

**Entwicklung und Optimierung von FIA-Biosensorsystemen zur
Bioprozeßüberwachung**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Chem. Jörg Hagedorn
geboren am 21.12.1966 in Gronau

Hannover im Oktober 1998

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: PD Dr. Bernd Hitzmann

Tag der Promotion: 10.12. 1998

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von Januar 1995 bis Oktober 1998 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper durchgeführt. Bei ihm möchte ich mich für die gebotenen Arbeitsmöglichkeiten und die fachliche Betreuung während dieser Zeit bedanken.

Herrn Dr. habil. Bernd Hitzmann danke ich für die Übernahme des Korreferats, sowie für seine Hilfsbereitschaft und Geduld bei der Lösung jeglicher CAFCA-Probleme.

Bei der Dr. Karl Thomae GmbH bedanke ich mich für die Bereitstellung zahlreicher Immunreagenzien und besonders bei den Mitarbeitern der Abteilung BTP für die freundliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit während meiner Aufenthalte in Biberach.

Ein großes Dankeschön geht weiterhin an Marco Rieseberg, Peter Sosnitza, Martin Kaduszkiewicz, Miriam Menge und Simona Becker die im Rahmen ihrer Diplom- bzw. Schwerpunktarbeiten konstruktiv zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Holger Lübben aus der Tierzellkulturtechnikgruppe bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und das prima Verständnis während und auch außerhalb der On line Messungen am Bioreaktor. Die Abende mit Dir, lieber Holger, waren zwar teuer aber witzig.

Bei Martina Weiß möchte ich mich für ihre stete Hilfsbereitschaft insbesondere bei der Anfertigung perfekter Grafiken bedanken.

Bei allen Mitarbeitern der Werkstätten bedanke ich für ihre Hilfe bei der Bewältigung zahlreicher Probleme mechanischer oder elektrischer Natur.

Am Ende und doch zu allererst möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung während der gesamten Studienzeit und das Erdulden aller meiner Launen bedanken. Ohne Eure Hilfe wär`s mit dem Doktor sicher nichts geworden.

Abstract

Hagedorn, Jörg

Entwicklung und Optimierung von FIA-Biosensorsystemen zur Bioprozeßüberwachung

Keywords: Fließinjektionsanalyse, Bioprozeßüberwachung, Immunoassay

Um das Potential der in biotechnologischen Prozessen eingesetzten Organismen optimal zu nutzen, sind aktuelle On line-Informationen über den jeweiligen Prozeßzustand unerlässlich. Dabei eröffnet der Einsatz von Biosensoren die Möglichkeit, komplexe Prozeßparameter mit hoher Selektivität und Sensivität zu erfassen. Die Anbindung der Sensoren erfolgt durch die Implementierung in Fließinjektionsanalysensysteme (FIA). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein für den industriellen Einsatz geeigneter, mehrkanaliger Prozeßanalysator auf Basis der FIA-Technik entwickelt und u.a. an einer Tierzellkultivierung zum Einsatz gebracht.

Weiterhin wurde der Einfluß der Temperatur und der Gelöstsauerstoffkonzentration der Probe auf die Meßsignale untersucht. Zur Minimierung durch Temperaturschwankungen bedingter Fehler wurden mathematische Modelle aufgestellt, mit dem Ziel, das Problem, statt mit einer aufwendigen Thermostatisierung, durch einen entsprechenden Algorithmus softwareseitig zu lösen. Der Einfluß des Sauerstoffgehalts wurde anhand verschiedener Experimente verdeutlicht und Lösungsvorschläge gemacht. Die Idee, im Laufe einer Messung am Bioprozeß deaktivierte Enzyme On line im FIA-System auszutauschen bildete die Grundlage für die vergleichenden Untersuchungen kovalenter und reversibler Immobilisierungstechniken im Anschluß daran.

Die Aminosäure L-Glutamin ist eine der Schlüsselkomponenten in Tierzellkultivierungen. Da die Analytik in der Regel Off line mittels HPLC erfolgt und somit keine aktuellen Informationen bzgl. Glutaminkonzentration zur Verfügung stehen, wurde ein On line FIA-System zur Bestimmung von Glutamin entwickelt. Weiterhin wurde eine Möglichkeit gefunden, die Analytik störendes Ammonium vorher aus dem System zu entfernen.

Im immunanalytischen Teil wurde ein bereits etablierter FIA-Immunoassay zur Prozeßüberwachung an einen Downstream-Prozeß gekoppelt. Auf Basis dieses Assays wurden zwei neue Immun-FIA Methoden mit enzymatischer bzw. fluorimetrischer Signalverstärkung zur Bestimmung von Proteinen entwickelt. Beide Systeme erwiesen sich als sehr sensitiv, der apparative Aufwand war allerdings sehr hoch.

Abstract

Hagedorn, Jörg

Development and Optimization of FIA Biosensorsystems for Bioprozessmonitoring

Keywords: Flow-injection-analysis, Bioprocesscontrol, Immunoassay

The optimal use of the potential of organism in biotechnical processes requires on line informations about the current state of the process. Biosensors permit the monitoring of complex parameters in a highly selective and sensitive manner. To interface the sensors to bioprocess they are integrated into flow-injection-analysis systems. In this work a multichanneling processanalyzer based on the principles of FIA technique and suitable for industrial purpose was developed and applied on the fermentation of mamalian cells.

Moreover the influence of temperature and oxygen concentration of the sample on the measuring signals was explored. Mathematical models were made up to minimize faults caused by deviation of temperature. The influence of oxygen concentration was illustrated by some experiments and different solutions of the problem were presented. The following chapter deals with covalent and reversible immobilization methods to change unusable enzymes on line during bioprocess.

L-glutamine is one of the key compounds in mamalian cell cultivations. Mostly the analysis occures off line by HPLC. For on line measurement of the aminoacid an adequat FIA system was set up. An additional possibility to avoid the disturbent influence of ammonia was found and integrated into the system.

In the immunochemical part of this work a known FIA-immunoassay was combined with a downstream-process. Based upon this assay two new immun-FIA systems with enzymatic and fluorimetric amplification for the determination of proteins were developed. Both assays showed a high sensitivity, however the set up was very complicated.

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....	1
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	4
2.1 Biosensoren.....	4
2.1.1 Funktionsweise.....	4
2.1.2 Einsatzbereiche	5
2.1.3 Biosensorsystem auf der Basis einer Gelöstsauerstoffelektrode in Verbindung mit immobilisierten Oxidasen.....	6
2.1.3.1 Amperometrische Sauerstoffelektrode.....	6
2.1.3.2 Enzyme.....	7
2.1.3.3 Immobilisierungstechniken	9
2.1.4 Fließinjektionsanalyse und FIA Biosensoren	12
2.2 Immunanalytik	14
2.2.1 Antikörper	15
2.2.2 Immunochemische Methoden.....	17
2.2.2.1 Methoden ohne Markierung.....	18
2.2.2.2 Methoden mit Markierung.....	19
2.2.2.3 Automatisierte FIA Immunoassays für die Bioprozeßkontrolle	23
3 ENTWICKLUNG EINES BIOPROZEß-ANALYSATORS	26
3.1 Aufbau.....	27
3.1.1 Auswahl der Gehäuse.....	27
3.1.2 Gehäuse 1 (Oberteil).....	28
3.1.3 Gehäuse 2 (Mittelteil)	29
3.1.3 Gehäuse 3 (Unterteil).....	30
3.1.4 Schlauchverbindungen.....	31
3.1.5 Steuerung des Analysenablaufs und Meßdatenerfassung.....	31
3.2 Abschlußbetrachtung und Überleitung	32

4 TEMPERATUR UND GELÖSTSAUERSTOFFGEHALT-EINFLUßGRÖßEN AUF FIA-SIGNALE	34
4.1 Einfluß der Temperatur	34
4.1.1 Entwicklung eines miniaturisierten Durchflußtemperatursensors	35
4.1.2 Voruntersuchungen mit immobilisierter GOD	35
4.1.3 Temperaturabhängigkeit der Kalibriergeraden für verschiedene Enzym/Substrat Systeme	39
4.1.3.1 Systemaufbau	39
4.1.3.2 Kalibriergeraden für verschiedene Enzym/Substrat Systeme	39
4.1.3.3 Untersuchte Modelle	41
4.1.3.4 Vorhersage auf verschiedene Temperaturen für alle Enzym/Substrat Systeme	41
4.1.3.5 Vergleich der Meßwerte mit und ohne Temperaturkompensation	43
4.2 Einfluß des Sauerstoffgehalts der Probe	44
4.3 Zusammenfassung	47
5 REVERSIBLE IMMOBILISIERUNGSMETHODEN	49
5.1 Reversible Kopplung an chelatisierender Sepharose/Con A	49
5.2 Reversible Kopplung auf chelatisierender Sepharose ohne Con A	51
5.3 Vergleich mit der Immobilisierung auf VA Epoxy	52
5.4 Zusammenfassung	53
6. ENTWICKLUNG EINES FIA-SYSTEMS ZUR GLUTAMIN BESTIMMUNG	55
6.1 FIA Aufbau und Meßprinzip	56
6.2 Optimierung des Systems	58
6.3 Qualität des Analysenverfahrens	61
6.3.1 Empfindlichkeit und Linearität der Kalibrierfunktion	61
6.3.2 Präzision und Richtigkeit	62

6.3.3 Langzeitstabilität	64
6.4 Erweitertes System mit Ammonium Entfernung.....	65
6.4.1 Systemaufbau und Funktionsweise	66
6.4.2 Konzentration des Citratpuffers und der Natronlauge	67
6.4.3 Messung von Glutaminstandards mit Ammoniumentfernung	68
6.4.4 Prozeßregelung am Beispiel einer simulierten Fermentation	70
6.4.5 On line Messung am Bioprozeß	73
6.5 Zusammenfassung.....	75
7 IMMUNANALYTIK	76
7.1 Der heterogene Elutionsassay.....	76
7.1.1 Funktionsweise und Systemaufbau	76
7.1.3 On line Überwachung eines Downstream-Prozesses.....	78
7.1.3.1 Aufbau und Versuchsdurchführung	78
7.1.3.2 Aufreinigung von r-AT III.....	79
7.1.3.3 Aufreinigung von rt-PA	81
7.1.3.4 Zusammenfassung.....	83
7.2 Immunoassay mit enzymatischer Verstärkungsreaktion	83
7.2.1 Vorversuche mit zwei Immunpartnern	83
7.2.2 Sandwich-ELISA -FIA zur Bestimmung von Antikörpern	86
7.2.2.1 Einfluß verschiedener Elutionsmittel	88
7.2.2.2 Einfluß der Reaktionszeit	90
7.2.2.3 Vergleich mit der bisherigen Methode	91
7.2.2.4. Zusammenfassung.....	91
7.3 Immunoassay mit OPA Derivatisierung	92
7.3.1 Systemaufbau	94
7.3.2 Charakterisierung und Optimierung der Analysenmethode.....	95
7.3.2.1 Einfluß des pH-Wertes des Elutionsmittels	96

7.3.2.2 Sensitivitätsvergleich zwischen den Methoden mit und ohne Derivatisierung	97
7.3.2.3 Einfluß der Reaktionszeit und der OPA Konzentration	98
7.3.2.4 Einfluß des Spülpuffers	99
7.3.2.5 Simulierte Fermentation	100
7.3.3 Zusammenfassung	102
8. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	103
9. ANHANG	107
10. LITERATURVERZEICHNIS	115

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Die Biotechnologie gehört zum Kernbereich der strategischen Technologien des 21. Jahrhunderts. Ihre Bedeutung als Schlüsseltechnologie wird uneingeschränkt mit der gegenwärtigen Bedeutung der Mikroelektronik und der Informationstechnik verglichen. Im Gegensatz zu diesen ist sie keine Entwicklung der Neuzeit, denn seit mehr als 8000 Jahren macht sich der Mensch die Stoffwechsellleistungen von Mikroorganismen zur Herstellung von Bier, Wein, Brot und Essig zunutze.

Der eigentliche Beginn biotechnologischer Forschung ist eng mit dem Namen Louis Pasteur verbunden. Er erkannte Mitte des 19. Jahrhunderts, daß Hefen für die alkoholische Gärung verantwortlich sind und das Bakterium *Acetobacter aceti* an der Umwandlung von Wein in Essig maßgeblich beteiligt ist. Pasteur führte auch den Begriff *Fermentation* für die anaerobe Umwandlung von Zucker in Alkohol ein. Nach einer Zeit der Stagnation kam die Weiterentwicklung mikrobieller Verfahren erst mit Beginn des ersten Weltkriegs wieder in Gang. Die fermentative Herstellung von Glycerin mit Hilfe von Hefepilzen sowie die Aceton-Butanol Gärung waren die ersten in großtechnischem Maßstab durchgeführten biotechnologischen Prozesse.

Der Brite Sir Alexander Flemming beobachtete 1928, daß eine vom Schimmelpilz *Penicillium notatum* gebildete Substanz hemmend auf das Wachstum von Bakterien wirkt. Diese Entdeckung war der Beginn des weltweiten Siegeszugs des Penicilins und legte den Grundstein für die biotechnologische Produktion von Antibiotika. Sie war das Vorbild für neue, ganz anders ausgerichtete Prozesse wie die Gewinnung von Waschmittelenzymen und Aminosäuren, die auf chemischen Weg nur schwer herstellbar waren.

Mit der Einführung der DNA-Rekombinationstechnik in den 70er Jahren trat die Biotechnologie in ein neues Stadium ein. Es war nun möglich, spezielle Teile der Erbsubstanz aus Lebewesen unterschiedlicher Herkunft neu zu kombinieren und in Bakterien oder Säugerzellen zu übertragen. Somit bestand die Möglichkeit, Mikroorganismen mit neuen Eigenschaften zu erzeugen.

Parallel dazu entwickelte sich die Tierzellkulturtechnik seit Beginn der 60er Jahre mehr und mehr zur Schlüsseltechnologie zur Produktion komplexer, therapeutisch relevanter Proteine, denn nur mit Hilfe der hochspezialisierten Syntheseapparate von Säugerzellen lassen sich posttranslationale Schritte wie die Glykosylierung realisieren.

Die Herstellung von Proteinen mit genetisch veränderten Mikroorganismen und Tierzellen steht heute im Mittelpunkt der biotechnologischen Forschung und Produktion. Die Tatsache, daß international mehr als 70% der Forschungsausgaben für den Pharmabereich aufgewendet werden, läßt erkennen, daß hier das gegenwärtig größte Entwicklungsfeld für biotechnologische Produkte gesehen wird und die größten Marktchancen zu erwarten sind. Zahlreiche mit gentechnisch veränderten Organismen hergestellte Therapeutika befinden sich bereits im Handel. Beispiele sind das Insulin, Faktor VIII zur Behandlung der Bluterkrankheit, Gewebefibrinolytika (t-PA) zur Herzinfarktbehandlung und der Tumor Nekrose Faktor (TNF) zur Krebstherapie.

Die Expansion des biotechnologischen Marktes wird neben der Entwicklung neuartiger Produkte besonders durch die Steigerung der Produktionsleistung bereits etablierter Verfahren vorangetrieben. Die Effizienz biotechnologischer Prozesse hängt davon ab, ob das biologische Potential der Organismen optimal genutzt werden kann. Dies macht geeignete Meßsysteme erforderlich, die eine ständige Beobachtung der chemischen und physikalischen Umgebung der Zellen ermöglichen. Die aufgenommenen Daten können zur Modellierung sowie zur Regelung des Prozesses verwendet werden. Die Meßtechnik nimmt daher eine wichtige Stellung in der Bioprozeßentwicklung und -optimierung ein.

Der Einsatz von Biosensoren eröffnet die Möglichkeit, komplexe Prozeßparameter mit hoher Selektivität und Sensitivität On line zu erfassen. Da In-situ-Biosensoren nicht sterilisierbar sind und sich während eines laufenden Prozesses nicht nachkalibrieren lassen, erfolgt ihre Anbindung an den Reaktor in der Regel über Fließinjektionsanalytensysteme (FIA). Auf diese Weise wird ein hoher Automatisierungsgrad erreicht und durch einen mehrkanaligen Aufbau läßt sich eine Multikomponentenanalytik verschiedener nieder- und hochmolekularer Metaboliten realisieren.

Die vorliegende Arbeit ist im Bereich „bioprocess-monitoring“ einzuordnen. Ein Schwerpunkt bildete die Planung und der Aufbau eines kompakten, industrietauglichen mehrkanaligen Bioprozeßanalytensystems auf der Basis der Fließinjektionsanalyse. Das System sollte übersichtlich im Aufbau, einfach bedienbar und flexibel hinsichtlich wechselnder analytischer Anforderungen sein. Die Grundlage des Analysators bildet eine in einer Durchflußkartusche ablaufende enzymatische Reaktion in Verbindung mit einer Sauerstoffelektrode als Detektor. Nach der Beschreibung der Anlage wird der

Einfluß der Temperatur und des Sauerstoffgehalts der Probe auf die Meßwerte erläutert und Lösungswege für die damit verbundenen Probleme aufgezeigt. Weiterhin werden anhand ausgewählter Beispiele die Vorteile reversibler gegenüber kovalenten Immobilisierungstechniken für Enzyme verdeutlicht.

Ein zweiter Schwerpunkt entstand durch die Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis „Tierzellkulturtechnik“ am TCI. Dort bestand Bedarf an einer On line Analytik zur Bestimmung von L-Glutamin, einer der Schlüsselkomponenten in Tierzellkultivierungen. Es wurde daher eine entsprechende FIA-Methode entwickelt, optimiert und abschließend an einer Fermentation von CHO Zellen zum Einsatz gebracht. Weiterhin ist neben der Konzentration niedermolekularer Metabolite wie Glucose, Lactat, Glutamin und Glutamat der aktuelle Produktgehalt im Medium von großem Interesse. Die Produktanalytik erfolgt in der Regel über immunchemische Off line Methoden wie dem ELISA Test. Dieser in Mikrotiterplatten durchgeführte Immunoassay ist sehr zeit-, arbeits- und kostenintensiv und eignet sich nicht zur On line Prozeßüberwachung. Aus diesem Grund wurden zwei automatisierte FIA-Immunoassays entwickelt, von denen einer einem in ein FIA-System integrierten ELISA Test entspricht. Der zweite Assay basiert auf den Prinzipien der Affinitätschromatographie, indem die Analytmoleküle an in einer Kartusche immobilisierte Antikörper gebundenen, eluiert, fluoreszenzmarkiert und anschließend detektiert werden.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Biosensoren

2.1.1 Funktionsweise

Das Prinzip des Biosensors wurde zum ersten Mal im Jahr 1962 von Clark beschrieben [CLARK, 1962] und seit den siebziger Jahren intensiv weiterentwickelt worden. Der Begriff „Biosensor“ zur Beschreibung einer enzymatisch modifizierten ionenselektiven Elektrode erschien erstmalig 1977 in der analytischen Literatur [CAMMANN, 1977]. Man versteht darunter ein Meßsystem, bei dem selektiv erkennende Biomoleküle (Rezeptor-Komponente) mit einem Signalwandler (Transducer) gekoppelt sind. Durch die Reaktion des Analyten mit der biologischen Komponente wird ein physikochemisches Signal erzeugt, das durch den Transducer in ein elektrisches Meßsignal umgewandelt, elektronisch verarbeitet und aufgezeichnet wird. Das Funktionsprinzip ist in Abbildung 2.1 verdeutlicht.

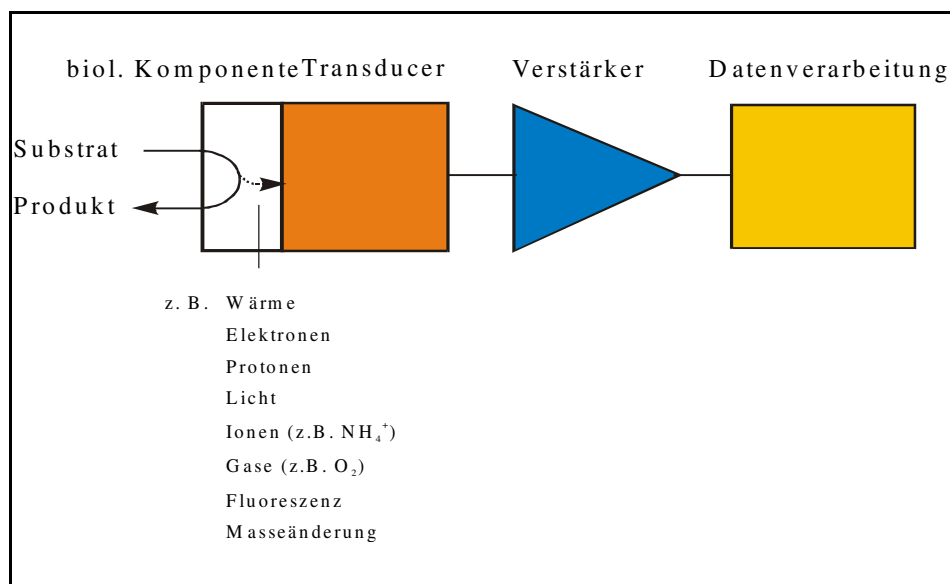


Abb. 2.1: Funktionsprinzip eines Biosensors [SCHEPER, 1991]

Als Biokomponente dienen vor allem Enzyme, Antikörper, Zellorganellen, Mikroorganismen, Rezeptoren oder Lektine. Als Transducer kommen am häufigsten potentiometrische, amperometrische und konduktive Elektroden, Thermistoren, Feldeffekttransistoren und Optoden zum Einsatz. Zwischen den einzelnen Komponenten sind verschiedene Kombinationen möglich, wobei der größte Teil aller beschriebenen Biosensoren aus der Kombination von Enzymen mit einer Elektrode resultiert. Dabei eignen sich Oxidoreduktasen vor allem für die Kopplung an amperometrische Trans-

duktionssysteme und Hydrolasen und Ligasen zur Kopplung an potentiometrische Elektroden.

Die Anforderungen, die an einen kommerziellen Biosensor gestellt werden, sind u.a. eine hohe Spezifität, eine große Stabilität unter Betriebsbedingungen (Temperatur, pH, Ionenstärke etc.), eine kurze Ansprechzeit sowie eine hohe Genauigkeit und gute Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse. Diese hohen Erwartungen besonders bzgl. der Stabilität der biologischen Komponente können von vielen Sensoren noch nicht erfüllt werden. Es besteht daher ein deutliches Mißverhältnis zwischen den zahlreichen im Forschungsbereich entwickelten und publizierten und den auf dem Markt erhältlichen Sensoren [CAMMANN, 1991; SCHELLER, 1991; KARUBE, 1993]. In Zukunft wird daher noch ein erheblicher Forschungsaufwand erforderlich sein, die genannten Wünsche der Anwender zu befriedigen [SCHEPER, 1994; SCHEPER, 1995].

2.1.2 Einsatzbereiche

Aufgrund der vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten von Biokomponenten und Transducertypen ergibt sich ein breites Feld für den Einsatz von Biosensoren. Im medizinischen Sektor können sie z.B. neben der Bestimmung von Glucose, Lactat und Harnstoff [HOME und ALBERTI, 1987] auch zur Messung von Kreatinin und Kreatin [SCHNEIDER, 1996; LAMMERS, 1996] sowie von Harnstoff [DANIELSON, 1988] und Cholesterin [DANIELSON, 1981] verwendet werden. Für den Umweltbereich wurden enzymatische Meßfühler zur Bestimmung zahlreicher Stoffe wie Phenol [KOTTE, 1991; KOTTE, 1995], Nitrat und Nitrit [STREHLITZ, 1994], Sulfit [FONONG, 1986], Phosphat [CONRATH, 1995] und Cyanid [GROOM, 1991] entwickelt. Auch über den Einsatz von Biosensoren in der Lebensmittel- und pharmazeutischen Industrie sind zahlreiche Publikationen erschienen [BERENQUER, 1989; SCHELLER, 1996; KIM, 1996; LUONG, 1991; SCHAERTEL, 1988; GEVORGYAN, 1997]. Am Schluß seien noch der militärische Bereich und der Pflanzenschutz als die klassischen Einsatzgebiete für Biosensoren genannt. Die für diese Zwecke entwickelten Sensoren dienen in den meisten Fällen der Detektion von Organophosphaten [PADDLE, 1997; KRAEMER, 1996; FENNOUH, 1997; SKLADAL, 1996]. Diese Substanzen kommen sowohl in Nervergasen (Tabun, Sarin) als auch in zahlreichen Insektiziden (Parathion „E605“, Dichlorvos, Bromophos), vor und hemmen die Aktivität der Acetylcholinesterase. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse

des Neurotransmitters Acetylcholin in Cholin und Essigsäure [BILITEWSKI, 1990]. Eine Hemmung durch Organophosphate führt zur Blockade der cholinergen Nervenimpulse, wodurch es zu Lähmungen und zum Tod durch Erstickten kommt [VOET, 1994].

Biosensoren haben in den letzten 15 Jahren auch in der Bioprozeßkontrolle zunehmend an Bedeutung gewonnen. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Selektivität ermöglichen sie die Bestimmung einzelner Analyte aus sehr komplexen und undefinierten Biomedien [SCHEPER, 1996]. In der Literatur ist eine Vielzahl von Biosensorsystemen zur On line Bestimmung unterschiedlicher Komponenten in Fermentationsmedien beschrieben. Eine gute Übersicht mit zahlreichen Literaturstellen wird bei [SCHEPER, 1991] gegeben.

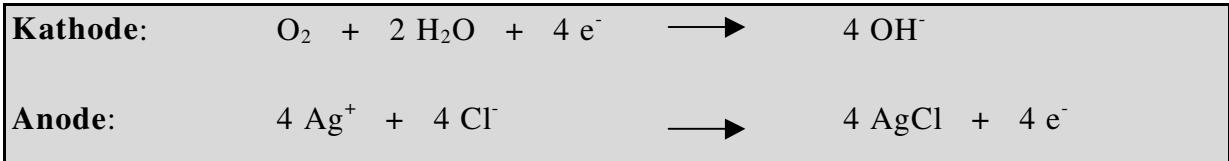
2.1.3 Biosensorsystem auf Basis einer Gelöstsauerstoffelektrode in Verbindung mit immobilisierten Oxidasen

In einem in dieser Arbeit eingesetzten Biosensorsystem werden verschiedene Oxidasen als biologische Komponenten in Verbindung mit einer amperometrischen Gelöstsauerstoffelektrode als Transducer verwendet. Die Enzyme befinden sich dabei nicht in direktem Kontakt mit dem Signalwandler, sondern sind in einer Durchflußkartusche vor der Elektrode immobilisiert. Die dazu notwendige Integration in ein Fließinjektionsanalysensystem (FIA) wird in Abschnitt 2.1.4 näher beschrieben.

2.1.3.1 Amperometrische Sauerstoffelektrode

Die verwendete Sauerstoffelektrode gehört zur Klasse der amperometrischen membranummantelten Elektroden und wurde erstmals 1959 von Clark [CLARK, 1959] beschrieben. Hinter einer 10-50 µm dicken Polytetrafluorethylen (Teflon)-membran mit hoher Sauerstoffdurchlässigkeit befindet sich eine 1 M KCl Lösung, in der ein von der Probe unabhängiger pH-Wert aufrecht erhalten wird. In die Elektrolytlösung taucht eine Platin-Kathode als Arbeitselektrode sowie eine Silber-Anode als Referenz. Der Sauerstoff diffundiert aus der Probe durch die Membran in den Elektrolyten und wird bei einem Arbeitselektrodenpotential von - 0,8 V reduziert. Bei diesem Potential erreicht die Strom-Spannungskurve ein Plateau, d.h. der Umsatz der Reaktion ist quantitativ und unabhängig von einer weiteren Spannungserhöhung. Die Reaktion läuft diffusionskontrolliert ab und der gemessene Strom ist proportional zum

Sauerstoffpartialdruck und somit zur Konzentration in der Probe. Die an den Elektroden ablaufenden Redoxreaktionen lauten wie folgt:



In dieser Arbeit wurde eine kommerziell erhältliche pO_2 -Elektrode der Firma Anasyscon verwendet. Es handelt sich dabei um eine Durchflußelektrode, die in eine Plexiglaszelle geschraubt wird. Das Meßkammervolumen ist sehr gering, so daß die Probe nicht durch Rückvermischung unnötig verdünnt wird.

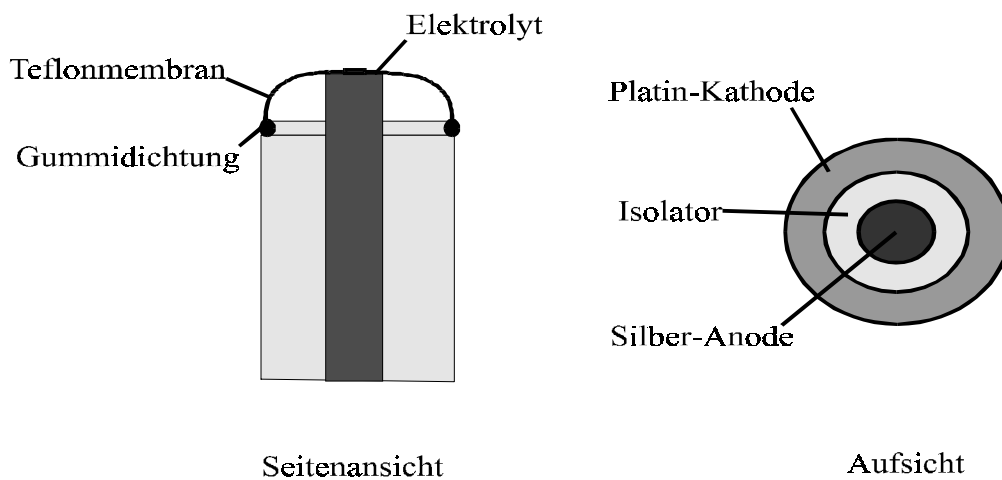


Abb. 2.2: Schematischer Aufbau der Anasyscon-Elektrode

2.1.3.2 Enzyme

Enzyme sind die katalytisch aktiven Einheiten in lebenden Organismen. Sie haben die Aufgabe, Stoffwechselreaktionen unter Herabsetzung der Aktivierungsenergie zu beschleunigen ohne dabei selbst umgesetzt zu werden. Aufgrund ihrer katalytischen Aktivität ist es möglich, Stoffwechselvorgänge unter milden physiologischen Bedingungen mit einer um das 10^8 - 10^{10} fach erhöhten Geschwindigkeit ablaufen zu lassen. Die meisten Enzyme sind globuläre Proteine mit relativen Molekülmassen zwischen 10 000 und 100 000 Dalton. Seit einigen Jahren sind aber auch katalytisch aktive RNA-Einheiten bekannt [KARLSON, 1984]. Enzyme besitzen eine ausgesprochene Substratspezifität, d.h. sie reagieren nur mit einem ganz bestimmten Intermediat des Stoffwechsels, während selbst strukturell nahe verwandte Substanzen nicht umgesetzt werden. Diese Selektivität ist jedoch bei den verschiedenen Enzymen unterschiedlich

stark ausgeprägt. Sehr viel stärker ausgebildet ist dagegen ihre Stereospezifität, d.h. sie setzen nur eines von zwei möglichen Isomeren um. Außerdem sind Enzyme wirkungsspezifisch, denn sie katalysieren nur eine von mehreren Reaktionen, die ein Stoff eingehen kann.

Für die katalytische Wirksamkeit ist das aktive Zentrum verantwortlich, das aus bestimmten Teilen der Polypeptidkette durch eine besondere Faltung entsteht. Durch die Wechselwirkung des aktiven Zentrums mit dem Substrat bildet sich ein Enzym-Substrat-Komplex. Dazu passen Enzym und Substrat entweder nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip zueinander oder aber das aktive Zentrum paßt sich durch eine Konformationsänderung der Substratstruktur an („induced fit“). Der Komplex reagiert dann zu den Produkten ab.

Neben dem eigentlichen Proteinanteil können auch noch Cofaktoren wie Nicotinamid-adenin-dinucleotid(phosphat) (NAD(P)^+) für die Funktionsfähigkeit eines Enzyms nötig sein. Sie werden auch als Coenzyme bezeichnet. Sind sie wie z.B. das Flavin-adenin-dinucleotid (FAD^+) kovalent an das Enzym gebunden, werden sie prosthetische Gruppen genannt. Coenzyme gehen verändert aus der enzymatischen Reaktion hervor. Sie sind als Cosubstrate anzusehen und müssen vor einem erneuten Einsatz regeneriert werden.

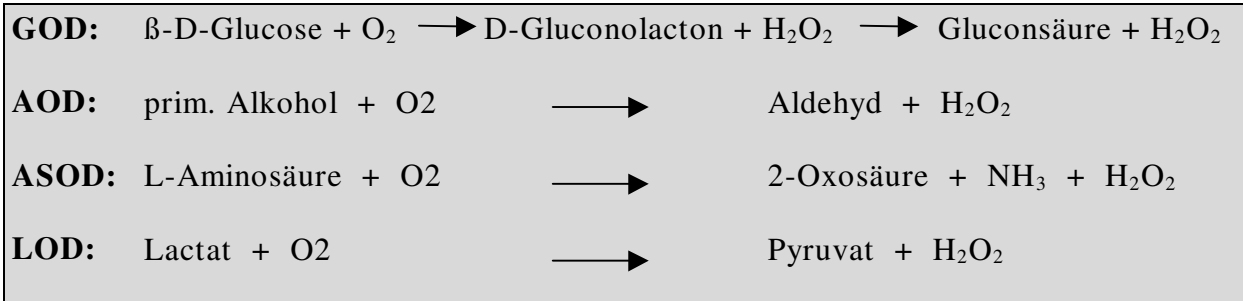
Man kann prinzipiell sechs Gruppen von Enzymen unterscheiden, die wiederum in verschiedene Untergruppen aufgeteilt sind:

1. Oxidoreduktasen (katalysieren Redoxreaktionen)
2. Transferasen (katalysieren die Übertragung verschiedener Gruppen)
3. Hydrolasen (katalysieren hydrolytische Reaktionen)
4. Lyasen (katalysieren nicht-hydrolytische Abspaltungsreaktionen)
5. Isomerasen (katalysieren Isomerisierungsreaktionen)
6. Ligasen (katalysieren Verknüpfungsreaktionen)

Die in dieser Arbeit in Verbindung mit der Sauerstoffelektrode verwendeten Enzyme Glucoseoxidase (GOD), Alkoholoxidase (AOD), L-Aminosäureoxidase (ASOD) und Lactatoxidase (LOD) katalysieren Redoxreaktionen und gehören somit zur Gruppe der Oxidoreduktasen. Da sie ihre Substrate unter Sauerstoffverbrauch umsetzen, werden sie auch als Oxidasen bezeichnet [DIXON, 1979]. Sie alle sind Flavoproteine, denn sie

bestehen aus einem Proteinmolekül und mehreren nicht proteinartigen prosthetischen FAD- bzw. FMN-Gruppen, die als Elektronenüberträger fungieren.

Die enzymatischen Umsetzungen verlaufen nach folgenden Reaktionsgleichungen:



2.1.3.3 Immobilisierungstechniken

Bei der Entwicklung eines Biosensors müssen Transducer und biologische Komponente in geeigneter Weise miteinander gekoppelt werden. Dazu wird die Biokomponente entweder direkt auf dem Transducer oder aber räumlich getrennt von diesem immobilisiert. Die mit einer Immobilisierung verbundenen Vorteile sind u. a. eine häufige Wiederverwendbarkeit sowie eine erhöhte Stabilität der Biokomponente z.B. gegenüber Temperatur- und pH Schwankungen. Nachteilig wirkt sich eine Immobilisierung häufig auf die Aktivität von Enzymen sowie auf die Ansprechzeit eines Biosensors durch den Aufbau von Transportbarrieren aus.

Die Literaturstellen [HARTMEIER, 1986; VELIKY, 1991; BARKER, 1987; MOSBACH, 1987] geben einen Überblick über die verschiedenen Immobilisierungstechniken. Die in dieser Arbeit angewendeten Methoden werden im Anschluß näher erläutert.

Kovalente Immobilisierung auf VA-Epoxy

VA-Epoxy Biosynth (Riedel de Haen, Hannover) ist ein perlförmiges poröses Trägermaterial, das in einer Suspensionspolymerisation aus Vinylacetat und N,N-Divinylethylenharnstoff hergestellt wird. Im Folgeschritt werden die Vinylacetatgruppen partiell oder vollständig zu Vinylalkoholgruppen hydrolysiert. Die Aktivierung des Trägers erfolgt durch die Umsetzung der Hydroxygruppen mit Epichlorhydrin oder 1,4-Butandioldiglycidether [BURG, 1987], was entweder zu langen (E12-Träger) oder kurzen (E3-Träger) Spacergruppen führt. Die Wahl des jeweiligen Trägers hängt von der Größe des zu immobilisierenden Enzyms ab. Die

reaktiven Gruppen sind in jedem Fall Epoxide, an die Amino-, Sulfhydryl-, Carboxyl-, phenolische Hydroxy-, Hydroxyl- und Imidazolgruppen der Enzyme binden können [MAUZ, 1992].

In dieser Arbeit wurde ausschließlich der E3-Träger von Riedel de Haen mit einer Partikelgröße von 125-200 μm verwendet. Zur Immobilisierung werden 200 mg Trägermaterial in 1 ml 1 M KPP Puffer (pH 6-8) in einer Kartusche aufgeschlämmt. Nach einer Reaktionszeit von 24-72 h in Abhängigkeit vom jeweiligen Enzym bzw. der benötigten Aktivität sind die Kartuschen im FIA-System einsetzbar.

Kovalente Immobilisierung auf CNBr-aktivierter Sepharose 4B

Sepharose ist ein Träger auf der Basis des Polysaccharids Agarose, das aus D-Galactose und 3,6 Anhydro-L-Galactose Einheiten aufgebaut ist [KARLSON, 1984]. Zur Erhöhung der Stabilität wird das natürliche Polymer mit Epichlorhydrin quervernetzt [HARTMEIER, 1986]. Die Aktivierung der zahlreichen OH-Gruppen erfolgt mit Cyanbromid, wobei außerordentlich reaktionsfreudige Imidocarbonate entstehen. Diese können mit den freien Aminogruppen der Biokomponente zu den gewünschten Immobilisaten reagieren.

In dieser Arbeit wurde Cyanbromid-aktivierte Sepharose 4B der Firma Sigma, Deisenhofen verwendet. Zur Immobilisierung werden 270 mg des Trägermaterials in 1 ml 0,1 M KPP Puffer 16-24 h mit dem jeweiligen Enzym oder Antikörper bei 4°C zur Reaktion gebracht. Nach Überführung des Immobilisates in eine Durchflußkartusche konnte diese im FIA-System eingesetzt werden.

Reversible Immobilisierung auf chelatisierender Sepharose

Das Trägermaterial Chelatisierende Sepharose Fast Flow von Pharmacia Biotech, Schweden besteht aus einer quervernetzten Sepharose Matrix, auf der sich über Etherbrücken an Spacer gebundene Iminodiacetatgruppen befinden [PHARMACIA PRODUKTINFO]. Diese negativ geladenen Gruppen haben die Fähigkeit, über ihre freien Elektronenpaare am Sauerstoff und am Stickstoff Metallkationen zu komplexieren [OLIN, 1995]. Die noch freien Koordinationsstellen am Metallkation können durch verschiedene Elektronenpaardonatoren wie beispielsweise H_2O , NH_3 oder Pufferionen besetzt sein. Die Immobilisierung der Proteine erfolgt über die Aminosäuren Cystein, Histidin und Tryptophan. Alle drei besitzen eine Thiol- oder Imidazolgruppe,

die die genannten Donormoleküle aus ihren Komplexen verdrängen können [COULET, 1981], wodurch es zu einer reversiblen Bindung der Proteine an die Trägeroberfläche kommt.

Die unterschiedlichen Affinitäten der Proteine zu Metallkationen sowie die Reversibilität der Bindung werden bereits seit langem in der Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) ausgenutzt [PORATH, 1975; PORATH, 1983; SULKOWSKI, 1985; KAGEDAHL, 1989]. Unter neutralen Bedingungen verläuft die Bindung fast ausschließlich über Histidin-Zentren und die Affinität eines Proteins zum aktivierten Träger ist proportional zur Anzahl dieser Zentren. Eine unspezifische Elution der gebundenen Proteine kann u.a. mittels EDTA und/oder 2M Salzsäure bei pH 1 erfolgen.

Reversible Immobilisierung auf Chelatisierender Sepharose/Con A

Concanavalin A, ein kohlenhydratfreies und erstmals 1972 von Summer aus *Canavalia ensiformis* (jack bean) isoliertes Lektin [SUMMER, 1919] ist aus identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von jeweils 25 500 Dalton aufgebaut [WANG, 1972]. Bei pH-Werten zwischen 5,5 und 9 bildet es Tetramere, bei niedrigeren pH-Werten liegt es als Dimer vor [KALB, 1968]. Con A eignet sich aufgrund seiner Eigenschaft, reversibel an mano(pyrano)sidische und glyco(pyrano)sidische Zuckerreste zu binden hervorragend zur Aufreinigung sowie zur Immobilisierung von Glycoproteinen [TREPANIER, 1976; SWALLOW, 1977]. Von den drei Bindungsstellen in jedem Monomer müssen zwei mit Mn^{2+} bzw. Ca^{2+} Ionen besetzt sein, um die Bindung eines Zuckerrestes an der dritten Position zu ermöglichen [BITTIGER, 1976]. Auf Con A immobilisierte Enzyme zeigen keinen Aktivitätsverlust [BISHAYEE, 1974; TAKAHASHI, 1974; BALASUBRAMANIAN, 1976], da die an der Bindung beteiligten Zuckerreste keine Rolle bzgl. der katalytische Funktion spielen [CHU, 1978; SHENOY, 1985]. Eine Elution der an Con A gebundenen Biomoleküle läßt sich mit konzentrierter Glucose- oder Mannoselösung sowie mit verdünnter HCl Lösung für stärker gebundenere Komponenten durchführen [SALEMUDIN, 1991].

Neben der Fähigkeit an Zuckerreste zu binden, zeigt Con A auch eine hohe Affinität gegenüber Metallionen. Besonders stark bindet es an die in der IMAC häufig verwendeten mit Cu(II)-Iminodiacetat Funktionen aktivierten Träger. [EL RASSI, 1986;

KATO, 1986; FIGUEROA, 1986]. Diese Fähigkeit ist auf die sechs in jeder Con A Untereinheit vorliegenden Histidin-Zentren zurückzuführen [EL RASSI, 1988]. Man erhält auf diese Weise ein stabiles Immobilisat aus chelatisierender Sepharose, Metallkationen, Con A und Glycoenzym. Die Elution der Enzyme mit oder ohne Con A kann durch die Wahl des geeigneten Elutionmittels beeinflusst werden.

2.1.4 Fließinjektionsanalyse und FIA-Biosensoren

Der Einsatz von In-situ-Biosensoren in Fermentern gestaltet sich sehr schwierig, da die Sensoren nicht sterilisiert werden können. Dies würde die Zerstörung der biologischen Komponente bedeuten. Weiterhin können In-situ-Biosensoren nicht nachkalibriert und erschöpfte biologische Komponenten nicht ausgetauscht werden. Um ihren Einsatz in der Bioprozeßkontrolle dennoch zu ermöglichen, werden sie in Fließinjektionsanalyssysteme (FIA) außerhalb des Bioreaktors integriert. Über ein Probennahmemodul wird dem Reaktor ein kontinuierlich fließender zellfreier Probenstrom steril entnommen, ein konstantes Probensegment daraus in das FIA-System injiziert und auf diese Weise dem Biosensor zugeführt.

Die Fließinjektionsanalyse wurde erstmals 1975 von Ruzicka und Hansen zur Automatisierung naßchemischer Verfahren vorgestellt [RUZICKA, 1975]. Ein einfach aufgebautes FIA-System (s. Abb. 2.3) besteht aus einer Peristaltikpumpe, einem Injektionsventil, einer Reaktionsstrecke (manifold) einem Detektor sowie einem Computer zur Datenaufnahme und Steuerung des Analysenablaufs.

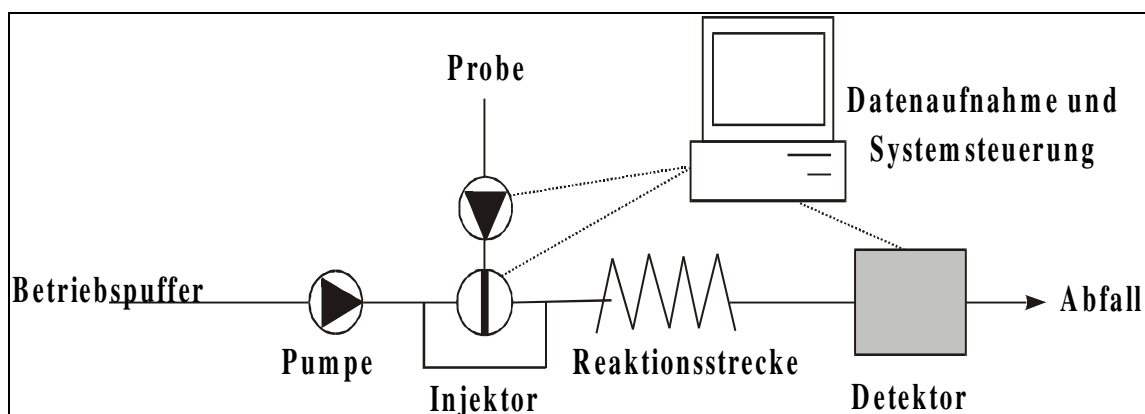


Abb. 2.3 Aufbau eines einfachen FIA-Systems

Über das Injektionsventil wird ein definiertes Probenvolumen in einen kontinuierlich fließenden Trägerstrom aufgegeben. Nach dem Erreichen des Manifold findet dort die Reaktion mit den dem Trägerstrom zugegebenen oder separat injizierten Reagenzien statt. Die Reaktionsprodukte werden anschließend im Detektor analysiert.

Während des Transports der Probe zum Detektionsort kommt es aufgrund von Dispersionprozessen zur Ausbildung eines axialen Konzentrationsprofils. Der ursprünglich aufgegebene Probenpfropf wird nicht als Rechtecksignal, sondern in Form eines Peaks registriert. Die Detektion kann bereits vor Erreichen des Gleichgewichts der Reaktion erfolgen, vorausgesetzt man arbeitet unter exakt reproduzierbaren Bedingungen (kontrollierte Dispersion) [DE LEONHULL, 1992] Die Fließinjektionsanalyse wird daher auch als dynamische Analysenmethode bezeichnet und besitzt zahlreiche Vorteile:

- Es werden nur sehr geringe Proben- und Reagenzienvolumina benötigt.
- Es ergeben sich lange Standzeiten, da die Belastung durch Proben und Reagenzien gering ist. Dies ist besonders beim Einsatz biologischer Komponenten wichtig.
- Die Meßfrequenz ist hoch, da kein stationärer Zustand abgewartet werden muß.
- Eine Probenkonditionierung (z. B. pH Wert Einstellung, Verdünnung) kann im FIA-System durchgeführt werden.

Eine ausführliche Beschreibung der FIA-Technik wird in dem Buch von Ruzicka und Hansen [RUZICKA, 1988], im Analytiker Taschenbuch [MÖLLER, 1988] sowie in zahlreichen Übersichtsartikeln [z.B. RUZICKA, 1986; RUZICKA, 1992] gegeben. Alle in dieser Arbeit vorgestellten Biosensoren sind in FIA-Systeme implementiert, wobei Biokomponente und Sensor nicht in direktem Kontakt stehen, sondern räumlich voneinander getrennt sind. Anstatt von einem Biosensor spricht man bei diesen Aufbauten inklusive Prozeßrechner besser von FIA-Biosensor-Systemen oder kurz Bio-FIA. Die verwendeten Enzyme oder Antikörper wurden in einer Durchflußkartusche auf einem festen Träger immobilisiert und die Kartusche vor den Detektor (pO₂-Elektrode, Fluorimeter, Photometer) in das Fließsystem integriert.

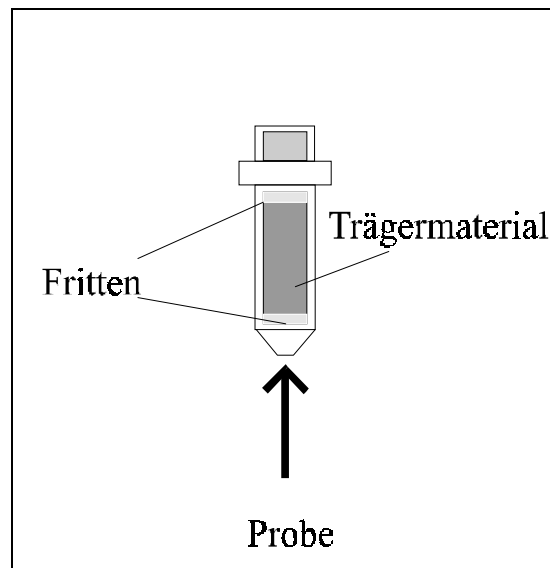


Abb. 2.4 Aufbau einer Enzymkartusche

Kartuschen sind in der Fließinjektionsanalytik häufig eingesetzte miniaturisierte Festbettreaktoren. Die verwendeten Kartuschen sind kommerziell erhältlich (Mobitec, Göttingen) und haben ein Volumen von 1 ml. Dies eignet sich für die Befüllung z.B. mit 200 mg VA-Epoxy Biosynth oder 300 mg Sepharose. Um ein Herausspülen des Trägers zu verhindern, befinden sich am Ein- und Ausgang jeweils kleine Filterfritten mit einem Porendurchmesser zwischen 35 und 90 μm .

2.2 Immunanalytik

Immunanalytische Methoden basieren auf der Detektion der Reaktion eines Antikörpers mit dem zugehörigen Antigen. Aufgrund der hohen Spezifität der gegen ein bestimmtes Zielmolekül gerichteten Antikörper hat die Bedeutung immunochemischer Verfahren in den letzten Jahren sehr stark zugenommen. Besonders im klinischen Bereich, in dem Proteine und Peptide aus so komplexen Matrices wie Blut und Urin bestimmt werden müssen, finden sie breite Anwendung.

2.2.1 Antikörper

Antikörper, die auch als Immunglobuline bezeichnet werden, sind Glycoproteine mit einem Kohlenhydratanteil von 2-14 % und einem Molekulargewicht von ca. 150 000 Dalton. Sie sind die Träger der humoralen Immunität (lat. *humor*, Flüssigkeit), die sich im Gegensatz zur zellulären Immunität vor allem gegen Bakterieninfektionen und die extrazelluläre Phase von Virusinfektionen richtet. Immunglobuline werden nach dem Eindringen eines Fremdkörpers (Antigen) von den aus B-Lymphozyten entstandenen Plasmazellen sezerniert. Alle Antikörper besitzen eine gemeinsame Grundstruktur aus vier Untereinheiten: zwei identische leichte L (light)-Ketten mit je 23 kD und zwei identische schwere H (heavy)-Ketten von 53-75 kD. Diese Untereinheiten lagern sich über Wasserstoffbrückenbindungen sowie Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten zusammen und bilden ein Y-förmiges Dimer. Jede Kette läßt sich in homologe Domänen mit jeweils 110 Aminosäuren unterteilen. Die beiden C-terminalen konstanten Domänen der schweren Ketten bilden den Fc Teil des Moleküls. Dieser ist für bestimmte biologische Funktionen wie Transport durch die Placentaschranke und Aktivierung des Komplementsystems verantwortlich. Die beiden „Arme“ des Antikörpers heißen Fab Bereiche und bestehen jeweils aus einer vollständigen L-Kette und dem N-terminalen Teil einer H-Kette. Die Antigenbindungsstellen werden aus den variablen Domänen der schweren und leichten Ketten gebildet und befinden sich an den Enden beider „Arme“, den hypervariablen Regionen des Immunglobulinmoleküls. Antikörper sind somit bivalent und können an zwei gleiche Epitope (bestimmte Region auf dem Antigen), die sich auf einem oder auf zwei verschiedenen Antigenen befinden, binden. Die einzelnen Abschnitte der Immunglobuline sind gegeneinander sehr beweglich, was sich besonders deutlich in der Gelenkregion, dem Polypeptidabschnitt, der die Fab Region mit dem Fc Segment verbindet, zeigt. Diese Flexibilität ermöglicht eine optimale Anpassung an die Antigenbindungsstelle und erleichtert somit die Bindung.

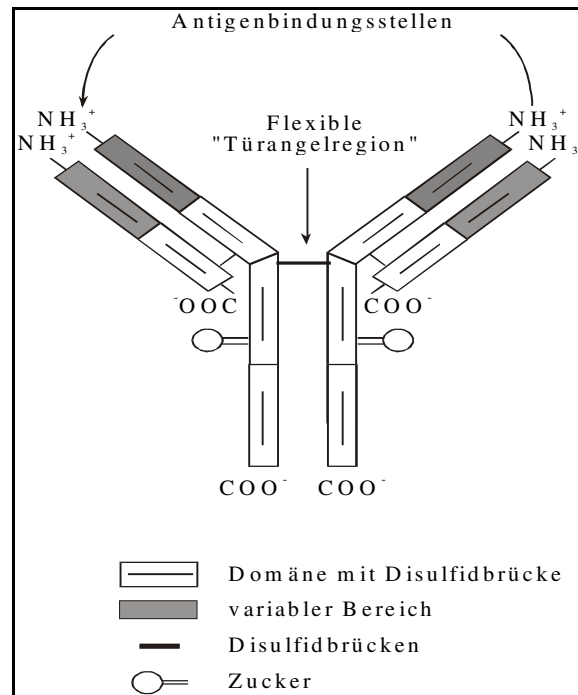


Abb.2.3 Struktur eines IgG

Bei den meisten höher entwickelten Säugetieren sind fünf verschiedene Klassen von Immunglobulinen bekannt, die mit IgA, IgM, IgD und IgG bezeichnet werden. Sie unterscheiden sich im Typ ihrer schweren Ketten, die in der selben Reihenfolge mit α , δ , ϵ , γ und μ benannt werden. IgD, IgE und IgG liegen nur als Dimere $(LH)_2$ vor, während IgM Pentamere der Dimere bildet. IgA findet man als Dimer und als Trimer. Die Dimer-Einheiten der Multimere sind über Disulfidbrücken miteinander gekoppelt. Die Immunglobuline der einzelnen Klassen besitzen verschiedene physiologische Funktionen. So findet sich IgM fast ausschließlich im Blut und ist besonders wirksam gegen eindringende Mikroorganismen. Es wird als erstes der Immunglobuline als Reaktion auf ein Antigen sezerniert. Seine Produktion beginnt 2-3 Tage nach dem ersten Antigenkontakt. IgG ist mit einem Anteil von 70-75 % das am häufigsten vertretene Immunglobulin. Es ist zwischen Blut und interstitieller Flüssigkeit gleichmäßig verteilt und seine Produktion beginnt 2-3 Tage nach dem ersten Auftreten von IgM.

Die Bildung des Antikörper-Antigen-Komplexes ist eine Gleichgewichtsreaktion an der Wasserstoffbrückenbindungen, van der Waals Kräfte, Coulomb'sche sowie hydrophobe Wechselwirkungen beteiligt sind [VAN OSS, 1986]. Die Bindung ist reversibel und erfolgt entweder nach dem Schlüssel-Schloß Prinzip [AMIT, 1986]

oder unter Konformationsänderungen von Antigen und Antikörper [COLMAN, 1987]. Die Bindungskonstanten liegen zwischen 10^5 und 10^{11} l/mol [SCHOEMAKER, 1984]. Man unterscheidet zwischen polyklonalen und monoklonalen Antikörpern. Führt man einem Organismus ein Antigen zu, so beginnen die an verschiedene Epitope bindenden Lymphozyten unterschiedliche nur gegen ihr spezifisches Epitop gerichtete Antikörper zu bilden. Aufgrund der Vielzahl der Epitope entsteht so ein Gemisch aus unzähligen polyklonalen Antikörpern. Köhler und Milstein gelang 1975 zum ersten Mal die Fusion von antikörperproduzierenden Maus-Lymphozyten und Maus-Blutkrebszellen (Myelomzellen) [KÖHLER, 1975]. Die so entstandene hybride Zellform besaß sowohl die Fähigkeit zur Antikörperbildung als auch zum unendlichen krebsartigen Wachstum. Mit einem solchen Zellklon war es nun möglich, große Mengen eines einheitlichen monoklonalen Antikörpers in Zellkulturen zu produzieren. Monoklonale Antikörper sind in der biochemischen Forschung seitdem zu einem unentbehrlichen Werkzeug geworden.

2.2.2 Immunchemische Methoden

Immunchemische Methoden lassen sich unter verschiedenen Aspekten klassifizieren. So wird zwischen Methoden ohne und mit Markierung unterschieden. Bei den zuerst genannten werden die gebildeten Immunkomplexe z.B. durch Trübungsmessungen direkt detektiert, während in den Immunoassays mit Markierung ein Immunpartner vor der Detektion an radioaktive Isotope, Enzyme oder Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt wird. Eine weitere Unterteilung kann in homogene Assays mit direkter Bestimmung der Immunkomplexe aus der Lösung und heterogene Assays unter Verwendung einer festen Phase zur Abtrennung der Immunkomplexe vor der Messung erfolgen. Zuletzt lassen sich noch kompetitive von nicht kompetitiven Methoden unterscheiden. Im kompetitiven Fall konkurrieren Probenantigene und eine definierte Menge zugesetzter markierter Antigene um eine begrenzte Anzahl an Antikörpern. In einem nicht kompetitiven Immunoassay sind die Antikörper im Überschuß vorhanden und alle zugesetzten Antigene werden gebunden.

Eine ausführlicher Überblick über die bekanntesten Methoden wird u.a. bei [SCHÜGERL, 1991; MASSEYEFF, 1993] sowie in einem Review von Hage [HAGE, 1995] gegeben.

Im Anschluß werden die wichtigsten immunanalytischen Methoden kurz beschrieben und am Ende auf automatisierte FIA-Immunoassays speziell im Bereich der Bioprozeßanalytik eingegangen.

2.2.2.1 Methoden ohne Markierung

Streulichtmethoden

Die Prinzipien der Immunnephelometrie und -turbidimetrie basieren auf der Messung der physikalischen Phänomene der Lichtstreuung bzw. Lichtabsorption in Verbindung mit der quantitativen Immunpräzipitation in homogener Phase [JOHNSON, 1987]. In der Nephelometrie wird die maximale Lichtstreuung in einem bestimmten Winkel gemessen, in der Turbidimetrie bestimmt man die Intensitätsabnahme des Durchlichtes - die Trübung. Die Grundlage beider Methoden bildet die von Heidelberger und Kendall beschriebene Präzipitationskurve [HEIDELBERGER, 1935], die das Trübungsverhalten in Abhängigkeit vom Antigen/Antikörper-Verhältnis beschreibt. Danach arbeitet man im Antikörperüberschußbereich, da dort ein linearer Zusammenhang zwischen Antigenkonzentration und Trübung besteht. Aufgrund der geringen Intensität des Streulichtes werden in der Nephelometrie Laser zur Einstrahlung verwendet, [SIEBER, 1975] während zur Messung des Durchlichtes in der Turbidimetrie ein Photometer den Anforderungen genügt.

Eine Senkung der Nachweisgrenze läßt sich durch die Bindung einer oder beider Immunpartner an größere Teilchen wie Erythrocyten oder Latexpartikel erreichen [GRESSNER, 1990; WILMS, 1980]. Als Reagenzien werden latexgebundene Antikörper und an Polymere gekoppelte Antigene verwendet. Die Probenantigene konkurrieren mit den polymergebundenen Antigenen um die Antikörper. Je niedriger die Antigenkonzentration der Probe, desto höher ist die Zahl der gebildeten lichtstreuenden Präzipitate. Der Nachweis von Haptenen (niedermolekulare Nichtproteine), die aufgrund ihrer Monovalenz keine Präzipitate bilden, kann mittels eines Latexinhibitionsassays erfolgen [CRAINE, 1987]. Das Meßsignal sinkt mit steigender Antigenkonzentration aufgrund einer verminderten Präzipitatbildung.

Die Vorteile der vorgestellten Methoden sind u.a. der Wegfall aufwendiger Probenvorbereitungs- und Separationsschritte, die kurze Analysendauer sowie die gute

Automatisierbarkeit der Verfahren. Ein Nachteil ist eine gegenüber den Immunoassays mit Markierung deutlich erhöhte Nachweisgrenze.

2.2.2.2 Methoden mit Markierung

Radioimmunoassays

Immunoassays mit Markierung sind aufgrund ihrer hohen Sensitivität im Nanogramm- bis Picogramm-pro-Milliliter Bereich gegenüber denjenigen ohne Markierung sehr viel weiter verbreitet. Die Entwicklung derartiger Methoden begann 1959 mit dem ersten von Yalow und Berson vorgestellten Radioimmunoassay zur Bestimmung von Seruminsulin [YALOW, 1959]. Aufgrund einer Reihe von Nachteilen wie Instabilität der Reagenzien, Umweltbelastung und hoher Kosten geht die Tendenz allerdings zunehmend in Richtung anderer Marker wie Enzymen und Fluoreszenzfarbstoffen. Dennoch finden die Radioimmunoassays aufgrund ihrer niedrigen Nachweisgrenze besonders in klinischen Laboratorien noch sehr häufig Anwendung.

Beim klassischen Radioimmunoassay (RIA) konkurrieren radioaktiv markierte mit in der Probe vorhandenen Antigenen um eine begrenzte Anzahl Antikörper. Je höher die Antigenkonzentration in der Probe, desto größer ist der Anteil an ungebundenen markierten Antigenen in der Lösung. Sie kann nach Abtrennung der Immunkomplexe bestimmt werden. Bei einer anderen Variante - dem kompetitiven Immunoradiometric Assay (IRMA) - konkurrieren an einer Trägeroberfläche adsorbierte Antigene mit den Probenantigenen um eine begrenzte Anzahl markierter Antikörper in der Lösung. Einen guten Überblick über die Entwicklung verschiedener Radioimmunoassays liefern Najjar und Weintraub [NAJJAR, 1993].

Enzymimmunoassays

In einem Enzymimmunoassays (EIA) wird die Antigen-Antikörperreaktion über die Detektion einer enzymatischen Umsetzung verfolgt. Die Verwendung von Enzymen als immunchemische Marker anstatt radioaktiver Isotope wurde erstmals 1971 von Avrameas und Guilbert beschrieben [AVRAMEAS, 1971]. Seitdem sind zahlreiche Enzymimmunoassays entwickelt worden. Die unzähligen Varianten lassen sich in die zwei Haupttypen, der heterogenen und der homogenen Assays einteilen.

Die starke Zunahme enzymatisch verstärkter immunchemischer Methoden ist auf eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Techniken zurückzuführen wie u.a.:

- hohe Sensitivität, die durch die Verwendung von Chemilumineszenzsubstraten die in RIAs erreichbaren Nachweisgrenzen noch unterschreiten kann
- Verwendung relativ kostengünstiger, ungefährlicher und über einen langen Zeitraum stabiler Reagenzien
- gute Automatisierungsmöglichkeiten

Alle heterogenen EIAs beinhalten einen Separationschritt, in dem die Immunkomplexe vor der Enzymreaktion abgetrennt werden. Das Konzept wurde erstmals 1968 von Miles und Hales [MILES, 1968] als mögliche Alternative zum RIA vorgeschlagen. Neben alkalischer Phosphatase, β -Galactosidase und Glucoseoxidase ist Meerrettichperoxidase (HRP) aufgrund seiner einfachen Konjugation an Proteine [Nakane, 1974] das am häufigsten verwendete Markerenzym.

Der bekannteste nichtkompetitive heterogene EIA ist der two-site- oder Sandwich-ELISA (enzyme-linked-immunosorbent assay). Dazu werden Mikrotiterplatten mit im Überschuß auf Agarose-, Polyacrylamid- oder Polystyrolträgern immobilisierten Antikörpern verwendet. Nach der Probenaufgabe und Inkubation erfolgt ein Waschschritt gefolgt von der Zugabe und Inkubation eines zweiten enzymgelabelten Antikörpers. Nach erneutem Waschen wird das Substrat der enzymatischen Reaktion zugegeben und die Reaktionsprodukte photometrisch, fluorimetrisch oder anhand ihrer Chemilumineszenz detektiert. Störungen die aufgrund von unspezifischer Adsorption an die Trägeroberfläche auftreten, können durch die Zugabe nichtionischer Detergenzien wie Tween 20 in Verbindung mit einem Protein wie BSA vermieden werden [VOLLER, 1979].

Der Sandwich-ELISA eignet sich nur zur Bestimmung bi- bzw. multivalenter Antigene, da diese an zwei Antikörper binden müssen. Die Bestimmung monovalenter Antigene wie Haptene wird in kompetitiven Tests durchgeführt. Dabei konkurrieren Probenhaptene und markierte Haptene um die Antikörperbindungsplätze. Die gemessene Enzymaktivität ist umgekehrt proportional der Analytkonzentration.

Der erste homogene EIA wurde 1972 von Rubenstein zur Bestimmung von Drogen entwickelt [RUBENSTEIN, 1972]. Homogene EIAs sind in den meisten Fällen kompetitiv und basieren auf der Beeinflussung der Enzymreaktion durch die Bildung der Immunkomplexe. Im EMIT (enzyme-multiplied-immunoassay technique)

verwendet man z.B. mit Glucose-6-phosphat-dehydrogenase gelabelte Antigene. Durch die Antikörperbindung erfährt das Enzym eine sterisch Hinderung, wodurch seine Aktivität abnimmt. Solche activity-modulation assays eignen sich besonders gut für kleine Antigene und finden daher häufig in klinischen Labors zur Bestimmung von Drogen und Hormonen sowie im Bereich des drug monitoring Anwendung [ERNST, 1987]. Weitere homogene EIAs werden von Schügerl [SCHÜGERL, 1991] und Nakamura [NAKAMURA, 1992] ausführlich beschrieben.

Fluoreszenzimmunoassays (FIA)

Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zur Markierung von Antikörpern wurde zum ersten Mal 1941 von Coons und seinen Mitarbeitern vorgestellt [COONS, 1941]. Der am häufigsten eingesetzte Marker ist FITC (Fluorescein-iso-thiocyanat), das sich durch eine gute Langzeitstabilität, eine hohe Lichtausbeute, angemessene Excitations- und Emissionswellenlängen sowie durch seine Eigenschaft, die Immunreaktion nicht zu beeinflussen, auszeichnet [NAKAMURA, 1984]. Ein Nachteil sind jedoch seine hydrophoben Eigenschaften. Einige FIAs erreichen mittlerweile die Sensitivität eines RIA, so daß bestimmte Analyte in einer Konzentration von 10^{-15} mol/l bestimmt werden können. Ein die Sensitivität häufig negativ beeinflussendes Phänomen ist die starke Hintergrundfluoreszenz biologischer Medien. Blutserum enthält beispielsweise Bilirubin und Proteine, die beide eine natürliche Eigenfluoreszenz zeigen.

Fluoreszenzimmunoassays lassen sich ähnlich wie die Enzymimmunoassays in homogene und heterogene Assays unterteilen. Bei den heterogenen gibt es kompetitive und nichtkompetitive Methoden, während bei den homogenen Assays nur die kompetitive Variante gebräuchlich ist.

Die Techniken der heterogenen Enzymimmunoassays lassen sich auf die entsprechenden Fluoreszenzimmunassays übertragen [HEMMILA, 1985]. Nachdem die Probenantigene mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden, folgt die Abtrennung mittels immobilisierter Antikörper. Nach der anschließenden Elution werden die Antigene detektiert. Bei der kompetitiven Variante konkurrieren Probe und markiertes Antigen um die im Unterschluß immobilisierten Antikörper. Nach Ablösung der Antigene wird die Fluoreszenz gemessen. Weisen die verwendeten Analyten eine zur Detektion ausreichende Eigenfluoreszenz auf, kann auf eine Markierung verzichtet werden.

Bei den homogenen Fluoreszenzimmunassays unterscheidet man zwischen quenching assays und enhancement assays. Bei den erstgenannten kommt es zu einer durch die Immunreaktion bedingten Verringerung der Fluoreszenz, bei den letzteren zu einer Fluoreszenzverstärkung. Ein Beispiel für einen homogenen Fluoreszenzimmunassay ist der Fluoreszenzenergietransfer-Immunoassay (FETIA) [Morrison, 1988]. Man verwendet dazu ein Donor/Akzeptorpaar, bestehend aus zwei verschiedenen Fluorophoren wie beispielsweise FITC und TMRITC (Fluorescein-iso-thiocyanat und Tetramethyl-rhodamin-iso-thiocyanat). Das bei der Anregung von FITC emittierte Licht kann von TMRITC absorbiert werden, da Emission- und Absorptionsmaxima der Moleküle nahe beieinander liegen. Als Folge der Absorption emittiert TMRITC seinerseits wieder Licht einer bestimmten Wellenlänge. Gemessen wird entweder die Intensitätsabnahme des von FITC emittierten oder die Intensitätszunahme des von TMRITC abgestrahlten Lichtes. Der FETIA ist ein kompetitiver Assay und es kommt nur im Fall einer Reaktion der Antikörper mit einem markiertem Antigen zum Energietransfer.

Eine weitere häufig angewandte immunochemische Nachweismethode ist der Fluoreszenzpolarisationsimmunassay (FPIA), der sich von den bisher vorgestellten Fluoreszenzimmunassays grundlegend unterscheidet. Man nutzt dabei das Polarisationsverhalten fluoreszierender Moleküle in Abhängigkeit von ihrer Rotationsgeschwindigkeit [HÄNSLER, 1986]. Regt man freie nur an Fluorescein gekoppelte Antigene mit polarisiertem Licht an, so depolarisieren sie dieses praktisch vollständig; das emittierte Fluoreszenzlicht ist unpolarisiert. Sind die markierten Antigene jedoch an Antikörper gebunden, so ist ihre Rotation und somit auch die Depolarisationsrate stark eingeschränkt. Das anregende und emittierte Licht sind annähernd gleich polarisiert. Anhand des Polarisationsgrades läßt sich auf die Konzentration der Probe schließen. Fluoreszenzpolarisationsimmunassays sind kompetitive Assays, d.h. ein hoher Polarisationsgrad bedeutet eine große Anzahl an Antikörper gebundener markierter Antigene und somit einen niedrigen Antigengehalt in der Probe. Um deutliche Veränderungen der Depolarisationsrate messen zu können, sollten die zu bestimmenden Antigene nicht größer als 20 000 Dalton sein [DEGRELLA, 1988], wodurch sich die Methode primär für klinische Untersuchungen eignet. Von der Firma Abbot Laboratories ist ein kommerzieller nach dem FPIA Prinzip arbeitender Multianalyser auf dem Markt [POPELKA, 1981], mit dem u.a. Digoxin in Serum

bis zu einer unteren Konzentration von 0,2 ng/ml bestimmt werden konnte [TAGGART, 1980].

2.2.2.3 Automatisierte FIA-Immunoassays für die Bioprozeßkontrolle

FIA-Immunoassays (FIIA) verbinden die hohe Spezifität der Antikörper-Antigenreaktion mit der Schnelligkeit, der hohen Präzision und der einfachen Automatisierbarkeit der Fließinjektionsanalytik. Sie eignen sich daher hervorragend zur schnellen und kontinuierlichen On line Bestimmung hochmolekularer Komponenten aus Bioprocessen. Aufgrund der kontrollierten Dispersion der Probe kann die Messung schon vor dem Erreichen des Gleichgewichts erfolgen, was besonders für die Detektion der sehr langsamen Immunreaktion eine deutliche Verkürzung der Analysenzeit bedeutet. Die meisten FIIAs sind in Anlehnung an bekannte Off line Methoden entwickelt worden, wobei die heterogenen gegenüber den homogenen Assays deutlich überwiegen. Die heterogenen Assays sind sensitiver, weniger empfindlich gegen Störsubstanzen, flexibler bzgl. verschiedener Marker und kostengünstiger aufgrund der Wiederverwendbarkeit der Reagenzien.

Nilsson et. al. beschreiben einen kompetitiven Flow-ELISA zur Bestimmung von HSA (Human Serum Albumin), in dem die Antigene an in einer Durchflußkartusche immobilisierte Antikörper binden [NILSSON, 1992]. Die nach dem Separationsschritt zugegebenen Meerrettichperoxidase-HSA Konjugate binden an die noch freien Antikörper. Nach einem Waschschrift erfolgt die Zugabe der Substrate (Phenol, 4-Aminoantipyrin, H_2O_2) und die photometrische Bestimmung der Enzymaktivität. Die Regenerierung des Trägers wird mit 0,1M Glycin/HCl Lösung durchgeführt.

Ein von Nilsson et. al. entwickelter Flow-ELISA zur Detektion von Human-IgG erlaubt die Bestimmung einer Probe innerhalb von 6-10 Minuten [NILSSON, 1991]. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist mit einem relativen Fehler von 1,5% deutlich niedriger als in herkömmlichen Off line ELISA Tests.

Der von Gebbert entwickelte FIIA arbeitet nach dem Prinzip eines kompetitiven fluorimetrischen Sandwich ELISA [GEBBERT, 1994]. Zur Bestimmung von Maus-IgG wurden β -Galactosidase gelabelte Anti-Maus-IgG als Sekundärantikörper verwendet. Das Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galactopyranosid wird enzymatisch in ein fluoreszierendes Produkt umgesetzt und bei 360 (Exc.) bzw. 450 nm (Em.)

detektiert. Im stopped-flow Modus dauert eine Messung 11 Minuten. Der Meßbereich liegt zwischen 1 und 1000 µg/ml und der relative Fehler bei max. 5%. Die Produktion monoklonaler Antikörper während der Kultivierung muriner Hybridomazellen konnte mit dem System On line überwacht werden.

In dem von Freitag entwickelten heterogenen Fluoreszenzassay wird eine definierte Menge mit Fluorescein-iso-thiocyanat markierter Antigene zusammen mit der Probe injiziert [FREITAG, 1990; DEGELAU, 1992]. Diese konkurrieren um eine limitierte Anzahl immobilisierter Antikörper in einer Durchflußkartusche. Nach einem Waschschritt werden die Antigene eluiert und die Fluoreszenz gemessen. Mit diesem System konnte die Aktivität des thermostabilen Enzyms Pullunase im Bereich von 100-1000 U/l bestimmt werden. Ein Meßzyklus dauerte 20-25 Minuten, wobei ca. 80 Bestimmungen ohne erkennbare Aktivitätsverlust durchgeführt werden konnten.

Ein nichtkompetitiver heterogener FIA-Immunoassay wird von Reinecke, Bayer und Schulze beschrieben [REINECKE, 1993; BAYER, 1994; SCHULZE, 1994]. Die in einer Kartusche im Überschuß immobilisierten Antikörper binden die aufgegebenen Probenantigene quantitativ. Die Detektion der eluierten Antigene erfolgt anhand ihrer natürlichen Eigenfluoreszenz. Mit der Methode konnten rt-PA, AT III sowie ein Maus-IgG aus komplexen Tierzellkultivierungsmedien in Konzentrationen zwischen 1-1000 mg/l bestimmt werden. Das System ist in Kapitel 7 näher beschrieben.

Häufig werden auch in FIA-Systeme integrierte kalorimetrische Sensoren zur Detektion der Immunreaktion eingesetzt. Mit Enzymthermistoren läßt sich die Wärmetönung der mit einer Immunreaktion verbundenen enzymatischen Umsetzung messen. In einem von Brandes beschriebenen TELISA (thermometric enzyme linked immunosorbent assay) ist Protein A in einer vor dem Thermistor befindlichen Kartusche immobilisiert [BRANDES, 1993]. Ein Fusionsprotein aus Protein A und β -Galactose bindet über den Protein A Teil an den separierten Antikörper. Nach der Injektion des Substrates Lactose wird dieses in Glucose und Galactose gespalten. Die Glucose kann im Enzymthermistor mit einem Glucoseoxidase/Katalase Coimmobilisat nachgewiesen werden. Mit dem TELISA konnten polyklonale Kaninchen-IgG nachgewiesen werden. Eine Weiterentwicklung dieses Systems ist bei [LAMMERS, 1994] beschrieben.

Abschließend seien noch die turbidimetrischen FIA-Immunoassays genannt. Sie arbeiten in der Regel im stopped-flow Modus, um eine für die Präzipitatbildung

ausreichende Reaktionszeit zu gewährleisten. Ein TIA (turbidimetrischer Immunoassay) ist relativ einfach in der Durchführung und die Meßfrequenz ist hoch (1-5 Minuten pro Analyse). Trotz ihrer geringen Sensitivität mit einer unteren Nachweisgrenze von 1 mg/l eignen sich TIAs gut zur Proteinbestimmung aus Kultivierungsüberständen, die in der Regel einen Titer von 1-500 mg/l aufweisen. Ein deutlicher Nachteil sind die hohen durch den Antikörperverbrauch bedingten Kosten. Mit einem von Freitag [FREITAG, 1991] beschriebenen TIA konnten AT III Konzentrationen zwischen 1-50 mg/l Off- und On line an einer simulierten Fermentation bestimmt werden. Die Präzision war mit einem relativen Fehler von 2,1% sehr gut und die Zykluszeit mit 2,5 Minuten sehr kurz. Weiterhin konnte die Pullunaseaktivität an einer Kultivierung von *C. thermosulfurogenes* über einen Zeitraum von 240 Stunden gemessen werden. Weitere, dem von Freitag sehr ähnliche Assays werden von Schulze und Middendorf zur Bestimmung von rt-PA sowie eines Maus IgG vorgestellt [SCHULZE, 1994; MIDDENDORF, 1993].

Die Anzahl an Veröffentlichungen über FIA-Immunoassays in der Bioprozeßkontrolle hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Daher konnten nur einige Beispiele stichprobenartig ausgewählt und vorgestellt werden. Einen ausführlicheren Überblick über den Stand der Technik geben die Übersichtsartikel von Puchades [PUCHADES, 1992; PUCHADES, 1996].

3 ENTWICKLUNG EINES BIOPROZESSANALYSATORS

Der Schlüssel zur effizienten Nutzung eines biotechnologischen Verfahrens liegt in der Kontrolle und Regelung des Prozesses. Dies erfordert eine schnelle direkt an den Bioprozeß gekoppelte Analytik, mit der parallel mehrere Prozeßparameter möglichst On line bestimmt werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein kompaktes Analysensystem auf der Basis der Fließinjektionsanalyse entwickelt, welches sich zur direkten Bestimmung verschiedener Schlüsselkomponenten aus komplexen Biomedien eignet. Zielsetzung war es, den in der Industrie gültigen Anforderungen an entsprechende Analysatoren gerecht zu werden. So verlangt der Einsatz in Technikums- oder Produktionshallen beispielsweise die Anpassung eines Analysensystems an die oftmals rauen Umgebungsbedingungen. Die Analytik beeinflussende bzw. sogar gefährdende Faktoren können u.a. Temperaturschwankungen sowie das Eindringen von Spritzwasser und Schmutz in die Anlage sein. Diese Störungen müssen kompensiert bzw. von vornherein ausgeschlossen werden. Ein weitere Forderung ist eine möglichst hohe Vielseitigkeit und Flexibilität des Systems bzgl. verschiedener analytischer Aufgaben. Die genannten Aspekte standen im Mittelpunkt der Planung und wurden in Form eines modularen Aufbaus sowie der Integration aller empfindlichen Komponenten in Schutzgehäuse realisiert.

Ein weiteres für die Akzeptanz seitens der Industrie entscheidendes Merkmal eines Analysensystems ist sein Automatisierungsgrad. Dieses Kriterium wird durch den Einsatz der FIA-Technik erfüllt. Die zugehörigen Komponenten wie Selektoren, Injektoren und Pumpen werden automatisch über einen PC nach einer vorab gewählten Methode angesteuert. Der Bediener kann sich somit nach der Programmierung des Systems anderen Aufgaben widmen. Da die Datenaufnahme, -speicherung und -auswertung ebenfalls voll automatisch erfolgen, ist die Anlage als stand-alone Version auch außerhalb der üblichen Arbeitszeiten einsetzbar. Dem Wunsch nach möglichst hoher Benutzerfreundlichkeit wurde durch einen einfachen, sehr übersichtlichen Aufbau sowie einer leicht zu bedienenden Software Rechnung getragen.

Als letztes Kriterium wurde noch die Möglichkeit des multi-channel-monitoring, d.h. die simultane Überwachung verschiedener Parameter im Verlauf eines Bioprozesses

berücksichtigt. Der Analysator beinhaltet aus diesem Grund drei unabhängig voneinander arbeitende FIA-Kanäle unter Verwendung der von der Anasyscon GmbH, Hannover vertriebenen BioCart Einschübe. Mit dieser Konfiguration ist z.B. eine enzymatische Bestimmung dreier niedermolekularer Schlüsselkomponenten wie Glucose, Lactat und Ethanol gleichzeitig möglich. Durch geringfügige Modifikationen wie durch den Austausch des Detektors kann die Anlage auch für andere analytische Methoden wie die Immunanalytik hochmolekularer Produkte genutzt werden.

3.1 Aufbau

Auf der folgenden Seite ist eine Skizze des Prozeßanalysators zu sehen.. An dieser Stelle sollen die einzelnen Komponenten des Analysators näher beschrieben und deren Funktionsweise erläutert werden.

3.1.1 Auswahl der Gehäuse

Aufgrund der geforderten Flexibilität der Anlage wurde ein dreiteiliger Aufbau realisiert. Die einzelnen Gehäuse sind in 19“ Bauweise gefertigt und über Stehbolzen miteinander verbunden. Dies ermöglicht eine einfache Neukombination und einen leichten Austausch der Racks sowie der darin integrierten Komponenten. Zum Schutz gegen äußere Einflüsse wurde für die Gehäuse die in der Industrie gängige Schutzart IP 54 gewählt. Sie gewährleistet Schutz gegen Staubablagerungen sowie gegen das Eindringen von Spritzwasser. Trotz aller Schutzmaßnahmen muß das System für Eingriffe in die laufende Analytik sowie für Reparatur- und Wartungsmaßnahmen jederzeit zugänglich sein. Aus diesem Grund sind die Gehäuse mit gedichteten Profiltüren aus Stahl auf der Rückseite bzw. aus Glas auf der Vorderseite ausgestattet. Letztere ermöglichen die Kontrolle der Analytik auch bei geschlossenen Türen. Um trotz der Größe und des nicht unerheblichen Gewichts des Prozeßgerätes eine hinreichende Mobilität - beispielsweise beim Wechsel zwischen verschiedenen Fermentern - zu erhalten, wurden an das untere Gehäuse Rollen montiert.

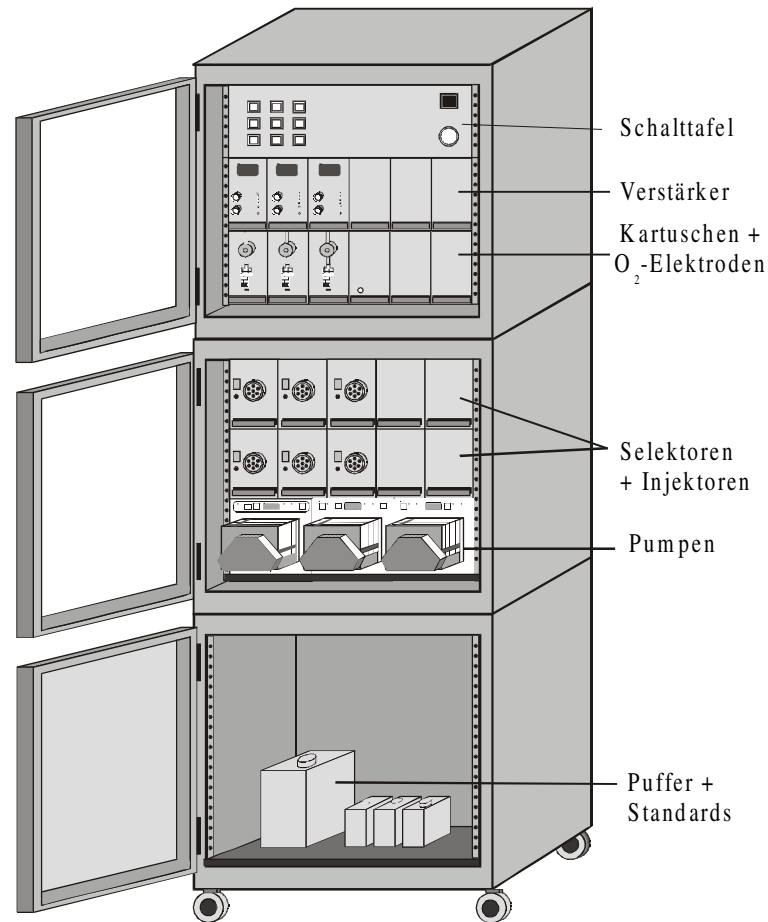


Abb. 3.1 Aufbau des Prozeßanalysators

3.1.2 Gehäuse 1 (Oberteil)

BioCart-System

Das Herzstück des Prozeßanalysators bildet das Biocart-System der Firma Anasyscon. Es ist im oberen Gehäuse integriert und setzt sich zusammen aus einem Detektor-Verstärker-Meßkanaleinschub mit einer Sauerstoffelektrode sowie einer Enzymkartusche. Die verwendete Sauerstoffelektrode ist in Abschnitt 2.1.3.1 bereits näher beschrieben worden. Durch ihre Miniaturisierung läßt sie sich einfach und platzsparend über eine Steckverbindung in den BioCart Einschub integrieren. Das Auswechseln einer defekten oder mit einer neuen Membran zu belegenden Elektrode gestaltet sich daher sehr einfach. Auch die Enzymkartusche ist einfach in einer Halterung auf der Vorderseite des Biocart Einschubs zu befestigen. Ein Methodenwechsel z.B. von Glucose auf Lactat kann problemlos und schnell durch den Austausch der Kartusche erfolgen.

Detektor-Meßkanaleinschub

Der Detektor-Meßkanaleinschub bildet die Basis des BioCart-Systems, denn auf ihm befinden sich alle analytisch wichtigen Hardwarekomponenten wie Sauerstoffelektrode, Meßverstärker mit Bereichsstufung sowie Bedien- und Anzeigenelemente. Der Meßkanaleinschub ist in 19“-Technik gefertigt und in ein extra Modulgehäuse innerhalb des eigentlichen Racks integriert. Der elektrische Anschluß erfolgt über einen 64 poligen Leiterplattensteckverbinder. Das Lösen und Wiederherstellen von Kabelverbindungen entfällt daher und gestattet somit einen schnellen und unkomplizierten Austausch sowie die Ergänzung weiterer Einschübe. Auf der Rückwand des Modulgehäuses befindet sich für jeden Meßkanaleinschub ein 10 Volt Ausgang, über den die Adaption an entsprechende Auswertprogramme erfolgt.

Neben den bisher beschriebenen Bauteilen befindet sich noch eine Schalttafel im oberen Gehäuse. Über sie lassen sich die einzelnen FIA Linien bestehend aus BioCart, Selektor, Injektor sowie Pumpe separat ein- und ausschalten.

3.1.3 Gehäuse 2 (Mittelteil)

Im mittleren Gehäuse des Prozeßanalysators befinden sich die Basiskomponenten eines jeden Fließinjektionssystems, wie Pumpen, Injektionsventile und Selektoren. Alle Ventile sind über ihre Frontplatten an vier Punkten mit dem 19“ Baugruppenträger verschraubt. Die Pumpen hingegen sind nicht fest installiert sondern stehen auf einem ausziehbaren Boden, was ihre Bedienung und Wartung erleichtert.

Injektor

Injektoren dienen zum Einbringen eines definierten Probenvolumens in den Trägerstrom. Bei den verwendeten Injektoren handelt es sich um 6-Port-Ventile mit Probenschleife der Firma Knauer, Berlin. Durch die auf einer drehbaren Scheibe eingefräßten Kanäle sind jeweils zwei Ports miteinander verbunden, wobei zwei verschiedenen Positionen möglich sind. In der „load“ Stellung wird die Probenschleife mit Probe oder Standardlösung gefüllt, der Trägerstrom fließt im Bypass vorbei zur Kartusche. In der „inject“ Position hingegen durchfließt der Trägerstrom die Schleife und transportiert das Probensegment zur Kartusche, während der Probenstrom direkt in den Abfall geleitet wird.

Die Injektionsventile sind auf einen elektrischen Antrieb montiert, der den automatischen Wechsel zwischen den Positionen übernimmt. Der Antrieb besitzt drei Fernsteuerausgänge sowie eine RS-232 Schnittstelle über die die externe Ansteuerung der Ventile mit einem PC erfolgen kann.

Selektor

Selektoren dienen zum Wechseln zwischen verschiedenen Standardlösungen bzw. Proben. Die eingesetzten 7-Port Schaltventile (Knauer) haben sechs Eingänge und einen Ausgang. Ein auf einer drehbaren Scheibe eingefräßter Kanal verbindet den Ausgang immer mit einem der Eingänge, so daß daraus insgesamt sechs mögliche Positionen resultieren. Wie die Injektions- sind auch die Schaltventile auf einen elektrischen extern ansteuerbaren Antrieb montiert, so daß manuelle Eingriffe während des Betriebes nicht erforderlich sind. Die einzelnen Ventilstellungen lassen sich nicht beliebig ansteuern, sondern nur in aufsteigender Reihenfolge schalten (1-2-3-4-5-6) oder aber von einer beliebigen Stellung nach Position 1 zurück (reset).

Pumpe

Zum pulsationsarmen Transport von Trägerpuffer sowie Standards und Probe werden peristaltische Pumpen (Accu, Anasyscon) eingesetzt. Sie sind in Abhängigkeit vom verwendeten Pumpkopf mit bis zu acht Kanälen ausgestattet und erreichen je nach Schlauchgröße eine Förderrate von maximal 700 ml/min. Die Pumpen sind extern ansteuerbar, so daß das Ein- und Ausschalten sowie die Veränderung der Förderrate über einen PC möglich ist.

Weitere Module

Neben den beschriebenen Komponenten ist im mittleren Gehäuse noch Raum zur Platzierung diverser On line Konditionierungs- bzw. Mischmodule, einer Rührkammer oder einer Luftblasenfalle. Im Laufe dieser Arbeit wurde mehrfach ein Multifold-Modul (Anasyscon) eingesetzt, in dem zwei T-Stücke, ein variables Dispersionscoil und eine Luftblasenfalle miteinander kombiniert sind. Je nach Applikation können alle oder aber auch nur einzelne Möglichkeiten genutzt werden.

3.1.3 Gehäuse 3 (Unterteil)

Im unteren Teil des Prozeßanalysators werden die benötigten Puffer- und Standardlösungen untergebracht. Der Raum ist so bemessen, daß er insgesamt drei 10 Liter-Kanister mit Puffer sowie zehn 0,5 Liter-Standardflaschen faßt. Die Volumina wurden

so ausgelegt, daß der Betrieb des Analysators über mehrere Tage (z.B. übers Wochenende) ohne ein Auffüllen der Gefäße möglich ist. Bei einer Standardpumprate des Trägerpuffers von 2ml/min reichen zehn Liter für ca. 83 Stunden.

3.1.4 Schlauchverbindungen

Die Verbindung zwischen den einzelnen FIA-Komponenten erfolgt über Teflonschläuche mit einem Innendurchmesser von 0,8 mm. Um die Anlage übersichtlicher zu gestalten werden die Schläuche an den Gehäuseinnenwänden entlang geführt. Die einzelnen Gehäuse sind über Bohrungen miteinander verbunden.

Probe bzw. Standards werden mit der gleichen Pumpe transportiert wie der Trägerpuffer. Dies ist möglich, da die unterschiedlichen Flußraten beider Ströme über die Wahl verschiedener Pumpschläuche eingestellt werden können.

3.1.5 Steuerung des Analysenablaufs und Meßdatenerfassung

Der Einsatz von Computern ermöglicht nicht nur die Automation der Steuerung und Auswertung von FIA-Signalen, sondern eröffnet auch Wege für neue Auswerteverfahren unterschiedliche Nachbearbeitungen sowie anwenderspezifische Ergebnisdarstellungen [HITZMANN, 1996]. Außerdem kann er bei einer Störfallerkennung wirksame Unterstützung leisten [BRAND, 1993; BRAND, 1994]. Zur Automatisierung von beliebigen Fließsystemen wurde am Institut für Technische Chemie das Softwarepaket CAFCA (Computer Assisted Flow Control & Analysis) entwickelt und in Kooperation mit der Firma Anasyscon zur Marktreife geführt. Die Software ist ein wichtiger Baustein im Gesamtkonzept des entwickelten Analysensystems, denn durch die Anbindung des Prozeßanalysators an einen PC wird die Idee von einem vollautomatisierten, On line fähigen stand-alone Analysensystems letztendlich erst Realität.

CAFCA läuft auf Computern ab Typ 386 unter MS-DOS und unterstützt kommerzielle Interfacekarten, die zur A/D-Wandlung, zur Steuerung mit digitalen IO-Signalen (TTL-Impulsen) oder zur Steuerung mit Relais (potentialfreie Schaltung) dienen. Ferner ist eine Steuerung über serielle Schnittstellen möglich. CAFCA stellt bis zu acht Kanäle zur Datenaufnahme, Visualisierung und On line Auswertung zur Verfügung. Mit einem Meßkanal können dabei alternierend maximal drei verschiedene Substanzen gemessen und die jeweiligen Konzentrationen On line ausgegeben werden. Die spezielle Auswertung eines jeden Meßkanals ist frei wählbar und kann

beispielsweise nach Peakhöhe (Kanal 1), Integral (Kanal 2) und Steigung (Kanal 3) erfolgen. CAFCA übernimmt ferner die Steuerung des gesamten Analysenablaufs von der Kalibration bis zur Ausgabe der Ergebnisse sowie die Koordination aller am analytischen Aufbau beteiligten Hardwarekomponenten wie Pumpen, Ventile etc.

Die mit CAFCA aufgenommenen Prozeßdaten können entweder programmintern direkt zur Regelung verwendet werden oder aber auch über eine serielle Schnittstelle weitergeleitet werden. Dies bietet die Möglichkeit der Integration des Prozeßanalysators in ein Prozeßleitsystem.

3.2 Abschlußbetrachtung und Überleitung

Mit der Fertigstellung des beschriebenen Analysators ist es gelungen, ein vollautomatisiertes den Anforderungen der Industrie entsprechendes Analysensystem zu schaffen, welches sich zur Überwachung und Regelung von Bioprozessen eignet. Im Anhang ist der Einsatz des Prozeßanalysators an einem 5 l Laborreaktor während der Kultivierung von Säugerzellen am Institut für Technische Chemie gezeigt.

Am Ende dieses Kapitels sei noch einmal darauf hingewiesen, daß das ursprüngliche Konzept des Prozeßanalysators stark auf die enzymatische Bestimmung von niedermolekularen Metaboliten mittels amperometrischer Sauerstoffdetektion zugeschnitten war. Das System bietet jedoch ein hohes Maß an Flexibilität bzgl. wechselnder analytischer Anforderungen, was auch im Verlauf dieser Arbeit genutzt wurde. So konnte durch den Austausch des BioCart Meßkanaleinschubes gegen ein Durchflußphotometer und den Einbau einer Dialysezelle beispielsweise ein FIA-System zur Bestimmung von Glutamin entwickelt werden (s. Kapitel 6). Auch die zahlreichen immunanalytischen Untersuchungen (s. Kapitel 7) können mit einem zusätzlichen Prozeßfluorimeters sowie einer Antikörperkartusche mit dem Analysator durchgeführt werden. Ein miniaturisierter Fluoreszenzdetektor zum Einbau in die 19“ Einschübe befand sich während der Anfertigung dieser Arbeit noch in der Entwicklung, ist mittlerweile jedoch kommerziell erhältlich.

Unerwünschte Probleme können durch Schwankungen der Umgebungstemperatur während der laufenden Analytik hervorgerufen werden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit, des Bedienkomforts und des apparativen Aufwandes wurde auf eine Thermostatisierungsmöglichkeit der Kartuschen und Elektroden verzichtet. Um

dennoch zuverlässige Ergebnisse bei wechselnden Temperaturen zu erzielen, sollte versucht werden, mit Hilfe eines Temperaturfühlers sowie eines mathematischen Modells eine Kompensation der Schwankungen softwareseitig zu erreichen.

Weiterhin kann eine von der des Trägerstrom abweichende Sauerstoffkonzentration im Kultivierungsmedium zu falschen Meßergebnissen führen. Der Einfluß verschiedener Sauerstoffkonzentrationen sollte untersucht, die resultierenden Fehler bestimmt und Lösungsansätze aufgezeigt werden.

4 TEMPERATUR UND GELÖBSTSAUERSTOFFGEHALT-EINFLUßGRÖßEN AUF FIA-SIGNALE

4.1 Einfluß der Temperatur

Mit steigender Temperatur durchläuft die Enzymaktivität ein Maximum, wobei oftmals die Enantioselektivität abnimmt. Dieses Maximum entsteht, da die Aktivität zunächst mit der Temperatur zunimmt, die Proteindenaturierung ab einer kritischen Temperatur aber so stark ist, daß die Aktivität insgesamt drastisch abnimmt.

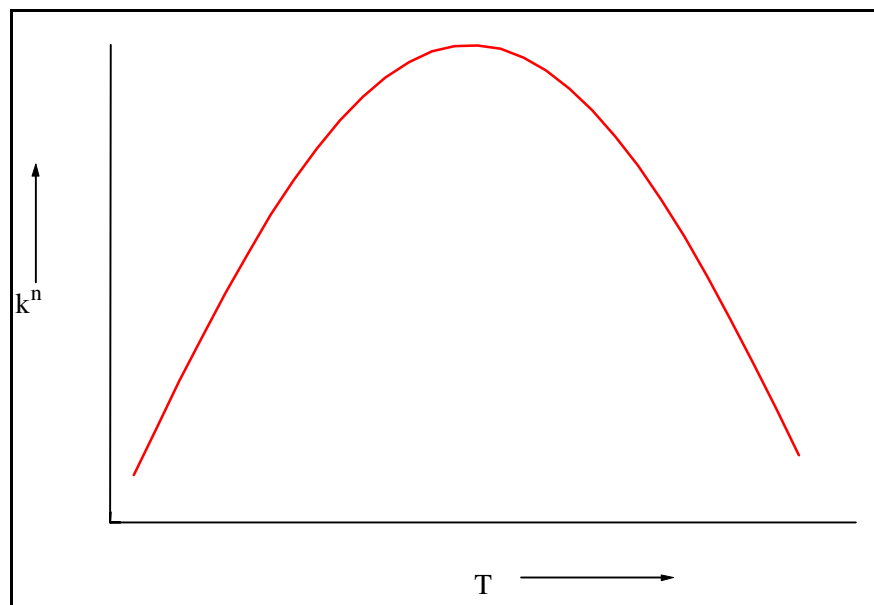


Abb. 4.1 Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität

Die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k_n wird durch die Arrhenius-Gleichung beschrieben:

$$k_n = k_0 * e^{-E_a/RT}$$

Da mit Hilfe des Arrhenius-Ansatzes Geschwindigkeitskonstanten bei verschiedenen Temperaturen berechnet werden können, eignet er sich zur Anpassung der Kalibrierfunktion an sich verändernde Umgebungstemperaturen.

4.1.1 Entwicklung eines miniaturisierten Durchflußtemperatursensors

Zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Reaktion im FIA-System ist es erforderlich, die Temperatur des Betriebspuffers in unmittelbarer Umgebung der Enzymkartusche kontinuierlich zu messen. Es wurde daher ein Sensor konstruiert, der direkt hinter der Kartusche ins FIA-System integriert werden kann. Ausgehend von einem kommerziell erhältlichen Uhren/Temperatur-Modul der Firma RS Components wurde der darin befindliche interne Thermistor herausgetrennt und extern in einen Metallkopf eingesetzt, welcher vom Betriebspuffer durchflossen wird. Der Temperatursensor erfaßt die Temperatur mit einer Auflösung von $0,1^{\circ}\text{C}$ bei einer Meßfrequenz von 1 Hz. Die Übertragung der aufgenommenen Werte an einen PC ist über eine RS-232-Schnittstelle möglich.

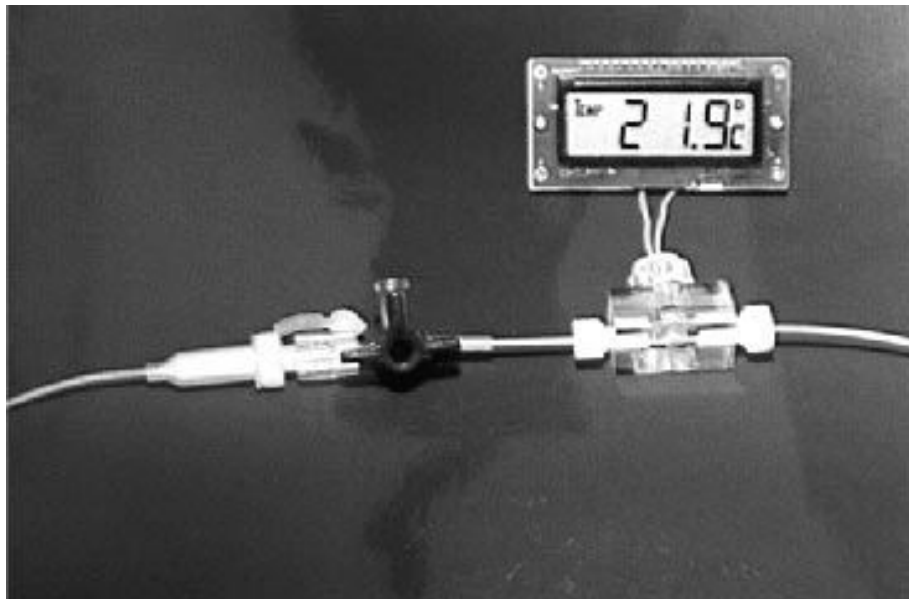


Abb. 4.2 Durchflußtemperaturfühler

4.1.2 Voruntersuchungen mit immobilisierter GOD

Zunächst sollte die Tauglichkeit des entwickelten Sensors getestet sowie die grundlegende Möglichkeit einer mathematischen Kompensation von Temperatureffekten überprüft werden. Dazu wurden in Voruntersuchungen mit dem BioCart-System und immobilisierter Glucoseoxidase in zwei voneinander unabhängigen Meßreihen Kalibriergeraden bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen. Zum Zweck der Thermostatisierung befand sich sowohl die Kartusche als auch der Pufferbehälter in einem Wasserbad. Eine Meßreihe wurde zur Berechnung des

Kalibrationsmodells verwendet, die andere diente zur Validierung. Um die Veränderung der Signale mit steigender Temperatur zu veranschaulichen, sind in der folgenden Abbildung exemplarisch drei bei gleicher Konzentration jedoch unterschiedlicher Temperatur aufgenommene Peaks dargestellt.

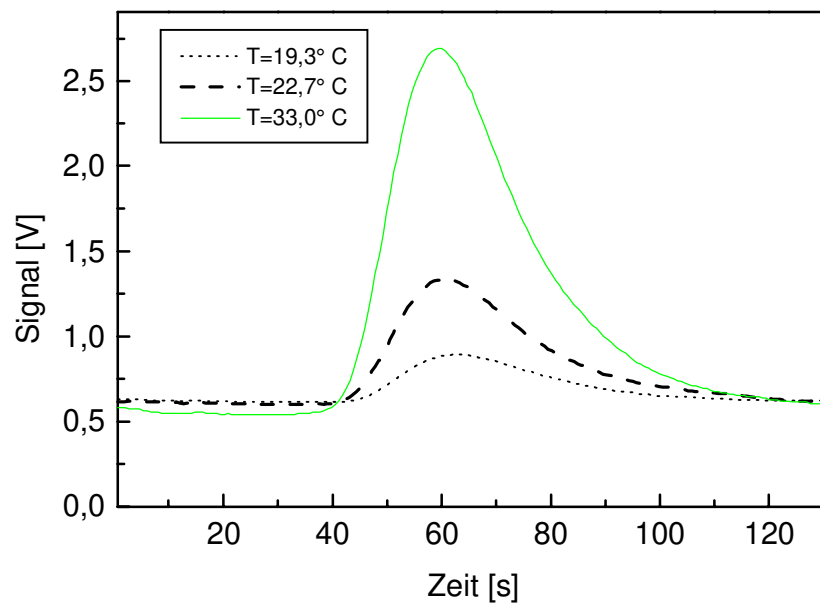
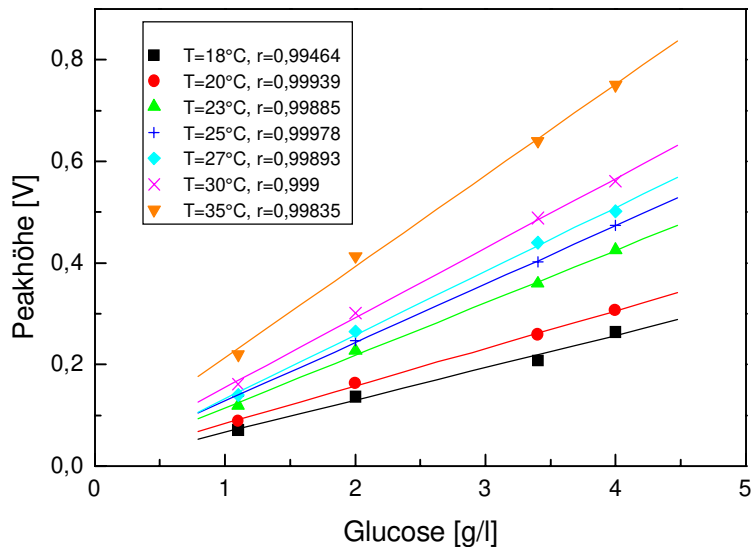


Abb. 4.3 Temperatureinfluß auf die Meßsignale

Meßbedingungen: Anasyscon BioCart-FIA mit HS-GOD Kartusche, Trägerstrom: 40 mM KPP-Puffer, pH 6,75; Volumenstrom = 2 ml/min; Probenvolumen = 35 μ l, $c_{\text{Glucose}}=9$ g/l

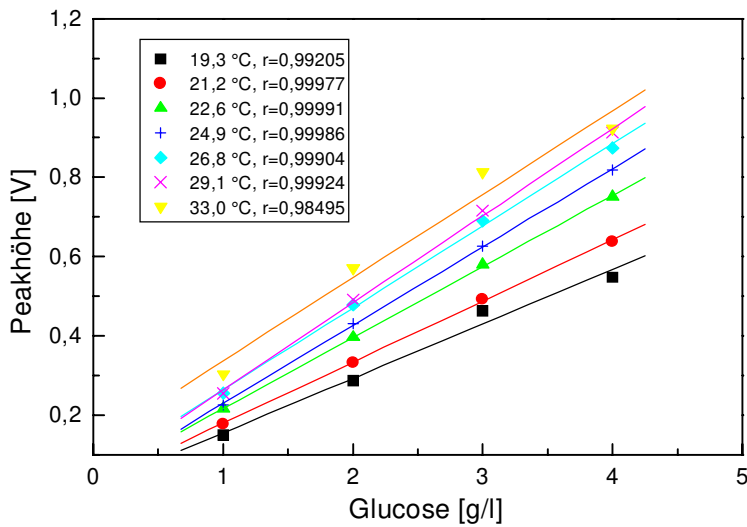
Bei der Aufnahme der Kalibriergeraden wurde jeder Glucosestandard sechsfach bestimmt und die Mittelwerte gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen. Im folgenden sind die Ergebnisse beider Meßreihen dargestellt.



T [C°]	CV[%]
18	3,4
20	2,7
23	2,0
25	2,4
27	5,8
30	4,2
35	6,5
Mittelwert	3,9

Abb.4.4 Kalibriergeraden der Meßreihe 1

Meßbedingungen:s. Abb.4.3



T [C°]	CV[%]
19,3	4,3
21,2	1,6
22,6	2,1
24,9	2,2
26,8	5,4
29,1	2,7
33,0	12,2
Mittelwert	4,4

Abb. 4.5 Kalibriergeraden der Meßreihe 2

Meßbedingungen s. Abb.4.3

Es ist eine deutliche Zunahme der Steigung sowie des Achsenabschnittes der Kalibriergeraden bei steigender Temperatur zu erkennen. Die errechneten Korrelationskoeffizienten belegen den guten linearen Verlauf über den gesamten Konzentrations- und Temperaturbereich.

Um den Einfluß der Temperatur auf ein FIA Meßsignal zu beschreiben, wurde von folgenden Voraussetzungen ausgegangen: Der Einfluß der Temperatur ist reversibel, d.h. es findet keine Denaturierung der Enzyme statt. Die Abhängigkeit der Signale von der Konzentration und der Temperatur läßt sich im linearen Meßbereich als Produkt zweier Funktionen $F(c)$ und $G(T)$ darstellen:

$$\text{Peakhöhe}(c, T) = F(c) \cdot G(T)$$

Mit der Meßreihe 1 wurden unterschiedliche Funktionen getestet, die die Abhängigkeit der Signalhöhe von der Temperatur beschreiben. Ein modifizierter Simplex Algorithmus diente dabei zur Berechnung der Modellparameter. Folgendes Modell erwies sich dabei mit einem mittleren relativen Fehler der Vorhersage von 5,2% als am besten geeignet zur Beschreibung der Temperaturabhängigkeit:

$$p_1 + p_2 \cdot \exp(p_3/T) \cdot \text{Höhe}$$

Der mittlere Fehler dieses Modells ist nur um 1,3 % größer als der mittlere Fehler der individuellen Methode bei konstanter Temperatur.

Zur Validation wurde die Meßreihe 2 verwendet. In das bei $T = 24,9^\circ\text{C}$ ermittelte Kalibrationsmodell wurde der funktionale Zusammenhang zur Berücksichtigung der Temperaturabhängigkeit implementiert, welcher mit der Meßreihe 1 gewonnen wurde. Dies ergibt sich wie folgt:

$$\text{Kalibrationsmodell bei konstanter Temperatur: } C = -0,1596 + 5,065 \cdot \text{Höhe}$$

$$\text{Kalibrationsmodell bei variabler Temperatur: } C = -0,1596 + \exp(38,8/T) \cdot \text{Höhe}$$

Dabei wurde $5,065 = \exp(38,8/T)$ mit $T = 24,9^\circ\text{C}$ gesetzt und somit die Temperaturabhängigkeit im Modell berücksichtigt. Werden nun mit diesem Modell die Konzentrationswerte der übrigen Messungen der Meßreihe 2 vorhergesagt, so ergibt sich ein mittlerer Fehler der Vorhersage von 8,4%. Interpretiert man die in der Tabelle zu Abbildung 4.5 erhaltenen Fehler der einzelnen Kalibrationsmodelle als Fehler der Messung bei einer konstanten Temperatur, so liegt der Fehler der Vorhersage nur um 4% höher als der Fehler der Messung.

Die erzielten Ergebnisse sind durchaus vielversprechend, die erhaltenen Daten jedoch nicht umfassend genug, um damit ein zuverlässiges allgemeingültiges Modell zur Kompensation von Temperatureffekten über die Kalibrierfunktion zu erhalten. Aus diesem Grund wurden weitere umfangreichere Messungen mit einem verbesserten Aufbau sowie unter Verwendung verschiedener Enzyme durchgeführt.

4.1.3 Temperaturabhängigkeit der Kalibriergeraden für verschiedene Enzym/Substrat Systeme

4.1.3.1 Systemaufbau

Wie schon unter 4.2. beschrieben kam auch in den folgenden Meßreihen das Anasyscon BioCart-System zum Einsatz. Um eine konstante Temperatur auch beim Injizieren der Probe in den Trägerpuffer zu erreichen, müssen beide gleichermaßen temperiert werden. Anstatt wie bisher die Kartusche und den Puffer in einem Wasserbad zu thermostatisieren, wurde die Fließstrecke zwischen Injektor und Kartusche auf einer Länge von 10 cm mit thermostatisierter Flüssigkeit umspült. Auch der Temperatursensor wurde leicht modifiziert, indem er in einen direkt auf die Kartusche schraubbaren Dreiwegehahn integriert wurde. Kartusche, Hahn und Fühler waren mit einem Styroporblock verkleidet.

4.1.3.2 Kalibriergeraden für verschiedene Enzym/Substrat Systeme

Die Messungen erfolgten bei vier verschiedenen Temperaturen (15, 18, 22 und 26°C), wobei pro Standard eine Fünffachbestimmung durchgeführt wurde, deren Mittelwert zur Auswertung herangezogen wurde. Die folgende Tabelle zeigt die eingesetzten Enzym/Substrat Systeme.

Messung	Enzym	Substrat	Kartusche	Pufferstrom [ml/min]	Standards [g/l]
1	Glucoseoxidase	Glucose	30 u	1,4	0,1-0,5
2	Glucoseoxidase	Glucose	30 u	1,9	0,15-0,6
3	Lactatoxidase	Lactat	15 u	1,9	0,025-0,15
4	Lactatoxidase	Lactat	15 u	1,4	0,02-0,1
5	Alkoholoxidase	Ethanol	50 u	1,4	0,05-0,25
6	L-Aminosäure-Oxidase	L-Tryptophan	15 u	1,9	0,03-0,24

Tabelle 4.1 Eingesetzte Enzym/Substrat Systeme [SOSNITZA, 1996]

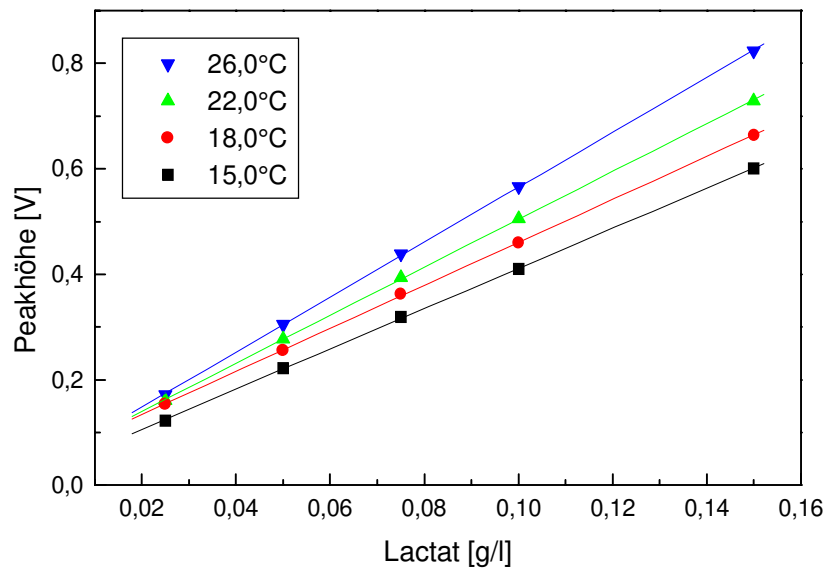


Abb.4.6 Kalibriergeraden der Meßreihe 3 [SOSNITZA, 1996]

Meßbedingungen: Anasyscon BioCart-FIA mit LOD Kartusche 15 U, Trägerstrom: 20 mM KPP-Puffer, pH 6,75; Volumenstrom=1,9 ml/min; Probenvolumen=30 µl,

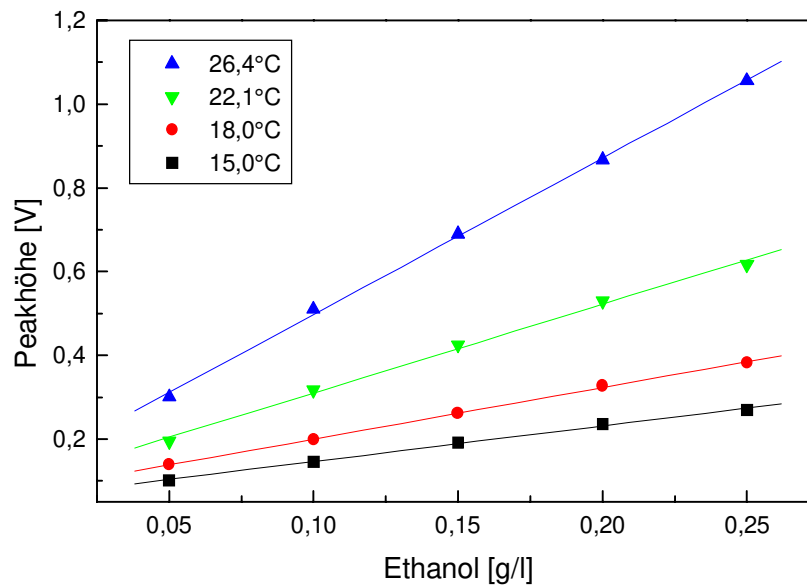


Abb.4.7 Kalibriergeraden der Meßreihe 5 [SOSNITZA, 1996]

Meßbedingungen: Anasyscon BioCart-FIA mit AOD Kartusche 50 U, Trägerstrom: 20 mM KPP-Puffer, pH 8,5; Volumenstrom=1,4 ml/min; Probenvolumen=30 µl,

Im folgenden sind exemplarisch zwei Meßreihen grafisch dargestellt. Alle weiteren mit den in Tabelle 4.1 dargestellten Systemen aufgenommenen Kalibriergeraden weisen einen ähnlichen Verlauf mit sehr guter Linearität auf.

4.1.3.3 Untersuchte Modelle

Mit den bereits unter 4.2 gemachten Annahmen wurden nun wiederum verschiedene Modelle zur Beschreibung der Temperaturabhängigkeit für jede der durchgeführten Messungen getestet. In Tabelle 4.2 sind die angewendeten Modelle aufgeführt.

Modell Nr.	Modell	Parameter zahl	mittlerer Fehler [%]	rel.
1	$p_1 + p_2 (1 + p_3 T)$ Höhe	3	7,0	
2	$p_1 + p_2 (1 + p_3 T + p_4 T^2)$ Höhe	4	5,7	
3	$p_1 + p_2 \exp[p_3 / (273 + T)]$ Höhe	3	6,1	
4	$p_1 + p_2 (1 + p_3 \exp[p_4 (273 + T)])$ Höhe	4	6,1	
5	$p_1 + p_2 (1 + p_3 \exp[p_4 T])$ Höhe	4	5,8	
6	$p_1 + p_2 \exp[p_3 / T]$ Höhe	3	8,4	
7	$p_1 + p_2 (1 + p_3 \exp[p_4 / T])$ Höhe	4	7,6	

Tabelle 4.2 Modelle zur Beschreibung der Kalibriergeraden [SOSNITZA, 1996]

Die Beschreibung der Messungen ist mit allen Modellen mit nahezu gleicher Genauigkeit möglich. Zur Vorhersage der Meßergebnissen bei veränderten Temperaturen wird daher ein mathematisch einfaches Modell mit möglichst wenigen Parametern herangezogen. Diese Bedingungen werden am besten von Modell 1 erfüllt, welches einen temperaturabhängigen und zwei Parameter für das lineare Kalibrationsmodell enthält.

4.1.3.4 Vorhersage auf verschiedene Temperaturen für alle Enzym/Substrat Systeme

Der temperaturabhängige Parameter p_3 im Modell 1 sollte für alle Enzyme einen ähnlichen Wert haben, um eine genaue Vorhersage zu ermöglichen. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß es sehr starke Abweichungen zwischen den Parametern der einzelnen Messungen gibt. Eine Vorhersage mit einem für alle Enzyme gültigen Modell unter Mittelung von p_3 kann daher nicht genauer sein als der durch diese Abweichungen bedingte Fehler.

Nach Einsetzen des gemittelten Parameters p_3 in Modell 1 wird jede der eingestellten Temperaturen einmal zur Berechnung einer Kalibrierfunktion verwendet, um dann die Meßwerte bei allen anderen Temperaturen vorherzusagen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Messung	Gemittelte Fehler der Vorhersage				Mittelwert [%]
	Kalibration bei T=15.0°C	Kalibration bei T=18.0°C	Kalibration bei T=22.0°C	Kalibration bei T=26.0°C	
1 GOD	14,3	8,3	9,1	15,4	15,5
2 GOD	24,4	25,1	13,6	13,8	
3 LOD	14,7	13,2	19,2	39,6	19,5
4 LOD	11,9	11,9	15,5	30,4	
5 AOD	75,2	46,0	29,0	29,0	44,8
6 ASOD	60,9	42,3	35,0	30,4	42,1
Mittelwert [%]	35,6	24,5	20,2	26,4	

Tab. 4.3: Mittlere Fehler der Vorhersage bei verschiedenen Kalibrationstemperaturen und gemitteltem Parameter p3 [SOSNITZA, 1996]

Die Fehler der Vorhersage liegen insgesamt sehr hoch. Der relativ geringe Fehler in Messung 1 ist durch die Lage des Parameters p3 nahe am Mittelwert bedingt. Weiterhin liefert die Kalibration bei einer mittleren Temperatur die besten Ergebnisse bzgl. der Vorhersage der bei anderen Temperaturen zu erwartenden Werte.

Die folgende Abbildung zeigt am Beispiel von Messung 1 anschaulich die Abweichungen zwischen vorhergesagten und experimentell bestimmten Meßwerten.

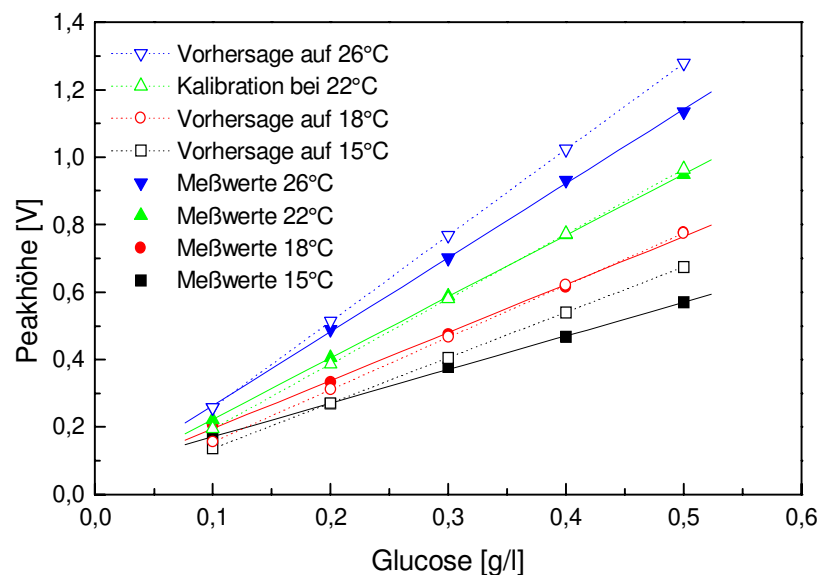


Abb. 4.8 Vorhersage der Meßwerte bei 15, 18 und 26°C nach Kalibration auf 22°C für Messung 1

Der durch den gemittelten Wert des Parameters p_3 bedingte Fehler spiegelt sich deutlich in den unterschiedlichen Steigungen der berechneten gegenüber den gemessenen Kalibriergeraden wider. Der mittlere Fehler der Vorhersage beträgt in diesem Fall 9,1%, ist jedoch für andere Enzym/Substrat Systeme teilweise erheblich höher (s. Tabelle 4.3). Eine bessere Vorhersage ist jedoch mit einem universellen Modell für alle Enzyme nicht möglich.

Aus Tabelle 4.4 geht hervor, daß eine Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit durch die Verwendung eines enzyspezifischer Temperaturparameters möglich ist.

Enzym	Mittlerer Fehler der Vorhersage [%]	
	Allgemeiner Temperaturparameter	Enzyspezifischer Temperaturparameter
GOD	15,5	15,0
LOD	19,5	9,8
AOD	44,8	20,3
ASOD	42,1	39,7

Tabelle 4.4: Mittlerer Fehler der Vorhersage mit universellen und enzyspezifischen Temperaturmodellen [SOSNITZA, 1996]

4.1.3.5 Vergleich der Meßwerte mit und ohne Temperaturkompensation

Die trotz der Verwendung individueller Modelle immer noch recht hoch erscheinenden Fehler der Vorhersage werden beim Vergleich von mit bzw. ohne Temperaturkompensation erhaltenen Meßergebnissen relativiert.

Standard [g/l]	Fehler der Messung bei 18°C	Fehler der Vorhersage mit universellem Modell [%]	Fehler der Vorhersage mit speziellem Modell [%]	Fehler der Messung ohne T-Kompensation [%]
0,025	0	1,2	1,2	20,0
0,050	0	20,0	0,0	24,0
0,075	1,3	24,0	5,3	26,7
0,1	0	26,0	6,0	26,0
0,150	0	28,0	9,3	26,7

Tabelle 4.5: Prozentuale Abweichung von berechneter und wirklicher Konzentration bei der Vorhersage von 18 auf 26°C für Messung 3 [SOSNITZA, 1996]

Man erkennt deutlich den Einfluß der berechneten Modelle auf die Qualität der Meßergebnisse. Besonders das enzyspezifische Modell ermöglicht Vorhersagen mit einem Fehler unter 10 %, während das universelle Modell keine deutliche Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit liefert.

4.2 Einfluß des Sauerstoffgehalts der Probe

Bei der enzymatischen Bestimmung verschiedener Substrate mit der Gelöftsauerstoffelektrode kann ein von dem des Trägerpuffers abweichender Sauerstoffgehalt der Probe zu falschen Ergebnissen führen. Auch Faktoren, die die Sauerstofflöslichkeit beeinflussen, wie Temperatur und Ionenkonzentration, müssen berücksichtigt werden.

Um den Einfluß einer stark verminderten Sauerstoffkonzentration der Probe auf den Signalverlauf zu verdeutlichen, wird ein zuvor mit Stickstoff begaster Glucosestandard in das FIA-System einmal mit und einmal ohne GOD-Kartusche injiziert.

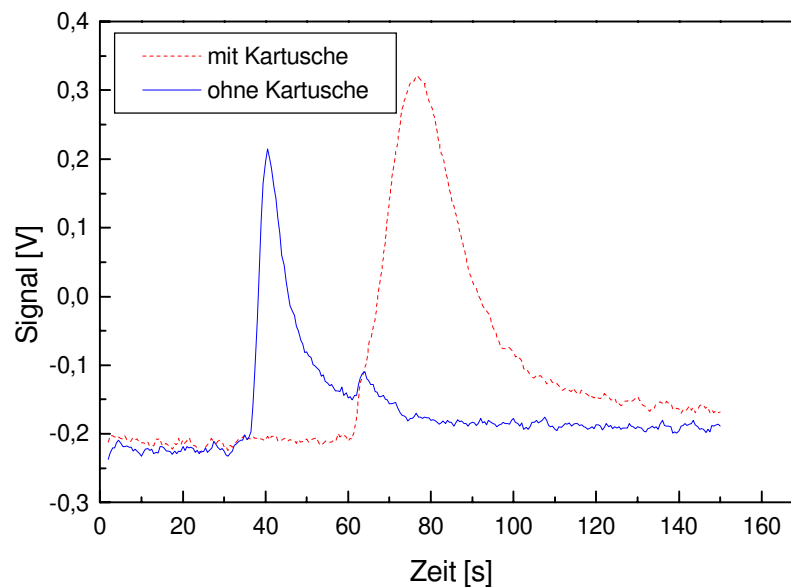


Abb.4.9 Signalverläufe bei der Bestimmung einer anaeroben Glucoseprobe mit bzw. ohne Enzymkartusche [SOSNITZA, 1996]

Meßbedingungen: BioCart-FIA, GOD Kartusche, Trägerstrom: 40 mM KPP-Puffer, pH 6,75; Volumenstrom = 1,4 ml/min; Probenvolumen = 35 μ l, $c_{\text{Glucose}} = 0,5$ g/l;

Die zeitliche Verschiebung sowie die verschiedenen Halbwertsbreiten der Signale sind durch die unterschiedlichen Verweilzeiten und Dispersionskoeffizienten bedingt. Es ist auch ohne enzymatische Reaktion ein deutliches Meßsignal zu beobachten, dessen Auswertung über die Höhe einen Anteil von 80 % des mit Enzymkartusche erhaltenen Wertes ergibt. Daraus wird ersichtlich, daß in erster Linie der niedrige Sauerstoffgehalt der Probe für die Signalbildung verantwortlich ist. Für die enzymatische Reaktion hingegen steht kaum noch Sauerstoff zur Verfügung, woraus

eine nur sehr geringe Signalerhöhung gegenüber dem Blindwert resultiert. Eine Analyse der Probe ist unter den gegebenen Bedingungen somit nicht möglich.

In Abbildung 4.10 ist der Einfluß eines sich verändernden Sauerstoffgehaltes der Probe, beispielsweise im Laufe einer Kultivierung, auf die Meßsignale dargestellt. Zu Simulationszwecken wurde die Probe unterschiedlich begast.

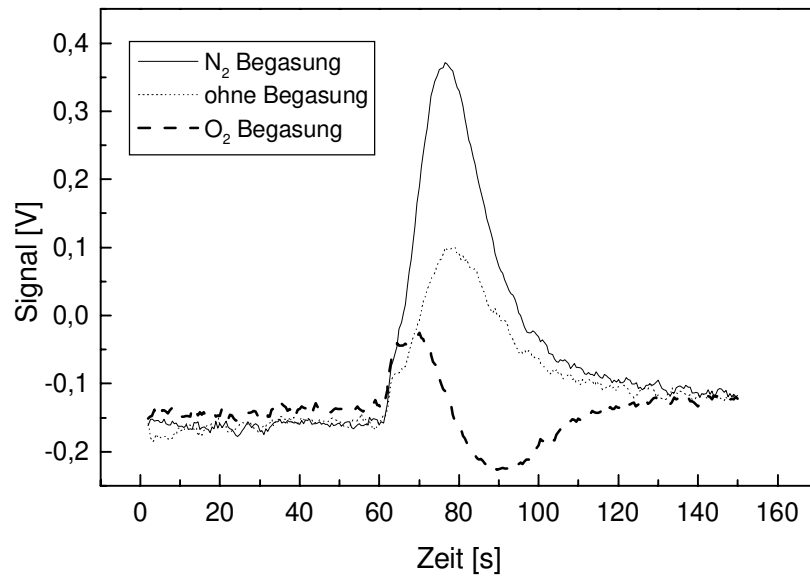


Abb.4.10 Signalverläufe bei unterschiedlicher Begasung der Probe [SOSNITZA 1996] *Meßbedingungen* s. Abb.4.9;

Es wird deutlich, wie stark die Meßwerte einer Probe mit unterschiedlichen Sauerstoffgehalten voneinander abweichen. Die Messungen ohne sowie mit Stickstoffbegasung weisen bekannte Verläufe auf, bei der Begasung mit Sauerstoff beobachtet man am Ende ein negatives Signal. Dies deutet auf einen auch nach der enzymatischen Reaktion noch vorhandenen Sauerstoffüberschuß in der Probe hin, der von den Enzymen nicht umgesetzt werden kann. Zusammenfassend kann man sagen, ist eine Analyse von Proben mit stark vom Trägerpuffer abweichenden Sauerstoffgehalt unter den genannten Bedingungen nicht möglich.

Zur Lösung des Problems müssen die Sauerstoffkonzentrationen der Probe und des Trägerstroms vor der Detektion einander angepaßt werden. Dies kann in erster Linie durch Vermischung (Dispersion) aber auch durch Diffusion von Sauerstoff durch die Teflonschläuche in die Probe erfolgen. Durch die Erhöhung der Schlauchlänge zwischen Injektionsventil und Kartusche sollte eine Anreicherung der Probe mit Sauerstoff erzielt und der Einfluß auf die Meßsignal untersucht werden. Zu diesem

Zweck wurde eine glucosehaltige, mit Stickstoff begaste Probe mit unterschiedlich langen Dispersionsstrecken unter sonst gleichen Bedingungen vermessen.

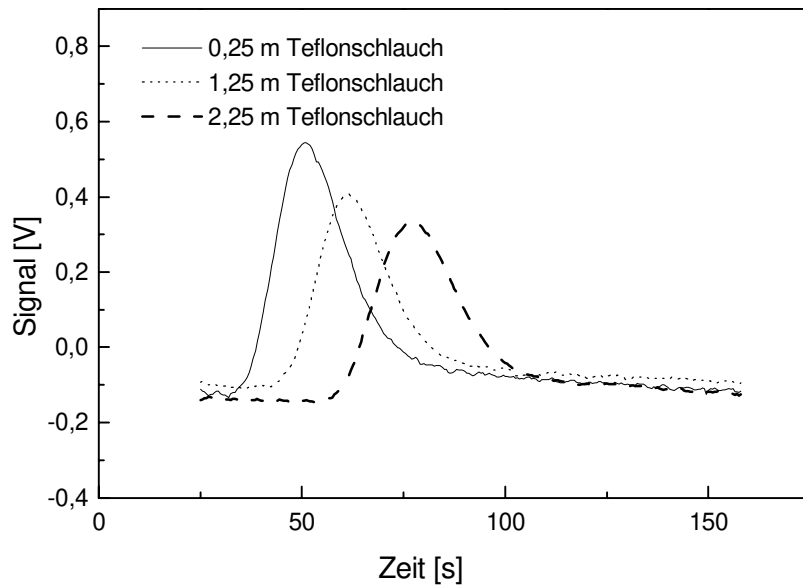


Abb. 4.11: FIA-Signale eines mit Stickstoff begasten Glucosestandards in Abhängigkeit von der Länge der Dispersionsstrecke [SOSNITZA, 1996]

Meßbedingungen: s. Abb. 4.9

Erwartungsgemäß nehmen die Elektrodensignale mit steigender Länge der Dispersionsstrecke ab, d. h. der Sauerstoffgehalt der Probe nähert sich dem des Trägerpuffers. Eine weitere Verlängerung würde jedoch zu einer unverhältnismäßig langen Analysenzeit führen, so daß anstattdessen die direkt Vermischung von Probe und Trägerstrom beispielsweise über ein T-Stück effektiver ist. Die mit der hohen Verdünnungsrate verbundene Signalverbreiterung führt allerdings zur Abnahme der Sensitivität der Methode.

Daß der Einfluß des Sauerstoffgehalts der Probe auf die Signalintensität durch eine verlängerte Dispersionsstrecke nicht vollständig kompensiert werden kann, veranschaulicht nochmals Abbildung. 4.12.

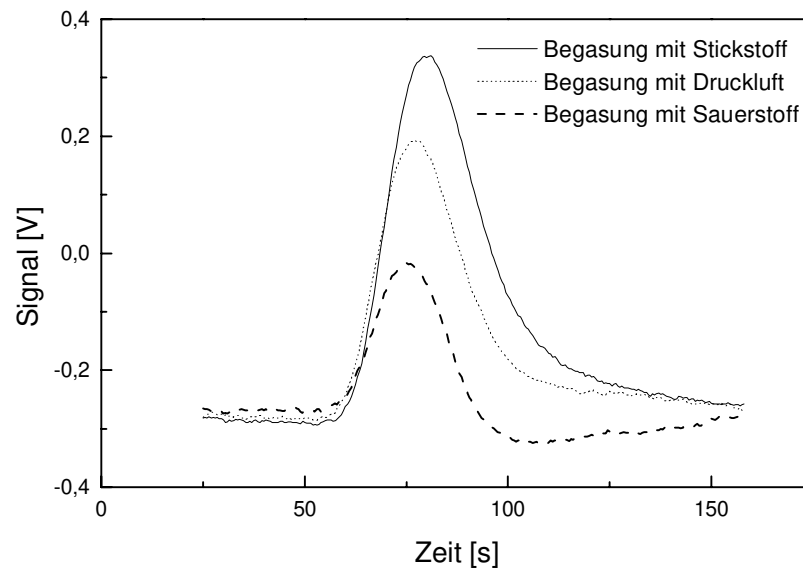


Abb.4.12 Signalhöhen in Abhängigkeit von der O_2 Konzentration bei Verwendung einer 2,5 m langen Dispersionsstrecke [SOSNITZA, 1996]

Meßbedingungen: s. Abb. 4.9

Die mit Stickstoff begaste Probe liefert immer noch das mit Abstand höchste Signal, dennoch ist eine Angleichung der Signalhöhen gegenüber der Messung ohne Verdünnungsstrecke erkennbar (s. Abb.4.10). Betrug das Höhenverhältnis der Signale der mit Stickstoff gegenüber der mit Sauerstoff begasten Probe ohne Dispersionsstrecke noch 6:1 fällt es nun mit 2,5:1 deutlich niedriger aus.

4.3 Zusammenfassung

In diesem Kapitel sollte der Einfluß der Temperatur und der Sauerstoffkonzentration der Probe auf die FIA-Meßsignale ermittelt werden. Zunächst wurde untersucht, ob mit Hilfe eines mathematischen Modells der Einfluß von Temperaturschwankungen während einer laufenden Messung auf die Qualität der Meßwerte kompensiert und die Ergebnisse bei veränderten Temperaturen vorhergesagt werden können. In ersten Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, daß für das System GOD/Glucose eine Vorhersage mit einem mittleren Fehler von 8,4% möglich ist. In weiterführenden Untersuchungen wurden verschiedene Modelle auf mehrere Enzym/Substrat Systeme angewendet. Dabei erwies sich ein universelles, für alle Systeme gültiges Modell aufgrund sehr hoher Fehler als ungeeignet zur Vorhersage der Meßergebnisse. Mit der Einführung eines für jedes Enzym spezifischen Temperaturparameters konnte hingegen

eine deutliche Verbesserung der Vorhersage im Vergleich ohne Temperaturkompensation erreicht werden. Die berechneten Fehler liegen für GOD und LOD mit 10% in einem akzeptablen Bereich und stimmen mit den im Rahmen der Voruntersuchungen ermittelten Abweichungen gut überein. Die Untersuchungen mit AOD und ASOD hingegen lieferten mit einem mittleren Fehler von 20 bzw. 40 % wesentlich schlechtere Ergebnisse. Ein Vergleich mit dem ohne Temperaturkompensation ermittelten Fehler von 140% für ASOD zeigt dennoch den korrigierenden Einfluß des Modells auf die Qualität der Meßwerte.

Abschließend läßt sich sagen, haben sich die spezifischen Modelle für GOD und LOD als sehr leistungsfähig zur Kompensation von Temperaturschwankungen erwiesen. Vor der Implementierung in die Steuer- und Auswertesoftware CAFCA zur Prozeßsteuerung muß der Temperatureinfluß jedoch noch genauer mathematisch erfaßt werden, mit dem Ziel, ein für alle Enzym/Substrat Systeme gültiges Temperaturmodell mit einem Fehler der Vorhersage $\leq 5\%$ zu erhalten.

Die Untersuchungen hinsichtlich verschiedener Sauerstoffgehalte der Probe ergaben, daß eine Anpassung der Sauerstoffkonzentrationen von Probe und Trägerpuffer zum Erhalt zuverlässiger Analysenergebnisse unbedingt erforderlich ist. Geringe Unterschiede im Sauerstoffgehalt lassen sich durch die Wahl einer geeigneten Dispersionsstrecke kompensieren, bei größeren Abweichungen muß auf eine entsprechende Mischkammer zurückgegriffen werden.

5 REVERSIBLE IMMOBILISIERUNGSMETHODEN

Die am häufigsten eingesetzten Verfahren zur Immobilisierung von Enzymen beruhen auf der Ausbildung kovalenter Bindungen zum Trägermaterial. Dies hat einerseits zwar eine hohe Stabilität des Immobilisats beispielsweise gegenüber extremen pH-Werten und Temperaturen zum Vorteil, führt andererseits aber auch nicht selten zur Abnahme der enzymatischen Aktivität aufgrund von Konformationsänderungen. Ein weiterer Nachteil ist, daß es im Laufe einer Messung am Bioprozeß zunehmend zu einer durch die Probenmatrix bedingten Degenerierung der Enzyme kommen kann. Eine möglichst schnelle Elution der degenerierten Enzyme vom Träger und eine nachfolgende Neubelegung mit aktiven Enzymen ist daher wünschenswert. Aus praktischen sowie zeitlichen Gründen sollte diese Neubelegung On line im FIA-System möglich sein. Eine solche reversible Immobilisierung ist mit kovalent gebundenen Enzymen jedoch nicht durchführbar, so daß auf andere Techniken zurückgegriffen werden muß.

5.1 Reversible Kopplung an chelatisierender Sepharose/Con A

Das verwendete Trägermaterial, das eingesetzte Lektin sowie das Immobilisierungsprinzip sind bereits in Kapitel 2.1.3.3 näher beschrieben worden. Aufbauend auf den Untersuchungen von Ulber [ULBER, 1996] wurde das Immobilisat aus chelatisierender Sepharose, Con A und GOD im Enzymkartuschensystem hinsichtlich Elution und Neubelegung getestet. Dazu werden 1 ml Chelating Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) mit einer Kupfer(II)chlorid Lösung ($c=0,5$ mg/ml) zur Reaktion gebracht, indem diese mit einem Volumenstrom von $0,33$ ml/min durch die Kartusche gepumpt wird. Die erfolgreiche Komplexbildung der Cu^{2+} Ionen durch die Iminodiacetatgruppen läßt sich an der Blaufärbung des Trägermaterials erkennen. Anschließend wird die Kartusche mit einer Con A Lösung ($c=1$ mg/ml in $0,1$ M Acetatpuffer pH 5,2; $V=5$ ml) 15 Minuten beladen. Daraufhin wird 15 Minuten mit Aktivierungspuffer (s. Anhang) gespült. Die Immobilisierung der GOD ($c=100$ U/ml in $0,1$ M Acetatpuffer pH 5,2; $V=5$ ml) erfolgt ebenfalls für 15 Minuten im Durchfluß. Nach abschließendem Spülen mit Acetatpuffer ist die Kartusche einsatzbereit. Wie bei Ulber gezeigt [ULBER, 1996] eignet sich eine so hergestellte Enzymkartusche zur Bestimmung verschiedener Glucosestandards im Konzentrations-

bereich von 0-1 g/l Glucose. Wiederholungsmessungen zeigten zudem eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Ziel der folgenden Untersuchungen war es u.a, die Vollständigkeit der Elution der Cu^{2+} /Con A/GOD Komplexe zu überprüfen. Weiterhin sollte der Einfluß wiederholten Eluierens und Neubelegens des Trägers auf die Qualität der Meßergebnisse untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde mit einer neu hergestellten Kartusche zunächst eine Kalibrierung durchgeführt. Daraufhin erfolgte die Elution von Cu^{2+} , Con A und GOD mittels EDTA ($c=0,05$ M, pH 6,75) und 2M HCl Lösung pH 1. Nach erfolgreicher Elution wurde die Kartusche neu belegt und kalibriert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Grafik dargestellt.

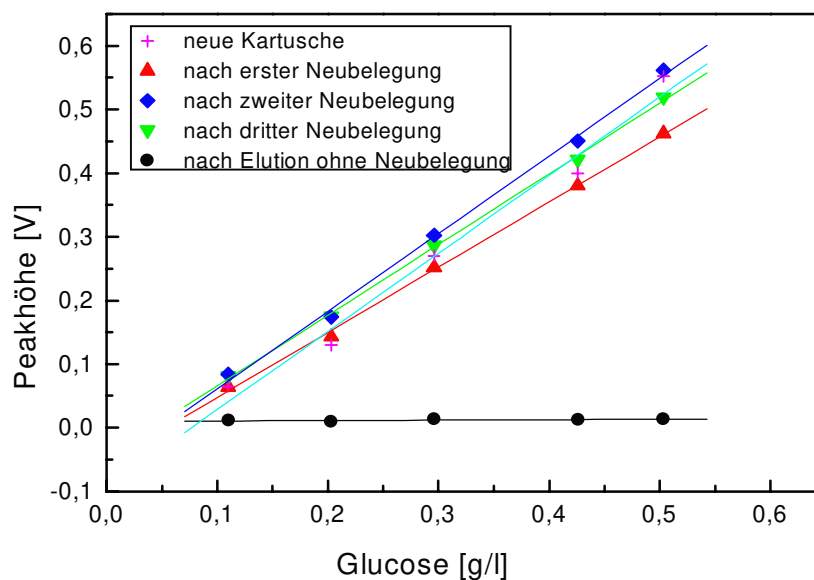


Abb. 5.1 Wiederholte Kalibration, Elution und Neubelegung des Trägers mit Cu^{2+} , Con A und GOD [KADUSZKIEWICZ, 1997]

Meßbedingungen: FIA-System mit pO_2 - Elektrode, Trägerstrom: 0,1 M NaHCO_3 Puffer pH 6,5; Volumenstrom = 3 ml/min; Probenvolumen = 40 μl

Es wird deutlich, daß eine reversible Kopplung von Enzymen auf chelatisierender Sepharose/Con A unter Verwendung eines geeigneten Elutionsmittels möglich ist. Nach dem Eluieren beobachtet man selbst bei höheren Glucosekonzentrationen keine Signale mehr, die Elution erfolgt somit quantitativ. Weiterhin ist zu erkennen, daß auch nach mehrmaligem Eluieren und Neubelegen keine deutliche Abnahme der Enzymaktivität stattfindet. Die aufgenommenen Kalibriergeraden unterscheiden sich nur geringfügig in ihren Steigungen.

Versuche nach erfolgter Elution lediglich das Enzym neu zu immobilisieren brachten erwartungsgemäß keinen Erfolg. Durch den Wechsel nach pH 1 wird die Bindung zwischen Träger und Kupferionen gelöst und der gesamte Komplex $\text{Cu}^{2+}/\text{Con A}/\text{GOD}$ herausgewaschen. Eine Möglichkeit nur das Enzym ohne Con A zu eluieren wird bei Ulber beschrieben [ULBER, 1996].

5.2 Reversible Kopplung auf chelatisierender Sepharose ohne Con A

Wie in Abschnitt 2.1.3.3 beschrieben lassen sich Proteine auch direkt über Metall-Aminosäure Wechselwirkungen auf chelatisierender Sepharose immobilisieren. Ein Verzicht auf Con A würde die Herstellungskosten einer Kartusche senken sowie kürzere Immobilisierungszeiten mit sich bringen. Aus diesen Gründen wurde eine Kartusche entsprechend der Vorschrift aus Kapitel 5.1 jedoch unter Verzicht auf Con A hergestellt. Es wurden Kalibrationen mit nachfolgender Elution und Neubelegung des Trägers durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 5.2.

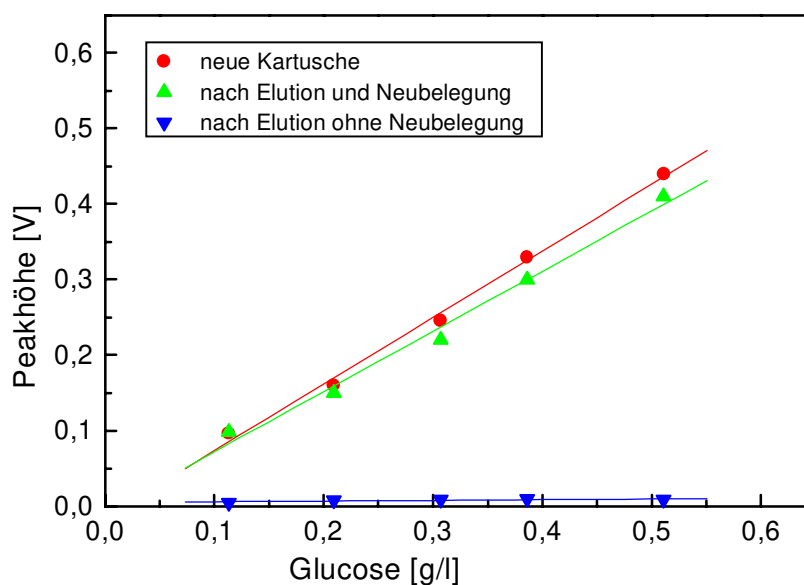


Abb.5.2 Wiederholte Kalibration, Elution und Neubelegung des Trägers mit Cu^{2+} und GOD; Meßbedingungen: siehe Abb.5.1 [KADUSZKIEWICZ, 1997]

Ein Vergleich mit Abbildung 5.1. zeigt, daß die Steigung der Kalibriergeraden sowie die Signalintensitäten beider Kartuschen einander sehr ähnlich sind. Man nimmt somit keinen Sensitivitätsverlust beim Verzicht auf Con A in Kauf. Auch die Elution der Enzyme mit nachfolgender Neubelegung liefert ohne sowie mit Con A gleich gute Ergebnisse.

Es wurde weiterhin untersucht, ob die Verwendung von Con A einen Einfluß auf die auf dem Träger immobilisierte Menge GOD hat. Zu diesem Zweck wurden die verwendeten Enzymlösungen mit den angefallenen Waschvolumina vereinigt und ein Proteintest nach Bradford durchgeführt [BRADFORD, 1976]. Auf dem mit Con A aktivierten Träger wurden 99,6%, auf dem Träger ohne Con A 94,6% GOD immobilisiert. Dieses Ergebnis erklärt die nahezu identischen Signalintensitäten in beiden Meßreihen.

5.3 Vergleich mit der Immobilisierung auf VA-Epoxy

VA-Epoxy Biosynth ist ein in der Enzymkartuschentechnik sehr häufig verwendetes Trägermaterial. Es soll daher ein Vergleich mit dem Träger Chelatisierende Sepharose bzgl. der maximal immobilisierbaren Enzymmenge sowie der erforderlichen Zeit angestellt werden. Dazu wurden insgesamt vier Kartuschen mit jeweils 200 mg VA-Epoxy beschickt. Drei Kartuschen wurden mit jeweils 500 units GOD gelöst in 1 ml 1M KPP Puffer (pH 7) befüllt und für 24, 48 bzw. 72 Stunden bei Raumtemperatur zur Immobilisierung gelagert. Durch die vierte Kartusche wurde die GOD Lösung im Kreis gepumpt und nach 15 Minuten, 24, 48 und 78 Stunden die immobilisierte Enzymmenge mittels Bradfordtest bestimmt. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse.

Immobilisierte Enzymmenge				
Zeit [h]	Stationär		im Durchfluß	
	Units	%	Units	%
0,25	-	-	100	20
24	298	59,6	166	33,2
48	325	65	270	54
78	340	68	315	63

Tab 5.1: Auf VA-Epoxy immobilisierte GOD Mengen [KADUSZKIEWICZ, 1997]

Es wird deutlich, daß eine nahezu vollständige Immobilisierung der gesamten eingesetzten Enzymmenge, wie es auf chelatisierender Sepharose gelungen ist, auf VA-Epoxy nicht möglich ist. Auch ist die Immobilisierungszeit von 2-3 Tagen vergleichsweise hoch.

Die Ergebnisse der Untersuchungen machen die Überlegenheit des Trägers Chelatisierende Sepharose gegenüber VA-Epoxy deutlich. Ein Nachteil soll an dieser Stelle jedoch nicht unerwähnt bleiben. Bei Untersuchungen zur Langzeitstabilität zeigte sich mehrfach, daß es im Laufe der Messungen aufgrund der gelartigen Konsistenz des Sepharoseträgers zu einer Volumenkontraktion kommt. Die dadurch bedingte Druckerhöhung im System führte fast immer zum Abspringen der Schlauchverbindungen und zum Abbruch der Messung. Weiterhin konnte über einen Meßzeitraum von 60 Stunden eine Abnahme der Signalintensitäten um 50% beobachtet werden. Bei der Verwendung von VA-Epoxy ist die Signalabnahme deutlich geringer, was auf die erhöhte Stabilität der kovalenten Bindung gegenüber elektrostatischen Wechselwirkungen zurückzuführen ist. Durch die Möglichkeit der reversiblen Immobilisierung verliert dieser Nachteil jedoch an Gewicht.

5.4 Zusammenfassung

Die in diesem Kapitel durchgeführten Untersuchungen dienten der Überprüfung und Modifizierung bekannter Immobilisierungsmethoden insbesondere unter dem Aspekt einer reversiblen Kopplung von Enzymen an aktivierte Trägermaterialien. Die verwendete chelatisierende Sepharose erwies sich dabei als für diese Zwecke sehr gut geeignet. Nach der Aktivierung mit Cu^{2+} Ionen und dem Lektin Concanavalin A konnten 500 units GOD innerhalb von nur 15 Minuten nahezu quantitativ gebunden werden. Durch eine saure Elution konnte die gesamte Enzymmenge vom Träger entfernt werden. Nach der anschließenden Neuimmobilisierung im Durchfluß konnte eine annähernd gleiche Enzymaktivität erzielt werden. Auch mehrmaliges Wiederholen dieses Vorganges hatte keine signifikante Abnahme der Enzymaktivität zur Folge.

Um Kosten und Zeit zu sparen wurde die gleiche Immobilisierungsmethode ohne Con A angewendet und das Glycoenzym direkt an die Metallionen gebunden. Es zeigte sich, daß die Immobilisierung ebenfalls zu fast 100% erfolgt und die aufgenommenen Kalibriergeraden sich kaum von denen mit Con A ermittelten unterscheiden.

Bei einem Vergleich mit dem Träger VA-Epoxy zeigte die Chelatisierende Sepharose deutliche Vorteile bzgl. Immobilisierungsraten und -dauer. Außerdem ist eine reversible Belegung des VA-Epoxy Trägers nicht möglich. Ein bisher nicht gelöstes Problem beim Einsatz der chelatisierenden Sepharose über einen längeren Zeitraum ist die Volumenkontraktion und der damit verbundenen Druckanstieg im FIA-System.

Zukünftige Untersuchungen sollten sich daher u.a. mit dieser Problematik beschäftigen, um den Einsatz von chelatisierender Sepharose zur Immobilisierung biologisch aktiver Komponenten in Zukunft auch in der On line Prozeßanalytik sicherzustellen.

6. ENTWICKLUNG EINES FIA-SYSTEMS ZUR GLUTAMINBESTIMMUNG

Die Aminosäure L-Glutamin ist neben Glucose eine der beiden Schlüsselkomponenten in Tierzellkultivierungen, denn sie stellt im Stoffwechsel tierischer Zellen eine wichtige Energie- und Stickstoffquelle dar [REITZER, 1979; JENKINS, 1992]. Glutamin wird im Aminosäuremetabolismus mit Hilfe des Enzyms Glutaminase unter Freisetzung eines Moleküls Ammonium zu Glutamat desaminiert. Dieses wird im Folgeschritt durch Glutamatdehydrogenase zu α -Ketoglutarat abgebaut, wobei wiederum Ammonium entsteht. Das gebildete α -Ketoglutarat kann im Zitronensäurezyklus entweder vollständig zu Wasser und Kohlendioxid abgebaut oder über Pyruvat zu Lactat umgewandelt werden [SHARFSTEIN, 1994; ZIELKE, 1980]. Beide Hauptabbauprodukte des Glutaminstoffwechsels Ammonium und Lactat inhibieren das Zellwachstum [OZTURK, 1992; GLACKEN, 1986], wobei Ammonium eine größere Bedeutung zukommt. Seine Konzentration ist häufig noch zusätzlich durch den chemischen Zerfall überschüssigen Glutamins erhöht. Zum Erreichen hoher Zelldichten sowie maximaler Produktausbeuten sind daher Fütterungsstrategien notwendig, die auf eine zu jedem Zeitpunkt der Fermentation optimale Glutaminkonzentration hinzielen. Dieses Bestreben ist jedoch nur mit einer kontinuierlichen On line Analytik zu realisieren.

In der Literatur sind zahlreiche Biosensoren zur Bestimmung von Glutamin beschrieben. In den meisten Methoden sind mehrere enzymatische Schritte erforderlich, um zu einem detektierbaren Reaktionsprodukt zu gelangen. Fast immer wird im ersten Schritt Glutamin zunächst mit Hilfe des Enzyms Glutaminase in Glutamat und Ammonium umgesetzt. Die weiteren Vorgehensweisen sind sehr unterschiedlich. In einem von Villarta beschriebenen Verfahren [VILLARTA, 1991] wird das entstandene Glutamat durch das Enzym Glutamatoxidase in α -Ketoglutarat, Ammonium und Wasserstoffperoxid umgewandelt. Das Enzym ist auf einer Membran vor einer Wasserstoffperoxid-sensitiven Elektrode immobilisiert, mit der die der Glutamat- proportionale H_2O_2 Konzentration gemessen wird. Eine ähnliche Methode wird von Renneberg et. al. [RENNEBERG, 1991] beschrieben. Romette und Cooney benutzen eine Enzymelektrode vom Clark Typ zur Bestimmung des durch die Enzymreaktion bedingten Sauerstoffverbrauchs [ROMETTE, 1987]. Blankenstein stellt eine

sehr sensitive chemiluminometrische Methode vor [BLANKENSTEIN, 1993]. Zwei in ein FIA-System integrierte Enzymreaktoren enthalten coimmobilisierte Glutaminase und Glutamatoxidase bzw. Peroxidase. Nach der Freisetzung von H_2O_2 in der ersten Kartusche wird 3-Aminophtalhydrazid (Luminol) injiziert, das in einer Peroxidase-katalysierten Reaktion zu dem blau fluoreszierenden und gut detektierbaren 3-Aminophtalat oxidiert wird. Weiterhin sind Methoden unter Verwendung von Glutamatdecarboxylase [REBING, 1995] beschrieben, bei der das freigesetzte CO_2 mit einer gassensitiven Elektrode gemessen wird. Bei Verwendung des Enzyms Glutamatdehydrogenase in Verbindung mit NAD^+ kann die photometrische Detektion des gebildeten NADH zur Bestimmung der Glutaminkonzentration genutzt werden [DULLAU, 1991].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein On line fähiges FIA-Systems zur Bestimmung von L-Glutamin entwickelt, optimiert und an einer Tierzelkultivierung zum Einsatz gebracht werden. Neben der Zuverlässigkeit und Einfachheit spielten bei der Entscheidung für eine bestimmte Methode auch die Kosten einer Analyse eine wichtige Rolle. Aus diesen Gründen fiel die Wahl auf eine Methode, in der nur ein Enzym benötigt wird, welches zudem auch noch vergleichsweise preiswert ist. Im Gegensatz zu Analysenverfahren mit mehreren enzymatischen Schritten entfallen somit auch Probleme, die aufgrund unterschiedliche pH-Optima der einzelnen Enzyme entstehen.

6.1 FIA Aufbau und Meßprinzip

Die Methodenentwicklung erfolgte in Anlehnung an eine von Campmajo [CAMPMAJO, 1994] vorgeschlagene Variante der Glutaminbestimmung, in der das bei der enzymatischen Umsetzung des Glutamins frei werdende Ammonium potentiometrisch gemessen wird. Im Gegensatz dazu sollte in diesem Fall die Detektion jedoch über die photometrische Messung des Farbumschlags eines Indikators erfolgen. Alle Messungen wurden mit dem in Kapitel 3 vorgestellten Prozeßanalysator durchgeführt. Gegenüber dem dort beschriebenen Systemaufbau wurde die Anlage zu diesem Zweck um eine Dialysezelle (Werkstatt des TCI; s. Anhang) sowie ein Durchflußphotometer (Skalar 601) erweitert. Die folgende Abbildung zeigt schematisch den Aufbau des modifizierten FIA-Systems.

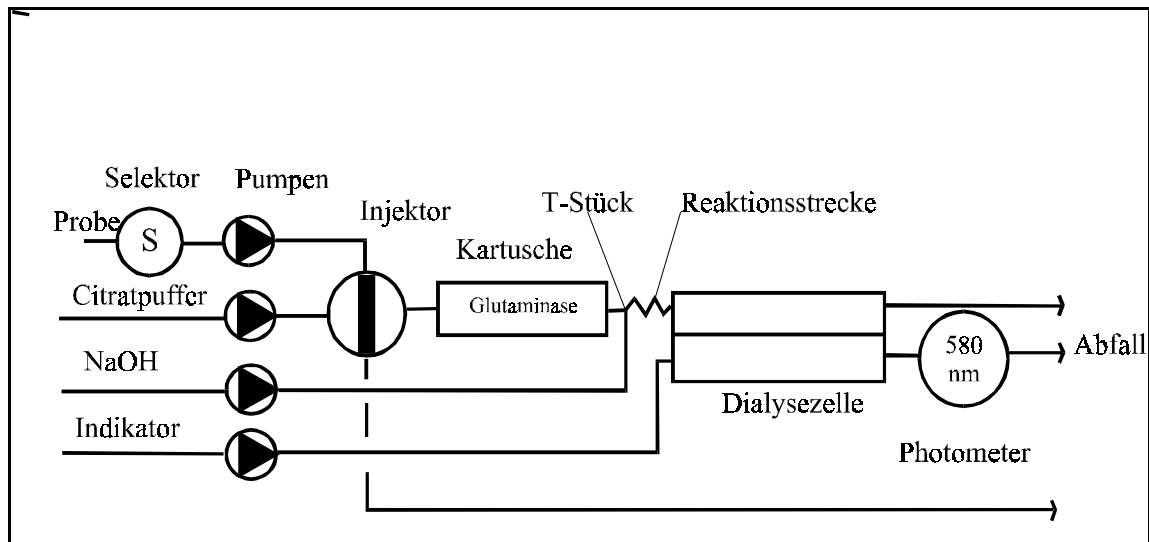
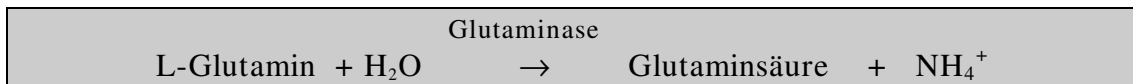


Abb.6.1: FIA-System zur Glutaminanalytik

Nach der Injektion der Probe in den Trägerstrom (0,1M Citratpuffer, pH 5) passiert diese zunächst die Enzymkartusche, die mit auf VA-Epoxy immobilisierter Glutaminase beschickt ist. In allen Versuchen wurden Enzymaktivitäten zwischen 20 und 40 units eingesetzt. Es findet die folgende Reaktion statt:



Dem ammoniumhaltigen Trägerstrom wird hinter der Kartusche über ein T-Stück Natronlauge im Verhältnis 1:1 zugemischt. Das dabei gebildete Ammoniak diffundiert durch eine sich in der angeschlossenen Dialysezelle (Austauschfläche=9,4 cm²) befindliche gasdurchlässige Polypropylenmembran (Typ PP2EHF, Akzo Nobel, Porendurchmesser = 0,2 µm), welche sich durch eine sehr hohe Ammoniakpermeabilität auszeichnet [THORDSEN, 1994], in den Indikatorstrom. Als Indikator wird Bromcresolpurpur mit einem pH-Wert von 6,4 [PRODUKTINFO ISMATEC] verwendet. Der mit der pH Änderung verbundene Farbumschlag von kirschrot nach violett kann bei 580 nm photometrisch gut verfolgt werden.

6.2 Optimierung des Systems

Ziel der Untersuchungen war es, verschiedene Systemparameter bzgl. Zuverlässigkeit, Genauigkeit und Sensitivität der Methode zu optimieren. Dabei wurde zuerst der Betrieb der Dialysezelle im Gleich- und Gegenstromverfahren getestet. Letzteres zeigte negative Auswirkungen auf die Stabilität der Dialysemembran und führte weiterhin zu einer starken Streuung der Meßwerte. Werden Träger- und Indikatorstrom hingegen im Gleichstrom gepumpt arbeitet die Anlage zuverlässig, so daß alle folgenden Versuche im Gleichstrombetrieb durchgeführt wurden.

Zunächst sollte die Abhängigkeit der Meßsignalintensität von der Konzentration der eingesetzten Natronlauge sowie von der Länge der verwendeten Reaktionsstrecke untersucht werden. Dazu wurde anfangs die Natronlaugekonzentration zwischen 0,3 und 1 mol/l bei einer konstanten Reaktionsstrecke von 30 cm (Teflonschlauch, ID=0,8 mm) variiert. Anschließend erfolgten Messungen mit verschiedenen Reaktionsstrecken bei einer konstanten Natronlaugekonzentration von 0,5 mol/l. Die Ergebnisse sind zusammengefaßt in der folgenden Abbildung dargestellt.

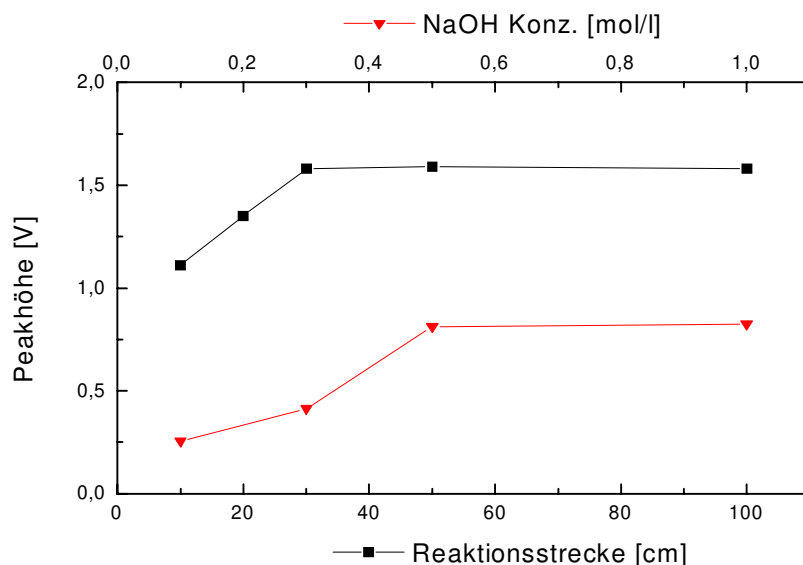


Abb.6.2 Abhängigkeit der Signalintensität von der Natronlaugekonzentration und der Länge der Reaktionsstrecke [RIESEBERG, 1997]

Meßbedingungen: FIA-System mit 20 U Glutaminase Kartusche, Trägerstrom: 0,1 M Citrat-Puffer, pH 5 Gesamtvolumenstrom Träger+NaOH (1:1)=5 ml/min; Indikatorstrom=1,8 ml/min, Probenvolumen = 65 µl, $c_{\text{Glutamin}}=150$ mg/l

Es wird ersichtlich, daß bis zu einer Natronlaugekonzentration von 0,5 mol/l sowie einer Reaktionsstrecke von 30 cm ein Anstieg der Signalhöhen erfolgt. Darüberhinaus

kann keine weitere Steigerung beobachtet werden. Der Grund dafür ist die bereits vollständige Umsetzung des gebildeten Ammoniums zu Ammoniak und die damit verbundene maximale pH-Wert Änderung. Eine weitere Verlängerung der Reaktionsstrecke würde aufgrund zunehmender Dispersionseffekte wieder zu niedrigeren Meßsignalen und somit geringerer Sensitivität führen. Die an dieser Stelle ermittelten Parameter wurden in allen weiteren Versuchen eingestellt.

Weiterhin wurde der Einfluß verschiedener Volumenströme des Trägerpuffers und der Natronlauge (=Gesamtvolumenstrom; Verhältnis ist immer 1:1) sowie des Indikators auf die Meßsignale untersucht und optimiert. Abbildung 6.3 zeigt die Ergebnisse.

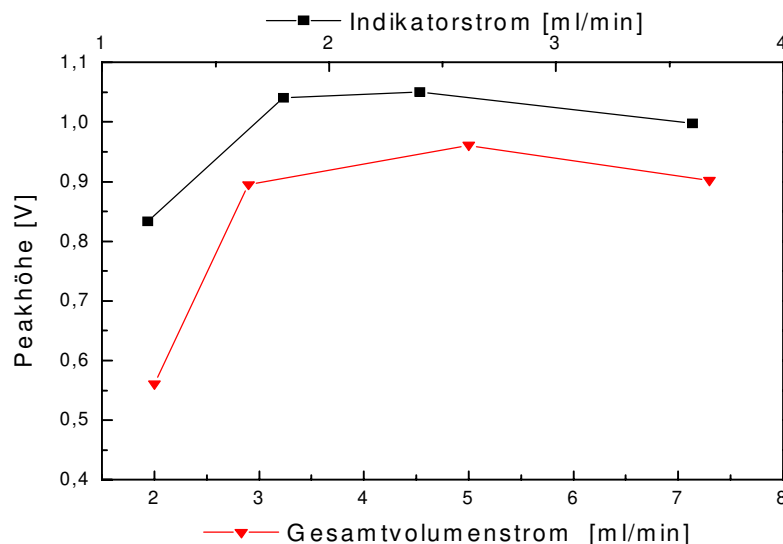


Abb. 6.3 Abhängigkeit der Signalintensität vom Gesamt- und Indikatorvolumenstrom [Rieseberg, 1997]

Meßbedingungen: s. Abb.6.3 mit optimierten Einstellungen und Variation der verschiedenen Volumenströme, NaOH:Trägerpuffer=1:1

Im Fall des Gesamtvolumenstromes hätte man einen umgekehrten Verlauf erwarten können, da sich mit zunehmendem Volumenstrom des Trägerpuffers die Verweilzeit des Probensegments in der Kartusche und somit auch die Kontaktzeit zwischen Substrat und Enzymen verkürzt. Dadurch sollte der Umsatz der enzymatischen Reaktion abnehmen, was zu kleineren Signalen führt. Dies gilt jedoch nur für kinetisch kontrollierte Enzymkartuschen [JÜRGENS, 1993]. Diese zeichnen sich durch geringe Enzymaktivitäten aus, so daß nur ein Teil der eingesetzten Substratmoleküle umgesetzt wird. Veränderungen des pH-Wertes, der Matrixzusammensetzung und auch des Volumenstroms des Trägerpuffers üben einen starken Einfluß auf den

Umsatz aus. Im Gegensatz dazu besitzen diffusionskontrollierte Enzymkartuschen sehr hohe Enzymaktivitäten, so daß alle Substratmoleküle, die die Enzymschicht durch Diffusion erreichen, umgesetzt werden. Aus Abbildung 6.3 geht hervor, daß die enzymatische Reaktion in der eingesetzten Glutaminasekartusche bis zu einem Gesamtvolumenstrom von 5 ml/min diffusionskontrolliert abläuft, d.h. der Umsatz ist vollständig. Die Zunahme der Signalhöhen ist auf verringerte Dispersionseffekte und einer damit verbundenen Abnahme der Halbwertsbreite der Peaks bei hohen Volumenströmen zu erklären. Die Signale werden „schlanker“ und höher. Erst bei Volumenströmen über 7,5 ml/min kommt der Einfluß der Kinetik auf das Umsatzverhalten der Enzymkartusche zum Tragen. Die Kontaktzeit der Reaktionpartner ist für eine vollständige Umsetzung zu kurz und es kommt zu einer Abnahme der Signalhöhen.

Der Einfluß des Volumenstromes der Indikatorlösung auf die Meßsignale ist als eher gering einzustufen und hängt ebenfalls mit veränderten Dispersionseffekten aufgrund unterschiedlicher Fließgeschwindigkeiten zusammen. In allen weiteren Messungen wurde der Indikatorstrom auf 2,5 ml/min eingestellt.

Die wichtigsten optimierten Systemparameter sind im folgenden noch einmal zusammengefaßt.

Volumenstrom des Trägerpuffers:	2,5 ml/min
Volumenstrom der Natronlauge:	2,5 ml/min
Resultierender Gesamtvolumenstrom:	5 ml/min
Volumenstrom des Indikators:	2,4 ml/min
Reaktionstrecke:	30 cm Teflonschlauch, ID=0,8 mm
Konzentration der Natronlauge:	0,5 mol/l
Enzymaktivität:	20-40 units pro Kartusche

Tabelle 6.1 Optimierte Systemparameter

Sofern nicht anders angegeben, betrug das Volumen der Probenschleife 65 µl. Ein Zyklus dauert unter den genannten Bedingungen 180 Sekunden, so daß eine Analysenfrequenz von 20 Bestimmungen in der Stunde erreicht werden kann. Die in Tabelle 6.1 aufgeführten Bedingungen wurden in allen folgenden Messungen beibehalten.

6.3 Qualität des Analysenverfahrens

Die Qualität eines Analysenverfahrens beinhaltet die Gesamtheit der Merkmale bezüglich seiner Eignung, festgelegte und vorausgesetzte Erfordernisse zu erfüllen [DIN 58936]. Die wichtigsten Qualitätsmerkmale sind dabei Präzision, Richtigkeit, analytische Empfindlichkeit sowie analytische Spezifität [DIN 55350; 58936(1); 58936(2)]. In diesem Kapitel soll die neue Analysenmethode anhand der drei an erster Stelle genannten Kriterien überprüft werden und die Ergebnisse im Rahmen der in der analytischen Qualitätskontrolle gültigen Anforderungen beurteilt werden. Auf die Spezifität der Methode wird an anderer Stelle eingegangen. Weiterhin sollte noch die Langzeitstabilität des Systems überprüft werden.

6.3.1 Empfindlichkeit und Linearität der Kalibrierfunktion

Empfindlichkeit beschreibt die Fähigkeit eines Analysenverfahrens, benachbarte Werte (z.B. Konzentrationen) zu differenzieren. Sie gibt an, in welchem Maße sich ein Wert in Abhängigkeit vom Signal des messenden Systems verändert und läßt sich durch die Steigung der Kalibrationskurve quantifizieren [DIN 58936(2)]. Für die Anwendbarkeit der einfachen linearen Regressionsrechnung muß zwischen Substanzgehalt und Meßwert ein linearer Zusammenhang vorliegen. Dieser wird in der Spektralphotometrie durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben, welches die Proportionalität von Extinktion und molarer Konzentration wiedergibt:

$$E = \epsilon \cdot d \cdot c$$

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient

d = Schichtdicke der Küvette

c = molare Konzentration des Analyten

Zur Bestimmung der Kalibrierfunktion wurden verschiedene Glutaminstandards in einem in der Tierzellkulturtechnik relevanten Konzentrationsbereich von 50-250 mg/l Glutamin vermessen. Die Aktivität der immobilisierten Glutaminase betrug 40 u. Wie Abbildung 6.4 zeigt verläuft die Kalibriergerade dem Lambert-Beerschen Gesetz entsprechend über den gesamten Meßbereich linear, was durch einen Regressionskoeffizienten von 0,999 belegt wird.

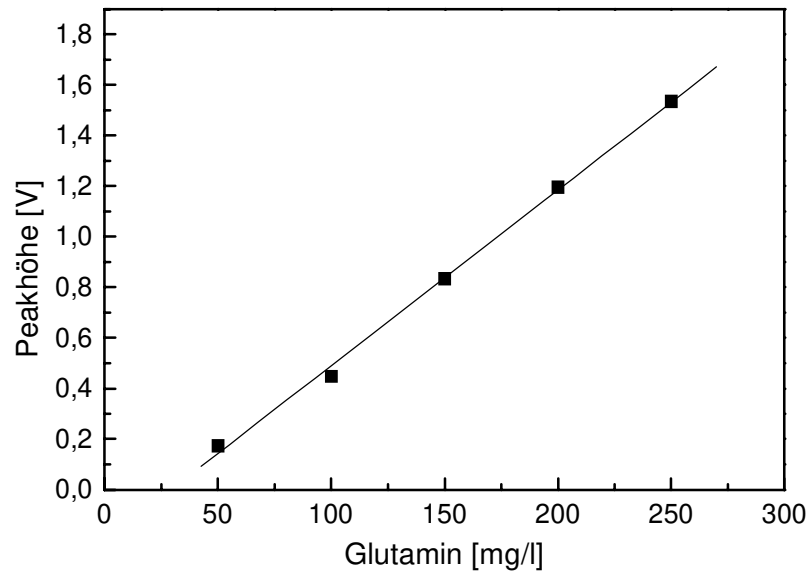


Abb.6.4 Lineare Kalibrierfunktion [RIESEBERG, 1997]

Der lineare Verlauf in Verbindung mit einer deutlichen Steigung der Kalibriergeraden läßt die Bestimmung von Glutamin im gewählten Konzentrationsbereich mit guter Genauigkeit zu.

6.3.2 Präzision und Richtigkeit

Neben der Empfindlichkeit, spielen die Richtigkeit und die Präzision bei der Beurteilung eines Analysenverfahrens eine wichtige Rolle. Beide Kriterien werden unter dem Begriff Genauigkeit zusammengefaßt [DIN 55350]. Die Präzision gibt das Ausmaß der Übereinstimmung von Ergebnissen bei wiederholter Anwendung einer Analysenmethode wieder. Sie wird durch Wiederholungsmessungen einer Probe mit anschließender Berechnung der Standardabweichung bzw. des relativen Fehlers CV ermittelt. Die Richtigkeit ist als die systematische Abweichung des Mittelwertes vom wahren Wert definiert. Als Maß für die Richtigkeit gilt die Wiederfindungsrate (WFR). Sie beschreibt den prozentualen Anteil der wiedergefundenen Konzentration bzw. des Mittelwertes der Konzentration der wahren Konzentration.

Zur statistischen Bewertung der Glutaminanalytik bzgl. der genannten Kriterien wurde eine 20-fach Bestimmung eines Glutaminstandards ($c = 240 \text{ mg/l}$) durchgeführt. Die Meßwerte sowie die statistischen Kenndaten sind im folgenden dargestellt.

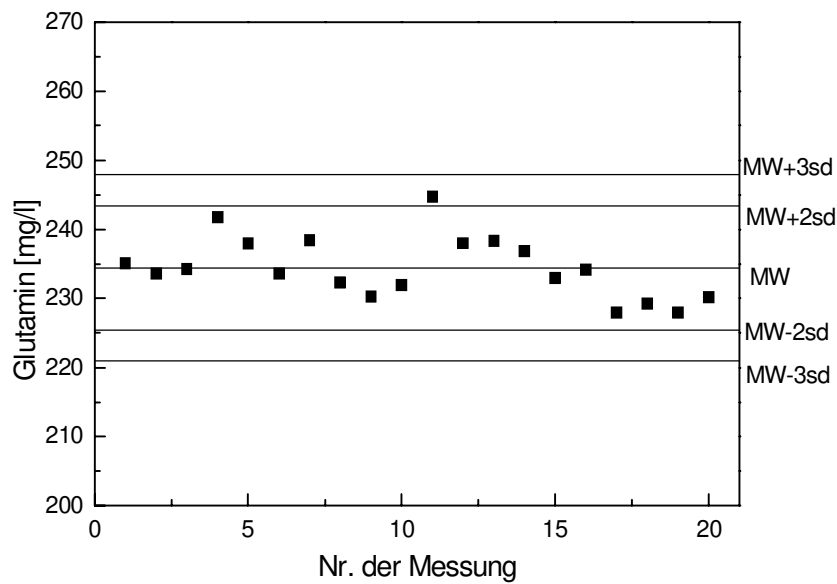


Abb. 6.5 Mehrfachbestimmung eines Glutaminstandards, $c = 240$ mg/l, [RIESEBERG, 1997]

Meßbedingungen: Optimiertes FIA-System mit 20 μ l Glutaminase Kartusche

Anzahl der Meßwerte	20
Mittelwert [mg/l]	234,4
sd [mg/l]	4,49
CV [%]	1,9
wahrer Wert [mg/l]	240
Wiederfindungsrate [%]	97,7

Tabelle 6.2 Statistische Daten der Mehrfachbestimmung

Aus Abbildung 6.5 sowie aus dem folgenden Histogramm wird deutlich, daß die Meßwerte statistisch um den Mittelwert streuen. Der geringe relative Fehler von 1,9% verdeutlicht die sehr gute Reproduzierbarkeit. Die eingezeichneten Grenzen stellen die in der analytischen Qualitätskontrolle festgelegten Qualitätsschranken dar. Man unterscheidet dabei zwischen Warn-(Mittelwert+2sd) und Kontrollgrenzen (Mittelwert+3sd) [DIN 55350, 58936]. Die Überschreitung der ersten wird toleriert, verlangt jedoch eine erhöhte Aufmerksamkeit. Die Überschreitung der Kontrollgrenzen hingegen macht einen unmittelbaren korrigierenden Eingriff ins System erforderlich. Die Festlegung der Grenzen beruht auf der Annahme, daß die ermittelten Ergebnisse normalverteilt sind [WILRICH, 1986] was aus Abbildung 6.6 hervorgeht.

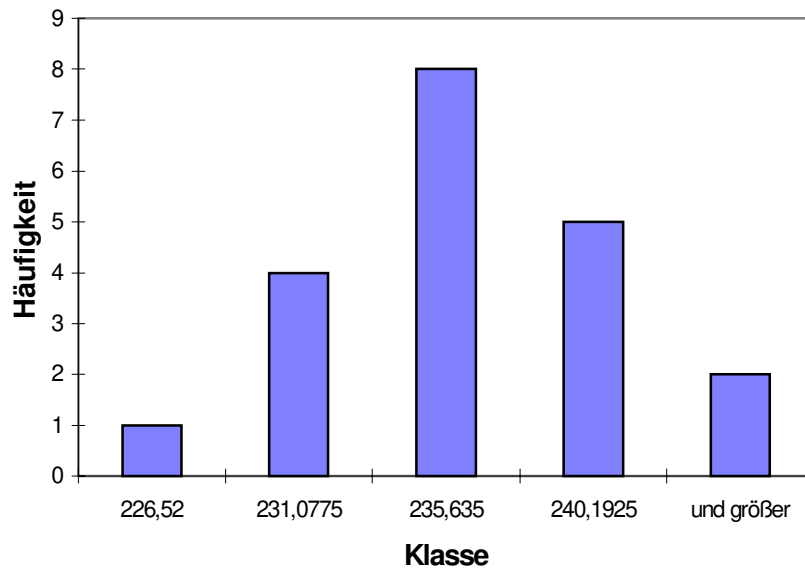


Abb. 6.6 Normalverteilung der Meßwerte einer Mehrfachbestimmung

Lediglich ein Meßwert, der gegenüber allen anderen deutlich erhöht und somit als Ausreißer zu werten ist, überschreitet die obere Warngrenze. Die Kontrollgrenzen werden hingegen zu keinem Zeitpunkt überschritten.

Bei der Überprüfung der Richtigkeit der Ergebnisse fällt eine leichte Verschiebung der gefundenen Werte zu kleineren Konzentrationen gegenüber dem wahren Wert auf. Der Mittelwert liegt mit 234,4 mg/l unterhalb des Sollwertes von 240 mg/l. Eine Wiederfindungsrate von 97,6% ist dennoch ein akzeptables Ergebnis.

Die Ergebnisse belegen die generelle Eignung des Verfahrens auch im Hinblick auf die in der analytischen Qualitätskontrolle geltenden Anforderungen. Die Zulassung für einen Einsatz an einem industriellen Produktionsprozeß macht jedoch die Durchführung weiterer umfangreicherer qualitätssichernden Maßnahmen erforderlich, auf die im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden konnte. Eine ausführliche Behandlung dieses Themas findet man bei [FUNK, 1992].

6.3.3 Langzeitstabilität

Es sollte untersucht werden, ob das System über einen Zeitraum von mehreren Stunden gleichbleibende Ergebnisse liefert, oder ob beispielsweise schon nach kurzer Zeit eine kontinuierliche Abnahme der Meßwerte aufgrund der Degenerierung der

Glutaminase zu beobachten ist. Zu diesem Zweck wurde alle zehn Minuten ein Glutaminstandard ($c=150$ mg/l) über einen Zeitraum von 6,5 Stunden injiziert.

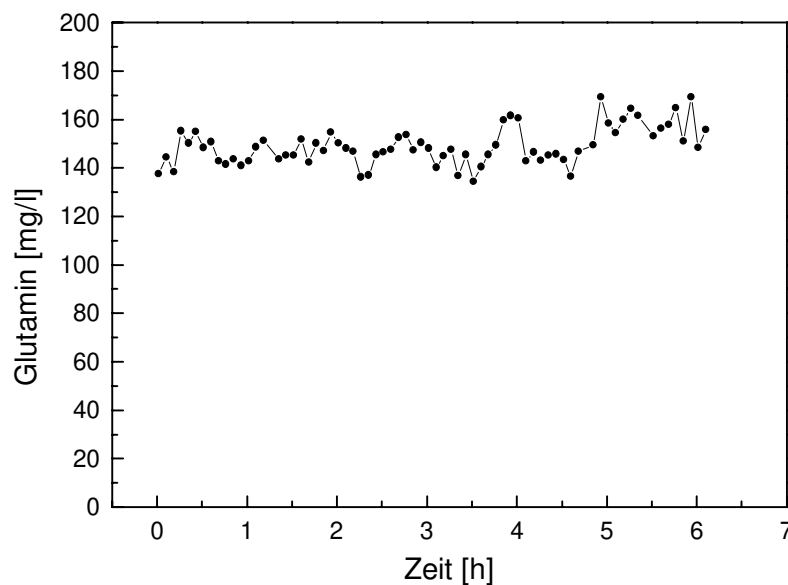


Abb.6.7 Langzeitstabilität des Systems [RIESEBERG, 1997]

Es sind weder eine abfallende oder ansteigende Tendenz der Werte noch periodische sondern lediglich statistische Schwankungen zu erkennen. Der relative Fehler ist mit 2,6% sehr klein. Das System arbeitet stabil und es erfolgt keine Abnahme der Enzymaktivität. Ein Nachkalibrieren ist in dem gewählten Meßzeitraum nicht erforderlich. Die Methode eignet sich somit prinzipiell zur On line Glutaminbestimmung an einer Kultivierung, wobei sich der Einfluß der sehr komplexen Tierzellmedien auf die Enzymstabilität an dieser Stelle noch nicht abschätzen läßt.

6.4 Erweitertes System mit Ammonium Entfernung

Die bisher beschriebene Methode eignet sich nur zur Glutaminbestimmung von ammoniumfreien Proben, da es andernfalls zu erhöhten Werten kommt. Da Ammonium jedoch in Form gelöster Salze in nahezu allen Fermentationsmedium enthalten ist oder im Verlauf einer Fermentation als Stoffwechselprodukt gebildet wird, muß eine Möglichkeit gefunden werden, seinen störenden Einfluß auszuschließen. Eine Variante wäre die Messung mittels eines Referenzkanals ohne Enzymkartusche, in dem bereits vorhandenes Ammonium detektiert und anschließend vom Gesamtsignal des Glutaminkanals subtrahiert wird. Ein Problem ist dabei der in der Regel sehr hohe Gehalt bereits im Medium vorhandenen Ammoniums im Verhältnis zum während der enzymatischen Umsetzung gebildeten Ammoniums. Aus diesem Grund liefert der

Ammoniumkanal sehr hohe Signale, wobei die Indikatorkapazität sehr schnell erschöpft ist, ein vollständiger Farbumschlag erfolgt und eine Unterscheidung verschiedener Konzentrationen unmöglich wird. Die Verwendung einer Membran mit kleinerer Austauschfläche scheidet aus, da dadurch die aus der Umsetzung des Glutamins resultierenden Signale sehr niedrig und die Ungenauigkeit der Messung sehr hoch wird. Durch die Verwendung unterschiedlicher Dialysemembranen sind beide Kanäle nicht mehr miteinander vergleichbar, so daß eine Subtraktion der Rohwerte nicht möglich ist.

Aus den genannten Gründen wurde anstattdessen eine andere Möglichkeit, nämlich die präventive Entfernung des bereits vorhandenen Ammoniums durch Umwandlung in Ammoniak mit anschließender Ausgasung realisiert. Der Aufbau des Systems sowie verschiedene Versuche zur Optimierung werden im folgenden beschrieben.

6.4.1 Systemaufbau und Funktionsweise

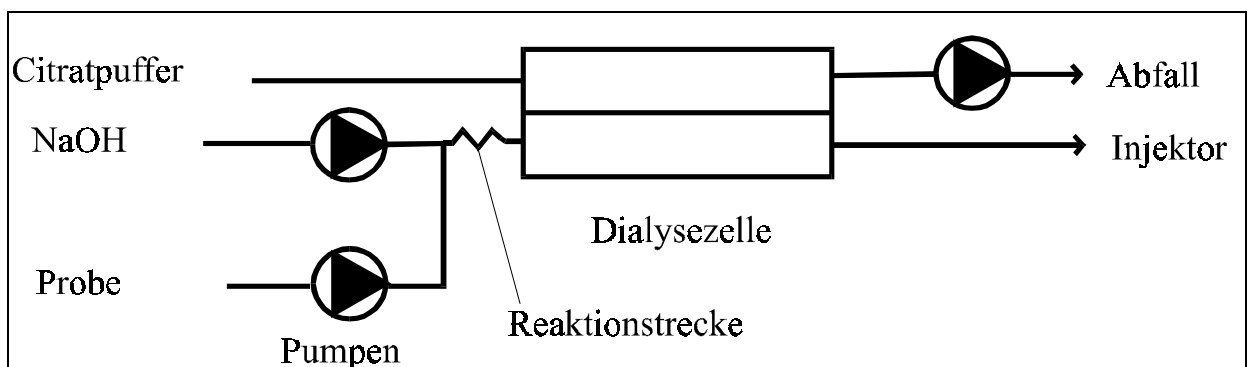


Abb.6.8 Schematischer Aufbau des Systems zur Ammoniumentfernung

Der Probenstrom wird über ein T-Stück mit 50mM Natronlauge vermischt. Das dabei gebildete Ammoniak entweicht über eine Polypropylenmembran (Typ PP2EHF, Akzo Nobel), in einen Citratpufferstrom, wo es wieder zu Ammonium reagiert und aus dem Gleichgewicht entfernt wird.

Es wurde eine Dialysezelle (Werkstatt des TCI) mit sehr großer Austauschfläche (25,2 cm²) verwendet (s. Anhang), um eine möglichst vollständige Entgasung zu erreichen. Die Zelle wurde im Gegenstromverfahren betrieben.

Für die Reaktionstrecke hinter dem T-Stück wurde Teflonschlauch (Länge=50 cm, ID=0,8 mm) verwendet, die Volumenströme der Probe sowie des Citratpuffers betragen 0,3 ml/min.

6.4.2 Konzentration des Citratpuffers und der Natronlauge

Die Konzentrationen des Citratpuffers sowie der Natronlauge sollten hinsichtlich einer möglichst vollständigen Entgasung optimiert werden. Dazu wurden zunächst verschiedene Citratkonzentrationen bei konstanter Natronlaugekonzentration (50 mM) getestet. Die Messungen erfolgten mit Standards im Konzentrationsbereich zwischen 2 und 10mM Ammonium.

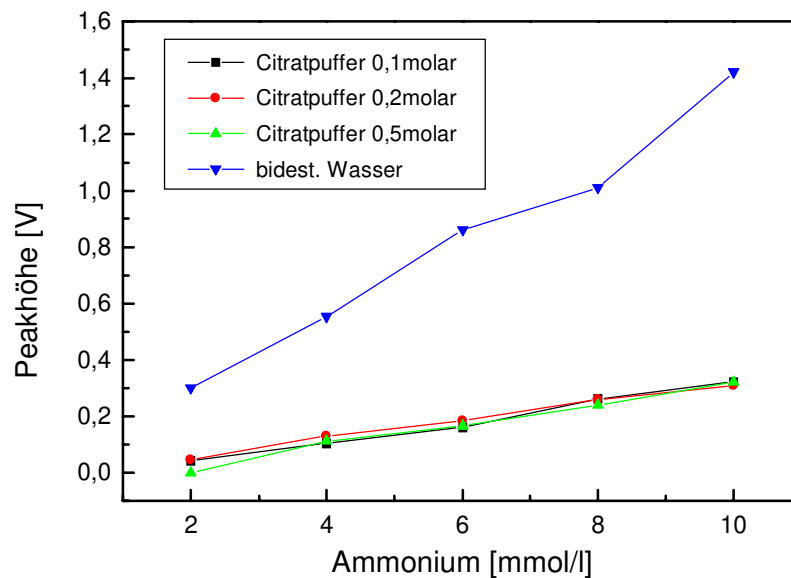


Abb. 6.9 Ammoniumentfernung in Abhängigkeit von der Citratpufferkonzentration [RIESEBERG, 1997]

Anhand der Grafik wird deutlich, daß die Qualität der Entgasung im Bereich 0,1-0,5M unabhängig von der Citratpufferkonzentration ist, so daß für alle weiteren Versuche der auch im Glutamin Kanal verwendete 0,1M Citratpuffer benutzt werden konnte. Bidest. Wasser eignet sich hingegen nicht als Akzeptorstrom, da die Entgasung unzureichend ist und man sehr hohe Störsignale erhält. Der Grund dafür ist der unvollständige Übergang des gebildeten Ammoniaks durch die Membran, da es von bidest. Wasser nur unzureichend aus dem Gleichgewicht entfernt wird.

Zur Untersuchung der Ausgasung in Abhängigkeit von der Natronlaugenkonzentration wurde diese zwischen 0 und 100mM variiert und pro Konzentration eine Dreifachmessung verschiedener Ammoniumstandards durchgeführt.

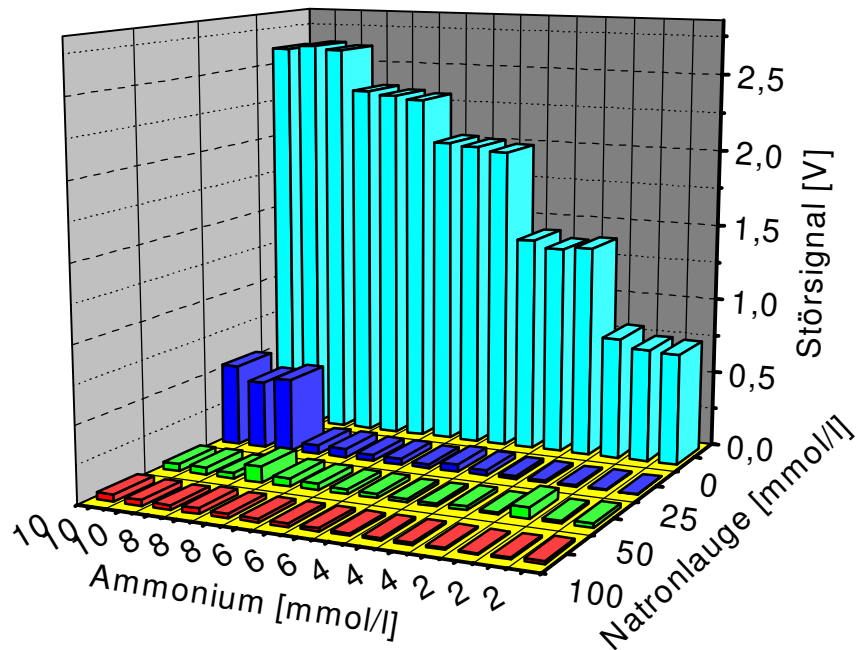


Abb. 6.10 Ammoniumentfernung in Abhängigkeit von der Natronlaugenkonzentration [RIESEBERG, 1997]

Anhand der Grafik erkennt man, daß mit mindestens 50mM Natronlauge gearbeitet werden muß, um eine nahezu vollständige Entgasung zu erzielen. Die verbleibenden Störsignale von maximal 50 mV sind vernachlässigbar klein, da sie bereits in den Rauschbereich des Detektors fallen. Alle weiteren Messungen wurden daher mit 50mM Natronlauge durchgeführt, denn eine unnötig hohe Basizität begünstigt die Hydrolyse des Glutamins.

6.4.3 Messung von Glutaminstandards mit Ammoniumentfernung

Nach der voneinander unabhängigen Optimierung der eigentliche Glutaminanalytik sowie der Ammoniumentgasung, wurde im Anschluß daran das System als ganzes untersucht. Um zu überprüfen, ob der Ammoniumgehalt der Probe einen Einfluß auf das Ergebnis der Glutaminbestimmung hat, wurden Glutaminstandards mit unterschiedlichen Ammoniumgehalten vermessen und die Signalhöhen miteinander verglichen.

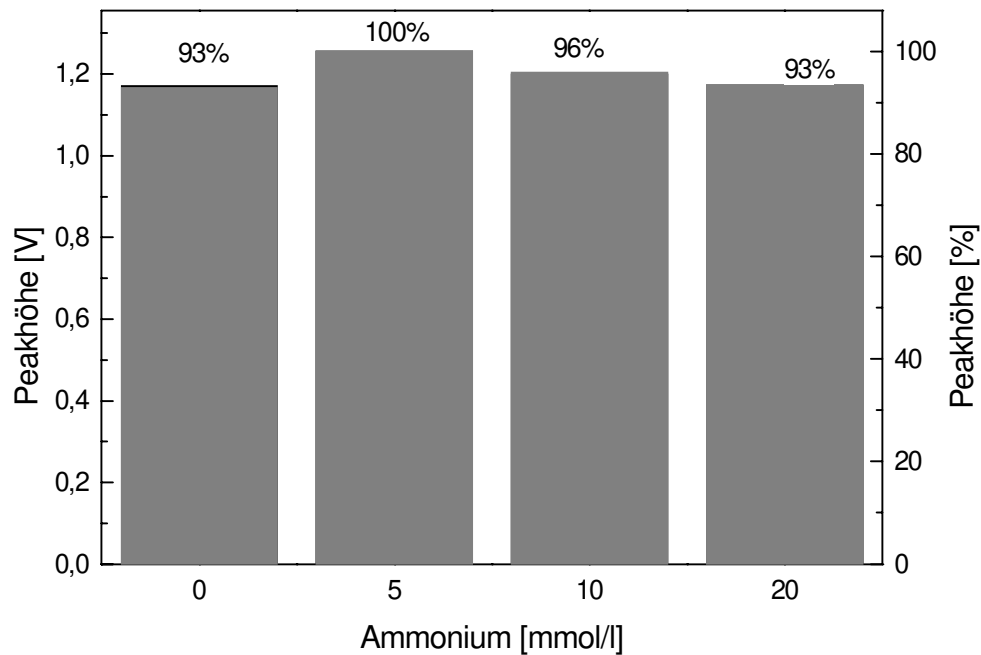


Abb. 6.11 Einfluß verschiedener Ammoniumgehalte auf die Signalhöhen

Meßbedingungen: FIA-System mit Ammoniumentfernung mit 20 U Glutaminase Kartusche, Probenvolumen = 65 µl, Glutaminkonz.= 250 mg/l; ansonsten gelten die optimierten Parameter

Es ist zu sehen, daß die Signalhöhen konstant und unabhängig vom Ammoniumgehalt der Probe sind. Die Entfernung des Ammoniuns erfolgt unter den gegebenen Bedingungen somit quantitativ.

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden vier Kalibrationen mit Glutaminstandards unterschiedlichen Ammoniumgehaltes durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt die folgende Grafik bzw. Tabelle.

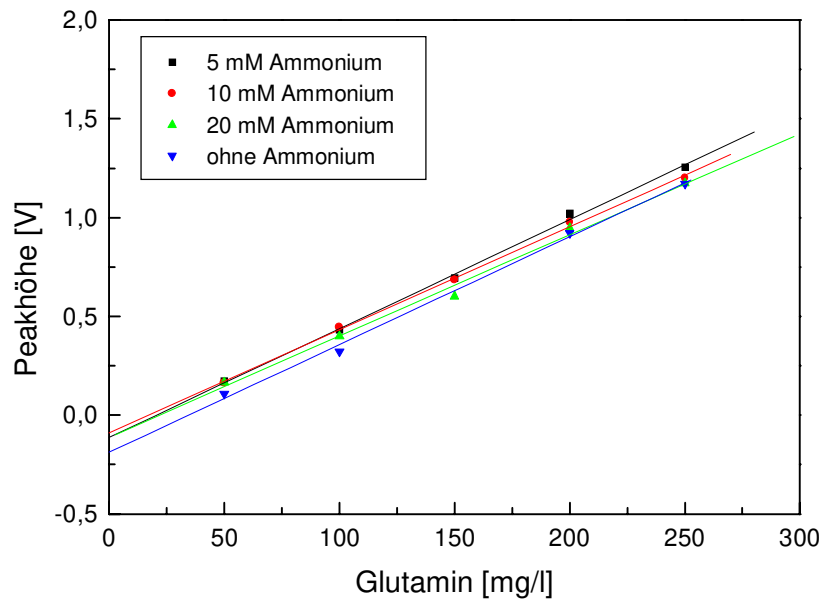


Abb. 6.12 Kalibriergeraden in Abhängigkeit vom Ammoniumgehalt der Glutaminstandards

Meßbedingungen: s. Abb. 6.10

Ammonium [mmol/l]	Steigung	Korrelationskoeffizient
0	0,00546	0,9985
5	0,00522	0,9990
10	0,00522	0,9993
20	0,00512	0,9965

Tabelle 6.3 Kenndaten der Kalibriergeraden

Die Verläufe aller Kalibriergeraden sind nahezu identisch und unabhängig vom Ammoniumgehalt der Standards. Unter den genannten Bedingungen eignet sich die Anlage somit auch zur Bestimmung ammoniumhaltiger Proben und kann zur Bestimmung von Glutamin in komplexen Kultivierungsmedien eingesetzt werden.

6.4.4 Prozeßregelung am Beispiel einer simulierten Fermentation

Mit jeder On line Analytik verfolgt man letztendlich das Ziel, anhand der erhaltenen Daten den Prozeß kontinuierlich zu überwachen und zu regeln. Die Regelung zielt darauf ab, den Zellen insgesamt ein optimales Milieu für Wachstum und Produktbildung zur Verfügung zu stellen und Störungen jeglicher Art auszugleichen. Die Aufgabe der Regelung während eines Prozesses besteht entweder darin, eine vorgegebene Größe, die sich aufgrund von Störeinflüssen ändern kann, auf einen gewünschten Wert zu bringen und diesen Wert zu halten oder die vorgegebene Größe ständig an eine sich ändernde Größe anzupassen. Die erstgenannte Art einer Regelung

nennt man Störgrößenregelung, die zweite Nachlaufregelung. Bei der Regelung eines Prozesses wird die zu regelnde Ausgangsgröße (Regelgröße; z.B. Temperatur, pH-Wert) ständig gemessen und mit einem vorgegebenen Sollwert (Führungsgröße) verglichen. Der Prozeß wird durch die Regelung dahingehend beeinflusst, daß möglichst die Differenz von gewünschtem Sollwert zu Regelwert null wird. Diese Differenz wird als Regeldifferenz oder Sollwertabweichung, der Wert der Regelgröße als Istwert bezeichnet. Die Größe mit der der Prozeß über eine Stelleinrichtung (Stellglied) beeinflusst wird, heißt Stellgröße. Weicht die Regeldifferenz von Null ab, d.h. sind der Istwert und der Sollwert unterschiedlich aufgrund von Störungen oder der gezielten Änderung des Sollwerts, so wird der Regler über das Stellglied so auf die Regelstrecke (den Prozeß) einwirken, daß der Istwert der Regelgröße sich dem Sollwert der Führungsgröße nähert.

Die Bestimmung eines aktuellen Stellwerts und seine Einstellung am Stellglied kann manuell oder mit einem entsprechenden Gerät durchgeführt werden. Werden die mit einem Sensor ermittelten Istwerte der Regelgröße per Computer erfaßt, in dem auch der Regelalgorithmus implementiert und ausgeführt wird, so nennt man diesen Regler auch Abtastregler bzw. digitalen Regler. Beim Abtasten der Meßwerte wird ein Analog-Digital-Wandler verwendet, der ein analoges Eingangssignal in ein digitales Ausgangssignal umsetzt und dies dem Computer zu Verfügung stellt.

Zur Regelung der Glutaminkonzentration im Verlauf einer simulierten Fermentation wurde in die Automatisierungssoftware CAFCA ein Algorithmus in Form eines digitalisierten PID Reglers (**p**roportional **i**ntegral **d**erivative) implementiert. Dieser basiert auf folgender Gleichung:

$$u(t) = K \left[e(t) + \frac{1}{T_I} \int_0^t e(\tau) d\tau + T_D \frac{de(t)}{dt} \right]$$

$u(t)$ ist der Stellwert, $e(t)$ die Regeldifferenz. Die Regelparameter dieser Gleichung werden wie folgt bezeichnet:

K = Verstärkungsfaktor
 T_I = Nachstellzeit
 T_D = Vorhaltezeit

Zur Durchführung der simulierten Fermentation wurde der Reaktor mit einem Liter Glutaminstandardlösung mit einer Anfangskonzentration von 200 mg/l befüllt und eine

konstante Austauschrate von 0,4 ml/min eingestellt, was einer Verdünnungsrate von 0,58 Reaktorvolumen/Tag entspricht. Der Sollwert wurde auf 175 mg/l Glutamin gesetzt. Zur Nachfütterung diente eine 20mM Glutaminlösung, die bei Unterschreitung des Sollwerts automatisch über eine vom PID Regler gesteuerte Pumpe (Heraeus Pericolor CD 70) in den Reaktor gepumpt wurde. Abbildung 6.15 zeigt den Verlauf der Glutaminkonzentration über den gesamten Fermentationszeitraum von ca. 70 Stunden sowie die zugehörige Pumprate der Nachfütterungspumpe.

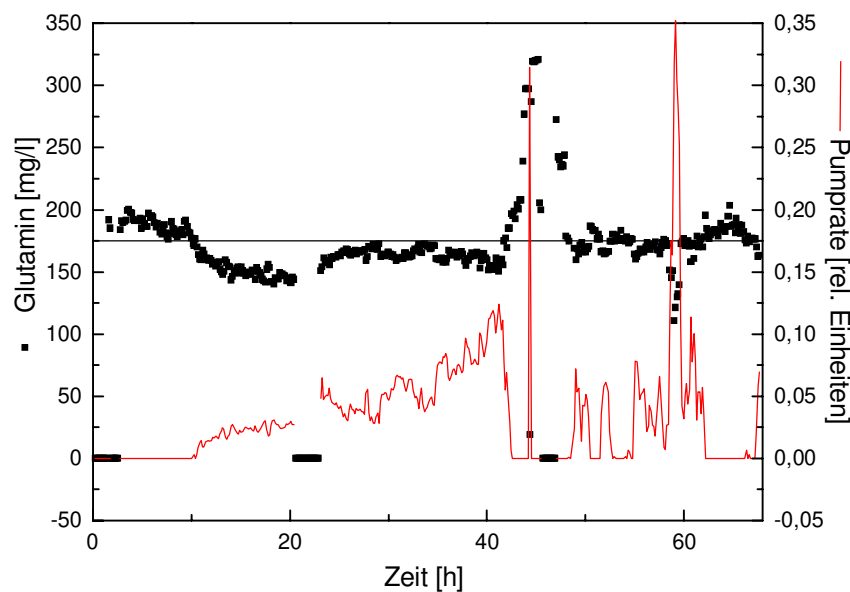


Abb. 6.13 Simulierte Fermentation mit Regelung der Glutaminkonzentration
Meßbedingungen: s.Text., optimiertes FIA-System mit Ammoniumentfernung

Während der ersten 10 Stunden erfolgte noch keine Verdünnung des Reaktorinhalts; die Glutaminkonzentration liegt konstant bei ca. 200 mg/l; eine Nachfütterung findet nicht statt. Ab der 10. Stunde fällt die Glutaminkonzentration unter den vorgegebenen Sollwert und die Nachfütterung beginnt. Es ist erkennbar, daß mit fallender Glutaminkonzentration die Pumprate zunächst entsprechend zunimmt, ab einem Gehalt von ca. 150 mg/l jedoch konstant bleibt und diese Konzentration gehalten wird. Der vorgegebene Sollwert von 175 mg/l wird nicht erreicht. Der Grund dafür sind die zu niedrig gewählten Verstärkungsfaktoren des PID Reglers. Nach deren Erhöhung und Neukalibrierung des Systems beobachtet man zwischen der 20. und 40. Stunde eine bessere Annäherung des Istwertes an den Sollwert. Trotz kontinuierlich zunehmender Pumprate kann der Wert von 175 mg/l nicht ganz erreicht werden. Zwischen der 42. und 50. Stunde trat eine durch eine verstopfte Membran bedingte Störung im FIA-System auf. Die dadurch stark erhöhten Werte führten zu einem Abfall der Pumprate

auf null. Nach dem Austausch der Membran wurde das System neu kalibriert und die Verstärkungsfaktoren nochmals erhöht. Während der folgenden 20 Stunden ist eine gute Übereinstimmung zwischen Ist- und Sollwert zu erkennen, die Regelung funktionierte hier zuverlässig.

Das Beispiel zeigt, daß mit Hilfe des aufgebauten FIA-Systems in Verbindung mit einem geeigneten in die Software CAFCA implementierten Regelalgorithmus eine Regelung der Glutaminkonzentration im Verlauf einer Fermentation möglich ist.

6.4.5 On line Messung am Bioprozeß

Am Ende der Entwicklung der Glutamin-FIA stand der Einsatz an einer Kultivierung von Säugerzellen. Die Kultivierung wurde am Institut für Technische Chemie im Arbeitskreis Kretzmer von Herrn Dr. Lübben durchgeführt. Bei der Zelllinie handelte es sich um rekombinante CHO (chinese hamster kidney) Zellen, die in einem 5 l Reaktor im fed-batch Betrieb kultiviert wurden. Ausführliche Angaben zu den Fermentationsbedingungen finden sich bei [LÜBBEN, 1997].

Die Probennahme erfolgte kontinuierlich über das ESIP Mikrofiltrationsmodul [HILMER, 1995] der Firma Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH mit einer Flußrate von 0,2 ml/min. Es handelt sich dabei um ein in situ Modul, das über den 19 mm Standardport direkt in den Reaktor eingeführt werden kann. Es enthält eine tubuläre Mikrofiltrationsmembran aus Polypropylen mit einer Porenweite von 0,2-0,6 µm, die als Sterilbarriere dient und vor Kontaminationen durch Mikroorganismen schützt. Der Verlauf der Glutaminkonzentration während der Kultivierung ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

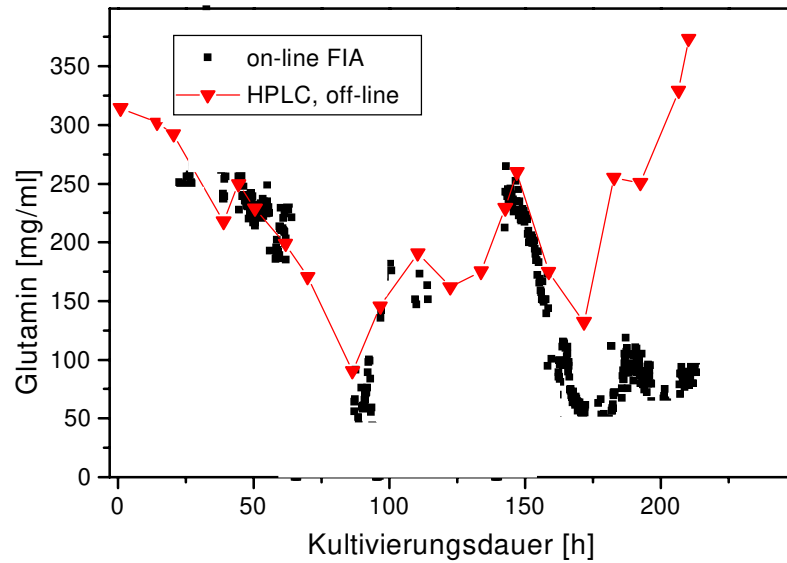


Abb. 6.14 On line Messung der Glutaminkonzentration während der Kultivierung von CHO Zellen [RIESEBERG, 1997]

Meßbedingungen: optimiertes FIA-System mit Ammoniumentfernung, 20 u Glutaminase Kartusche, Injektionsvolumen=65µl

Es ist zu erkennen, daß die On line gemessenen Werte gut mit den Off line mittels HPLC bestimmten Werten übereinstimmen. Innerhalb mehrerer Zeiträume konnten keine On line Daten aufgenommen werden konnten, da es zu Störungen im FIA-Systems kam. In den meisten Fällen waren diese Störungen durch Verstopfungen im Fließsystem oder der Dialysemembran bedingt. Die auftretenden Probleme konnten auch durch regelmäßiges Spülen der Anlage nicht zufriedenstellend gelöst werden.

Von anfänglich 320 mg/l nimmt die Glutaminkonzentration aufgrund der Verstoffwechslung durch die Zellen auf ca. 50 mg/l innerhalb der ersten 90 Stunden ab. Daraufhin wurde mit der kontinuierlichen Nachfütterung von Glutamin begonnen. Die Zunahme der Konzentration ließ sich gut On line verfolgen. Nach ca. 150 Stunden und bei einem Glutamingehalt im Medium von ca. 275 mg/l wurde die Nachfütterung wieder unterbrochen, was bei einer inzwischen sehr hohen Zelldichte von $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml zu einer raschen Abnahme der Glutaminkonzentration führte. Diese Abnahme konnte On line wiederum gut beobachtet werden, der aufgrund weiterer Zufütterung folgende Anstieg jedoch nicht mehr, da es zu diesem Zeitpunkt zur Verstopfung des Probennahmemoduls kam. Die viel zu niedrigen Werte am Ende der Fermentation veranschaulichen die Störung. Ein Austausch des Moduls ist während einer laufenden Fermentation nicht möglich, so daß die Messung abgebrochen werden mußte.

6.5 Zusammenfassung

Es wurde eine FIA Methode zur Bestimmung von L-Glutamin entwickelt und optimiert. Mit dem neuen Verfahren konnten Proben im Konzentrationsbereich zwischen 50 und 250 mg/l Glutamin bestimmt werden. In Mehrfachmessungen zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit einem relativen Fehler von 1,9%. Da Kultivierungsüberstände die Glutaminanalytik störendes Ammonium enthalten, wurde weiterhin ein System zur präventiven Entfernung des Ammoniums entwickelt und in die Glutamin-FIA integriert. Auf diese Weise konnte die Glutaminkonzentration von Proben mit Ammoniumgehalten bis zu 20mM störungsfrei bestimmt werden. Die aufgenommenen Kalibriergeraden weisen von der Ammoniumkonzentration unabhängige nahezu identische Verläufe auf. Beim abschließenden Einsatz an einer Fermentation von Säugerzellen konnten die Glutaminkonzentration zeitweise On line bestimmt werden, jedoch kam es mehrmals zur Verstopfung der Dialysemembranen, wodurch lange Ausfallzeiten entstanden. Die Lösung dieses Problems sollte im Vordergrund zukünftiger Untersuchungen stehen.

7 IMMUNANALYTIK

In Kapitel 2 wurde ein Überblick über eine Reihe immunchemischer Off- sowie On line Methoden gegeben und u.a. der von Reinecke entwickelte heterogene FIA-Immunoassay kurz beschrieben. In diesem Abschnitt wird die On line Produktbestimmung während eines chromatographischen Proteinaufreinigungsprozesses als ein neues Einsatzgebiet der Immun-FIA vorgestellt. Im Anschluß soll anhand zweier weiterentwickelter Assays gezeigt werden, daß sich sowohl durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen sowie enzymgebundener Antikörper eine Erhöhung der Sensitivität der Methode erzielen läßt.

7.1 Der heterogene Elutionsassay

7.1.1 Funktionsweise und Systemaufbau

Bei dem heterogenen Elutionsassay handelt es sich um einen in ein FIA-System implementierten nicht kompetitiven Immunoassay, in dem die gegen das zu bestimmende Antigen gerichteten Antikörper in einer Durchflußkartusche im Überschuß immobilisiert sind. Als Trägermaterialien wurden VA-Epoxy Biosynth oder cyanbromidaktivierte Sepharose 4B (Sigma) verwendet. In der folgenden Abbildung ist das Funktionsprinzip schematisch dargestellt.

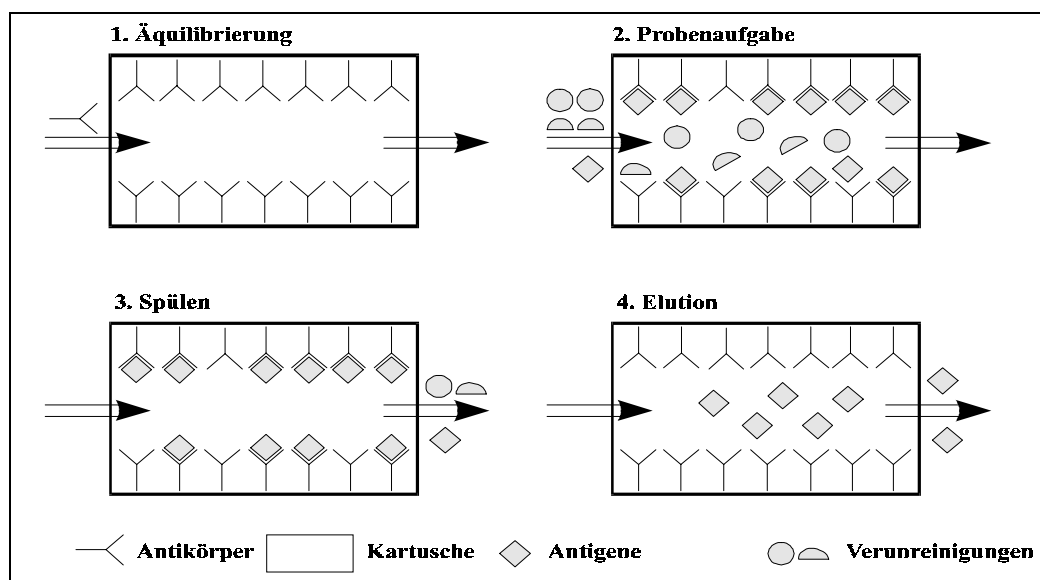


Abb. 7.1 Funktionsprinzip des heterogenen Elutionsassays

Nach der Injektion der Probe werden die darin enthaltenen Antigene quantitativ von den Antikörpern in der Kartusche gebunden. Alle anderen Probenbestandteile werden während des folgenden Spülzyklus ausgetragen. Im Anschluß daran wird durch Umschalten auf einen stark basischen Elutionspuffers die Antikörper-Antigen Bindung gelöst und die zu bestimmenden Analytmoleküle fluorimetrisch detektiert.

Der Systemaufbau sowie die während fast aller Messungen gültigen Systemparameter sind im folgenden dargestellt. Die Steuerung der Anlage sowie die Datenaufnahme erfolgte wie in allen bisherigen Untersuchungen voll automatisch über die Software CAFCA [HITZMANN, 1995].

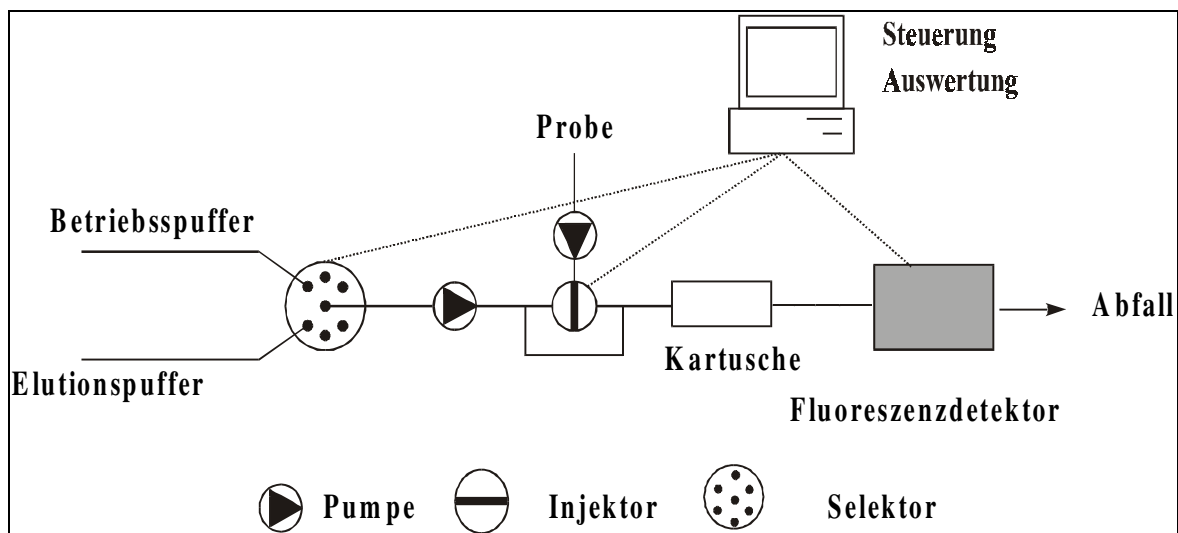


Abb. 7.2 Systemaufbau der heterogenen Immun-FIA

Betriebsspuffer	0,1 M KPP, pH=7,4
Elutionspuffer	0,1 M KPP pH=12,3
Probenvolumen	50-80 μ l
Volumenstrom	1 ml/min
Detektion bei	280 (Exc.)/340 (Em.) nm
Immobilisat	260 μ g AK auf 350 mg Sepharose 4B
Zykluszeit	6-8 Minuten

Tabelle 7.1 Meßbedingungen der Immun-FIA

7.1.3 On line Überwachung eines Downstream-Prozesses

Der heterogene FIA-Immunoassay wurde ursprünglich zur schnellen vollautomatisierten On- und Off line Bestimmung der Produktkonzentration in Tierzellkultivierungsüberständen entwickelt. In diesem Kapitel soll ein neues Einsatzgebiet des Assays vorgestellt werden, und zwar die chromatographische Proteinaufreinigung. Es war das Ziel, mit Hilfe der direkt an den Downstream-Prozeß angekoppelten FIA wichtige Sofortinformationen über den Verlauf der Trennung, insbesondere über die Reinheit der einzelnen Produktfraktionen zu bekommen. Aufgrund dieser zusätzlichen Daten kann eine Optimierung des Aufreinigungsprozesses erfolgen.

7.1.3.1 Aufbau und Versuchsdurchführung

Es wurden zwei Proteingemische mit unterschiedlicher Zusammensetzung im Laufmittel gelöst und auf die Säule gegeben. Die Trennung erfolgte auf einer Gelfiltrationssäule (Bettvolumen: 300 ml; Länge: 90 cm; Innendurchmesser: 4 cm; Medium: Sephacryl S-100, Pharmacia). Als Laufmittel wurde 0,1M KPP (pH 7,4) mit einer Flußrate von 0,5 ml/min verwendet. Der Prozeß wurde photometrisch bei 280 nm mit einem im Bypass installierten Durchflußphotometer (Uvicord II; LKB) verfolgt. In die Immun-FIA wurden über ein sich direkt hinter dem Photometer befindlichen Injektionsventil jeweils alle sechs Minuten 50 µl aus dem Eluatstrom der Säule injiziert und die Produktkonzentration bestimmt.

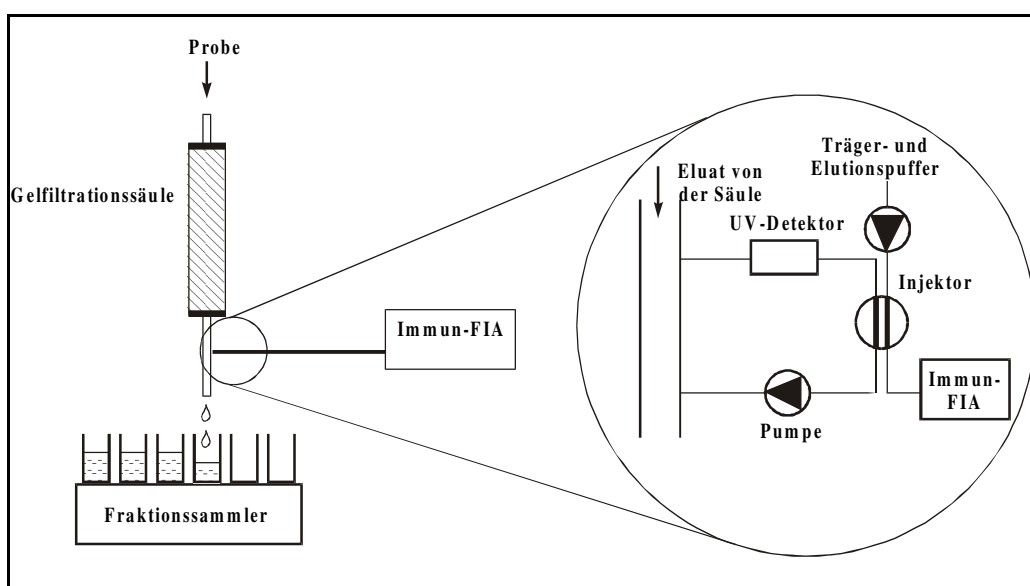


Abb. 7.3 Kopplung der Immun-FIA an einen Downstream-Prozeß

7.1.3.2 Aufreinigung von r-AT III

Das Glycoprotein AT III (Antithrombin III) hat ein Molekulargewicht von ca. 65 000 Dalton mit einem Kohlenhydratanteil von 10-15%. Es gehört zur Klasse der Serinprotease-Inhibitoren und inhibiert die Faktoren XIIa, XIa, Xa und XIa der Blutgerinnungskaskade sowie Thrombin [GRIFFITH, 1986]. Das Enzym Thrombin spaltet Fibrinogen in Fibrinmonomere, die sich spontan zu faserförmigen Strukturen, dem Fibrin, vernetzen. Dies ist zusammen mit den Thrombozyten für den Verschluss einer Wunde verantwortlich. AT III liegt im Blutplasma in einer Konzentration von ca. 2 $\mu\text{mol/l}$ vor [FRANZEN, 1980] und bei einem Mangel besteht ein erhöhtes Thromboserisiko [THALER, 1985]. AT III wird in der Medizin u.a. nach operativen Eingriffen und zur Behandlung von Thrombosen eingesetzt. Das biotechnologisch hergestellte rekombinante AT III wurde zusammen mit den polyklonalen anti-AT III Antikörpern von den Behringwerken, Marburg zur Verfügung gestellt.

Das der Trennung zugrunde liegende Chromatogramm ist in Abbildung 7.4 dargestellt. r-AT III lag in dem Gemisch zusammen mit fünf anderen in der Legende aufgeführten Proteinen vor.

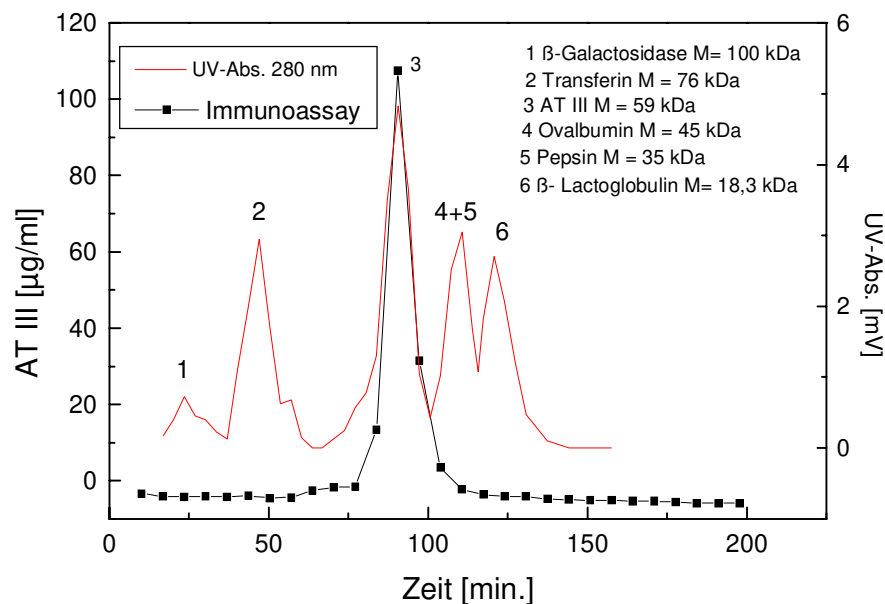


Abb. 7.4 Chromatogramm und FIA Meßwerte eines AT III-haltigen Proteingemisches

Der Produktpeak läßt sich anhand der FIA Daten eindeutig zuordnen, so daß die entsprechenden Fraktionen gezielt aufgefangen werden können.

Weitere Informationen über die Reinheit der Produktfraktionen erhält man durch den Vergleich der Flächen von Spül- und Elutionspeaks im Signalverlauf der FIA im Zeitraum der r-AT III Elution. Im Falle einer idealen Trennung sollte ein hoher Elutionspeak sowie kein bzw. ein nur sehr kleiner Spülpeak zu beobachten sein. In der folgenden Abbildung sind die entsprechenden FIA Signale dargestellt.

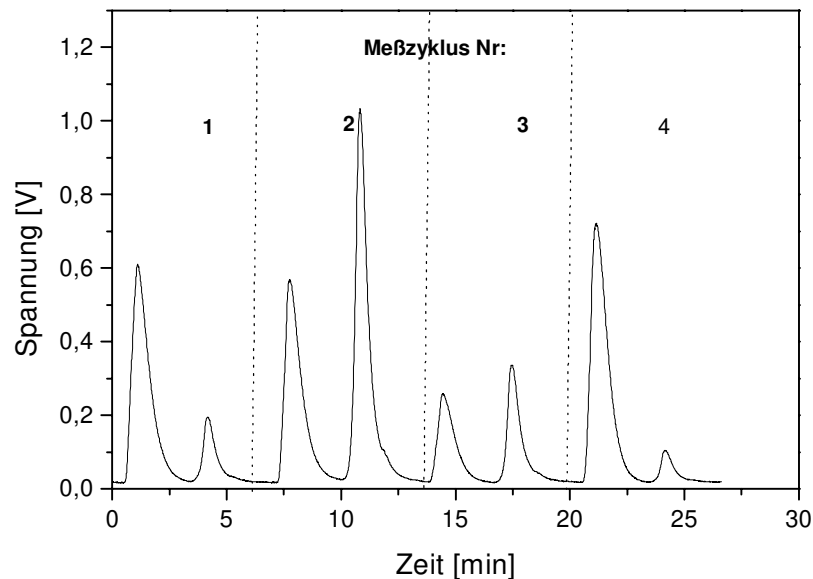


Abb.7.5 Signalverläufe aufeinanderfolgender Analysenzyklen im Zeitraum der r-AT III Elution

Es wird deutlich, daß in allen Produktfraktionen ein mehr oder weniger hoher Anteil an Fremdproteinen enthalten ist. Selbst zum Zeitpunkt der höchsten r-AT III Konzentration im Eluat der Säule (Meßzyklus Nr.2) beträgt dieser Fremdanteil - bestimmt aus dem Flächenverhältnis von Spül- und Elutionspeak - noch ca. 60-70% des Produktgehaltes.

Informationen über den Anteil an Produkt bzw. Verunreinigungen im Eluat über den gesamten Prozeßverlauf erhält man durch die Auftragung der Flächen aller Spül- und Elutionssignale über diesen Zeitraum (Abb. 7.6).

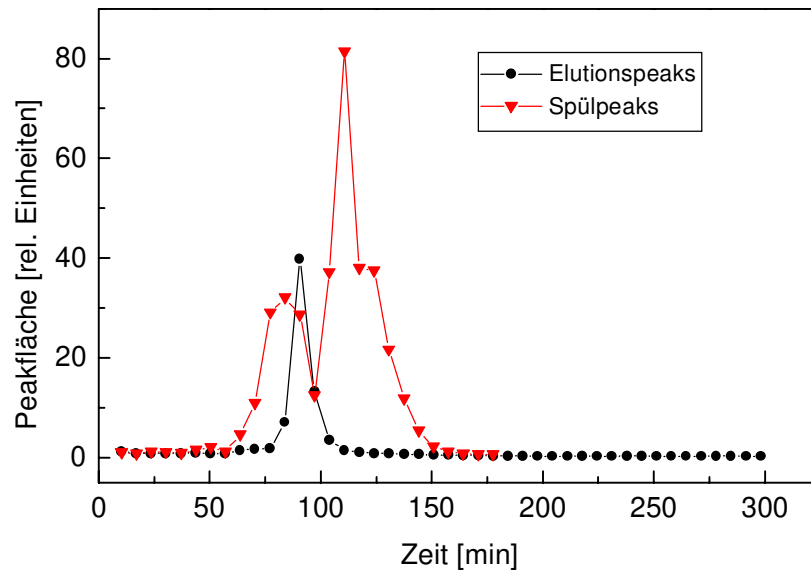


Abb.7.6 Flächen von Spül- und Elutionspeaks über den gesamten Prozeßzeitraum

Es ist zu erkennen, daß unter den gewählten Bedingungen keine zufriedenstellende Abtrennung des AT III von den restlichen Proteinen erreicht werden kann. Die Produktfraktionen enthalten zu jedem Zeitpunkt noch einen hohen Anteil an anderen Proteinen.

Dieses Beispiel zeigt, daß mit Hilfe des Immunoassays zusätzliche Informationen über die Qualität einer Trennung gewonnen werden können. Eine zunächst im Verlauf des Chromatogramms durch UV Detektion nicht sichtbare Überlagerung mehrerer Fraktionen kann anhand der FIA Daten eindeutig erkannt werden.

7.1.3.3 Aufreinigung von rt-PA

t-PA (recombinant tissue type Plasminogen Activator) ist ein einkettiges Glycoprotein mit einer Molekülmass von 65 000 Dalton. [BACHMANN, 1984]. t-PA ist im menschlichen Blutplasma in einer Konzentration von 5 ng/ml enthalten. Es gehört zu den Serinproteasen und spielt eine wichtige Rolle in der Fibrinolyse, bei der vernetztes Fibrin zu kleinen Spaltprodukten abgebaut wird. t-PA findet in der Medizin als Therapeutikum gegen thrombotische Verschlüsse z.B. der Koronararterie Anwendung [COLLEN, 1980]. Es wird von der Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach a.d. Riss mit rekombinanten CHO-Zellen großtechnisch hergestellt und unter dem Namen Actilyse vertrieben.

In der Kartusche wurden polyklonale Antikörper TD 27/4 gegen rt-PA immobilisiert, die wie die Actilyse von der Firma Thomae zur Verfügung gestellt wurden.

Zunächst wurde ein rt-PA-haltiges Proteingemisch auf die Säule gegeben und das Chromatogramm sowie der FIA Signalverlauf wiederum On line aufgezeichnet. Im Anschluß daran wurde der Prozeß unter den gleichen Bedingungen mit einem rt-PA freien Proteingemisch ansonsten gleicher Zusammensetzung sowie mit einem reinen rt-PA Standard wiederholt. Auf diese Weise sollte die mit der Immun-FIA bestimmte Retentionszeit für rt-PA überprüft sowie mögliche Querempfindlichkeiten erkannt werden.

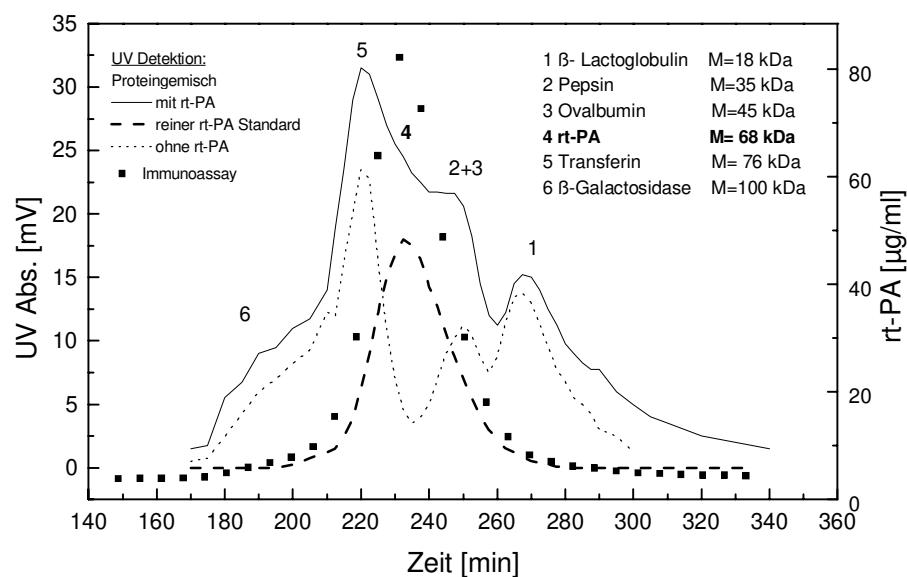


Abb. 7.7 Chromatogramme und FIA Meßverlauf eines rt-PA haltigen Proteingemisches

Aus dem UV Spektrum kann die Retentionszeit von rt-PA aufgrund von Überlagerungen mit Signalen anderer Proteine – insbesondere von Transferrin – nicht eindeutig erkannt werden. Erst die FIA Daten zeigen, daß die Elution zwischen der 210. und 260. Minute stattfindet. Dieses Ergebnis stimmt sehr genau mit den anhand des rt-PA Standards sowie des rt-PA freien Proteingemisches über UV Detektion gewonnenen Daten überein (Maxima und Minima liegen übereinander).

Die Richtigkeit der Bestimmung der Retentionszeit des Zielproteins mit der Immun-FIA unter Ausschluß von Querempfindlichkeiten konnte anhand dieses Beispiels bewiesen werden.

7.1.3.4 Zusammenfassung

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß sich die Immun FIA zur Ankopplung an Downstream-Prozesse zur Proteinaufreinigung eignet. Auf diese Weise können bereits während der laufenden Trennung On line wichtige Informationen bzgl. der Retentionszeit des Produktes sowie der Reinheit der einzelnen Fraktionen gewonnen werden. Dies ermöglicht es dem Anwender, optimale Schnitte zwischen den Fraktionen vorzunehmen und somit eine möglichst hohe Reinheit des Endproduktes zu erzielen.

7.2 Immunoassay mit enzymatischer Verstärkungsreaktion

Das Ziel der in diesem Kapitel durchgeführten Untersuchungen war die Weiterentwicklung des heterogenen Immunoassays in Hinblick auf eine Erhöhung der Sensitivität. Dazu sollte entsprechend eines Sandwich-ELISA ein Immunkomplex aus Antikörper, Antigen sowie enzymmarkiertem Antikörper in der Kartusche generiert und nach der Injektion eines Substrats das Reaktionsprodukt der enzymatischen Umsetzung photometrisch detektiert werden.

7.2.1 Vorversuche mit zwei Immunpartnern

Zunächst wurde untersucht, ob sich die gewählte enzymatische Reaktion im FIA-System durchführen und photometrisch nachweisen läßt. Als Markierungsenzym wurde Meerrettichperoxidase (HRP), gekoppelt an anti-rabbit IgG als kommerziell erhältliches Konjugat (Sigma) eingesetzt. Zu Testzwecken wurde anfangs ein stark vereinfachtes System mit nur zwei Immunbindungspartnern verwendet. Das anti-rabbit-IgG-HRP Konjugat diente dabei als Probenantigen, das an die in der Kartusche immobilisierten Antikörper (rabbit-IgG) bindet. Als Substrat wurde der häufig in enzymatischen Tests gebräuchliche Redoxindikator 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS) [MATTENHEIMER, 1986; BERGMAYER, 1974] in Verbindung mit H₂O₂ benutzt. In der Detektionsreaktion wird das Wasserstoffperoxid unter Katalyse der Peroxidase reduziert während ABTS zum blaugrünen Radikalkation oxidiert wird.



Das Absorptionsspektrum des Kations zeigt bei 425 nm im Gegensatz zur farblosen reduzierten Form eine deutliche Absorptionsbande [WERNER, 1970], so daß der Nachweis bei dieser Wellenlänge erfolgen kann. ABTS zeichnet sich durch eine hohe Stabilität der oxidierten Form sowie seine physiologische Unbedenklichkeit aus [GAWERU, 1970].

Es werden 300 µg rabbit IgG (Sigma) unter Standardbedingungen auf cyanbromid-aktivierter Sepharose 4B in einer Kartusche immobilisiert. Das verwendete FIA-System sowie die eingestellten Meßbedingungen sind im folgenden gezeigt.

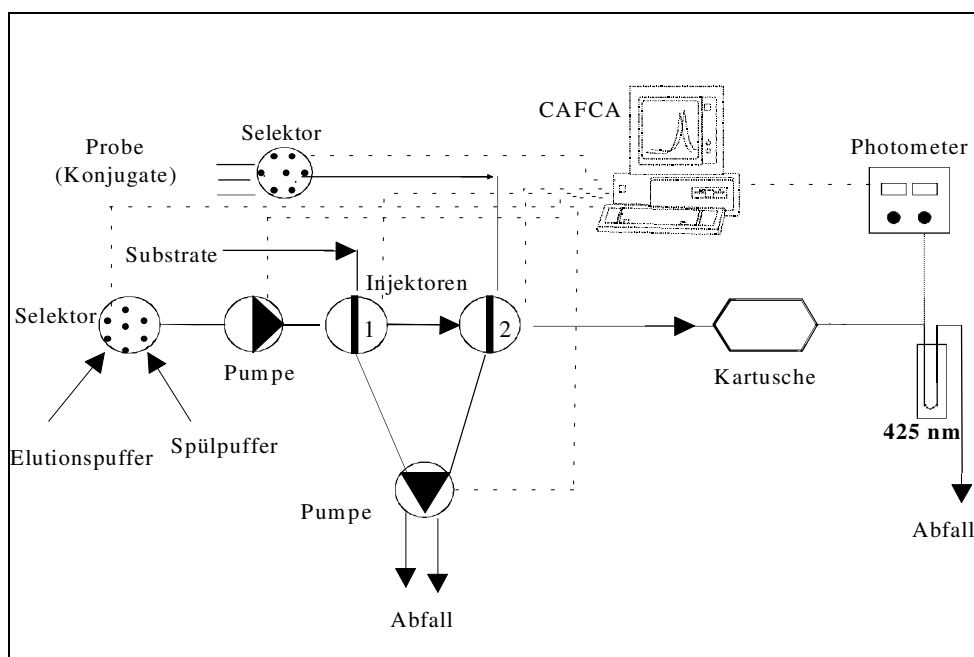


Abb.7.8 Schematischer Aufbau des FIA-Systems

Betriebspuffer	0,1 M KPP, pH=7,4
Elutionspuffer	0,1 M Glycin/HCl, pH=2,0
Probenvolumen	160 µl,
Substratvolumen	340 µl
Substrat	1,33 g/l ABTS + 3 g/l H ₂ O ₂
Volumenstrom	1,2 ml/min
Zykluszeit	12 Minuten

Tabelle 7.2 Meßbedingungen der Anlage 1

Nach der Injektion des IgG-Peroxidase Konjugats über Selektor 2 und fünfminütigem Spülen erfolgt die Aufgabe der Substratlösung über Injektor 1 mit anschließender Detektion der Reaktionsprodukte über einen Zeitraum von drei Minuten. Nach

vierminütiger Elution der Konjugate und Äquilibrierung kann die nächste Messung beginnen.

Zunächst sollte untersucht werden, ob die enzymatische Umsetzung unter den gewählten Bedingungen abläuft und ob bei einer Erhöhung der Konjugatmenge in der Kartusche und somit auch der Enzymaktivität eine Steigerung der Meßsignale zu beobachten ist. Dazu wurden wiederholt IgG-HRP Konjugat (5U/ml HRP) injiziert ohne im Anschluß daran zu eluieren.

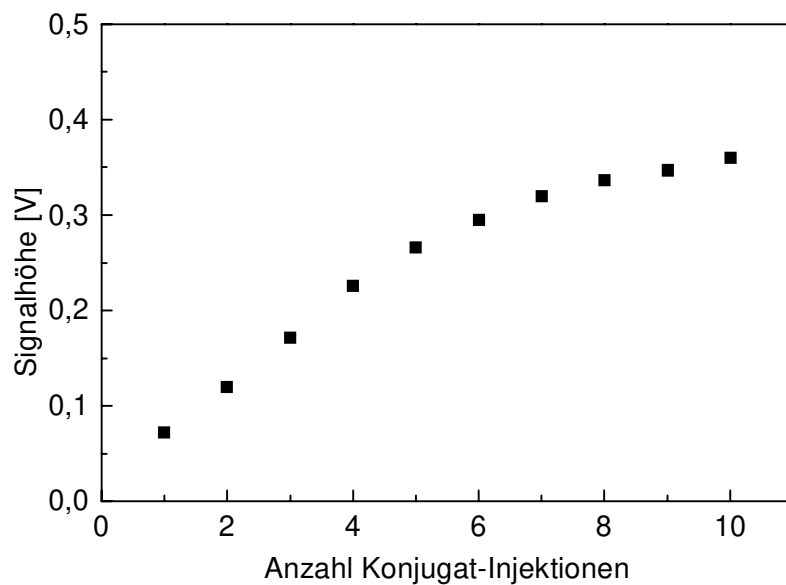


Abb. 7.9 Abhängigkeit der Signalhöhe von der eingesetzten Konjugatmenge

Es ist ein deutlicher Anstieg der Signale mit zunehmender Konjugatmenge zu beobachten. Nach der achten Injektion nähern sich die Meßwerte einem Grenzwert, was vermutlich auf eine vollständige Belegung der Bindungsplätze in der Kartusche zurückzuführen ist. Da es vom Hersteller keine Angaben zur Antikörperkonzentration in der Konjugatlösung gibt, muß auf eine weitere Diskussion diesbezüglich verzichtet werden. Ein wichtiges Erkenntnis ist jedoch, daß offensichtlich keine unspezifische Bindung der Konjugate an die Trägermatrix stattfindet, da andernfalls ein weiterer Anstieg der Meßsignale hätte beobachtet werden müssen.

Als nächstes wurde eine Kalibrierung mit verschiedenen IgG-HRP Standards durchgeführt.

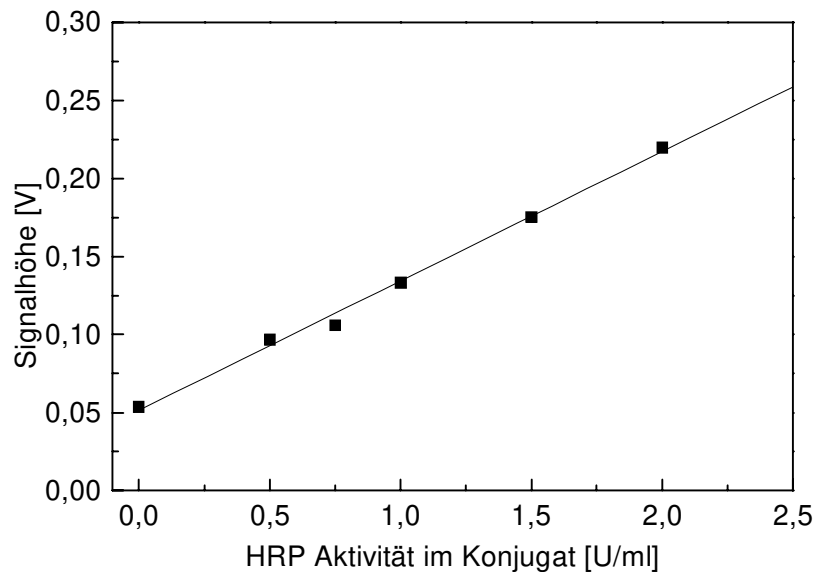


Abb. 7.10 Kalibration mit unterschiedlichen Konjugatkonzentrationen

Die Kalibriergerade zeigt einen guten linearen Verlauf. Weiterhin ist zu sehen, daß aus der Injektion von bidest. Wasser nur ein sehr kleiner Blindwert resultiert. Dies deutet auf eine nahezu vollständige Elution der gebundenen Konjugate hin.

Insgesamt sind die mit dem stark vereinfachten immunologischen System rabbit-IgG/anti-rabbit-IgG-HRP erzielten Ergebnisse vielversprechend im Hinblick auf weiterer Untersuchungen unter Generierung eines aus drei Immunkomponenten bestehenden Sandwiches.

7.2.2 Sandwich-ELISA-FIA zur Bestimmung von Antikörpern

Als Modellreaktion zur Generierung eines Sandwich ELISA im FIA-System wurde die Bindung von rabbit-IgG (Sigma) an Protein G und anschließender Markierung mit an Protein A gekoppelter HRP untersucht. Protein G und A sind Oberflächenproteine aus den Zellwänden von *Streptococcus spec.* bzw. *Staphylococcus aureus* [AKERSTRÖM, 1986]. Sie haben ein Molekulargewicht von 63 bzw. 50 kDa und besitzen am carboxyterminalen Ende mehrere Fc-spezifische Bindungsstellen [NYGREN, 1988]. Während Protein G an alle IgG Klassen und Unterklassen bindet besitzt Protein A keine Affinität gegenüber Human-IgG3, Ziegen- und Ratten-IgG [KRONVALL, 1969; MEDGEYSI, 1978].

Das Funktionsprinzip des Assays ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

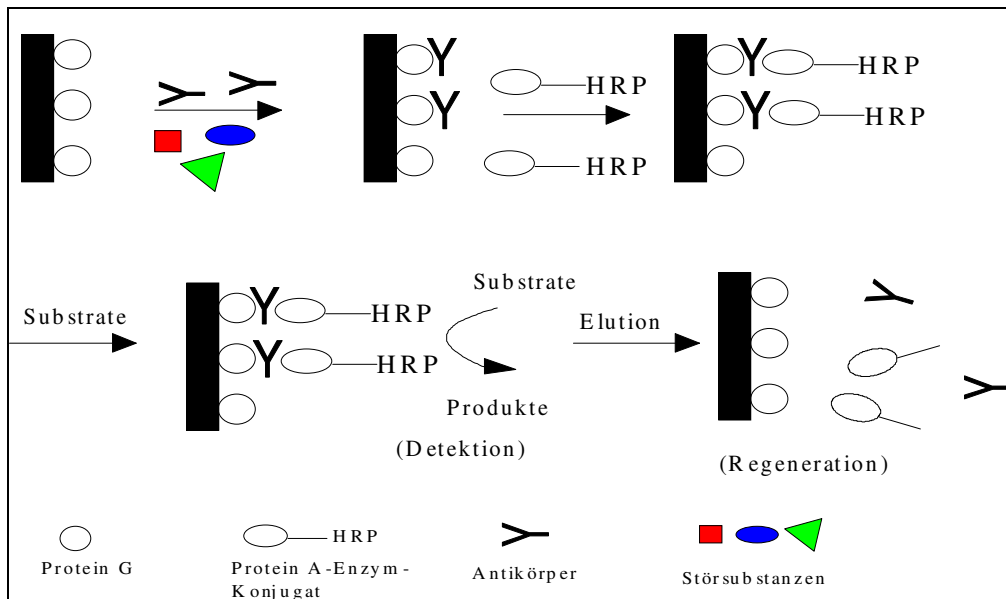


Abb. 7.11 Funktionsprinzip des FIA-Sandwich-ELISA

Als Affinitätsmatrix wurde ein kommerziell erhältliches Immobilisat von Protein G auf cyanbromidaktivierter Sepharose (Sigma) in der Kartusche verwendet. Das HRP-Protein A Konjugat wurde ebenfalls von Sigma bezogen.

Zur Durchführung der folgenden Versuche wurde die FIA-Anlage geringfügig modifiziert.

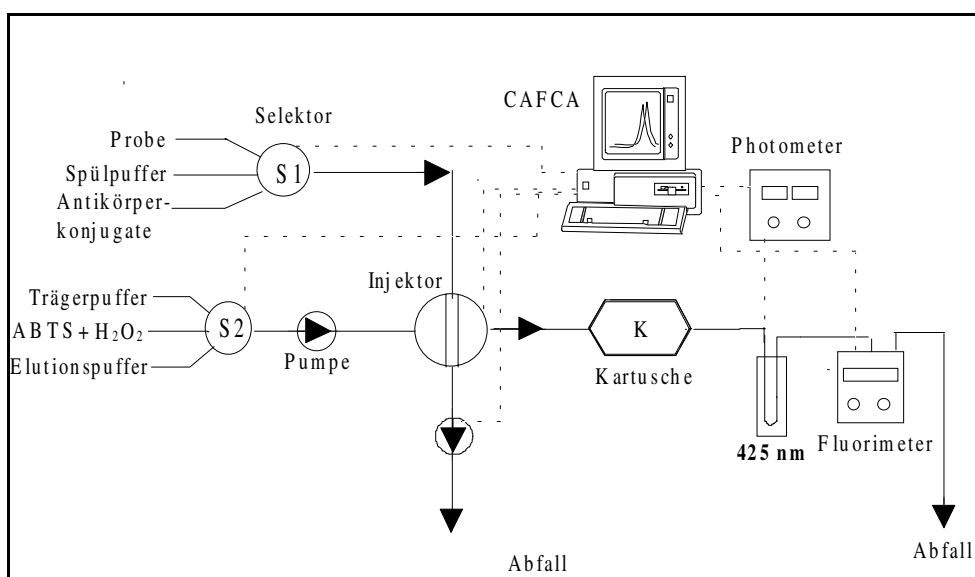


Abb.7.12 Schematischer Aufbau des modifizierten-FIA-Systems

Betriebspuffer	0,1 M KPP, pH=7,4
Elutionspuffer	0,1 M Glycin/HCl, pH=2,0
Probenvolumen	125 μ l,
Aufgabe der Substate	40 sec. entspricht 530 μ l
Substrat	1,33 g/l ABTS +3 g/l H ₂ O ₂
Volumenstrom	0,8 ml/min
Zykluszeit	20 Minuten

Tabelle 7.3 Betriebsbedingungen des FIA-Systems

Die Substratlösung wird nicht mehr über ein Injektionsventil in den Betriebspuffer injiziert, sondern fließt kontinuierlich durch die Kartusche. Dadurch werden Dispersionseffekte minimiert, was zu einer Erhöhung der Signalintensität führt.

Die Zykluszeit wurde auf 20 Minuten verlängert, da nach jeder Analyt-bzw. Reagenzienaufgabe ein Spülzyklus eingefügt wurde, um mögliche Verschleppungen auszuschließen.

7.2.2.1 Einfluß verschiedener Elutionsmittel

Zum Erhalt zuverlässiger Meßwerte ist nach jeder Bestimmung eine möglichst vollständige Elution der gebundenen Analyt- bzw. Konjugatmoleküle und Regenerierung der Kartusche erforderlich. Aus diesem Grund wurden verschiedene aus der Affinitätschromatographie bekannte Lösungen hinsichtlich ihrer Elutionsstärke untersucht. Dazu wurde zunächst eine Messung mit einem rabbit-IgG Standard durchgeführt, eluiert und im Anschluß daran zweimal bidest. Wasser als Probe injiziert und wiederum jeweils ein Meßzyklus durchlaufen. Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse.

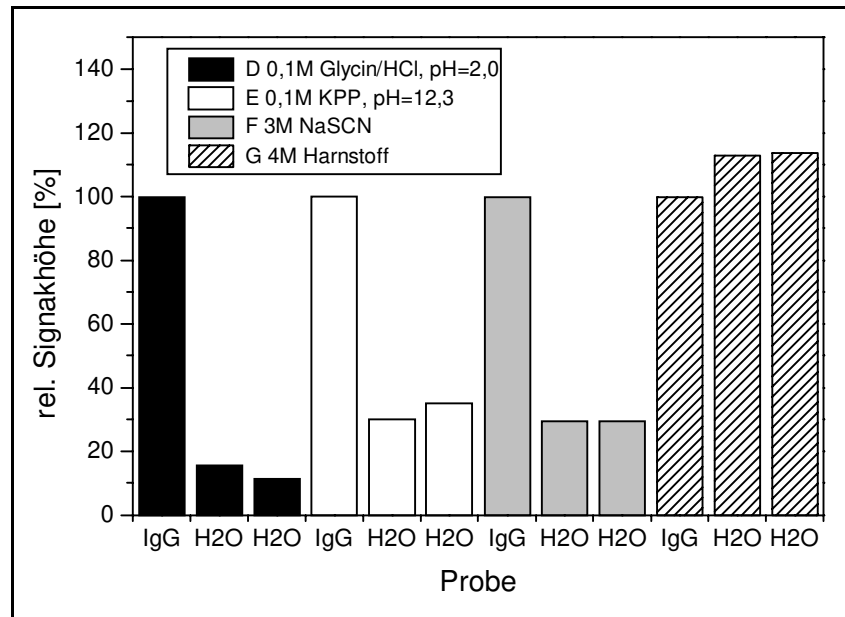


Abb. 7.13 Einfluß verschiedener Elutionsmittel

Meßbedingungen: FIA Anlage , IgG Standard (100 µg/ml), Konjugat: HRP-Protein A, 0,8 U/ml

Zur Auswertung wurden die bei der IgG Standard Messung aufgenommenen Signalkhöhen gleich 100% gesetzt. Es sind deutliche Unterschiede in der Elutionsstärke der einzelnen Lösungen zu erkennen, wobei der bisher verwendete Glycin/HCl Puffer sich als am besten geeignet erweist. Die 4M Harnstofflösung zeigt keinen erkennbaren Elutionseffekt. Nach der Injektion von bidest. Wasser kann sogar ein gegenüber der IgG haltigen Probe erhöhtes Meßsignal beobachtet werden. Dies ist damit zu erklären, daß nach abgeschlossener IgG Bestimmung weder eine Elution der Konjugate noch der Antikörper stattgefunden hat. Die in der folgenden Messung mit bidest. Wasser injizierten Konjugate binden zum Teil an noch freie Antikörper, was zu einer Signalverstärkung führt. Die zweite Messung mit bidest Wasser als Probe bringt keine weitere Steigerung der Signalintensität mit sich, da nun vermutlich alle Bindungsplätze belegt sind und die Konjugate aufgrund fehlender Bindungsmöglichkeiten schon während des Meßzyklus aus der Kartusche gespült werden.

Diese Akkumulation der Konjugate kann bei der Verwendung der drei anderen Elutionsmittel nicht beobachtet werden. Da die Blindwerte im Fall des Glycin/HCl Puffers am niedrigsten ausfielen, wurde er in allen weiteren Untersuchungen eingesetzt.

7.2.2.2 Einfluß der Reaktionszeit

In weiteren Versuchen zur Erhöhung der Empfindlichkeit der Methode wurde mit der stopped-flow Technik gearbeitet. Dazu wurde der Substratstrom, nachdem er die Kartusche erreicht hatte, für eine, drei bzw. fünf Minuten angehalten. In Abbildung 7.14 sind die Signalhöhen in relativen Einheiten gegen die Stopzeit aufgetragen.

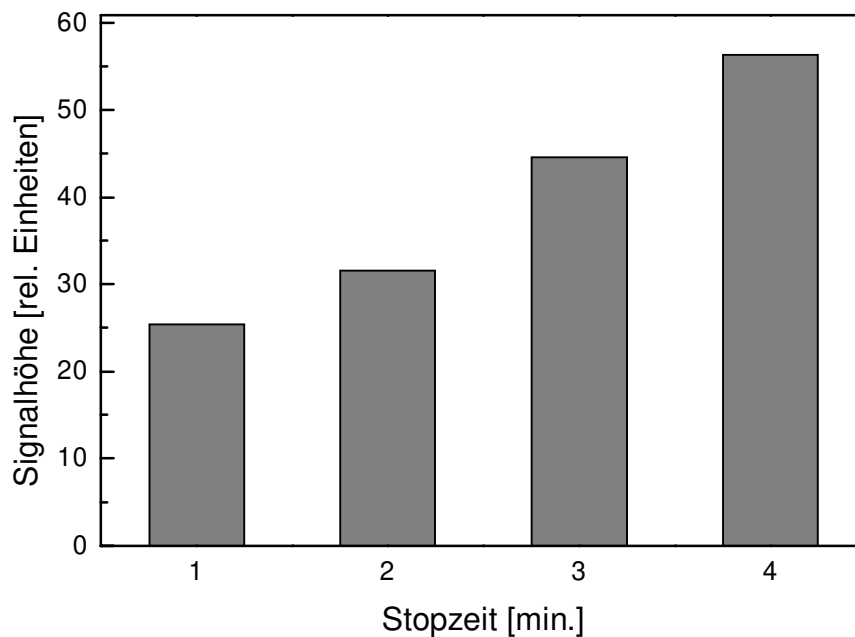


Abb. 7.14: Einfluß der Stopzeit auf die Signalhöhe

Meßbedingungen: FIA Anlage, Probe: rabbit-IgG (50 µg/ml), Konjugat: HRP-Protein A (0,2 U/ml)

Es ist eine deutliche Steigerung der Signalhöhen um bis zu 100% mit zunehmender Stopzeit zu erkennen. Der Grund dafür ist die Verlängerung der Kontaktzeit zwischen Enzymen und Substraten und die damit verbundene Erhöhung des Umsatzes der Reaktion. Die Reaktion ist demnach kinetisch kontrolliert, was bei den eingesetzten niedrigen Enzymaktivitäten auch zu erwarten war.

Grundsätzlich ist die stopped-flow Technik ein geeignetes Mittel zur Steigerung der Signalintensität in der ELISA-FIA. Dabei muß jedoch eine Verlängerung der Analysendauer in Kauf genommen werden.

7.2.2.3 Vergleich mit der bisherigen Methode

Das mit der Entwicklung der ELISA-FIA verfolgte Ziel war es, eine Steigerung der Sensitivität gegenüber dem etablierten heterogenen Elutionsassay zu erreichen. In einem vergleichenden Experiment wurde daher eine Kalibration mit verschiedenen rabbit IgG-Standards mit der ELISA-FIA durchgeführt. Zusätzlich wurde hinter dem Photometer ein Fluoreszenzdetektor integriert, um die Proteinfluoreszenz während der Elution zu detektieren. Die Ergebnisse zeigt die folgende Abbildung.

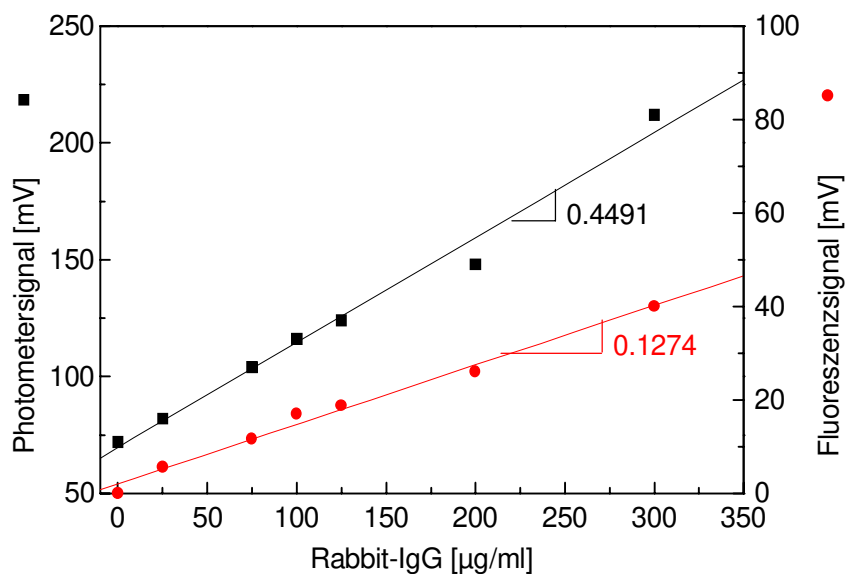


Abb.7.15: Vergleich der photometrisch und fluorimetrisch aufgenommenen Kalibriergeraden

Meßbedingungen: FIA Anlage 2 +Fluoreszenzdetektor (280/340 nm), Probe: rb-IgG (0-300 $\mu\text{g/ml}$), Konjugat: HRP-Protein A (0,4 U/ml)

Die photometrisch aufgenommenen Meßwerte liegen deutlich höher und die Kalibriergerade weist einen um den Faktor 4 erhöhte Steigung auf. Dabei muß noch bedacht werden, daß neben den eigentlichen zu bestimmenden Analytmolekülen die eluierten Konjugate noch einen zusätzlichen Beitrag zur Fluoreszenz leisten, der zu erhöhten Werte führt. Der Unterschied zwischen photometrisch und fluorimetrisch aufgenommenen Signalen ist somit eigentlich noch um ein Vielfaches größer.

7.2.2.4. Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, daß sich die entwickelte ELISA-FIA zur Bestimmung von Antikörpern eignet. Das Ziel - eine gegenüber der bisherigen Methode erhöhte Empfindlichkeit der Messung - konnte erreicht werden. Die vorgestellten Ergebnisse

können als Grundlage für weiterführende Untersuchungen beispielsweise mit anderen immunologischen Komponenten dienen.

Ein kritischer Vergleich von ELISA-FIA und heterogenem Elutionsassays macht jedoch neben Vor- auch Nachteile der neue Methode deutlich. So ist der Systemaufbau komplizierter und die Anzahl benötigter Reagenzien größer, was zu höheren Kosten und einer zunehmenden Störanfälligkeit führt. Weiterhin verlängert sich die Analysenzeit von durchschnittlich 8 auf 20 Minuten. Ein Vorteil der ELISA-FIA ist wie bereits erwähnt eine erhöhte Sensitivität. Diese ist zudem noch variabel, denn sie läßt sich über die eingesetzten Enzymaktivitäten beeinflussen und kann den jeweiligen Analytkonzentrationen angepaßt werden.

7.3 Immunoassay mit OPA Derivatisierung

Neben einer enzymatischen Verstärkungsreaktion kann auch durch die Derivatisierung der eluierten Proteine mit geeigneten Reagenzien zu fluoreszierenden Produkten eine Erhöhung der Empfindlichkeit der Methode erreicht werden. Ein in der Aminosäureanalytik häufig eingesetztes Reagenz ist das ortho-Phtaldialdehyd (OPA). Seine Anwendung wurde erstmals 1971 von Roth [ROTH, 1971] als Alternative zur klassischen Farbreaktion mit Ninhydrin vorgestellt. Seitdem sind in der Literatur zahlreiche HPLC Methoden mit Vor- sowie Nachsäulenderivatisierung u.a. zur Bestimmung von Aminosäuren, Proteinen [ALLENMARK, 1985; ROTH, 1973; GARDNER, 1980, JONES, 1981; HODGIN, 1979; DAVIS, 1979; LINDROTH, 1979]; und Sulfonamiden [VINAS, 1996] beschrieben worden. Weiterhin wurden FIA Verfahren zur Messung von Ammonium in Wasserproben [AOKI, 1983] und On line an Tierzellkultivierungsprozessen [SPOHN, 1994] sowie von Sulfamethoxazol im Urin und im Blut [LOPEZ, 1994] entwickelt.

OPA reagiert u.a. mit primären Aminosäuren in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol in alkalischem Medium unter Bildung fluoreszierender 1-Alkyl-thio-2-alkyl substituierter Isoindole. Simons und Johnson zeigten anhand massenspektroskopischer Untersuchungen, daß dem Thiol dabei nicht wie zunächst angenommen lediglich die Rolle eines reduzierenden Agenzes zum Schutz des OPA vor oxidativer Zerstörung zukommt, sondern es an der Reaktion teilnimmt und ein Bestandteil des Produktes ist [SIMONS, 1978]. Der Mechanismus der Reaktion sowie die Stabilität der Produkte wurde von zahlreichen Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Ergebnissen untersucht

[SIMONS, 1978; STERNSON, 1985; NAKAMURA, 1982; STOBAUGH, 1983;]. Der folgende von Simons vorgeschlagene Mechanismus erscheint dabei am wahrscheinlichsten [SIMONS, 1978 (A)]:

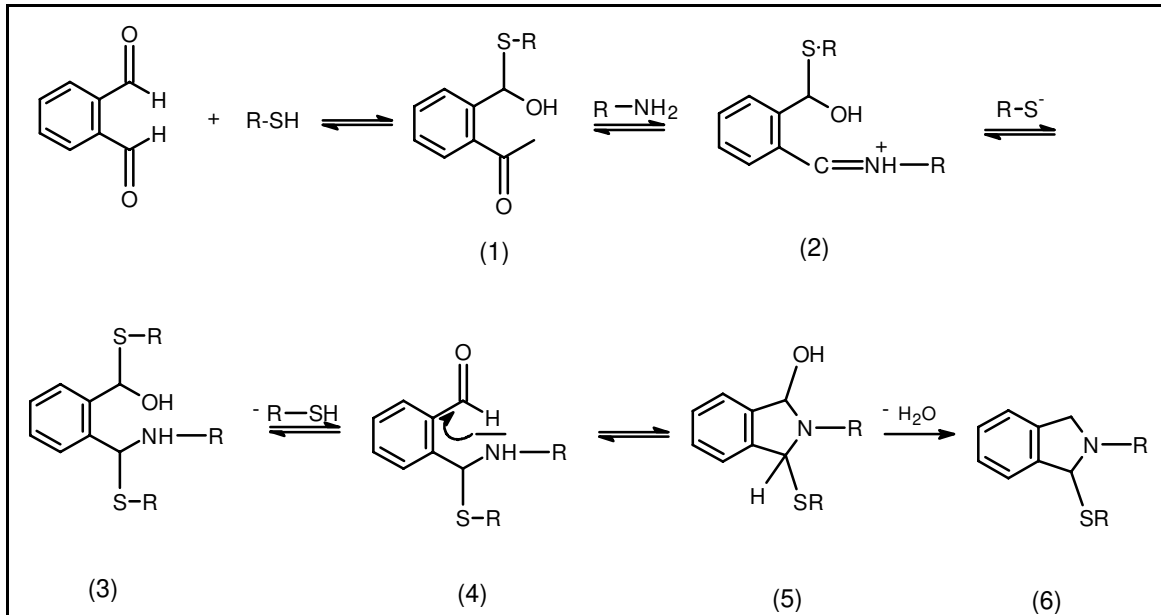


Abb. 7.16 Reaktionsschema der Derivatisierung einer Aminogruppe mit OPA

Im ersten Reaktionsschritt wird OPA zunächst mit 2-Mercaptoethanol unter Bildung eines Semithioacetals (1) umgesetzt, welches mit dem Amin zum protonierten Imin (2) weiterreagiert. Das durch den nucleophilen Angriff des Thiolanions auf das Imin entstandene Semithioacetal (3) zerfällt im basischen Milieu [BARNETT, 1967; BARNETT, 1969] unter Generierung des α -Alkyl-amino-benzyl-sulfids (4). Durch einen intramolekularen nucleophiler Angriff des Aminostickstoffs auf die Carbonylgruppe kommt es zum Ringschluß. Das gebildete Intermediat (5) geht durch Dehydratisierung leicht in das fluoreszierende Indol (6) über.

Viele Faktoren wie z.B. der pH-Wert, die OPA Konzentration, die Reaktionsdauer sowie die Struktur der Aminkomponente beeinflussen sehr stark die Stabilität der gebildeten Isoindole. Diese können unter ungünstigen Bedingungen entweder durch saure Hydrolyse [SIMONS, 1977; SIMONS, 1978 (B)] oder aber über einen intramolekularen Angriff der Hydroxylgruppe des 2-Mercaptoethanols zu N-alkyl-phtalimiden zerfallen [SIMONS, 1978 (A)].

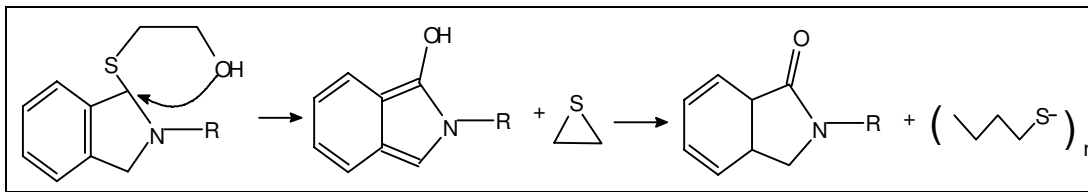


Abb. 7.17 Zerfall der OPA-ME Addukte

Die erhöhte Stabilität der Derivate in Boratpuffer, der die Hydroxylgruppen komplexiert untermauert diese Annahme [SIMONS, 1978 (B)].

Die Gründe für die häufige Verwendung von OPA insbesondere in der Aminosäure- und Proteinanalytik mittels chromatographischer Methoden sind vielfältig. So läuft die Derivatisierungsreaktion sehr leicht und schnell bei Raumtemperatur ab und weder die möglichen Nebenprodukte noch überschüssiges OPA selbst zeigen Fluoreszenz. Weiterhin ist OPA eines der wenigen wasserlöslichen fluoreszenzgebenden Reagenzien und gleichzeitig das mit der höchsten Spezifität. Gegenüber kolorimetrischen zeigen fluorimetrische Methoden eine bis um Faktor 100 erhöhte Sensitivität, was eine erhebliche Senkung der Nachweisgrenze ermöglicht.

Die folgenden Untersuchungen dienen der Entwicklung und Optimierung eines FIA-Systems zur Proteinbestimmung auf der Basis des heterogenen Immunoassays mit zusätzlicher OPA-Nachsäulenderivatisierung. Als Modellprotein wurde rt-PA verwendet.

7.3.1 Systemaufbau

Das eingesetzte FIA-System ist in Abbildung 7.18 schematisch dargestellt. Gegenüber dem heterogenen Elutionsassay ohne Verstärkungsreaktion ist die hier verwendete Anlage um einen hinter die Kartusche geschalteten Injektor zum Einbringen der OPA-Lösung erweitert. Um eine gute Vermischung von Probe und Reagenz sowie eine ausreichende Reaktionszeit zu gewährleisten, befindet sich im Anschluß an den Injektor noch eine Reaktionsschleife.

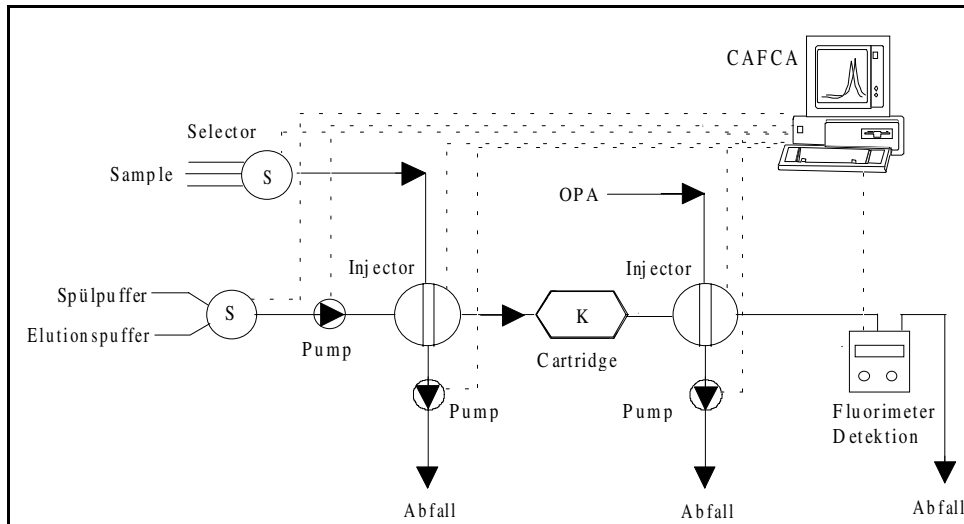


Abb. 7.18 Systemaufbau der OPA-FIA

Die Kartusche ist mit einem Immobilisat von 300 µg polyklonalen Antikörpern TD 27/4 gegen rt-PA (Dr. K. Thomae AG) auf bromcyanaktivierter Sepharose 4B befüllt. Die Detektion der eluierten und nachfolgend derivatisierten rt-PA-Moleküle erfolgt fluorimetrisch bei Wellenlängen von 330 (Exc.) und 420 nm (Em.). Die genannten Bedingungen gelten für alle folgenden Untersuchungen.

7.3.2 Charakterisierung und Optimierung der Analysenmethode

Die Derivatisierungsreaktion sowie die Stabilität der Produkte werden u.a. sehr stark vom pH Wert, der Reaktionszeit, der Temperatur sowie der OPA Konzentration beeinflusst. Zur näheren Charakterisierung und Optimierung des Verfahrens wurden daher einige dieser Parameter variiert und jeweils Kalibriermessungen mit rt-PA Standards durchgeführt. Die Standardbetriebsbedingungen, die mit Ausnahme des jeweils zu optimierenden Parameters während aller Untersuchungen beibehalten wurden, sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Betriebspuffer	0,1 M KPP, pH=7,4
Elutionspuffer	0,1 M K ₃ PO ₄ , pH 12,3
Probenvolumen	100 µl,
OPA Reagenz:	40 mM in Boratpuffer, pH 9,5
Injektionsvolumen	100µl
Derivatisierungszeit	55 sec.
Volumenstrom	1 ml/min
Zykluszeit	600 sec.
Detektionswellenlängen Exc./Em.	330/420 nm

Tabelle 7.4 Standardbetriebsbedingungen des FIA-Systems

7.3.2.1 Einfluß des pH-Wertes des Elutionsmittels

Der optimale pH Wert für die Derivatisierungsreaktion liegt zwischen 9 und 10 [ROTH, 1973]. Da der zur Elution von rt-PA im heterogenen Elutionsassay optimierte Puffer einen pH-Wert von 12,3 hat [BEYER, 1995], wurde zunächst untersucht, ob die Derivatisierungsreaktion unter diesen drastischen Bedingungen überhaupt abläuft und welches Elutionsmittel die besten Ergebnisse liefert. Es wurden verschiedene 0,1M KPP-Puffer mit pH-Werten zwischen 7,4 und 13 getestet. Zunächst wurden die Messungen ohne Immunreaktion durchgeführt, indem ein rt-PA Standard ($c=10 \mu\text{g/ml}$) über Injektor 1 sowie OPA Reagenz über Injektor 2 nacheinander injiziert wurden. Im Anschluß daran erfolgte die Implementierung der Immunkartusche ins FIA-System und eine Wiederholung der Versuche unter den gleichen Bedingungen. Zur Auswertung wurden die bei $\text{pH}=12,3$ berechneten Peakflächen gleich 100% gesetzt. Die Ergebnisse zeigt die folgende Abbildung.

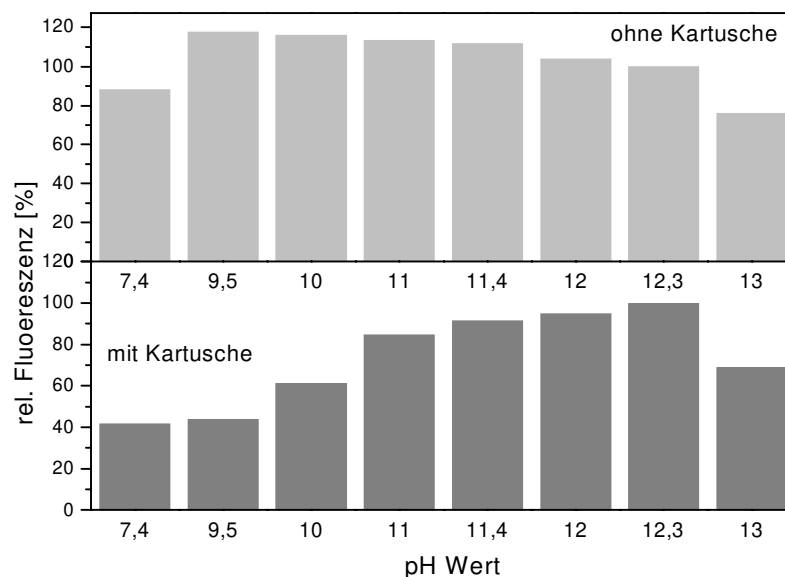


Abb. 7.19 Abhängigkeit der Fluoreszenzsignale vom pH-Wert des Eluenten

Erwartungsgemäß ist die ohne Kartusche aufgezeichnete Fluoreszenzintensität bei $\text{pH } 9,5$ am größten, nimmt in Richtung höherer Basizität jedoch nur geringfügig ab. Die beim Eluieren des rt-PA von der Kartusche aufgenommenen Signalintensitäten weisen bei $\text{pH } 12,3$ sogar ein Maximum auf. Dies ist auf die vollständige Elution der Proteinmoleküle und dem unter diesen Bedingungen immer noch hohen Umsatz der Reaktion sowie eine ausreichende Stabilität der gebildeten Isoindole zurückzuführen. Bei niedrigeren pH-Werten erfolgt eine nur unvollständige Elution und ein zu stark

basisches Milieu (pH 13) wirkt sich negativ auf den Umsatz der Reaktion bzw. die Stabilität der Produkte aus.

Die Ergebnisse zeigen, daß der im heterogenen Elutionsassay verwendete Elutionspuffer auch im erweiterten Assay mit OPA Derivatisierung die höchsten Signale liefert und daher in allen weiteren Untersuchungen eingesetzt wurde.

7.3.2.2 Sensitivitätsvergleich zwischen den Methoden mit und ohne Derivatisierung

Um einen Vergleich beider Verfahren hinsichtlich ihrer Sensitivität zu ermöglichen, wurden Kalibrierungen mit mehreren rt-PA Standards durchgeführt. Die Proteineigenfluoreszenz der nicht derivatisierten Proteine wurde bei Wellenlängen von 280 (Exc.) und 340 nm (Em.) gemessen.

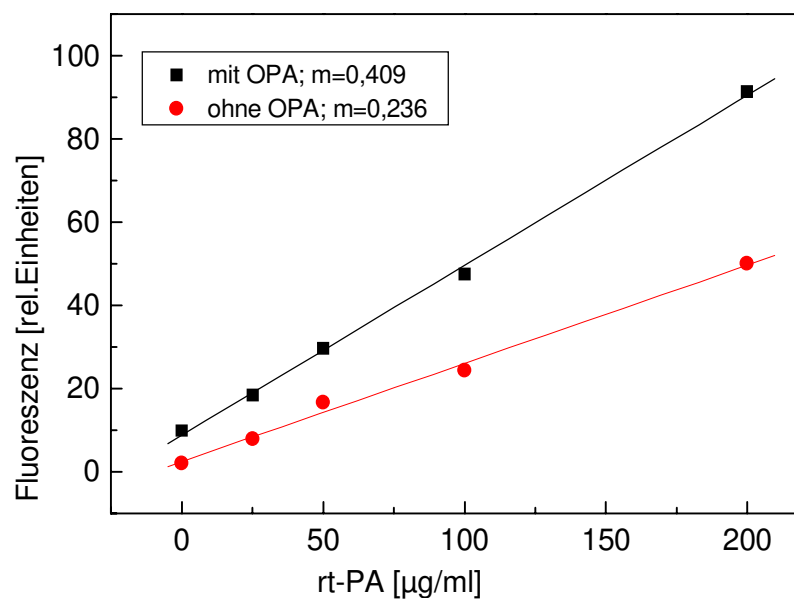


Abb. 7.20 Kalibrierung ohne und mit OPA Derivatisierung

Beide Kalibriergeraden verlaufen im Bereich 0-200 µg/ml rt-PA linear, wobei eine deutlich Erhöhung der Signale sowie eine um ca. 70% größere Steigung bei der OPA Methode beobachtet werden kann. Die Ergebnisse zeigen, daß sich die gewählte Derivatisierungsreaktion für den Einsatz im FIA-System eignet und sich damit eine deutliche Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber der etablierten Methode erreichen läßt.

7.3.2.3 Einfluß der Reaktionszeit und der OPA Konzentration

In mehreren beschriebenen HPLC Methoden mit OPA Nachsäulenderivatisierung wird die Vermischungszeit von Reagenz und eluierte Analyten mit 2 bis 5 Minuten angegeben [ALLENMARK, 1985; ROTH, 1973]. In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde die Vermischungszeit durch die Verwendung verschieden langer Reaktionsstrecken bei konstantem Volumenstrom zwischen 10 und 95 Sekunden variiert. Abbildung 7.21 zeigt die mit verschiedenen rt-PA Standards aufgenommenen Kalibriergeraden

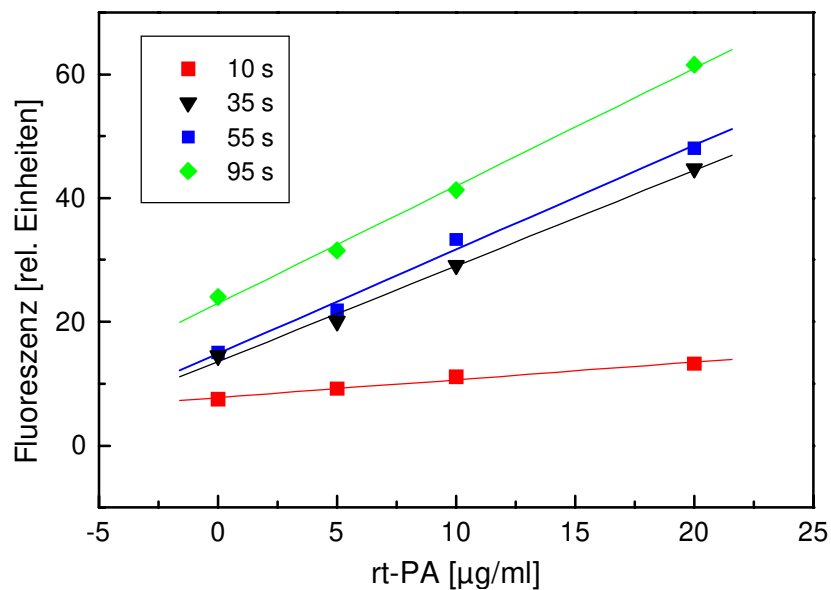


Abb. 7.21 Einfluß der Derivatisierungszeit auf die Meßsignale

Eine Derivatisierungszeit von 10 Sekunden erweist sich als zu kurz, was sich in Form sehr niedriger Signale sowie einer sehr flach verlaufenden Kalibriergeraden äußert. Die Reaktionszeit sollte mindestens 35 Sekunden betragen um deutlich erhöhte Signale messen zu können. Eine Verlängerung auf 95 Sekunden führt zwar zu einer weiteren Steigerung der Signalintensität, jedoch nur zu einer geringfügig erhöhten Geradensteigung d.h. Empfindlichkeit. Weiterhin kommt es aufgrund zunehmender Dispersionseffekte zu deutlichen Signalverbreiterungen. Als Kompromiß zwischen Sensitivität und Analysenfrequenz wurde in allen Untersuchungen eine Reaktionszeit von 55 Sekunden gewählt.

In weiteren Kalibriermessungen wurde die Abhängigkeit der Empfindlichkeit und der Nachweisgrenze von der OPA Konzentration untersucht. Dies ist insofern von Bedeutung, da eine zu niedrige Reagenzkonzentration zu sehr kleinen Signalen führt,

während ein zu großer OPA Überschuß eine Degenerierung der gebildeten Isoindole bewirken kann [BARNETT, 1967; BARNETT, 1969]. Wie in Abbildung 7.21 zu sehen ist, nehmen sowohl die Meßwerte als auch die Geradensteigungen mit steigender OPA Konzentration zu. Eine Abnahme ist aufgrund des starken Verdünnungseffektes im FIA-System vermutlich erst bei sehr viel höheren OPA Konzentrationen zu beobachten.

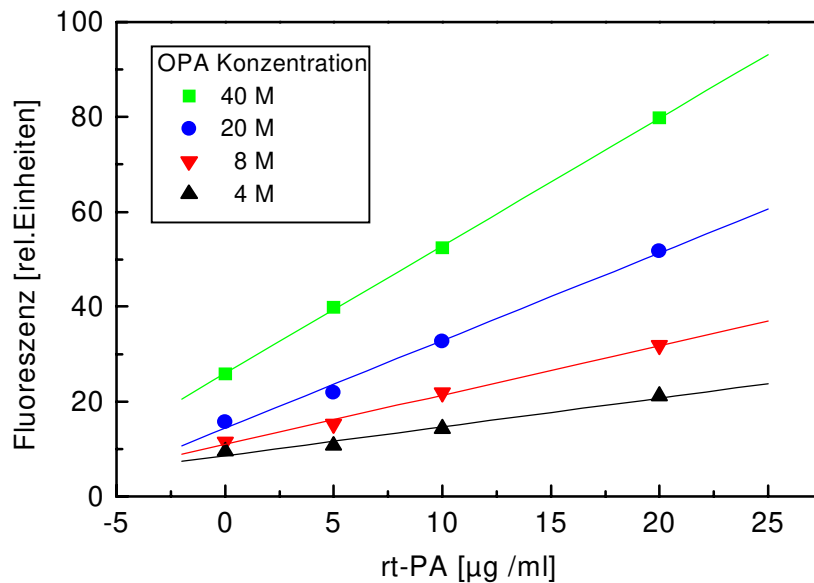


Abb. 7.22 Einfluß der OPA Konzentration auf die Meßsignale

Es wird deutlich, daß auf diese Weise eine wesentlich effektivere Erhöhung der Sensitivität erreicht werden kann als durch eine Verlängerung der Reaktionszeit. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, daß durch Variation der Reaktionszeit sowie der Reagenzkonzentration eine hohe Flexibilität der Methode bzgl. sehr unterschiedlicher Probenkonzentrationen gegeben ist. Dadurch können Verdünnungs- bzw. Aufkonzentrierungsschritte entfallen.

7.3.2.4 Einfluß des Spülpuffers

Alle bisher vorgestellten Optimierungsversuche wurden unter Verwendung wässriger rt-PA Standards durchgeführt. Reale Fermentationsproben enthalten Proteine, die die Analyse stören können, indem sie unspezifisch an die Trägermatrix binden, im Elutionsschritt ausgetragen und mitdetektiert werden.

Es sollte untersucht werden, ob durch die Zugabe von 1 Vol.% Tween 20 – einem nichtionischen Tensid - oder 1 g/l Polyethylenglycol zum Spülpuffer eine vollständigere Elution erreicht werden kann. Zur Untersuchung des Einflusses der Konzentration der Störproteine auf die Meßsignale in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Spülpuffers wurde ein rt-PA Standard ($c=10 \mu\text{g/ml}$) in bidest. Wasser sowie in Tierzellfermentationsmedium angesetzt und mit verschiedenen Mengen an BSA versetzt.

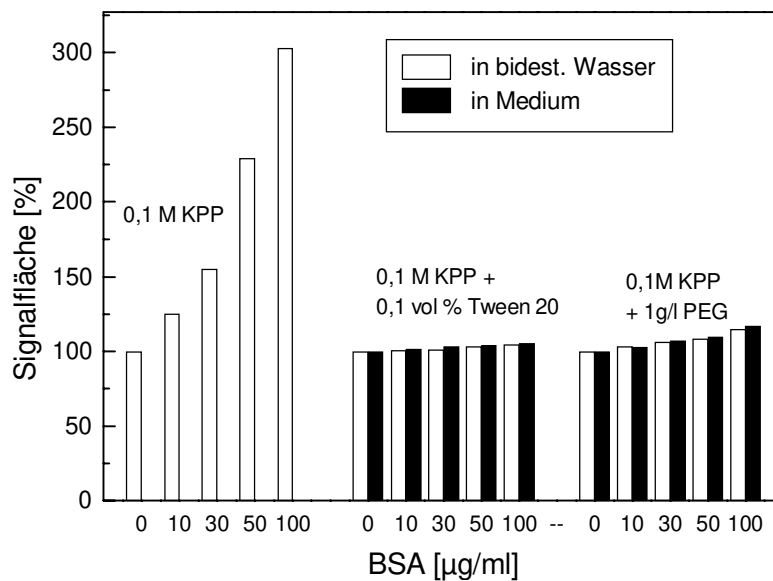


Abb. 7.23: Einfluß des Spülpuffers (Peakfläche bei $c=0 \mu\text{g/ml}$ BSA = 100%)

Bei der Verwendung von reinem KPP als Spülpuffer nehmen die Signale mit steigender BSA Konzentration erwartungsgemäß stark zu. Sowohl durch die Zugabe von Tween 20 als auch von PEG kann hingegen ein nahezu vollständiger Austrag aller Störproteine vor der Elution erreicht werden. Auch alle in dem sehr komplexen Kultivierungsmedium enthaltenen und die Analytik möglicherweise beeinflussenden Substanzen werden fast vollständig ausgewaschen. Die Zugabe einer der beiden Substanzen zum Spülpuffer ist für alle zukünftigen Messungen - auch mit dem heterogenen Elutionsassay ohne Derivatisierung - daher sehr zu empfehlen.

7.3.2.5 Simulierte Fermentation

Zum Abschluß wurde das entwickelte FIA-System zur On line rt-PA Bestimmung an einem simulierten Bioprozeß getestet. Dazu wurde ein kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor (CSTR) mit einem Arbeitsvolumen von 100 ml mit 0,1 M KPP

Puffer befüllt und eine Austauschrate von 0,3 ml/min eingestellt. Nach 2 Stunden wurde im Zulauf von reinem KPP Puffer auf eine rt-PA Lösung ($c=20\ \mu\text{g/ml}$) gewechselt und diese über einen Zeitraum von 7 Stunden kontinuierlich zugegeben. Ab der 9. Stunde erfolgte die Zugabe einer BSA Lösung ($c=50\ \mu\text{g/ml}$), um den Einfluß von Störproteinen zu simulieren.

Die eingesetzte Kartusche war mit auf VA-Epoxy Biosynth immobilisierten Antikörpern gegen rt-PA beschickt. Der als Spül- und Trägerpuffer verwendete 0,1M KPP Puffer enthielt 1 g/l PEG.

Während des gesamten Prozesses wurden zusätzlich manuell Proben gezogen, eingefroren und später Off line mit einem ELISA Test der rt-PA Titer bestimmt. Die gemessenen Konzentrationen sind zusammen mit den On line Daten in der folgenden Grafik aufgetragen.

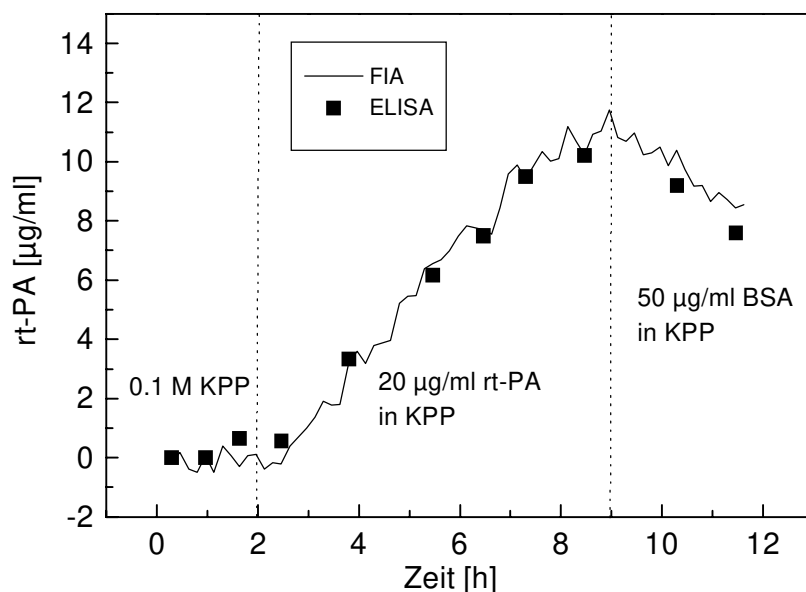


Abb 7.28: Simulierte Fermentation

Man erkennt eine gute Übereinstimmung zwischen On- und Off line Daten. Der Prozeßverlauf konnte mit dem neuen FIA-Assay über den gesamten Zeitraum ohne Störungen verfolgt werden.

7.3.3 Zusammenfassung

Es wurde ein neues Verfahren zur Proteinbestimmung auf der Basis des etablierten heterogenen Elutionsassays mit zusätzlicher Nachsäulenderivatisierung mit OPA entwickelt. Das neue Verfahren wurde unter Verwendung von rt-PA als Modellprotein systematisch charakterisiert. Dabei wurde u.a. der Einfluß des pH-Wertes des Elutionsmittels, der OPA Konzentration und der Reaktionszeit untersucht. Weiterhin konnte der Spülpuffer dahingehend optimiert werden, daß Störsubstanzen vor der Elution des Analyten vollständig aus der Kartusche ausgetragen werden und die Analyse nicht beeinflussen. Das Hauptziel, eine Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber der bisherigen Methode zu erreichen, konnte realisiert werden. Weiterhin wurde in einer simulierten Fermentation gezeigt, daß sich das System prinzipiell zur On line Proteinbestimmung am Bioprozeß eignet.

8. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue auf dem Prinzip der Fließinjektionsanalyse basierende immunchemische und enzymatische Methoden zur Bioprozeßüberwachung entwickelt und optimiert. Dazu wurde ein den industriellen Anforderungen entsprechendes, modulare zusammengesetztes, mehrkanäliges FIA-System aufgebaut.

Der entwickelte Prozeßanalysator enthält alle für die Fließinjektionsanalytik notwendigen Hardwarekomponenten wie Selektoren, Injektoren, Pumpen und Detektoren. Die Integration von drei voneinander unabhängigen FIA-Kanälen ermöglicht die Parallelbestimmung mehrerer Parametern. Wichtige Kriterien hinsichtlich der Industrietauglichkeit sind eine möglichst große Flexibilität der Methoden sowie ein hoher Automatisierungsgrad. Beide Anforderungen konnten durch einen modularen Aufbau sowie durch die FIA-Technik in Verbindung mit einem Prozeßrechner zur Steuerung und Datenaufnahme erfüllt werden.

Parameter wie die Umgebungstemperatur und der Sauerstoffgehalt einer Probe unterliegen Schwankungen, die leicht zu falschen Meßergebnissen führen können. Daher wurde der Einfluß dieser Größen für verschiedene Enzym/Substrat-Systeme untersucht. Die Abhängigkeit der Meßsignale von der Temperatur wurde durch die Aufnahme mehrerer Kalibriergeraden bei unterschiedlichen Temperaturen gezeigt. Anhand der aufgenommenen Daten wurden verschiedenen mathematische Modelle zur Vorhersage der Ergebnisse bei veränderten Temperaturen berechnet. Dabei erwies sich ein universelles, für alle Enzym/Substrat Systeme gültiges Modell aufgrund sehr hoher Fehler als ungeeignet. Wird ein für jedes Enzym spezifischer Temperaturparameter eingeführt, liegt der Fehler der Vorhersage für GOD und LOD unterhalb 10%. Die Vorhersage der Ergebnisse für AOD und ASOD waren zwar mit Fehlern von 20-40% behaftet, diese lagen aber dennoch deutlich unter den ohne Temperaturkompensation resultierenden Fehlern. Die Untersuchungen haben gezeigt, daß eine Vorhersage der Ergebnisse bei veränderten Temperaturen prinzipiell möglich ist. Der Implementierung eines entsprechenden Algorithmus in die Steuer- und Auswertesoftware CAFCA sollten jedoch noch weitere Untersuchungen vorausgehen, mit dem Ziel, ein für alle Enzym/Substrat-Systeme gültiges Modell mit einem Fehler der Vorhersage <5% zu erhalten.

Untersuchungen zum Einfluß des Sauerstoffgehalts der Probe auf die Meßsignale, machten deutlich, daß eine Anpassung an die Sauerstoffkonzentration des Trägerpuffers unbedingt erforderlich ist. Dies kann durch eine lange Dispersionstrecke oder gegebenenfalls durch eine Mischkammer realisiert werden.

Weiterhin wurde das Trägermaterial chelatisierende Sepharose in Verbindung mit Kupferionen und Con A auf seine Eignung zur reversiblen Immobilisierung von Enzymen in Kartuschensystem untersucht. Die hergestellten Enzymkartuschen wurden im FIA-System hinsichtlich Belegung und Elution der Enzyme getestet. Es konnten 500 Units GOD nahezu vollständig immobilisiert werden. Nach der Elution und Neubelegung des Trägers im FIA-System wurden keine Aktivitätsverluste beobachtet. Da sich Proteine auch direkt über Metall-Aminosäure Wechselwirkungen auf chelatisierender Sepharose immobilisieren lassen, wurde im folgenden Versuch auf Con A verzichtet. Die Untersuchungen lieferten in Hinblick auf die immobilisierten Enzymaktivitäten sowie das Elutionverhalten nahezu identische Ergebnisse. Die kovalente Immobilisierung auf VA-Epoxy Biosynth hingegen hatte deutlich niedrigere Enzymaktivitäten bei sehr viel längeren Immobilisierungszeiten zur Folge. Neben den genannten Vorteilen bringt die Verwendung von chelatisierender Sepharose auch Nachteile mit sich. In Langzeitmessungen zeigte sich eine wesentlich schnellere Abnahme der Signale d.h. ein größerer Aktivitätsverlust. Weiterhin kam es durch Kontraktion des gelartigen Trägermaterials häufig zu Druckerhöhungen im System, was zum Abspringen der Schläuche und zum Abbruch der Messung führte. Die Lösung dieser Probleme sollte das Ziel zukünftiger Untersuchungen sein, um die Verwendung des Trägermaterials in der Bioprozeßanalytik sicherzustellen.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Entwicklung und Optimierung einer FIA Methode zur Bestimmung von L-Glutamin in komplexen Kultivierungsmedien. Das Verfahren basiert auf der enzymatischen Umsetzung von Glutamin zu Glutamat und Ammonium, welches durch Zugabe von Natronlauge in Ammoniak umgewandelt wird. Dieses kann über eine Dialysemembran aus dem Trägerstrom in einen Indikatorstrom übergehen. Die pH-Wert Änderung kann photometrisch verfolgt werden. Mit der Methode konnte Glutamin im Konzentrationsbereich zwischen 10 und 250 mg/l bestimmt werden. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war mit einem relativen Fehler von 1,9% sehr gut und es konnte über einen Zeitraum von sechs Stunden keine Abnahme der Enzymaktivität beobachtet werden. Da sich das während einer

Kultivierung von den Zellen gebildete Ammonium störend auf die Messung auswirkt wurde eine Möglichkeit gefunden, es vor der Glutaminbestimmung zu entfernen. Nach der Optimierung des Systems zeigten selbst Ammoniumkonzentrationen bis zu 20 mM keinen Einfluß auf die Glutaminbestimmung. Mit dem Gesamtsystem konnte die Glutaminkonzentration in einer simulierten Fermentation geregelt werden. Zum Abschluß wurde die Anlage an einer Tierzellkultivierung eingesetzt. Die Glutaminkonzentration konnte innerhalb einzelner Zeiträume On line gemessen werden und es zeigte sich eine gute Übereinstimmung mit den mittels HPLC bestimmten Off line Werten. Es kam zwischendurch jedoch immer wieder zu längeren Ausfallzeiten, die durch Verstopfungen der Dialysemembranen bedingt waren. Dieses Problems konnte im Laufe dieser Arbeit nicht zufriedenstellend gelöst werden und sollte daher Ausgangspunkt zukünftiger Untersuchungen sein.

Den zweiten thematischen Schwerpunkt bildeten immunchemische FIA Methoden. Ein bereits etablierter heterogener FIA-Immunoassay, der ursprünglich zur on- und Off line Produktanalytik in Fermentationsbrühen entwickelt wurde, konnte an einen Downstream-Prozeß gekoppelt werden. Am Beispiel der Trennung eines AT III haltigen Proteingemisches auf einer Gelfiltrationssäule konnte gezeigt werden, daß der im Chromatogramm dem Produkt zugeordnete Peak von weiteren Signalen überlagert wird und die zugehörige Fraktion einen hohen Anteil an Verunreinigungen enthält. Bei der Trennung eines rt-PA haltigen Proteingemisches konnte die Produktfraktion nur anhand der On line FIA Daten eindeutig erkannt werden. Die durch die Anbindung der Immun-FIA an den Downstream-Prozeß gewonnenen Informationen ermöglichen es, optimale Schnitte zwischen den Fraktionen vorzunehmen und somit eine möglichst hohe Reinheit des Endproduktes zu erzielen. Die Weiterentwicklung der Anlage sollte in Richtung eines mehrkanäligen Aufbaus zielen, um durch eine höhere Meßfrequenz auch schneller ablaufende Prozesse überwachen zu können.

Weiterhin wurden auf der Basis der etablierten Immun-FIA zwei neue Immunoassays mit nachgeschalteten Verstärkungsreaktionen entwickelt. Die erste Methode entspricht einem in ein FIA-System implementierten Sandwich-ELISA. Als Modellreaktion wurde die Bindung von rabbit-IgG an Protein G mit anschließender Markierung mit an Protein A gekoppelter HRP untersucht. Als Substrat wurden ABTS und H_2O_2 verwendet. Die Kalibrierungen im Konzentrationsbereich von 10-300 mg/l IgG zeigten einen guten linearen Verlauf und eine gegenüber der etablierten Methode erhöhte

Steigung. In darauffolgenden Untersuchungen zur Optimierung der Elutionsmittel erwies sich eine 0,1 M Glycin/HCl Lösung als am effektivsten. Weiterhin wurde mit der stopped-flow Technik gearbeitet und gezeigt, daß sie sich zur Steigerung der Signalintensität bei der Bestimmung niedrigen Konzentrationen eignet.

In der zweiten Methode werden die Analytmoleküle in der mit immobilisierten Antikörpern beschickten Kartusche gebunden, eluiert, mit OPA zu fluoreszierenden Produkten derivatisiert und anschließend fluorimetrisch detektiert. Das Verfahren wurde hinsichtlich der Spül- und Elutionspuffer, der Derivatisierungszeit und der OPA Konzentration optimiert und an einer simulierten Fermentation getestet. Die Ergebnisse stimmten gut mit den mittels ELISA-Test bestimmten Off line Werten überein.

Der biotechnologischen Herstellung therapeutisch relevanter Proteine kommt heute und auch in Zukunft eine entscheidende Bedeutung zu. Bei der Entwicklung und Optimierung entsprechender Tierzellkultivierungsprozesse sind Informationen über die aktuelle Produktkonzentration von großem Interesse. Geeignete automatisierte immunochemische Verfahren sind -wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte- vorhanden, ihre Akzeptanz von seiten der Industrie ist jedoch noch immer gering. Die Gründe dafür sind eine häufig unzureichende Langzeitstabilität der Systeme sowie eine durch die komplexe Probenmatrix bedingte Verfälschung der Meßwerte. An diesem Punkt sollten alle zukünftigen Forschungsaktivitäten ansetzen, um immunochemische On line Verfahren auch in der Industrie zu etablieren.

9 ANHANG

9.1 Abkürzungsverzeichnis

A/D Wandler	Analog/Digital Wandler
ABTS	2,2` Azino-bis (3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AOD	Alkoholoxidase
ASOD	Aminosäureoxidase
BSA	Bovine Serum Albumin
CAFCA	Computer Assisted Flow Control&Analysis
CHO	Chinese Hamster Ovary
Con A	Concavalin A
D	Dalton
DIN	Deutsche Industrie Norm
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent Assay
EMIT	Enzyme-Multiplied-immunoassay Technique
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FETIA	Fluoreszenzenergietransfer-Immunoassay
FIA	Flow Injection Analysis
FIA	Fluoreszenzimmunoassay
FITC	Fluorescein-iso-thiocyanat
FPIA	Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay
GOD	Glucoseoxidase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
KPP	Kaliumphosphat
LOD	Lactatoxidase
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid(Phosphat)
OPA	ortho-Phtaldialdehyd
PC	Personal Computer
PEG	Polyethylenglycol

PID Regler	Proportional Integral Regler
r-AT III	rekombinantes Antithrombin III
RIA	Radioimmunoassay
rt-PA	recimbinant tissue-Plasminogen Activator
TCI	Technisch Chemisches Institut
TELISA	Thermometric-Enzyme-Linked-Immunsorbent Assay
TIA	Turbidimetrischer Immunoassay
TMRITC	Tetramethyl-rhodamin-iso-thiocyanat
U	Unit

9.2 Chemikalienliste

9.2.1 Enzyme

Alkoholoxidase	Sigma A 2404
Glucoseoxidase	Sigma G-2133
Glutaminase	Sigma G 5382
Lactatoxidase	Sigma L 0638
L-Aminosäureoxidase	Sigma A 9253
β-Galactosidase	Sigma, G 6008

9.2.2 Immunchemikalien,

anti rabbit IgG-Peroxidase	Sigma
pAK vs. r-ATIII	Behring
paK vs. rt-PA	Thomae
Protein A-Peroxidase	Sigma, P 8651
Protein G-Sepharose	Pharmacia Biotec
rabbit IgG	Sigma

9.2.3 Feinchemikalien

ABTS	Boehringer Mannheim, 1112422
Bromcresol Violett	Sigma, B 5880
Bovine Serum Albumin	Sigma, A 3425
Calciumchlorid	Sigma, C 3881
Chelat. Sepharose Fast Flow	Pharmacia Biotech
Citronensäure	Merck, 159134
CNBr aktivierte Sepharose4B	Sigma, C 1150
Concanavalin A	Sigma, C 2010
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, 105104
EDTA	Sigma ED
Ethanol	Merck 818760
Glucose	Fluka 49159
Glycin	Sigma, G 7403
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, 104877
Kaliumphosphat	Merck, 105102
Kupfer(II)chlorid	Merck, 102733
L-Tryptophan	Sigma T 8659
Magnesiumchlorid	Sigma, M 2670
Manganchlorid	Sigma, M 3634
Milchsäure	Sigma L 6402
Natriumacetat	Sigma, S 8625
Natriumazid	Sigma, S 8032
Natriumchlorid	Merck, 6404
o-Phtaldialdehyd	Fluka
Ovalbumin	Sigma, A 2512
Pepsin	Sigma, P 6887
Polyethylenglycol 100 000	Serva
r-AT III	Behring
rt-PA	Thomae
β -Lactoglobulin	Sigma, L 3908
β -Mercaptoethanol	Sigma, M6250
Transferrin	Sigma, T 3309

Triton X	Serva, 372240
Ultra CHO Medium	Boehringer Ingelheim
Wasserstoffperoxid	Sigma
Biophore I Medium	Bio Whittaker
VA Epoxy 500	Riedel de Haen

9.3 Puffer- und Reagenzienzusammensetzung

Betriebspuffer für LOD:

0,02M K_2HPO_4

pH 6,75

Betriebspuffer für GOD:

0,04M K_2HPO_4

0,05M NaCl

0,025M EDTA

2-3 Tropfen Triton X

Betriebspuffer für AOD:

0,2M K_2HPO_4

pH 8,5

Betriebspuffer für ASOD:

0,04M K_2HPO_4

0,05M NaCl

0,025M EDTA

pH 8,5

Betriebspuffer für die Immun-FIA:

0,1M K_2HPO_4

0,1M KH_2PO_4

pH 7,4

Basischer Elutionspuffer für die Immun-FIA:

0,1M K_3PO_4

pH 12,3

Saurer Elutionspuffer für die Immun-FIA:

0,1M Glycin

0,1M HCl

2-3 Tropfen Tween 20

pH 2

Aktivierungspuffer für ConA:0,1M NaHCO₃

0,05M NaCl

0,1mM MgCl₂0,1mM CaCl₂0,1mM MnCl₂

pH 8,5

OPA Reagenz:

5,4 g OPA

100 ml Ethanol

4 ml Mercaptoethanol

mit 0,4M Boratpuffer pH 9,5 auf 1l auffüllen

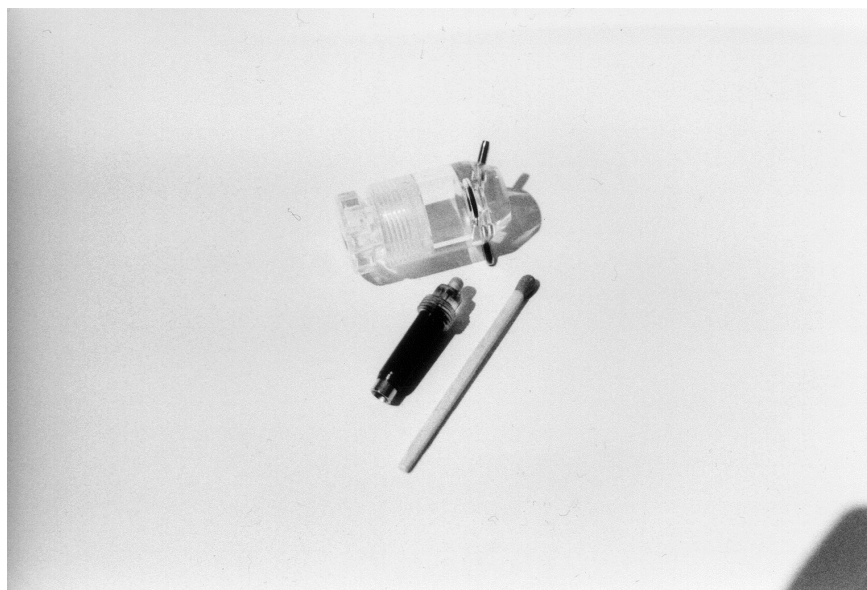
9.4 Geräteliste

6-port Injektionsventil	V7042, Ver. 091, Knauer
7-port Schaltventil	V7227, Ver. 0790, Knauer
BioCart-Meßkanaleinschub	Anasyscon
Computer	486 DX/33; 386 DX
Detektor-Meßkanaleinschub	Anasyscon
EVA Line FIA	Eppendorf, Netheler&Hinz
Fluoreszenzdetektor	F-1050, Merck-Hitachi
Peristaltikpumpen	IPS 4, IPS 8, Ismatec Accu, Anasyscon
Photometer	Skalar 601 Uvikord II, LKB
Sauerstoffelektrode	Anasyscon
Thermostat	K 15, Haake
Uhren-Temp.Modul	101940, RS Components
Detektor-Meßkanaleinschub	Anasyscon

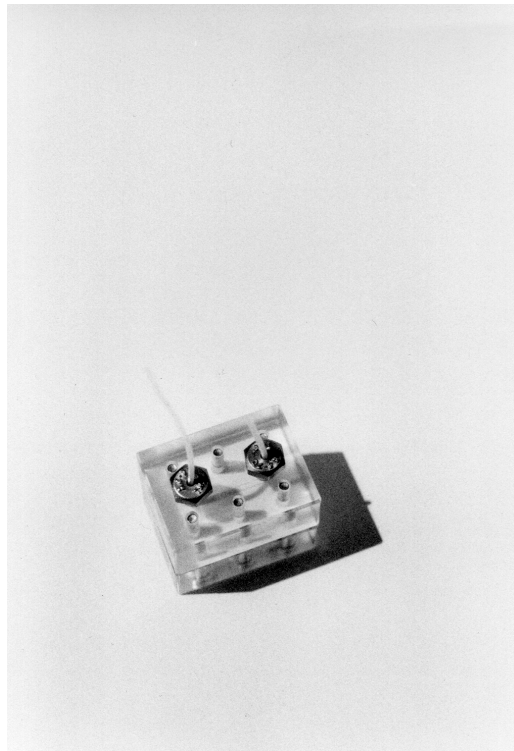
9.4 Fotos



Multifunktionsmodul mit Dispersionstrecke und Luftblasenfalle (Anasyscon)



Gelöstsauerstoffelektrode (Anasyscon)



Dialysezelle zur Glutaminanalytik



Entgasungszelle zur Ammoniakentfernung



Prozeßanalysator im Einsatz an einer Tierzellkultivierung

10. LITERATURVERZEICHNIS

- Akerström, B.; Björck, L. (1986) A physicochemical study of Protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties; *J. Biol. Chem.* 261, 10240-10247
- Allenmark, S., Bergström, S. and Ennerbäck, L. (1985) A selective postcolumn o-phthaldehyde-derivatization system for the determination of histamine in biological material by high-performance liquid chromatography; *Anal. Biochem.* 144, 98-103
- Amit, A. G., Marinza, R. A. Phillip, S. E. V., Poljack, R. (1986) Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution, *Science* 233; 747-753
- Aoki, T, Uemura, S. and Munemori, M. (1983) Continuous-flow fluorimetric determination of ammonia in water; *Anal. Chem.* 55, 1620-1622
- Avrameas, S., Guilbert, B. (1971) Dosage enzymoimmunologique de protéine à l'aide d'immunoabsorbants et d'antigènes marqués aux enzymes; *C. R. Acad. Sci.* 273, 2205-2707
- Bachmann, F., Egebert, M.D., Egebert, I.R., Kruithof, K.O. (1984) Tissue Plasminogen Activator: Chemical and physiological aspects; *Seminars in thrombosis and hemostasis* 10(1), 6 ff
- Balasubramanian, K.A., Cherian, R., Bachhawat, B.K. (1976) Immobilization of testicular hyaluronidase using Concanavalin A; *Ind. J. Biochem. Biophys.* 13, 125-128
- Barker, A. S. (1987) Immobilization of biological components of biosensor; in: *Biosensors-Fundamentals and Applications* (eds: A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson, Oxford Science Publication, Oxford, pp: 85-99
- Barnett, R. E. Jencks, W. P. (1969) Diffusion-controlled and concerted base catalysis in the decomposition of hemithioacetals; *J. Amer. Soc.* 91, 6758-6765
- Barnett, R., Jencks, W.P. (1967) Base-catalyzed hemithioacetal decomposition at a diffusion-controlled rate; *J. Amer. Chem. Soc.* 89, 5963-5964
- Bayer, K., Reinecke, M., Noe, W., Scheper, T. (1995) Immunobased elution assay for process control; *Anal. Chim. Acta*, 309 301-305
- Berenguer, J.J.; Manjon, A.; Iborra, J.L. (1989) A pH-tyrosinase [monophenol monooxygenase] biosensor for amino-acids, catecholamines and adrenergic drugs determination; *Biotechnol. Tech.* 3(3), 211-216
- Bergmeyer, H.U.; Garwehn, K. (1974) *Methoden der enzymatischen Analyse*; Bd.2 3. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim
- Beyer, K., Reinecke, M., Noe, W., Scheper, T. (1995) Immunobased elution assay for process control; *J. Biotechnol.* 309, 301-305
- Bilitewski, U., Schmidt, R. D. (1990) Von FIA bis Biosonde – biochemische Analytik in Anwendungsbeispielen; *GIT Fachz. Lab.* 34(9), 1045-1052
- Bishayee, S., Bachhawat, B.K. (1974) Interaction between concanavalin A and brain lysosomal acid hydrolases; *Biochim. et Biophys. Acta* 334, 378-388
- Bittiger, H., Schnebli, H. P. (1976) *Concavalin as a tool*; Wiley London New York
- Blankenstein, G., Preuschoff, F., Spohn, U., Mohr, K.-H. (1993) Determination of L-glutamate and L-glutamine by flow-injection analysis and chemiluminescence

- detection: comparison of an enzyme column and enzyme membrane sensor; *Anal. Chim. Acta* 271, 231-237
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding; *Anal. Biochem.* 72, 255-260
- Brandes, W., Maschke, H.-E., Scheper, T. (1993) Specific flow injection sandwich binding assay for IgG using protein A and a fusion protein; *Anal. Chem.* 65, 3368-3371
- Brandt, J., Hitzmann, B. (1993) Computer-aided detection of failures in flow injection analysis systems; *Amer. Biotechnol. Lab.* 11, 78
- Brandt, J., Hitzmann, B. (1994) Knowledge-based fault detection and diagnosis in flow-injection analysis; *Anal. Chim. Acta* 291, 29-40
- Burg, K., Mauz, O., Noetzel, S., Sauber, K. (1988) Neue synthetische Träger zur Fixierung von Enzymen; *Angew. Makromol. Chem.* 157, 105-121
- Cammann, K. (1970) Bio-sensors based on ion selective electrodes; *Fresenius Z. Anal. Chem.* 287, 1-9
- Cammann, K., Lemke, U., Rohen, A., Sander, J., Wilken, H., Winter, B. (1991) Chemical sensors and biosensors-principles and applications; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30, 516-539
- Campmajo, C., Cairo, J. J., Sanfeliu, A., Martinez, E., Alegret, S., Godia, F. (1994) Determination of ammonium and L- glutamine in hybridoma cell cultures by sequential flow-injection analysis; *Cytotechnology* 14, 177-182
- Chu, F.K., Trimble, R.B., Maley, F. (1978) The effect of carbohydrate deletion on properties of yeast external invertase; *J. Biol. Chem.* 253, 8691-8693
- Clark, L. C. (1959) Electrochemical device for chemical analysis; US-A 2913386
- Clark, L.L., Lyons, C. (1962) Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery; *N.Y. Acad. Sci.* 102, 29-45
- Collen, D. (1980) The regulation and control of fibrinolysis; Edward Kowalski Memorial Lecture; *Throm. Haemostas* 43, 77-89
- Colman, P. M., Laver, W. G., Varghese, J. N., Baker, A. T., Tulloch, P. A., Air, G. M., Webster, R. G. (1987) Three-dimensional structure of a complex of antibody with influenza virus neuraminidase; *Nature (Lond.)* 326, 358-361
- Conrath, N., Gruendig, B., Huewel, S., Cammann, K. (1995) A novel enzyme sensor for the determination of inorganic phosphate; *Anal.Chim.Acta* 309(1-3), 47-52
- Coons, A. H., Creech, H. J., Jones, R. N. (1941) Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group; *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 47, 200-202
- Coulet, P.R., Carlson, J., Porath, J. (1981) Immobilization of enzymes on metal-chelate regenerable carriers; *Biotechn. Bioeng.* 23, 663-668
- Craine, J. E. (1987) Uniform latex particles; *Am. Biotechnol. Lab.* 5, 34-41
- Danielson, B., Mattiason, B., Mosbach, K. (1981) Enzyme thermistor application and their analytical applications; *Appl. Biochem.* 3, 97-143

- Danielson, B., Mosbach, K. (1988) Enzyme thermistors; *Meth. Enzymol.* 137, 181-197
- Davis, T.P., Gehrke, C.W., Gehrke JR., C.W., Cunningham, T.D., Kuo, K.C., Gerhard, K.O., Johnson, H.D. and Williams, C.H. (1979) High-performance liquid chromatographic analysis of biogenic amines in biological materials as o-phthaldehyde derivatives; *J. Chromatogr.* 162, 293-310
- Degelau, A., Freitag, R., Linz, F., Middendorf, C., Scheper, T., Bley, T., Müller, S., Stoll, P., Reardon, K. (1992) Immuno- and flow cytometric analytical methods for biotechnological research and process monitoring; *J. Biotechnol.* 25, 115-144
- DeGrella, R. F. (1988) Fluoreszenz polarisation: a review of laboratory applications; *Am. Biotechnol. Lab.* 6(6), 29-33
- DeLeon-Hull, R., Malick, R. E., Dorsey, J. G. (1992) Dispersion phenomena in flow-injection systems; *Anal. Chim. Acta* 267, 1-24
- DIN 55350 Teil13: Begriffe der Qualitätssicherung und Statistik. Begriffe zur Genauigkeit von Ermittlungsverfahren und Ermittlungsergebnissen (Juni 1987)
- DIN 58936 Teil 1: Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin. Grundbegriffe (April 1989)
- DIN 58936 Teil 2: Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin- Begriffe zur Qualität und Anwendung von Klassierungs-, Zähl- und Meßsystemen (April 1989)
- Dullau, T., Schügerl, K. (1990) Process analysis and control by enzyme FIA-systems; in: *Flow-injection analysis (FIA) based on enzymes or antibodies; International workshop at the GBF, Braunschweig; GBF Monographie, 14* (Hrsg: Schmidt, R.D.), Verlag Chemie, Weinheim (1991), 27-39
- El Rassi, Z., Horvarth, Cs. (1986) Metal chelate interaction chromatography of proteins with iminodiacetic acid-bonded stationary phases on silica support; *J. Chromatogr.* 359, 241-253
- El Rassi, Z.E., Truei, Y., Maa, Y.-F., Horvath, C. (1988) High-performance liquid chromatography with concanavalin A immobilized by metal interactions on the stationary phase; *Anal. Biochem.* 169, 172-180
- Ernst, R., Williams, M., Dalbey, M., Collins, C., Pankey, S. (1987) Homogeneous enzyme immunoassay (EMIT) protocol for monitoring tricyclic antidepressants on COBAS-B10 centrifugal analyzer; *Ther. Drug Monit.* 9, 85-90
- Fennouh, S., Casimiri, V., Burstein, C. (1997) Increased paraoxon detection with solvents using acetylcholinesterase inactivation measured with a choline oxidase biosensor; *Biosens. Bioelectron.* 12(2), 97-104
- Figueroa, A., Corradini, C., Binyamin, F., Karger, B.L. (1986) High-performance immobilized-metal affinity chromatography of proteins on iminodiacetic acid silica-based bonded phases; *J. Chromatogr.* 371, 335-352
- Fonong, T. (1986) Amperometric determination of sulphite with sulphite oxidase immobilized at a platinum electrode surface; *Anal.Chim. Acta.* 184, 287-290
- Franzen, L.E., Svensson, S. (1980) Structural studies on the carbohydrate protein of human antithrombin III; *J. Biol. Chem.* 255, 5090-5093

- Freitag, R. (1990) Entwicklung und Automatisierung von immunochemischen Nachweisverfahren zur On line Detektion hochmolekularer Medienkomponenten in Fermentationsprozessen; Dissertation, Universität Hannover
- Freitag, R., Scheper, T., Schügerl, K. (1991) Development of a turbidimetric immunoassay for On line monitoring of proteins in cultivation processes; *Enzyme Microb. Technol.* 13, 969-975
- Funk, W., Dammann, V., Donnevert, G. (1992) Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie; VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Gardner, W.S. and Miller III, W.H. (1980) Reverse-phase chromatography analysis of amino acids after reaction with o-phthalaldehyde; *Anal. Biochem.* 101, 61-65
- Gaweru, K.; Wielinger, H.; Werner, W. (1970) Screening von Chromogenen für die Blutzuckerbestimmung nach der GOD/POD-Methode. *Z. Anal. Chem.* 252, 222-224
- Gebbert, A., Alvarez-Icaza, M., Peters, H., Jäger, V., Bilitewski, U. (1994) On line monitoring of monoclonal antibody production with regenerable flow-injection immuno systems; *J. Biotechnol.* 32, 213-220
- Gevorgyan, A.M., Tsagaraev, E.T., Allambergenov, B.A., Kalyadin, V.G. (1997) Amperometric biosensors for determining ascorbic acid in food products and pharmaceutical preparations; *Chem. Nat. Compd. (Engl. Transl.)* 32(6), 918-919
- Glacken, M. W., Fleischacker, R. J., Sinskey, A. J. (1986) Reduction of waste product excretion via nutrient control: Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells; *Biotechnol. Bioeng.* 28, 1376-1389
- Gressner, A. M. (1990) Entwicklungstendenzen nephelometrischer und turbidimetrischer immunoassays, *GIT Labor-Medizin* 9, 419-429
- Griffith, M.J. (1986) Inhibitors: antithrombin and heparin; *New Compr. Biochem. (Blood Coagulation)* 13, 259-283
- Groom, C.A.; Luong, J.H.T. (1991) Flow-through analysis biosensor system for cyanide; *J. Biotechnol.* 21(1,2), 161-172
- Hage, D.S., (1995) Immunoassays; *Anal. Chem.* 67(12) 455-462
- Hänsler, E., (1986) Medikamentenbestimmung mittels Fluoreszenzpolarisation; *Labor und Medizin* 13. Jg., Nr. 10
- Hartmeier, W. (1986) Immobilisierte Biokatalysatoren; Springer Verlag Berlin
- Heidelberger, M., Kendall, F. E. (1935) The precepitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and homologous antibody III. A quantitative study and theory of reaction mechanism; *J. Exp. Med.* 61, 563-591
- Hemmila, I. (1984) Fluoroimmunoassays and immunofluorimetric assays; *Clin. Chem.* 31, 359-370
- Hillmer, J.M., Scheper, T. (1996) A new version of an in situ sampling system for bioprocess analysis; *Acta Biotechnol.* 16, 2-3, 185-192
- Hitzmann, B., Löhn, A., Reinecke, M., Schulze, B., Scheper, T. (1995) The automatization of immun-FIA-Systems; *Anal. Chim. Acta* 313, 55-62
- Hodgin, J.C. (1979) Separation of pre-column phthalaldehyde derivatived amino acids by high-performance liquid chromatography; *J. Liq. Chromatogr.* 2, 1047-1059

- Home, P.D., Alberti, K.G.M.M. (1987) Biosensors in medicine<: the clinican`s requirements; in: Biosensors-Fndamentals and Applications (eds: A.P.F. Turner, I. Karube, G.S. Wilson, Oxford Science Publication, Oxford, pp:723-736
- Isamatec SA, Biosensors; Firmenschrift, Glattburg
- Jenkins, H. A., Butler, M., Dickson, A. J. (1992) Characterization of glutamine metabolism in two related murine hybridomas; *J. Biotechnol.* 23, 167-182
- Johnson, A. M. (1987) Nephelometric immunoassay; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 5, 803-809
- Jones, B.N., Paabo, S. and Stein, S. (1981) Amino acid analysis and enzymatic sequence determination of peptides by an improved o-phthalaldehyde precolumn labeling procedure; *J. Liq. Chromatogr.* 4, 565-586
- Jürgens, H. (1993) Entwicklung und Einsatz der Enzymkartuschentechnik in der Fließinjektionsanalyse; Dissertation, Universität Hannover
- Kaduszkiewicz, M. (1997) Aufbau eines Glucosesensors; Diplomarbeit, Universität Hannover
- Kagedahl, L. (1989) Immobilized metal ion affinity chromatography; in: Protein purification: principles, high resolution methods and applications (eds: Jansson, J. C., Ryden, L.); VCH Publisher Inc. 227-251
- Kalb, A. J., Lustig, A. (1968) The molecular weight of concavalin A; *Biochim. et Biophys. Acta* 168-366
- Karlson, P. (1984) Kurzes Lehrbuch der Biochemie; Thieme Verlag, Stuttgart
- Karube, I., Yokovama, K. (1993) Trends in biosensor research and development; *Sens. Actuators B* 13 (1-3), 12-15
- Kato, Y., Nakamura, K., Hashimoto, T. (1986) High-performance metal chelate chromatography of proteins, *J. Chromatogr.* 354, 511-517
- Kim, N., Haginoya, R., Karube, I. (1996) Characterization and food application of an amperometric needle-type L-lactate sensor; *J. Food Sci.* 61(2) 286-290
- Köhler, G., Milstein, C. (1975) Continous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity; *Nature* 256, 495-497
- Kotte, H., Gruendig, B.; Vorlop, K.-D.; Strehlitz, B.; Stottmeister, U. (1995) Methylphenazonium-modified enzyme sensor based on polymer thick films for sub-nanomolar detection of phenols; *Anal. Chem.* 67(1), 65-70
- Kotte, H., Strehlitz, B., Ethner, K., Gründig, B. (1992) Einweg-Biosensoren für umweltrelevante Analyte; Vortrag, 6. Heiligenstädter Kolloquium
- Kraemer, P.M. (1996) Biosensors for measuring pesticide residues in the environment: past, present, and future; *J. AOAC Int.* 79(6), 1245-1254
- Kronvall, G., Williams, R.C. (1969) Differences in anti-protein A activity among IgG subgroups; *J. Immunol.* 103, 828
- Lammers, F. (1996) Neue Enzymthermistoren für die On line Prozeßkontrolle in der Biotechnologie; Dissertation Universität Hannover
- Lammers, F., (1996) Neue Enzymthermistoren für die on line Prozeßkontrolle in der Biotechnologie; Dissertation, Universität Hannover

- Lindroth, P., Mopper, K: (1979) High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatisation with o-phthalaldehyde; *Anal. Chem.* 51, 1667-1674
- Lopez Erros, C., Vinas, P., Hernandez Cordoba, M. (1994) Flow injection fluorimetric analysis of sulfamethoxazole in pharmaceutical preparations and biological fluids; *Talanta*, 41, No. 12, 2159-2164
- Lübber, H. (1997) Einsatz unterschiedlicher Prozeßführungsmodi zur Charakterisierung und Beurteilung des Stoffwechsels rekombinanter CHO-Zellen; Dissertation, Universität Hannover
- Luong, J.H.T.; Groom, C.A.; Male, K.B.(1991) Potential role of biosensors in the food and drink industries; *Biosens-Bioelectron.* 6(7), 547-554
- Masseyeff, R.F., Albert, W.H., Staines, N.A. (Eds.) (1993) *Methods of Immunological Analysis*; VCH: New York Vol. 1
- Mattenheimer, M.D.H. (1986) *Die Theorie des enzymatischen Tests*; Fa. Boehringer, Mannheim
- Mauz, O., Wernicke, R. (1992) Derivatisierungsversuche am Polymerträger VA-Hydroxy Biosynth; *Biotec 1*; 30-35
- Medgeysi, G.A., Fürst, G., Gergely, J., Bazin, H. (1978) Classes and subclasses of rat immunoglobulins: interaction with the complement system and with staphylococcal Protein A
- Middendorf, C., Schulze, B., Freitag, R., Scheper, T., Howaldt, M., Hoffmann, H. (1993) On line immunoanalysis for bioprocess control; *J. biotechnol.* 31, 395-403
- Miles, L. E. M., Hales, C. M. (1968) Labeled antibodies and immunological assay systems; *Nature (London)* 219, 186-189
- Möller, J. (1988) *Flow injection analysis*; *Analytiker Taschenbuch*, Springer, Verlag Bd. 7, 199-275
- Morrison, L. E. (1988) Time-resolved detection of energy-transfer: Theory and application to immunoassays; *Anal.Chem.* 174, 101-120
- Mosbach, K. (ed.) (1987) Immobilized enzymes and cells. Part C, in: *Methods in Enzymology* (eds: S. P. Colowick, N. O. Kaplan), 136, Academic Press, Orlando
- Najjar, S. M., Weintraub, B. D. (1993) in: *Handbook of Endocrine Research Techniques*; De Pablo, F., Scanes, C. G., Weintraub, B. D. (Eds.); Academic: San Diego, CA, pp 3-23
- Nakamura, H., Matsumoto, A. and Tamura, Z. (1982) Stability of isoindole-type fluorophores derived from phthalaldehyde, primary amino compounds and thiols; *Anal. Letters* 15, 1393-1410
- Nakamura, R. M., (1984) Fluorescent immunoassay, p. 1-24. in: R. C. Boguslaski, E. T. Mazzio and R. M. Nakamura (ed.), *Clinical Immunochemistry: Principles of Methods and Applications*. Little, Brown&Co., Boston
- Nakamura, R. M., Kasahara, Y., Rechnitz, G. A. (Eds.) (1992) *Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s*, Am. Soc. Microb., Washington DC
- Nakane, P. K., Kawaoi, A. (1974) Peroxidase labeled antibody. A new method of conjugation; *J. Histochem. Cytochem.* 22, 1084-1091

- Nilsson, M., Hakanson, H., Mattiasson, B. (1991) Flow-injection ELISA for process monitoring and control; *Anal. Chim. Acta* 249, 163-168
- Nilsson, M., Hakanson, H., Mattiasson, B. (1992) Process monitoring by flow-injection immunoassay. Evaluation of a sequential competitive binding assay, *J. Chromatogr.* 597, 383
- Nygren, P.-A., Eliasson, M., Abrahmsen, L., Uhlen, M. (1988) Analysis and use of the serum albumin binding domains of streptococcal protein G; *J. Mol. Recogn.* 1(2), 69-74
- Olin, M., Carlson, J., Bülow, L. (1995) Quantitation of transition metals using genetically engineered enzymes carrying polyhistidin tails; *Anal. letters* 28(7), 1159-1171
- Ozturk, S. S., Riley, M. R., Palsson, B. O. (1992) Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism and antibody production; *Biotechnol. Bioeng.* 39, 418-431
- Paddle, B.M. (1996) Biosensors for chemical and biological agents of defence interest; *Biosens. Bioelectron.* 11(11), 1079-1113
- Porath, J., Carlson, J., Olsson, I., Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation; *Nature* 258, 598-599
- Porath, J., Olin, B. (1983) Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel immobilized iron and nickel ions; *Biochemistry* 22, 1621-1630
- Produktinformation von Pharmacia: Affinity Chromatography
- Puchades, R., Maquieira, A. (1996) Recent developments in flow injection immunoanalysis; *Crit. Rev. Anal. Chem.* 26(4), 195-218
- Puchades, R., Maquieira, A., Atienza, J. (1992) A comprehensive overview on the application of flow injection techniques in immunoanalysis; *Crit. Rev. Anal. Chem.* 23, 301-321
- Rebing, S. (1995) Zum Einsatz der Fließinjektionsanalyse in Verbindung mit immobilisierten Enzymen für Schadstoff- und Lebensmittelanalytik; Dissertation, Universität Clausthal
- Reinecke, M. (1993) Entwicklung neuer immunochemischer Methoden nach dem FIA-Prinzip zur Analyse von biotechnologisch hergestellten Proteinen; Dissertation, Universität Hannover
- Reitzer, L. J., Wice, B. M., Kennel, D. (1979) Evidence that glutamine, not sugars, is the major energy source for cultured HELA cells; *J. Biol. Chem.* 275, 2669-2676
- Renneberg, R., Trott-Kriegeskorte, G., Lietz, M., Jäger, V., Pawlowa, M., Kaiser, G., Wollenberger, U., Schubert, F., Wagner, R., Schmidt, R.D., Scheller, F.W. (1991) Enzyme sensor-FIA-system for On line monitoring of glucose, lactate and glutamine in animal cell cultures; *J. Biotechnol.* 21, 173-186
- Rieseberg, M. (1997) On line Bestimmung von L-Glutamin mittels Fließinjektionsanalyse an rCHO-Zellkulturen; Diplomarbeit, Universität Hannover
- Romette, J., Cooney, C.L. (1987) *Anal. Lett.* 20 1069-1078
- Roth, M. (1971) Fluorescence reaction for amino acids; *Anal. Chem.* 43, 880-882

- Roth, M., and Hampai, A., (1973) Column chromatography of amino acids with fluorescence detection; *J. Chromatogr.* 83, 353-356
- Rubenstein, K.E., Schneider, R.S., Ullmann, E.F. (1972) Homogeneous enzyme immunoassay: a new immunochemical technique; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 846-851
- Ruzicka, J. (1992) The second coming of flow-injection-analysis; *Anal. Chim. Acta* 261, 3-10
- Ruzicka, J., Hansen, E. H. (1975) Flow-injection-analysis I. New concept of fast continuous flow analysis; *Anal. Chim. Acta* 78, 145-157
- Ruzicka, J., Hansen, E. H. (1988) Flow-injection-analysis; 2nd edition, Wiley, New York
- Ruzicka, J., Hansen, E. H. The first decade of flow-injection-analysis: from serial assay to diagnostical tool; *Anal. Chim. Acta* 179, 1-58
- Salemudin, M., Husain, Q. (1991) Concanavalin A: A useful ligand for glycoenzyme immobilisation - a review; *Enzyme Microb. Technol.* 13, 290-295
- Schaertel, B.J., Firstenberg-Eden, R. (1988) Biosensors in the food industry: present and future; *J-Food-Prot.* 51(10), 811-820
- Scheller, F.W.; Scheller, A.B. (1996) Bienzyme electrode for determining glucitol in pharmaceutical products; *GIT Fachz. Lab.* 40(7), 706, 708-709
- Scheller, W., Hintsche, R., Pfeiffer, D., Schubert, F., Riedel, K., Kindervater, R. (1991) Biosensors: Fundamentals, applications and trends; *Sens. Actuators B* 4, 197-206
- Scheper, T (1995) Sensoren zur Überwachung biotechnologischer Prozesse; *Nachr. Chem. Techn. Lab.* 43, 328-329
- Scheper, T. (1991) Bioanalytik; Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig
- Scheper, T. (1994) Biosensoren-ein weiter Weg bis zur Industriereife; *Chemische Industrie* 6, 56-58
- Scheper, T., Hilmer, J. M., Lammers, F., Müller, C., Reinecke, M. (1996) Biosensors in bioprocess monitoring; *J. Chromatogr. A* 725, 3-12
- Schneider, J.; Gruendig, B.; Renneberg, R.; Cammann, K.; Madaras, M.B.; Buck, R.P.; Vorlop, K.-D. (1996) Hydrogel matrix for three enzyme entrapment in creatine/creatinine amperometric biosensing; *Anal-Chim-Acta.* 325(3) 161-167
- Schoemaker, H., Wall, M., Zurawski, V. (1984) *Biotech* 84 Pinner: Online: p. 405-420
- Schügerl, K. (1991) Analytische Methoden in der Biotechnologie; Vieweg Verlag, Braunschweig
- Schulze, B. (1994) Proteinanalytik mit der turbidimetrischen Immun-FIA zur Bioprozesskontrolle in der pharmazeutischen Industrie; Dissertation Universität Hannover

- Schulze, B., Middendorf, C., Reinecke, M., Scheper, T., Noe, W., Howaldt, M. (1994) Automated immunoanalysis systems for monitoring cell cultivation process; *Cytotechnology* 15, 259-269
- Sharfstein, S. T., Tucker, S. N., Mancuso, A., Blanch, H. W., Clark, D. S. (1994) Quantitative in vivo nuclear magnetic resonance studies of hybridoma metabolism; *Biotechnol. Bioeng.* 43, 1059-1074
- Shenoy, B.C., Katwa, L.C., Appu Rao, A.G., Raghavendra Rao, M.R. (1985) Fungal glucoamylases; *J. Biosci.*, 7, 399-419
- Sieber, A., Gross, J. (1975) Determination of proteins by laser nephelometry; *Protides Biol. Fluides, Proc. Colloq*, 23, 295-298
- Simons, S. S. Johnson, D.F. (1977), Ethanethiol: A thiol conveying improved properties to the fluorescent product of o-phthalaldehyde and thiols with amines; *Anal. Biochem.* 82, 250-254
- Simons, S.S. Johnson, D. F. (1978) [B] Reaction of o-phthalaldehyde and thiols with primary amines: Fluorescent properties of 1-alkyl (and aryl) thio-2-alkylisoindoles; *Anal Biochem.* 90, 705-725
- Simons, S.S. Johnson, D.F. (1978)[A], Reaction of o-phthalaldehyde and thiols with primary amines: Formation of 1-alkyl (and aryl) thio-2-alkylisoindoles; *J. Org. Chem.* 43, 2886-2891
- Skladal, P., Fiala, M. Krejci, J. (1996) Detection of pesticides in the environment using biosensors based on cholinesterases; *Int.J. Environ. Anal. Chem.* 65(1-4), 139-148
- Spohn, U., van der Pool, J., Eberhard, R., Joks, B., Wandrey, Ch. (1994) An automated system for multichannel flow-injection analysis; *Anal. Chim. Acta* 292, 281-295
- Sternson, L. A., Stobaugh, J. F., Repta, A. J. (1985) Rational design and evaluation of improved phthaldehyde-like fluorogenic reagents; *Anal. Biochem.* 144, 233-246
- Stobaugh, J. F., Repta, A. J. and Sternson, J. F. (1983) Factors affecting stability of fluorescent isoindoles derived from reaction of phthaldehyde and hydroxyalkylthiols (mercaptoethanols) with primary amines; *Anal. Biochem.* 135, 495-504
- Strehlitz, B.; Gruendig, B.; Vorlop, K.D., Bartholmes, P.; Kotte, H.; Stottmeister, U. (1994) Artificial electron donors for nitrate and nitrite reductases usable as mediators in amperometric biosensors; *Fresenius' J. Anal. Chem.* 349(8-9), 676-678
- Sulkowski, E. (1985) Purification of by IMAC; *Trends in Biotech.* 3, 1-7
- Summer, J. B. (1919) The globulins of the jack bean *canavalia ensiformis*; *J. Biol. Chem.* 37, 137
- Swallow, D.M., Evans, L., Hopkins, D.A. (1977) Several of adenosine deaminase isoenzymes are glycoproteins; *Nature* 269, 261-262
- Takahashi, S., Pollack, J., Seifter, S. (1974) Purification of γ -glutamyltransferase of rat kidney by affinity chromatography using Concanavalin A conjugated with sepharose 4B; *Biochim. et Biophys. Acta*, 371, 71-75
- Thaler, E. (1985) Antithrombin III Mangel und Thrombophilie, *Hämostaseologie* 5, 127ff

- Trepanier, J.M., Sergeant, L.E., Stinson, R.A. (1976) Affinity Purification and some molecular properties of human liver alkaline phosphatase; *Biochem. J.* 155, 653-660
- Ulber, R. (1996) Optimierung von Sensorsystemen für die Biotechnologie; Dissertation, Universität Hannover
- Van Oss, C. J. (1986) Nature of antigen antibody interaction; *J. Chromatography* 376, 111-119
- Veliky, I.A., Mc Lean, R.J.C. (Editors) (1991) Immobilized Biosystems-Theory and Practical Applications; Blackie Academic & Professional, London
- Villarta, R. L., Cunningham, D. D., Guilbault, G. G. (1991) Amperometric enzyme electrodes for the determination of L-glutamate; *Talanta* 38(1), 49-55
- Vinas, P., Lopez Erros, C., Campillo, N., Hernandez-Cordoba, M. (1996) Determination of sulphonamides in foods by liquid chromatography with postcolumn fluorescence derivatization; *J. Chromatogr. A.* 726, 125-131
- Voet, D., Voet, J. G. (1994) Biochemie ; VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Voller, A., Bidwell, D. E., Bartlett, A. (1979) The Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA); Micro Systems, Guernsey, UK
- Wang, J., Cunningham, B. A., Edelman, G. M. (1971) Unusual fragments in the subunit structure of concavalin A; *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 1130
- Waßmann, A., Hitzmann, B. (1996) Neuronale Netze zur Auswertung von Meßsignalen der Fließinjektionsanalyse; *Chem. Ing. Tech.* ???
- Werner, W.; Rey, H.G.; Wielinger, H. (1970) Über die Eigenschaften eines neuen Chromogens für die Blutzuckerbestimmung nach der GOD/POD-Methode; *Z. Anal. Chem.* 252, 224-228
- Wilms, K. (1980) Latex-Agglutinationstest zum Nachweis von Hepatitis B-surface-Antigen (HB Ag); *Immunologische Arbeitsmethoden*; H. Friemel (Ed.), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 131-133
- Wilrich, P.-Th. (1986) Qualitätsregelkarte bei vorgegebenen Grenzwerten; *QZ* 24(10), 260-280
- Yalow, R. S., Berson, S. A. (1959) Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods; *Nature (London)* 184; 1648-1649
- Zielke, H. R., Sumbilla, C. M., Sevdalian, D. A., Hawkins, R. L., Ozand, P. T. (1980) Lactate: A major product of glutamine metabolism by human diploid fibroblasts; *J. Cell Physiol.* 104, 433-441