

Entwicklung eines faseroptischen Chemo- und eines Biosensors und deren Einsatz in der Biotechnologie

Dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Hung T. Lam

geboren am 07. Juli 1972 in Ben Tre

Hannover 2002

Referent	Prof. Dr Thomas Scheper
Korreferent	Prof. Dr. Diethard Hesse
Tag der Promotion	10. Dezember 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1998 bis März 2002 im Institut für Technische Chemie unter Anleitung von Professor Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ihm möchte ich an dieser Stelle für die interessante Themenstellung, die mir angebotenen Arbeitsmöglichkeiten und die freundliche Unterstützung danken.

Herzlichen Dank auch Herrn Professor Dr Diethard Hesse für die Übernahme des Korreferates. Ebenfalls möchte ich bei Herrn Dr. Schobert vom Forschungszentrum Jülich für die kooperative Messung im NMR-Bioreaktor danken.

Einen besonderen Dank möchte ich an Herrn Dipl.-Ing. H.R. Mischke für die allzeit hilfsbereite Unterstützung sowie manche tote Nervenzellen und an meine Kollegin Amelita Bartolome für die erfolgreiche Zusammenarbeit und Freundschaft richten. Vielen Dank den CDG-Stipendiaten und Freunden, insbesondere Jang, Pui, Ha und Hang dafür, dass ich Asien wiederentdecke. Außerdem möchte ich mich bei Marc für seine stete Freundschaft und Hilfsbereitschaft bedanken.

Bei Herrn Marco Rieseberg, Alexander Loa und Georg Renemann möchte ich mich für die anregenden Gespräche herzlich bedanken.

Last but not least danke ich ebenfalls alle anderen Kollegen, die Elektronik- und Feinmechanikwerkstatt und alle anderen Kollegen im Institut für ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit.

我要題詞獻給我敬愛的父母這本論文。
林俊雄

漢諾威，十一月二〇〇二年

Abstract

Lam, Tuan Hung

Entwicklung eines faseroptischen Chemo- und eines Biosensors und deren Einsatz in der Biotechnologie

In der vorliegenden Arbeit wurden faseroptische Sensoren entwickelt, die auf dem Prinzip der Fluoreszenzmessung basieren. Dabei wurde ein bestehendes faseroptisches 4-Kanal-Fluoreszenzintensitätsmesssystem zur ausschließlichen Sauerstoffmessung so weiterentwickelt, dass zusätzlich Temperaturmessung und Toxinmessung mit Hilfe von GFP-produzierenden *E. coli* möglich ist. Aufbauend auf dem Sauerstoffsensor wird des Weiteren ein Glucosesensor entwickelt. Ferner wird die Temperaturabhängigkeit des faseroptischen Sauerstoffsensors genauer untersucht. Ein weiteres Kapitel beschreibt die Entwicklung eines faseroptischen Sauerstoffsensors, dessen Messprinzip sowohl die Fluoreszenzintensität als auch die Abklingzeit des sauerstoffsensitiven Fluorophors Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Ruthenium-Chlorid basiert.

Zur Sauerstoffmessung wird der sauerstoffsensitive Fluorophor Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Ruthenium-Chlorid verwendet. Die Fluoreszenzintensität und die Abklingzeit des Fluorophors werden auf Grund des Quenching-Prozesses durch molekularen Sauerstoff verringert. Je größer die Sauerstoffkonzentration ist, umso kleiner die Intensität bzw. die Abklingzeit. Der kombinierte Intensität- und Abklingzeitsensor ist modular aufgebaut: Die Messeinheit ist in einem separaten Gehäuse untergebracht, während die Auswerteeinheit ein PC mit eingebauter Multifunktionskarte ist. Durch Verwendung einer grafischen Programmierenebene ist es möglich, einen Steuerungsalgorithmus zu entwickeln, der komplexe Abläufe kontrolliert. Für den Benutzer des Sensors ist die Handhabung des Steuerungsprogrammes einfach. Der momentane Messwert wird dabei auf einem Onscreen-Display angezeigt, der gesamte Messverlauf wird in einem grafischen Fenster dargestellt und gleichzeitig in einer Datei gesichert.

Die Temperaturabhängigkeit des Sauerstoffsensors wird genau untersucht. Die Fluoreszenzintensität nimmt mit der Temperaturzunahme ab. Insgesamt lässt sie sich durch exponentielle Funktionen beschreiben. Es stellte sich dabei heraus, dass der Fluoreszenz-, der Quenchingprozess und die verwendete Farbstoffmatrix von der Temperatur beeinflusst werden.

Ein faseroptischer Temperatursensor wurde entwickelt. Der verwendete Fluorophor ist Rhodamin B. Das Messprinzip basiert auf dem Quenching der Rhodaminfluoreszenz durch die Temperatur. Der Sensor ist im Bereich 0-90°C linear.

Unter Verwendung des Sauerstoffsensors als Transducer wird ein Glucosesensor entwickelt. Glucoseoxidase wurde dabei auf Zeolithpulver adsorbiert, der auf der Sauerstoffmembran adhäsiv gebunden ist. Er ist bis zu einer Glucosekonzentration von $1.4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ linear.

Zur Bestimmung von erbgutschädigendes Toxin wird ein rekombinanter *E. Coli*-Stamm eingesetzt, der in Anwesenheit von erbgutschädigenden Toxinen das GFP-Gen exprimiert und das grünfluoreszierende Protein GFP produziert. Diese Fluoreszenz wird mit Hilfe eines selbst weiterentwickelten faseroptischen Messsystems gemessen. Auf diese Weise wird über die *E. coli* als Biosensor Toxin gemessen.

Stichwörter: faseroptischer Sensor, Abklingzeitmessung, GFP, Sauerstoff, Temperatur

Abstract

Lam, Tuan Hung

The development and applications of fiberoptical chemo and biosensors in biotechnology

In this thesis the development of several fiber optical sensors is described. The principle of these sensors is based on the measurement of fluorescence. An existing fiber optical 4-channel-sensor for oxygen measurement built in the institute was upgraded. The upgraded sensor system is able to measure temperature and toxin using GFP producing *E.coli*. Based on the oxygen sensor as a transducer a glucose sensor was developed. Furthermore the temperature dependency of the fiber optical oxygen sensor was subject of research in this thesis and a strategy for temperature compensation was developed. In another chapter the development of an oxygen sensor is described which measures the fluorescence intensity and decay time of the oxygen sensitive fluorophore Tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline-ruthenium(II)-chloride simultaneously.

For oxygen measurement this dye was used throughout the thesis. According to the Stern-Volmer-Law its fluorescence intensity and decay time vary with the concentration of oxygen which acts as a quencher: the higher the oxygen concentration the lower is the fluorescence intensity and decay time. The combined intensity and decay time sensor has a modular setup. The measuring unit is placed in an own case, whereas the data processing is performed in an interfaced pc with a built-in 12-bit-multifunctioncard. Using the graphical programming tool DASyLab[®] the controlling algorithm of the sensor was programmed in a user friendly way. The current measured value is displayed on an onscreen digital display; the whole curve of the measurement is displayed in a diagram that is actualized by each coming data value. At the same time all data is saved in an arbitrary file.

The temperature dependency of the oxygen sensor was examined in detail. The fluorescence intensity was found to decline with increasing temperature. It can be described by second order exponential functions. Furthermore, fluorescence intensity was also found to be dependent on the fluorophor's matrix.

A fiber optical temperature sensor was created using rhodamine B as the sensing fluorophore. The linear range of the sensor is between 0-90°C. The reproducibility is good and there is no cross sensitivity to carbon dioxide.

Using the oxygen sensor as the transducer a glucose sensor was developed. The glucose oxidase was adsorbed on zeolithe that was adhesively bound on the silicone membrane of the oxygen optode. The detection range was up to 1.4 g·l⁻¹ glucose.

For detection of genotoxic compounds a recombinant *E.coli* strain was used. This strain produces the green fluorescent protein GFP when exposed to genotoxic environment. For the measurement of this bio-fluorescence a sensor system was constructed. It could be shown that the GFP fluorescence intensity corresponds with the concentration of nalidixic acid that was used as the genotoxin.

Key words: fiber optical sensor, GFP, temperature, decay, oxygen

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung und Zielsetzung</i>	15
2	<i>Theorie</i>	17
2.1	Fluoreszenz	17
2.2	Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz.....	19
2.3	Konzentrationslöschung.....	20
2.4	Fluoreszenzlöschung (Quenching).....	20
2.5	Sauerstoff als Quencher	22
2.6	Sauerstoffsensitive Fluorophore.....	23
2.7	Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Ruthenium	24
3	<i>Der faseroptische Intensitätssensor</i>	26
3.1	Theorie.....	26
3.1.1	Sauerstoff.....	26
3.2	Aufbau des faseroptischen Fluoreszenzintensitätssensors.....	29
3.3	Temperaturabhängigkeit der Optode	31
4	<i>Der faseroptische Temperatursensor</i>	37
4.1	Theorie.....	37
4.2	Präparation der Temperaturoptode	39
4.3	Messung mit der Temperaturoptode	40
4.4	Untersuchung auf eine mögliche pH-Abhängigkeit der Temperaturoptode	45
4.5	Einfluss der Polymermatrix auf das Signalverhalten	47
5	<i>Der faseroptische kombinierte Intensität- und Abklingzeitsensor für Sauerstoffmessung</i>	49
5.1	Abklingzeitmessung	50
5.1.1	Phasenmessung	50
5.1.2	Impulsmessung.....	53
5.2	Voruntersuchungen.....	55
5.2.1	Versuchsaufbau	55
5.2.2	Optimale Triggerungsfrequenz der LED.....	56
5.3	Aufbau des optischen Systems.....	62

5.3.1	Lichtquelle	63
5.3.2	Filter	63
5.3.3	Dichroitischer Spiegel.....	64
5.3.4	Photomultiplier (PMT).....	65
5.3.5	Lichtwellenleiter/Trommellinse	66
5.4	Elektronik	67
5.4.1	Mikrokontrollerboard.....	67
5.4.2	Multifunktionskarte	68
5.4.3	DASYLab 5.6.....	69
5.5	Systemaufbau	70
5.6	Programmierung der Steuerungselektronik.....	71
5.7	Auswerteeinheit.....	74
5.8	Ermittlung der Kalibrationskurve.....	78
5.9	Langzeitmessung mit dem kombinierten Sensor.....	80
6	<i>Online-Messungen mit dem faseroptischen Sauerstoffsensor</i>	82
6.1	Online-Messung mit dem kombinierten Sensor bei einer Fermentation mit <i>Saccharomyces Cerevisae</i>	82
6.2	Sauerstoffmessung bei der Kultivierung von <i>Acremonium chrysogenum</i>	83
6.3	Fed-Batch-Kultivierung von <i>E. coli JM 109 pcrash 2</i>	84
6.4	Bestimmung von Gelöstsauerstoff in NMR-Bioreaktoren	87
6.5	Kinetische Messung der Oxidation von Ascorbinsäure und Ascorbat durch molekularen Sauerstoff.....	89
6.5.1	Theorie	89
6.5.2	Versuchsbeschreibung:.....	89
6.5.3	Resultat:	90
7	<i>Der faseroptische Glucosesensor</i>	94
7.1	Theorie	94
7.2	Präparation der Glucosesensoren.....	95
7.3	Messung.....	96
7.3.1	Glucosesensor auf Ti-Al-Zeolith-Basis	97

8	<i>Der faseroptische auf GFP basierende Toxin-Sensor</i>	103
8.1	Theorie.....	103
8.2	Das Rekombinante <i>E.coli</i> UTL2.....	105
8.3	Fluoreszenz-Spektrophotometer F-4500 als Basiseinheit.....	106
8.4	Aufbau des faseroptischen GFP-Sensorsystems.....	107
8.5	Kultivierung.....	111
8.6	Messverfahren.....	111
8.7	Resultat.....	112
9	<i>Zusammenfassung</i>	117
10	<i>Ausblick</i>	119
11	<i>Kürzerverzeichnis</i>	121
12	<i>Literatur</i>	122
13	<i>Anhang</i>	125
13.1	Temperaturabhängigkeit des Wasserdampfdruckes bei Normaldruck.....	125
13.2	Methode zur Normierung von Kalibrierkurven.....	126
13.3	Konstruktionszeichnung des LED-Gehäuses.....	127
13.4	Konstruktionszeichnungen der GFP-Meßzelle.....	128
13.5	Konstruktionszeichnung des Strahlenteilers.....	130
13.6	Lebenslauf.....	131

1 Einleitung und Zielsetzung

Optische Sensortechnologien erfahren mit rasantem Fortschritt von Laser, Photodetektoren und Mikroelektronik eine unvergleichliche Entwicklung. Besonders in der Luft- und Raumfahrt, Astronomie und Meteorologie stellen sie die einzige Alternative für telemetrische Messungen von physikalischen und chemischen Parameter dar. Ohne optische Sensoren wären moderne Wettervorhersagen, globale Umweltmessungen, geologische Untersuchungen undenkbar. Ebenso gilt dies für militärische Aufklärungen, ferngelenkte oder automatische Marschflugkörper. Die Popularität von optischen Sensoren liegt in ihrer extrem hohen Präzision, die nicht ihresgleichen findet, und Unempfindlichkeit gegenüber elektromagnetische Störungen begründet. Außerdem sind Anwendungsmöglichkeiten in allen möglichen Bereichen kaum Grenzen gesetzt.

Aus diesen Gründen wurde in neuerer Zeit ihre Forschung für industrielle, medizinische und laboratorische Applikationen forciert. In Kombination mit der Lichtleitertechnologie wurden faseroptische Sensoren entwickelt, die sich durch ihre Miniaturität und sehr schnelle Ansprechzeiten auszeichnen und hinsichtlich ihrer Messgenauigkeit viel versprechend sind. Das Messprinzip dieser Systeme basiert auf Fluorophoren, die auf bestimmte Messgrößen sensitiv reagieren und ihre Fluoreszenzeigenschaften verändern. Zum einen verändert sich nämlich mit der Konzentration des Analyten die Fluoreszenzintensität, zum anderen die Abklingzeit des Fluorophors. Sensoren, deren Messprinzip auf der Intensitätsmessung basiert, sind einfacher zu realisieren und bieten aus prinzipiellen Gründen bei Kurzzeitmessung eine höhere Präzision. Bei Langzeitmessung dagegen verliert er an Genauigkeit, da der Farbstoff durch langzeitige Bestrahlung ausbleicht und an Intensität verliert. In diesem Falle ist die Abklingzeitmessung von Vorteil, da sie im Prinzip unabhängig ist von der Fluoreszenzintensität.

Eine große Bedeutung nimmt dabei die Sauerstoffmessung ein, da sie in vielen Bereichen eminent wichtig ist. So ist beispielsweise der Sauerstoffgehalt eine der wichtigsten Parameter bei der Fermentation, ebenfalls von großer Bedeutung ist die Blutgasmessung in der Medizin und bei der Herstellung von Medikamenten in der Pharmaindustrie. Da der derzeitige Trend in der Forschung hin zur Reaktionsdurchführung und Analysen in Mikromaßstab geht, besteht aufgrund ihrer sehr guten Miniaturisierbarkeit eine große Chance für die faseroptische Sensortechnologie, sich in diesem Bereich zu etablieren.

Eine aktuelle Entwicklung verfolgt die Nutzung transgenen Mikroorganismen, die unter bestimmten Stressbedingungen das grünfluoreszierende Protein GFP produzieren. Dieser Stressbedingungen

können durch Toxine hervorgerufen werden. Durch Messung dieser Fluoreszenz kann somit Rückschlüsse auf die Toxinkonzentration geschlossen werden. Da die genetische Initiierung zur GFP-Produktion substratspezifisch ist, können somit sehr selektiv und ohne Querempfindlichkeit auf den Analyten geschlossen werden. Des Weiteren ist das GFP ein sehr stabiler Fluorophor mit hohem Emissionswert, so dass es ein relativ hohes und stabiles Messsignal liefert.

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Eigenschaften des faseroptischen Intensitätssensor zur Sauerstoffmessung genauer untersucht und bei Fermentationen getestet. Dabei wird bei der Untersuchung großes Gewicht auf die Temperaturabhängigkeit gelegt. Ferner wird das Potentials des Sensors als Transducer für auf Enzyme basierende Biosensoren getestet. Ein weiterer Part der Arbeit besteht in der Entwicklung eines kombinierten faseroptischen Sauerstoffsensorsystems, das sowohl auf der Intensitäts- als auch der Abklingzeitmessung basiert. Ausserdem wird ein faseroptisches Toxinsensorsystem auf der Basis eines GFP-produzierenden *E.coli*-Stammes entwickelt und charakterisiert.

2 Theorie

2.1 Fluoreszenz

Unter Fluoreszenz versteht man eine Leuchterscheinung von festen, flüssigen und gasförmigen Stoffen, die so lange beobachtet werden kann, wie diese Stoffe Licht bestimmter Wellenlänge ausgesetzt sind. Fluoreszierende Stoffe bezeichnet man als Fluorophore. Typische Fluorophore sind aromatische und heteroaromatische Verbindungen.

Der Prozeß der Fluoreszenz wird durch Absorption von elektromagnetischer Strahlung bestimmter Wellenlänge initiiert. Das Molekül geht dabei gemäß dem Franck-Condon-Prinzip in einem vertikalen Übergang vom elektronischen Grundzustand in den angeregten Zustand über. Angeregte Moleküle können mit Moleküle in der Umgebung kollidieren, die absorbierte Energie in Form von Phononen in strahlungslosen Übergängen (internal conversion, strahlungslose Desaktivierung) abgeben, und auf das Grundschnwingungsniveau des elektronisch angeregten Zustands gelangen. Da die Energiedifferenz zwischen dem elektronisch angeregten Zustand und dem elektronischen Grundzustand größer ist, als dass die Energie durch eine Kollision abgeführt werden kann, erfolgt die Desaktivierung durch spontane Strahlungsemission, die Fluoreszenz.

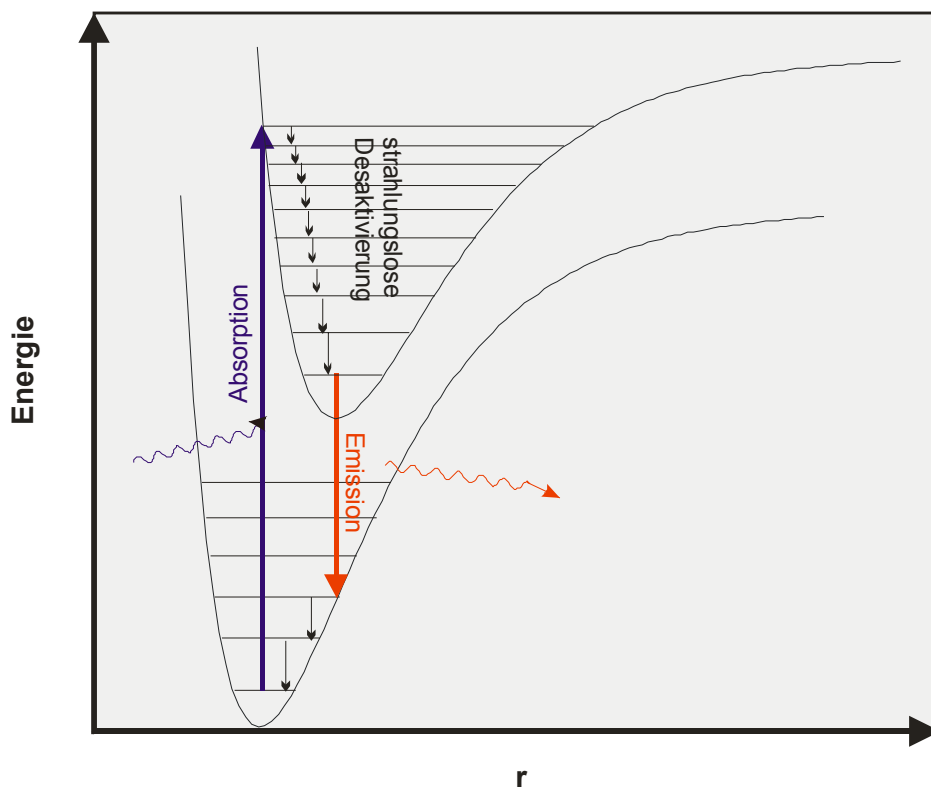


Abbildung 1 Quantenmechanische Deutung der Fluoreszenz

Da ein Teil der absorbierten Energie durch strahlungslose Desaktivierung verloren geht, ist die Energie der Fluoreszenzstrahlung kleiner als die Anregungsenergie. Die strahlungslose Desaktivierung bestimmt die Stärke des Fluoreszenzlichtes, die durch die Quantenausbeute ϕ ausgedrückt werden kann. Diese ist wie folgt definiert:

$$\text{Quantenausbeute} \quad \phi = \frac{\text{Anzahl emittierter Photonen}}{\text{Anzahl absorbierter Photonen}} \quad \text{Gl. 1}$$

Die Anzahl der Photonen wird quantenmechanisch durch statistische Übergangsraten k ausgedrückt.

$$\text{Quantenausbeute} \quad \phi = \frac{k_f}{k_f + k_i} \quad \text{Gl. 2}$$

k_f = Übergangsrate für die Fluoreszenz

k_i = Übergangsrate für die internal conversion

Häufig erweist es sich als bequem, wenn man eine weitere Definition, die Lebensdauer τ einführt. Sie gibt die Zeit an, die ein System in einem bestimmten Zustand existiert. Dabei entspricht die Lebensdauer τ dem Kehrwert der Übergangsrate k .

Die Fluoreszenzlebensdauer ist ein Maß dafür, wie lange ein Molekül im angeregten Zustand verweilt, bevor die Fluoreszenzemission erfolgt. Die Lebensdauer eines angeregten Moleküls ist dagegen die Zeitdauer, die das Teilchen im angeregten Zustand verweilt.

$$\text{Fluoreszenzlebensdauer} \quad \tau_f = \frac{1}{k_f} \quad \text{Gl. 3}$$

$$\text{Lebensdauer des angeregten Moleküls} \quad \tau = \frac{1}{k_f + k_i} \quad \text{Gl. 4}$$

2.2 Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz

Die Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz lässt sich anhand des unteren Schemas verdeutlichen:

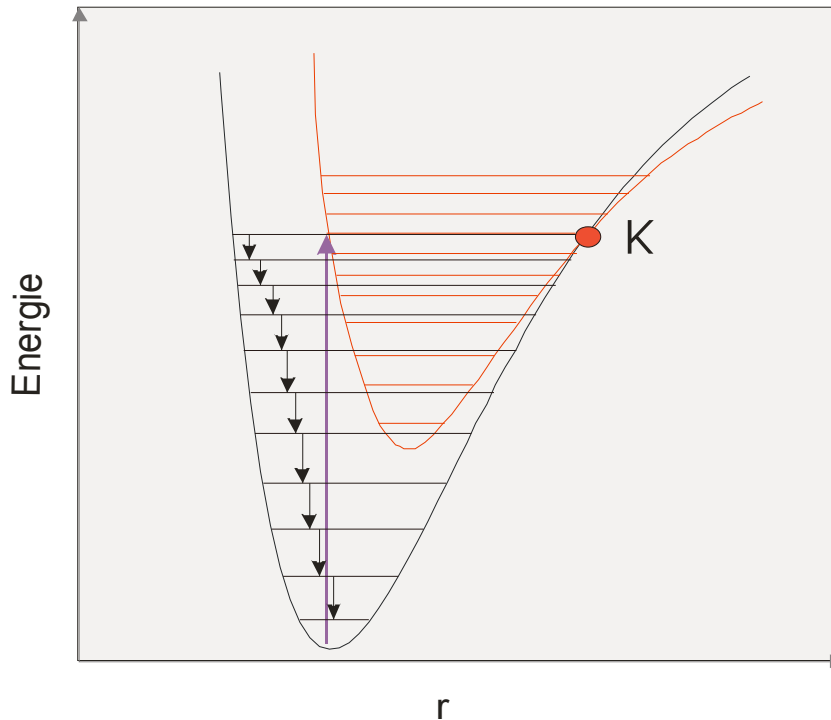


Abbildung 2 Quantenmechanische Deutung der Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz

Die Potentialkurven des angeregten und des Grundzustandes schneiden sich in einem bestimmten Punkt K. D.h. an dieser Stelle fällt ein Schwingungsniveau des elektronisch angeregten Zustands mit einem Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustand zusammen. Das angeregte Fluoreszenzzentrum kann sich infolge der thermischen Aktivierung in einem angeregten Schwingungsniveau befinden, das bei dem Überkreuzungspunkt K der Potentialkurven des Grundzustands und des angeregten Zustands liegt. Hat das Fluoreszenzzentrum diese Energie erreicht, wird es strahlungslos in den Gleichgewichtsabstand des Grundzustands zurückkehren und seine Energie in Form von Phononen an das Farbstoffkristallgitter abgeben. Daher sinkt mit steigender Temperatur die Quantenausbeute. Für jeden Fluoreszenzfarbstoff gibt es eine sogenannte Löschtemperatur, bei der die Fluoreszenz verschwindet. Sie ist umso kleiner, je kleiner die Energiedifferenz zwischen dem Schwingungsgrundzustand und dem Kreuzungspunkt K ist.[27]

2.3 Konzentrationslöschung

Die Quantenausbeute eines Fluoreszenzfarbstoffes ist von seiner Konzentration abhängig und durchläuft bei einer bestimmten für jeden Farbstoff charakteristischen Konzentration ein Maximum. Bei geringer Konzentration ist der Abfall aufgrund der geringen Emissionszentren verständlich. Die Abnahme bei höheren Konzentration (Konzentrationslöschung) ist für breitbandig emittierende Farbstoffe nach einer Theorie von Dexter und Schumann zu erklären. Übersteigt danach die Aktivatorkonzentration (Fluoreszenzcentrenkonzentration) in einem Wirtsgitter einen bestimmten Grenzwert, wird der Abstand zwischen den Aktivatoren so klein, daß ein gegenseitiger Energietransfer stattfindet. Die Anregungsenergie kann dabei zu sogenannten Killerzentren gelangen, wobei sie strahlungslos verloren geht. Killerzentren sind beispielsweise Verunreinigungen, Gitterfehler, Oberflächendefekte. Um die Killerzentren auf einer minimalen Konzentration zu halten, dürfen Fluoreszenzfarbstoffe z.B. nicht durch Mahlen zerkleinert werden, da auf diese Weise Defekte erzeugt werden.

Bei schmalbandig emittierenden Aktivatoren erfolgt die Konzentrationslöschung über eine Kreuzrelaxation. Dabei findet ein Energietransfer zwischen zwei benachbarten Aktivatoren in nicht lumineszierende Terme statt. Dieser Prozeß wird als Selbstlöschung bezeichnet.[27]

2.4 Fluoreszenzlöschung (Quenching)

Die Fluoreszenzquantenausbeute eines Fluorophors wird nicht nur durch seine intrinsischen Eigenschaften bestimmt, sondern auch durch sogenannte Löschermoleküle (Quencher) beeinflusst. Dabei wird die Anregung des Fluorophors nicht beeinflusst. Vielmehr wird Energie des angeregten Fluorophors durch Wechselwirkung mit dem Quencher strahlungslos abgeführt.

Es gibt zwei verschiedene Arten des Quenchings:

1. dynamisches Quenching
2. statisches Quenching

Bei der dynamischen Fluoreszenzlöschung wird durch Stoßprozesse die Energie vom Fluorophor abgeführt. Dieser wird dabei chemisch nicht verändert.. Die Quantenausbeute des Fluorophors bei einem Quenchprozeß nimmt durch die Einführung der Übergangsrate k_Q für das Quenching folgende Gestalt an:

Übergangsrate für das Quenching

$$\phi_Q = \frac{k_f}{k_f + k_i + k_Q} \quad \text{Gl. 5}$$

Bildet man unter Berücksichtigung der vorausgegangenen Gleichungen 3 das Verhältnis der Quantenausbeuten mit und ohne Löschermolekülen, so erhält man

Quantenausbeute mit Quencher

$$\frac{\phi_0}{\phi} = \frac{k_f + k_i + k_Q}{k_f + k_i} = 1 + \frac{k_Q}{k_f + k_i} = 1 + k_Q \tau \quad \text{Gl. 6}$$

Bei einer konstanten Konzentration des Fluorophors ist die Übergangskonstante k_Q für die Fluoreszenzlöschung proportional zur Konzentration c_Q der Löschermoleküle:

Übergangskonstante

$$k_Q = K_{SV} * [Q] \quad \text{Gl. 7}$$

K_{SV} = Stern-Volmer-Konstante

Da die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Quantenausbeute ϕ ist, lässt sich Gleichung 5 wie folgt umschreiben:

Stern-Volmer-Gleichung

$$\frac{I_0}{I} - 1 = K_{SV} * c_Q * \tau \quad \text{Gl. 8}$$

Diese Gleichung ist die Stern-Volmer-Gleichung. Sie ist linear, die Steigung ist $K_{SV} * \tau$. Dies hat bei der Auswahl von Fluorophoren für die optische Messung von Quencherkonzentration eine große Bedeutung. Je größer die Stern-Volmer-Konstante und Lebensdauer ist, desto empfindlicher reagiert der Fluorophor auf die Konzentrationsänderung der Quenchemoleküle.

Im Gegensatz zur dynamischen handelt es sich bei der statischen Fluoreszenzlöschung um eine chemische Reaktion. Dabei bildet das Quenchemolekül mit dem energiereichen angeregten Fluorophor unter Energieverbrauch ein Komplex, was zum einen eine Fluoreszenzlöschung und zum anderen eine Veränderung der chemischen Eigenschaft des Fluorophors zur Folge hat.

Die Quantenausbeute ϕ mit Löschermolekülen ist gegeben durch folgende Beziehung:

Quantenausbeute mit Löschermolekülen

$$\phi = \frac{[M^*]}{[Q^*] + [M^*]} \quad \text{Gl. 9}$$

Bildet man das Verhältnis zwischen der Quantenausbeute ϕ_0 ohne Löschermolekülen und der mit Löschermolekülen ϕ , so erhält man folgende Beziehung:

relative Quantenausbeute

$$\frac{\phi_0}{\phi} = \frac{[MQ']}{[M']} + 1$$

Gl. 10

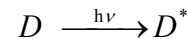
 $\phi_0 = 1$ (per Definition)

Ein Vergleich zwischen den Quantenausbeuten der dynamischen und statischen Fluoreszenzlöschung zeigt eine formelle Analogie. Im Gegensatz zum statischen Löschprozeß ist der dynamische zusätzlich von der Lebensdauer des angeregten Moleküls abhängig (siehe Gleichung 9).

2.5 Sauerstoff als Quencher

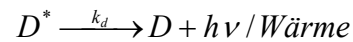
Das diatomare Sauerstoffmolekül kommt unter normalen Bedingungen als Triplett-Sauerstoff vor. Durch Energiezufuhr wandelt es sich durch einen elektronischen Übergang in das sehr reaktive Singulett-Sauerstoff um. Die für den Übergang benötigte Energie kann in Form von elektromagnetischen Wellen oder chemisch durch energiereiche Moleküle, wie z.B. angeregte Fluorophormoleküle, übertragen werden.

I) Anregung des Donors durch Licht :

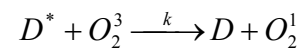


II) Deaktivierung des Donors

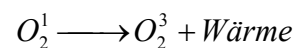
a – durch Emission oder interne Konversion :



b – Energieübertragung auf den Triplett-Sauerstoff :



III) Deaktivierung des Singulett-Sauerstoffs



Der Mechanismus der Energieübertragung durch angeregte Moleküle besteht aus folgenden Schritten: Der im ersten Schritt durch Licht angeregte Donor wird im zweiten Schritt in Abwesenheit von Sauerstoff durch strahlungslose Übergänge bzw. durch Emission von Licht deaktiviert. Bei Anwesenheit von Sauerstoff erfolgt die Deaktivierung zusätzlich noch durch Energieübertragung auf den Triplett-Sauerstoff, wobei dieser in einen elektronisch angeregten Zustand, den Singulettzustand gelangt: Der Prozeß wird als Quenching bezeichnet. Um die Stärke des Quenchings abschätzen zu können, bildet man das Verhältnis zwischen k und k_d , welches als Stern-Volmer-Konstante K_{SV} bezeichnet wird. Der so erhaltene sehr reaktive Singulett-Sauerstoff kann unter Abgabe von Wärme in den Triplettzustand zurückkehren oder in Anwesenheit von reaktiven Reagenzien mit diesen chemisch reagieren.

2.6 Sauerstoffsensitive Fluorophore

Es gibt eine Reihe von Fluorophoren, die durch Sauerstoff gequenchet werden. Zu ihnen gehören eine Reihe von polycyclischen aromatischen Verbindungen sowie Komplexverbindungen mit unterschiedlichen Metallionen aus den Nebengruppen (Os, Ir, Ru, Sm...). Die aromatischen Verbindungen kennzeichnen sich dadurch, daß sie im energiereichen Bereich des ultravioletten oder im kurzwelligen Bereich des sichtbaren Spektrums absorbieren. Die Komplexverbindungen werden ebenfalls durch kurzwellige elektromagnetische Wellen angeregt. Das Absorptionsspektrum liegt jedoch im längerwelligen Bereich als es bei den aromatischen Verbindungen der Fall ist.

	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]	Stokes' shift [nm]
Fluoranthren	365	460	95
3-Aminofluoranthren	370	516	146
Coronen	345	450	105
Pyren	330	400	90
Decacyclen	380	510	13

Tabelle 1 Spektroskopische Daten einiger polycyclisch aromatischer Fluorophore [1]

	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]	Shift [nm]	$\epsilon \cdot 10^{-4}$ [$l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]	ϕ	τ [μs]	K_{sv} [M^{-1}]
[Ru(bpy) ₃] ²⁺	455	604	149	1.36	0.042	0.6	2060
[Ru(phen) ₃] ²⁺	447	605	158	1.81	0.058	1.0	4900
[Ru(DPP) ₃] ²⁺	438	618	180	2.86	0.366	6.4	13600

Tabelle 2 Spektroskopische Daten einiger Rutheniumkomplexe [1]

Bei der Auswahl von Fluorophoren als optischen Sauerstoffsensoren ist auf folgende Auswahlkriterien zu achten:

Auswahlkriterium	erzielter Nutzen
lange Lebenszeit des angeregten Zustandes τ	hohe Sauerstoffsensibilität
große Stern-Volmer-Konstante	gute Absorption des Anregungslichtes geringere Fremdlichtempfindlichkeit
hohe Quantenausbeute	hohe Fluoreszenzlichtintensität geringere Detektorempfindlichkeit notwendig besseres Signal/Rausch-Verhältnis
Excitations- und Emissionswellenlänge im sichtbaren Spektralbereich	Einsatz von preisgünstigen LED oder intensiven Halbleiterlasern als Exzitationslichtquelle kleinen Siliziumphotodioden als Detektoren
großer Stokes' shift	einfache Auftrennung von Exzitations- und Emissionsstrahlung
Wasserunlöslichkeit des Fluorophors	kein Auswaschen aus der Fluorophormatrix

Tabelle 3 Erwünschte Eigenschaften von Fluorophoren für die Analytik [1]

2.7 Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Ruthenium

Der in dieser Arbeit verwendete Fluorophor ist der metallorganische Komplex Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Ruthenium. Er hat eine Molmasse von $1098 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Das Ruthenium(II)-Kation ist oktaedrisch durch drei zweizählige Liganden Diphenyl-Phenanthrolin-Moleküle komplexiert.

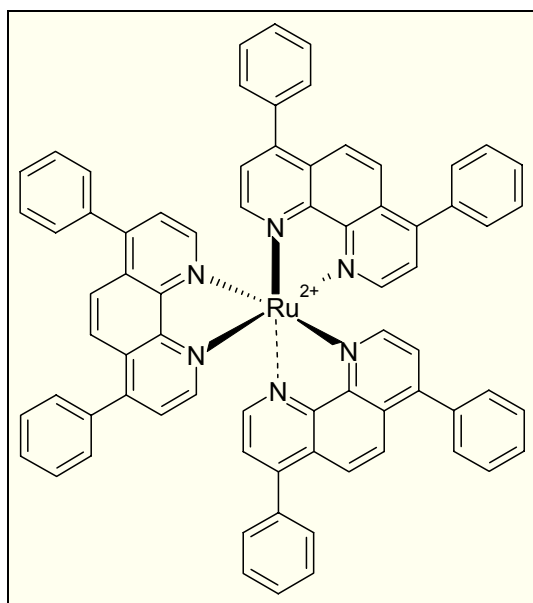


Abbildung 3 Molekülstruktur von Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Ruthenium

Der Fluorophor besitzt ein ausgedehntes delokalisiertes π -Elektronensystem, wodurch die Lichtabsorption vom UV-Bereich hin zum sichtbaren Bereich verschoben ist. Die Exzitation erfolgt dabei nicht nur über das π -Elektronensystem allein, sondern ebenfalls auch über d-d-Übergänge im Zentralatom sowie über Charge-Transfer-Übergänge zwischen Rutheniumion und den Liganden. Abbildung 4 zeigt, dass Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Ruthenium innerhalb des UV-VIS-Bereiches drei Exzitationsmaxima hat, wobei das Maximum bei etwa 480nm die höchste Fluoreszenzintensität hervorruft. Die Fluoreszenzmaxima liegen alle im Bereich von 600nm, wenn der Fluorophor in Chloroform gelöst ist.

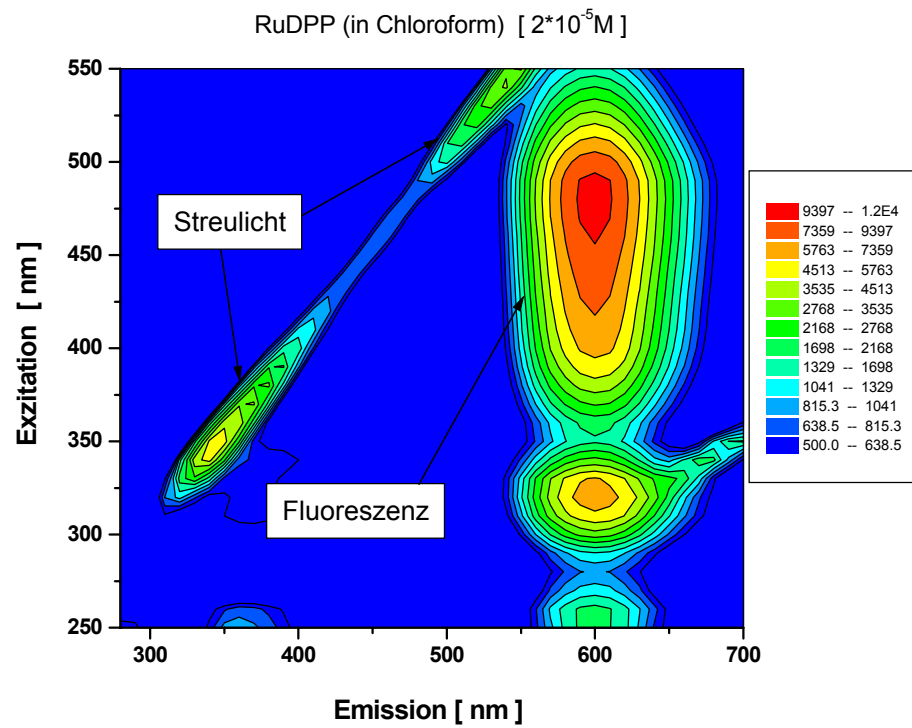


Abbildung 4 2D-Fluoreszenzspektrum von Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Ruthenium (gelöst in Chloroform, $2 \cdot 10^{-5}$ molar)

3 Der faseroptische Intensitätssensor

Der vorliegende Sauerstoffsensor enthält keine Temperaturkompensation. Daher eignet er sich nicht für Messungen von nicht isothermen Prozessen. Um eine geeignete Strategie für eine Temperaturkompensation zu entwickeln, wird im Folgenden die Temperaturabhängigkeit der Optode untersucht.

3.1 Theorie

3.1.1 Sauerstoff

Elementarer Sauerstoff existiert unter Standardbedingungen vor allem als diatomares Sauerstoffmolekül. Dieses befindet sich unter Standardbedingung im Triplettzustand und ist ein Diradikal, was seine gute Reaktionsfähigkeit und seinen paramagnetischen Charakter erklärt. Unter Lichteinstrahlung wandelt sich der Triplett-Sauerstoff unter Spinumkehr in den sehr reaktiven Singulett-Sauerstoff um, der diamagnetisch wird.

Zusammensetzung der Erdatmosphäre	Anteil [Vol-%]
Stickstoff	78.09
Sauerstoff	20.95
Edelgase	0.93
Kohlendioxid	0.03

Tabelle 4 Zusammensetzung der Erdatmosphäre

Sauerstoffsensoren können in der Regel nur den Sauerstoffpartialdruck messen und nicht seine Konzentration. Da der Partialdruck von verschiedenen Faktoren abhängen, ist es wichtig diese Einflüsse zu kennen.

Jede mit der Gasphase in Kontakt stehende Flüssigkeit tauscht mit dieser soviel Gas aus, bis die Fugazität, d.h. der Partialdruck des gelösten Gases in Gleichgewicht steht mit dem Partialdruck in der Gasphase. Hat die Flüssigkeit den Gleichgewichtszustand erreicht, so ist sie mit dem Gas in der Gasphase gesättigt. Steht Wasser mit Luft in Kontakt, so ist sie u.a. mit Sauerstoff gesättigt. Der relative Sauerstoffpartialdruck von trockener Luft beträgt 20.95 Prozent. Da die mit Wasser in Kontakt stehende Luft stets mit Wasserdampf gesättigt ist, ist der Sauerstoffpartialdruck um den Betrag des Wasserdampfes vermindert:

$$p_{O_2} = 0.2095 * (p_{Luft} - p_{H_2O}) \quad \text{Gl. 11}$$

Der Dampfdruck jeder beliebigen Flüssigkeit ist abhängig von der Temperatur. Mit zunehmender Temperatur wächst der Dampfdruck. Dies hat als Konsequenz, dass der Sauerstoffpartialdruck mit zunehmender Temperatur kleiner wird. Der Dampfdruck einer beliebigen Flüssigkeit lässt sich in erster Näherung mit der Clausius-Clapperon-Gleichung beschreiben [2]:

$$\text{Clausius-Clapperon: } p(T_2) = p(T_1) * e^{-\frac{\Delta H_V}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right)} \quad \text{Gl. 12}$$

$$\Delta H_V = 40.7 \text{ kJ} \cdot \text{Mol}^{-1}$$

$$R = 8.314 \text{ Joule} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$$

Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Verdampfungsenthalpie ΔH_V ebenfalls temperaturabhängig ist, was bei großer Temperaturunterschied zwischen T_1 und T_2 zu nicht zu akzeptablem Fehler führt. Daher werden basierend auf Literaturdaten (s. Anhang S. 125) folgende Näherung für Wasser eingeführt:

$$p_{H_2O}^0 = 0.6099 + 0.0453 * T + 0.0013 * T^2 + 3.2589 * 10^{-5} * T^3 + 1.4874 * 10^{-7} * T^4 + 4.0093 * 10^{-9} * T^5 - 4.5230 * 10^{-12} * T^6 \quad \text{Gl. 13}$$

Diese Näherung setzt als Vorbedingung den normalen Atmosphärendruck voraus. Für andere Drücke muss sie um einen Relationskoeffizienten erweitert werden:

$$p_{H_2O} = \frac{p}{p^0} * p_{H_2O}^0 \quad \text{Gl. 14}$$

$p^0 = \text{Normaldruck}$

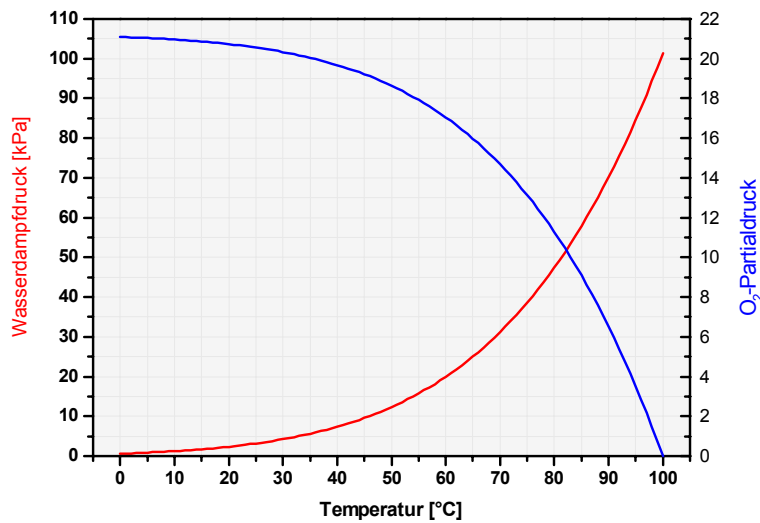


Abbildung 5 Einfluss der Temperatur auf den Wasserdampfdruck und O₂-Partialdruck unter Normaldruck

In manchen Fällen ist es wichtig, die Sauerstoffkonzentration zu wissen. Diese ist proportional von dessen Partialdruck abhängig. Sinkt der Sauerstoffpartialdruck, so nimmt auch die Konzentration ebenfalls ab. Ein weiterer Faktor, der sich auf die Konzentration von Sauerstoff in einer Flüssigkeit auswirkt, ist seine Löslichkeitseigenschaft in dieser Flüssigkeit. Diese Abhängigkeiten werden durch das Henry'sche Gesetz beschrieben:

$$p_{O_2} = K_H * x_{O_2} \quad \text{Gl. 15}$$

K_H = Henry-Konstante

x = Molenbruch

In der Praxis wird statt des Henry-Gesetzes folgende Gleichung benutzt:

$$[O_2] = \frac{a_{O_2} * p_{O_2} * M_{O_2}}{V_M} \quad \text{Gl. 16}$$

a = Bunsenscher Absorptionskoeffizienten

M = Molmasse

V = Molvolumen

Die obige Gleichung ist nur für reine Lösungsmittel gültig. Befinden sich gelöste Stoffe im Lösungsmittel, so tritt der Aussalzeffekt auf, der die Sauerstofflöslichkeit verringert. So enthält Meerwasser weniger Gelöstsauerstoff als Süßwasser. Diese Effekt wird durch die Einführung der Salinität berücksichtigt.

3.2 Aufbau des faseroptischen Fluoreszenzintensitätssensors

Der in den folgenden Kapiteln verwendete faseroptische 4-Kanalsensor basiert auf der Messung von Fluoreszenzintensität. Er ist im Institut zur Messung von Sauerstoff mit Hilfe der metallorganischen Rutheniumkomplexe, Tris(2,2'-bispyridin)-ruthenium(II) und Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Ruthenium entwickelt worden. Dem entsprechend sind die optischen Filter für diesen Zweck ausgelegt. Der optische Aufbau besteht aus einer blauen LED als Exzitationslichtquelle, Exzitations- und Emissionslichtfilter, einem dichroitischen Spiegel, Kugellinse, Lichtwellenleiter und Photomultiplier:

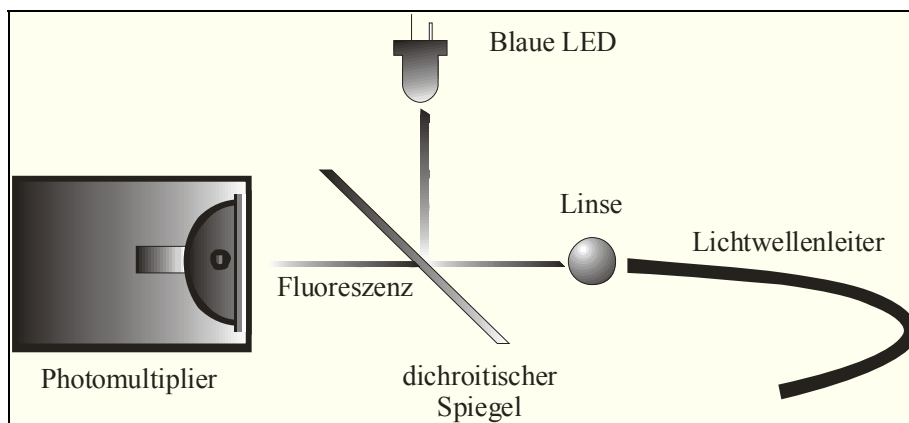


Abbildung 6 Optischer Aufbau des faseroptischen Fluoreszenzintensitätssensors

Die Messung läuft so ab, dass mit Hilfe eines Timerbausteins Rechteckssignale erzeugt werden, die die LED mit einer Frequenz von 1kHz moduliert. Das modulierte LED-Licht trifft nach Passieren eines Blaulichtfilters, das für Licht bis zu einer Wellenlänge von ca. 490nm durchlässig ist, auf den dichroitischen Spiegel, der in 45°-Stellung zur Strahlrichtung des Exzitationslichtes steht. Bei diesem Spiegel handelt es sich um einen frequenzabhängigen Strahlenteiler, der von seiner chemischen Beschichtung und in dieser geometrischen Anordnung das blaue Licht der LED zur Kugellinse hinreflektiert. Diese fokussiert den Lichtstrahl in den Lichtwellenleiter, der einen Kerndurchmesser von 600µm hat und an dessen Ende der Fluorophor immobilisiert ist. Der so präparierte Lichtwellenleiter stellt die essentielle sauerstoffmessende Komponente des Systems dar und wird als **Optode** bezeichnet. Das LED-Licht regt den Fluorophor an. Ein Teil des ebenfalls modulierten Fluoreszenzlichtes wird von demselben Lichtwellenleiter zurück ins Innere des optischen Systems geleitet, wo es nach Passieren der Kugellinse an den dichroitischen Spiegel gelangt, der für Licht ab einer Wellenlänge von 500nm durchlässig ist. Auf diese Weise erreicht das Fluoreszenzlicht schließlich den Photomultiplier. Dort wird dieses Lichtsignal in ein elektrisches umgewandelt und zur Verarbeitung an die elektronischen Auswerteeinheit geleitet.

Optische Komponente	Serienbezeichnung	Hersteller
LED	LNG992CFB	Panasonic, Japan
Exzitationsfilter	SWP490	Delta Light&Optics, Denmark
Emissionsfilter	LWP515	Delta Light&Optics, Denmark
Dichroitischer Spiegel	SWP500	Delta Light&Optics, Denmark
Kugellinse	W43-712	Edmund Sciencetific, USA
Lichtwellenleiter	HCS600	Lasercomponents, Deutschland
Photomultiplier	H5701	Hamamatsu, Japan

Tabelle 5 Optische Komponenten des 4-Kanal-Fluoreszenzintensitätssensors

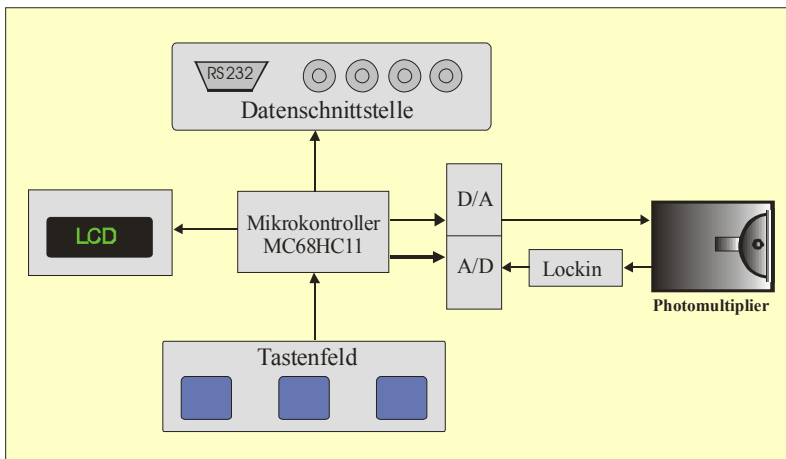


Abbildung 7 Schematischer elektronischer Aufbau des faseroptischen Sensors

Das modulierte Ausgangssignal vom PMT wird mit Hilfe eines Lockin-Verstärkers vom Gleichlichtanteil und Rauschen isoliert und anschließend verstärkt. Anschließend wird es von einem 12-Bit-Analog-Digital-Konverter digitalisiert. Das digitalisierte Signal wird im darauf folgenden Schritt von der Mikrokontrollereinheit durch Ausführen des im Eprom abgelegten Programms ausgewertet. Der Mikrokontroller kontrolliert und wacht über sämtliche Prozesse. Die ausgewerteten Daten werden dann vom Mikrokontroller einerseits auf ein LCD-Display, andererseits auf die digitale Schnittstelle RS232 und auf die analoge BNC-Schnittstelle ausgegeben. Außerdem kontrolliert er über den Digital-Analog-Konverter die Kontrollspannung des PMT und regelt somit dessen Sensitivität. Das Sensorsystem verfügt über drei Tasten, mit deren Hilfe der Anwender die Messparameter einstellen und die Messung starten bzw. beenden kann.

Elektronischer Baustein	Serienbezeichnung	Hersteller
Lockin-Verstärker	AD630	Analog Devices, USA
Timer	NE555	Analog Devices, USA
AD-Konverter	ADC 674	Analog Devices, USA
Mikrokontroller	MC68HC11	Motorola, USA

Tabelle 6 Elektronische Hauptkomponenten des faseroptischen Sensors

3.3 Temperaturabhängigkeit der Optode

Wie jedes andere System ist auch die Optode von der Temperatur abhängig, da sowohl die Fluoreszenzemission des Fluorophors als auch die Membran, in der der Farbstoff eingebettet ist, von der Temperatur beeinflusst werden. Denn einerseits wird mit zunehmender Temperatur die strahlungslose Energieabgabe des angeregten Fluorophors in Form von Phononen stärker begünstigt, andererseits dehnt sich die Membran aus, so dass die Farbstoffkonzentration abnimmt. Ebenfalls ändert sich das Quenchingverhalten des Sauerstoffs gegenüber dem Farbstoff mit der Temperatur. Im Folgenden wird das Fluoreszenzverhalten der Optode bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Das Messmedium ist Wasser, dessen Temperatur mit Hilfe eines Thermostaten kontrolliert, und der Sauerstoffgehalt durch Begasung des Wassers mit einem Stickstoff-Sauerstoffgemisch geregelt werden, dessen Zusammensetzung an zwei Massflowcontroller (Mättig, Deutschland) eingestellt wird. Für die Optode wird der auf Kieselgel (Lichrosorb 100) adsorbierte Fluorophor Tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin)-ruthenium(II)chlorid verwendet. Die Membran ist aus Silicon (RTV E43, Wacker). Die Messung in Abwesenheit von Sauerstoff ergibt, dass die Fluoreszenz stetig mit steigender Temperatur abnimmt. Diese Abnahme des Signals ist nur auf die Temperaturabhängigkeit des Membrans und des Fluorophors zurückzuführen.

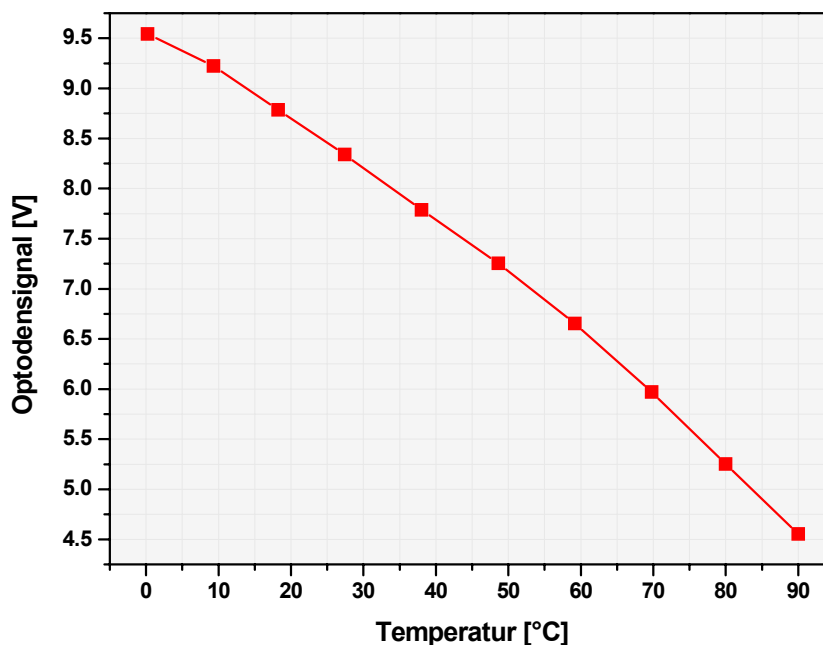


Abbildung 8 Temperaturabhängigkeit der Optode bei Abwesenheit von Sauerstoff

Dabei ist auffällig, dass ein äquidistanter Temperatursprung bei hohen Temperaturen zu einer größeren Fluoreszenzabnahme führt als bei niedrigen Temperaturen. Führt man eine polynomiale Regressionsanalyse durch, erhält man für den verwendeten Messbereich eine quadratische Gleichung:

$$f(x) = A + B_1 * x + B_2 * x^2 \quad \text{Gl. 17}$$

Parameter	Wert	Fehler
A	9.55844	0.02146
B ₁	-0.03836	0.00114
B ₂	-1.90911E-4	1.21883E-5
R-Quadrat)	0.99979	
SD	0.02771	

Tabelle 7 Ermittelte Parameterwerte der quadratischen Näherung

Untersucht man die Temperaturabhängigkeit der Optode bei verschiedenen Stickstoff-Sauerstoffgemischen, wie es in Abbildung 8 wiedergegeben wird, erkennt man, dass der Kurvenverlauf sich mit dem Sauerstoffgehalt verändert. Bei Abwesenheit von Sauerstoff ist die Kurve negativ gekrümmt, bei einer Begasung mit einem Prozent Sauerstoff ist der Kurvenverlauf nahezu linear. Mit steigendem Sauerstoffanteil geht die negativ gekrümmte Kurve in eine positiv gekrümmte über, wobei ein Minimum in einem Temperaturbereich von 70-80°C zu sehen ist. Die Entstehung des Extremums ist auf die Wirkung des Temperatureffektes auf den Sauerstoffpartialdruck und die Fluoreszenz zurückzuführen. Denn einerseits begünstigt die Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes durch Temperaturzunahme ein höheres Fluoreszenzsignal, andererseits aber nimmt die Fluoreszenz gleichzeitig wegen der erhöhten Tendenz zu strahlungsloser Energieabgabe ab. Dieser Effekt hat insgesamt eine limitierende Wirkung auf den Messbereich der Optode mit dieser Konfiguration, da oberhalb von 70 °C das Optodensignal sich nicht mehr eindeutig auf einen bestimmten Sauerstoffgehalt zurückführen lässt.

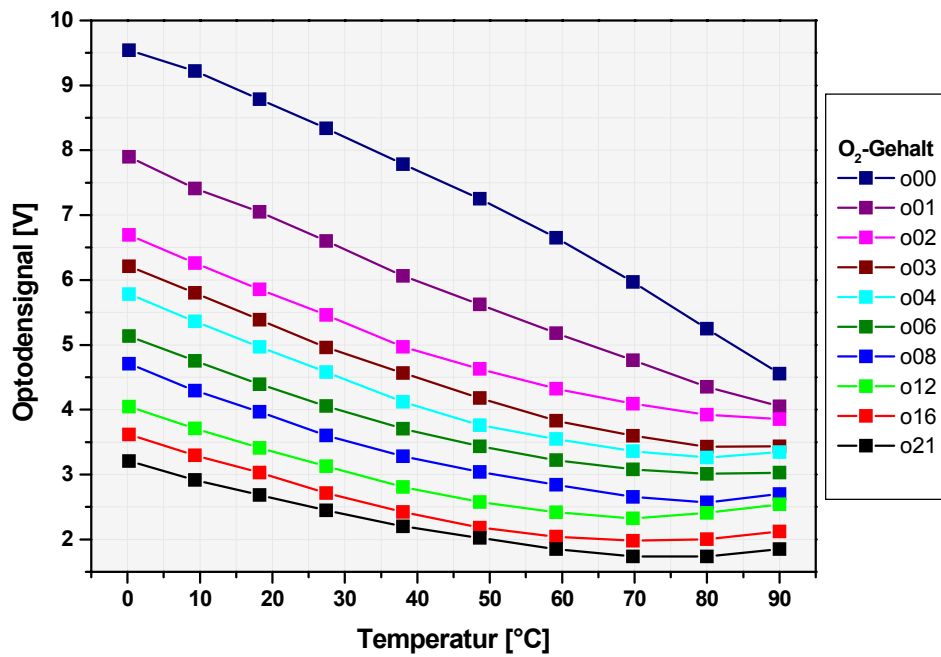


Abbildung 9 Temperaturabhängigkeit der Optode bei verschiedenen Gasmischverhältnissen

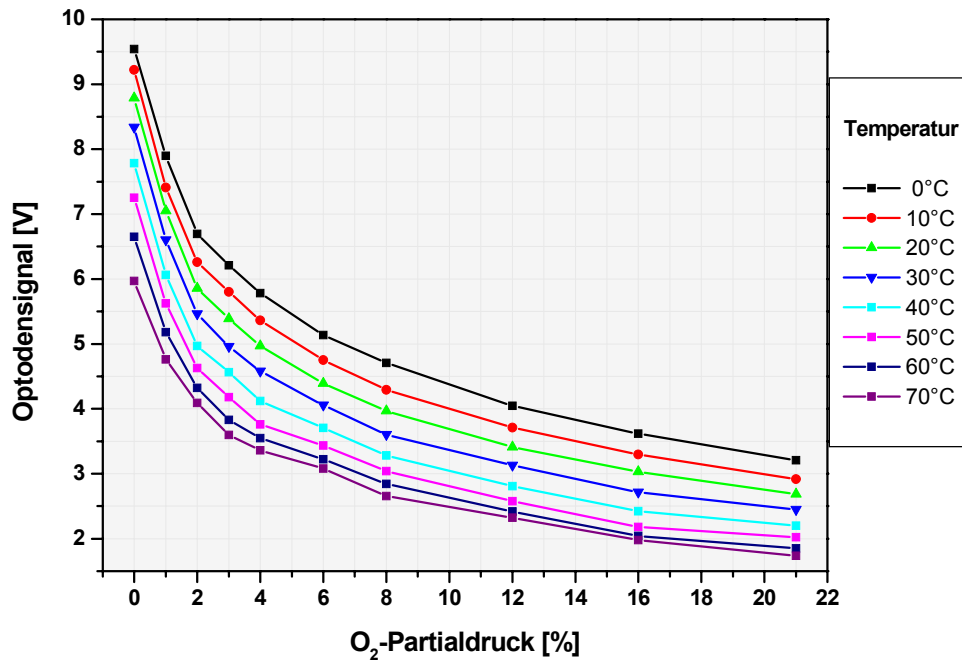


Abbildung 10 Kalibrationskurven für verschiedene Temperaturen

Betrachtet man die Kalibrationskurve für den Sauerstoffbereich zwischen Null und einundzwanzig Prozent für den Temperaturbereich zwischen 0°C und 70°C, so ist eine Abnahme der Fluoreszenz bei Temperaturzunahme wieder zu erkennen. Diese Abnahme ist auf die Fluoreszenzabnahme zurückzuführen, die allerdings durch die Erhöhung des Wasserdampfdruckes und die daraus resultierende Senkung des Sauerstoffpartialdruckes bis zu einem gewissen Grade gedämpft wird. Werden diese beiden Effekte mit Hilfe der Gleichungen 11 und 17 berücksichtigt, so nehmen die Kalibrationskurven in Abbildung 11 folgende Form an:

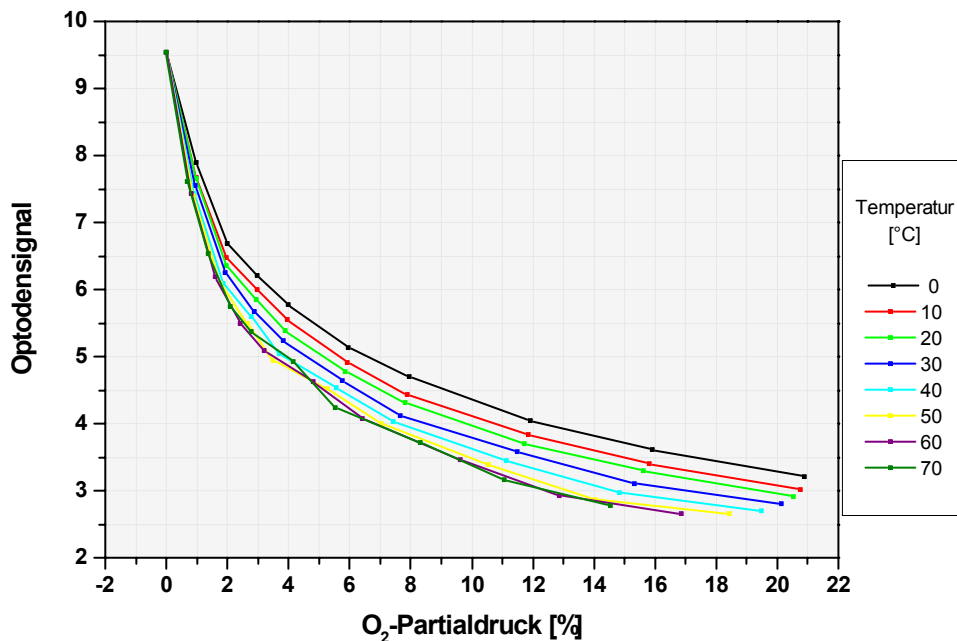


Abbildung 11 Korrigierte Kalibrationskurven für verschiedene Temperaturen

Aus Abbildung 11 geht hervor, dass nach Berücksichtigung der Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz und des Sauerstoffpartialdruckes die Kurven nicht miteinander übereinstimmen. Als einzige noch verbleibende Ursache für diese Abweichung ist eine mögliche Temperaturabhängigkeit des Quenchingprozesses selbst. Mit zunehmender Temperatur erhöht sich dem zufolge die Quenchingrate. Was allerdings auffällt, ist die Tatsache, dass ab einer Temperatur von 50°C die Kurven einander sehr ähneln. Dies könnte möglicher Weise ein Indiz dafür sein, dass ab dieser Temperatur die Steigerung der Quenchingrate eine asymptotische Grenze erreicht.

Normiert man das Maximum der jeweiligen Kurven und das Maximum des Sauerstoffpartialdruckes der jeweiligen Kurven auf eins, so erkennt man, dass auch durch Normierung beider Parameter die Kurven verläufe nur einen ähnlichen Trend aufweisen. Die Kurven lassen sich zwar nicht durch eine einzige Funktion, jedoch jede Kurve für sich durch eine exponentielle Funktion beschreiben.

$$p_{O_2}^n = A_1 * e^{-\frac{x}{t_1}} + A_2 * e^{-\frac{x}{t_2}}$$

Gl. 18

x = Messsignal der Optode

$p_{O_2}^n$ liefert Werte zwischen Null und eins. Dabei stellt eins den maximalen Sauerstoffpartialdruck bei der jeweiligen Temperatur dar.

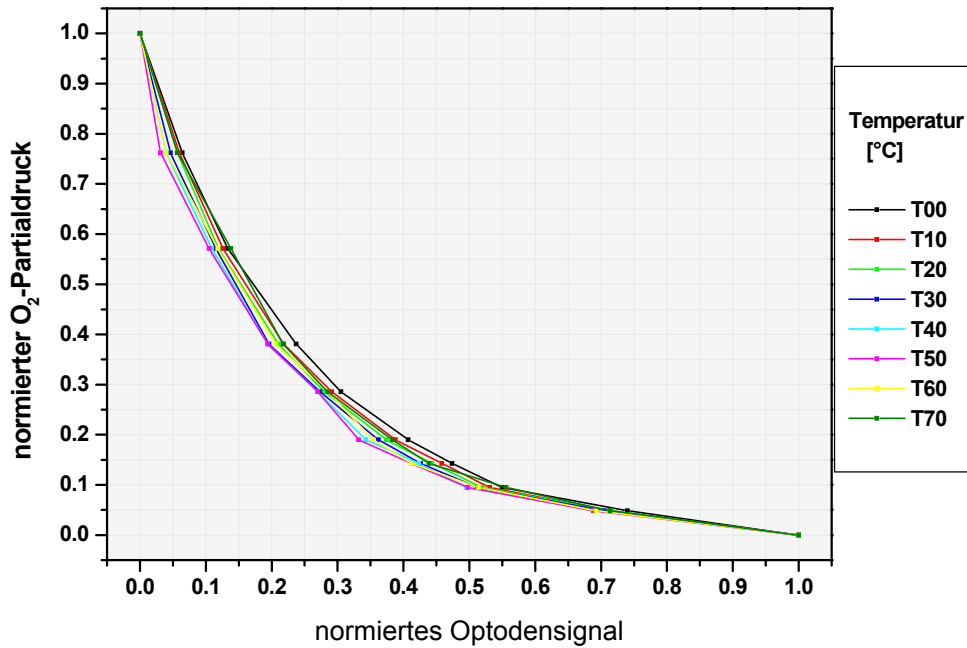


Abbildung 12 Normierte Kalibrationskurven für verschiedene Temperaturen

T [°C]	A ₁	t ₁	A ₂	t ₂
0	0.83843	0.24225	0.15893	0.24207
10	0.69850	0.21263	0.29772	0.27383
20	0.30830	0.15643	0.68909	0.25526
30	0.94490	0.22456	0.05489	0.00925
40	0.51272	0.14729	0.46637	0.29340
50	0.54015	0.15093	0.42099	0.29337
60	0.91831	0.23290	0.07989	0.00484
70	0.85627	0.23041	0.13978	0.23229

Tabelle 8 Koeffizienten für Gleichungen zweiter Ordnung

Basierend auf diesen Daten lässt sich ein Verfahren zur Temperaturkompensation entwickeln. Da die Kalibrationskurven in Abbildung 12 sich nicht durch eine einzige Gleichung beschreiben lassen, was vieles hätte vereinfachen können, wird folgendes Verfahren vorgeschlagen: Man kalibriert zunächst den Sensor auf einer bestimmten Temperatur, für welche eine mathematische Näherung besteht (s. Tabelle 8) – z.B. für 0°C. Mit Hilfe des vom Sensor gelieferten Messwertes wird zunächst unter Verwendung der Gleichung 18 der normierte Sauerstoffpartialdruck $p_{O_2}^n$ berechnet. Um nun den zur Erdatmosphäre relativen Sauerstoffpartialdruck zu erhalten, wird $p_{O_2}^n$ mit der maximalen relativen Sauerstoffpartialdruck $p_{O_2}^{\max}$ für diese Temperatur multipliziert:

$$p_{O_2}(\text{Probe}) = p_{O_2}^n * p_{O_2}^{\max} \quad \text{Gl. 19}$$

Liegt die Temperatur zwischen zwei Kalibrationskurven, so wird mit Hilfe dieser beiden Kurven jeweils der Messwert berechnet und das arithmetrische Mittel gebildet.

Insgesamt läuft der Kompensationsprozess nach folgendem Muster ab:

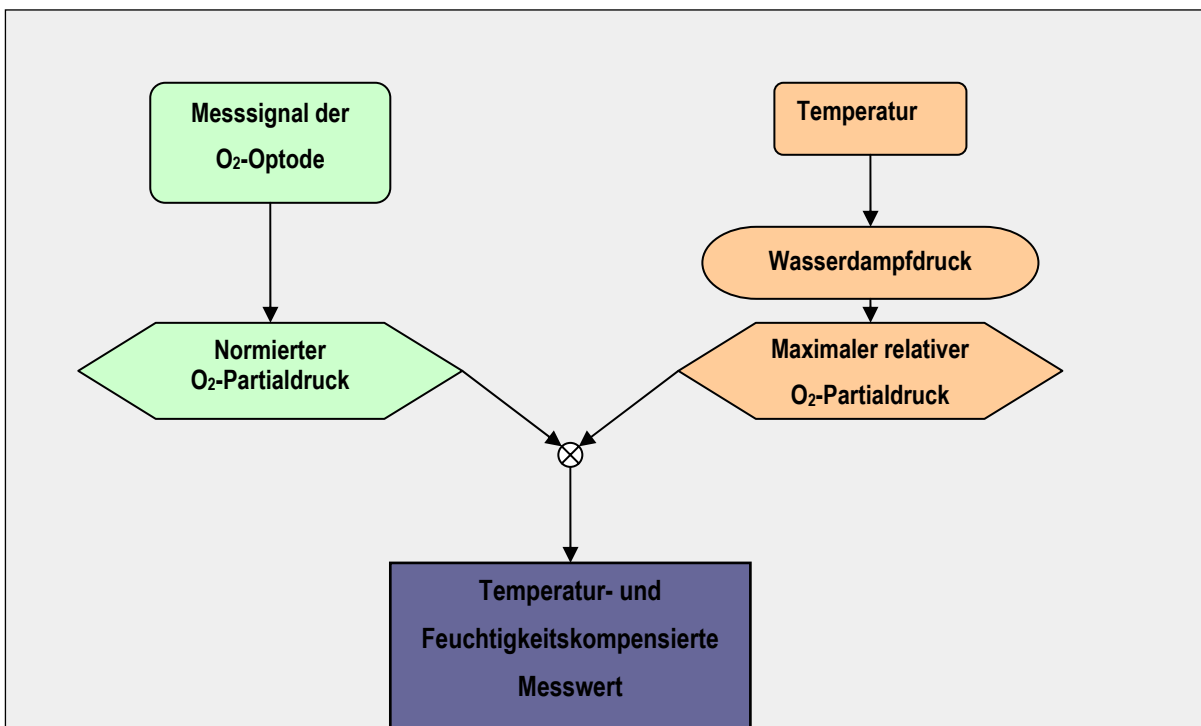


Abbildung 13 Schematischer Ablauf einer Feuchtigkeits- und Temperaturkompensation eines Messsignals

4 Der faseroptische Temperatursensor

4.1 Theorie

Temperatur gehört zu den wichtigsten physikalischen Größen und hat Einfluss auf allen naturwissenschaftlichen Prozessen. Es ist daher essentiell sie zu erfassen.

Zur Temperaturmessung existieren verschiedene Arten von Messinstrumenten, wovon die älteste Form das klassische Thermometer ist. Dieses nutzt die temperaturabhängige Volumenänderung der Meßflüssigkeit aus. Je nach Messbereich verwendet man verschiedene Thermometerflüssigkeiten. Mit Quecksilber gefülltem Thermometer lassen sich Temperaturen zwischen -35 bis 600°C messen, mit gefärbtem Alkohol gefülltem Thermometer zwischen -100 und 70°C und mit Pentan bis -200°C. Zu den präzisesten Temperaturmessern zählt das Gasthermometer, das zur Eichung von Thermometern verwendet wird. Sein Prinzip basiert auf dem idealen Gasgesetz, wonach eine Temperaturänderung eine Druckänderung hervorruft. Für konstantes Volumen gilt das Amontonsschen Gesetz:

$$p(T) = p_0 \left(1 + \frac{1}{273.14} * T \right) \quad \text{Gl. 20}$$

Durch Messung der Druckänderung erhält man die Temperatur.

Zu den neueren Temperatursensoren zählen Thermoelemente und Resistoren. Thermoelemente bestehen prinzipiell aus zwei Drähten verschiedener Metalle, die an beiden Enden mit einander verbunden sind. Aufgrund unterschiedlicher elektrischer Potentiale entsteht infolge von Elektronenwanderung vom elektronegativeren Metall zum positiveren eine Kontaktspannung. Ihre Größe ist von der Temperatur der Kontaktfläche abhängig. Sind die beiden Enden der verbundenen Drähte gleicher Temperatur ausgesetzt, so sind die Kontaktspannung an beiden Enden gleich und heben sich daher gegenseitig auf. Besteht dagegen eine Temperaturdifferenz, so fließt gemäß des Seebeck-Effektes ein Thermostrom, der durch die Potentialdifferenz der beiden Drahtenden, der sogenannten Thermospannung aufrechterhalten wird. Diese Spannung ist in einem begrenzten Bereich linear abhängig von der Temperaturdifferenz der beiden Drahtenden. Da die Thermospannung eines Thermoelementes sehr klein ist, werden zur Verstärkung mehrere Thermoelemente in Reihe zu einer Thermosäule geschaltet. Modernere Thermoelemente verwenden Halbleitermaterialien.

Im Gegensatz zum Thermoelement, welches zu den sogenannten aktiven Temperatursensoren gehören, da es das Messsignal direkt erzeugt, sind Resistoren passive Temperaturmesser. Sie nutzen die Temperaturabhängigkeit des elektrischen Widerstandes eines unter Strom stehenden Materials aus.

Als Material werden Platin (Pt100-Resistoren) und Metalloxidgemische (NTC-Thermistoren) verwendet. NTC-Thermistoren unterscheiden sich von Pt100-Detektor dadurch, dass der Widerstand mit zunehmender Temperatur kleiner wird.

Eine andere Methode der Temperaturmessung ist die IR-Radiometrie. Jeder Körper mit einer Temperatur über 0°K sendet eine elektromagnetische Strahlung aus, deren Wellenlänge und Strahlungsdichte von der Temperatur des Körpers abhängen und durch das Plancksche Strahlungsgesetz und die daraus resultierende Wiensche und Stefan-Boltzmann-Gesetz beschrieben werden :

$$\text{Stefan-Boltzmannsches Gesetz} \quad M_{e(s)} = \sigma * T^4 \quad \text{Gl. 21}$$

Inframeter messen das Infrarotlicht, das von einer Probe emittiert wird. Die Strahlungsintensität M ist nach dem Stefan-Boltzmann-Gesetz proportional zur vierten Potenz der Temperatur. IR-Radiometrie als reine Oberflächenmessmethode liefert oft nicht die gewünschten Temperaturdaten, da hier das Emissionsvermögen der Probe genau bekannt und auch temperaturunabhängig sein, stets Sichtkontakt zwischen IR-Kamera und Messobjekt vorliegen müssen und Reflexionen benachbarter Teile das Messergebnis verfälschen können. Darüber hinaus wird die IR-Radiometrie bei niederen Temperaturen weniger empfindlich

Eine andere Methode bietet die Messung der Lumineszenzabklingzeit von bestimmten Leuchtstoffen. Einer dieser Farbstoffe ist die anorganische Verbindung Magnesium-Fluorogermanat. Ihre Abklingzeit liegt je nach Temperatur zwischen 5.5 ms bei -200°C und 0.5ms bei +400°C. In diesem Kapitel wird eine Temperaturoptode vorgestellt, die auf der Fluoreszenzintensitätsmessung basiert und die in den vorhandenen Sauerstoffsensorsystem integrieren lässt, ohne dass dieses modifiziert werden muss.

4.2 Präparation der Temperaturoptode

In dieser Arbeit wird ein faseroptischer Temperatursensor unter Verwendung des faseroptischen Sauerstoffsensorsystems entwickelt. Am System wird instrumentell nichts verändert. Als temperatursensitiver Fluorophor wird statt des sauerstoffsensitiven Tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin)-ruthenium(II)chlorid Rhodamin B verwendet, der, in Ethanol gelöst, ein Absorptionsmaximum bei 540 nm und bei 565nm ein Emissionsmaximum aufweist.

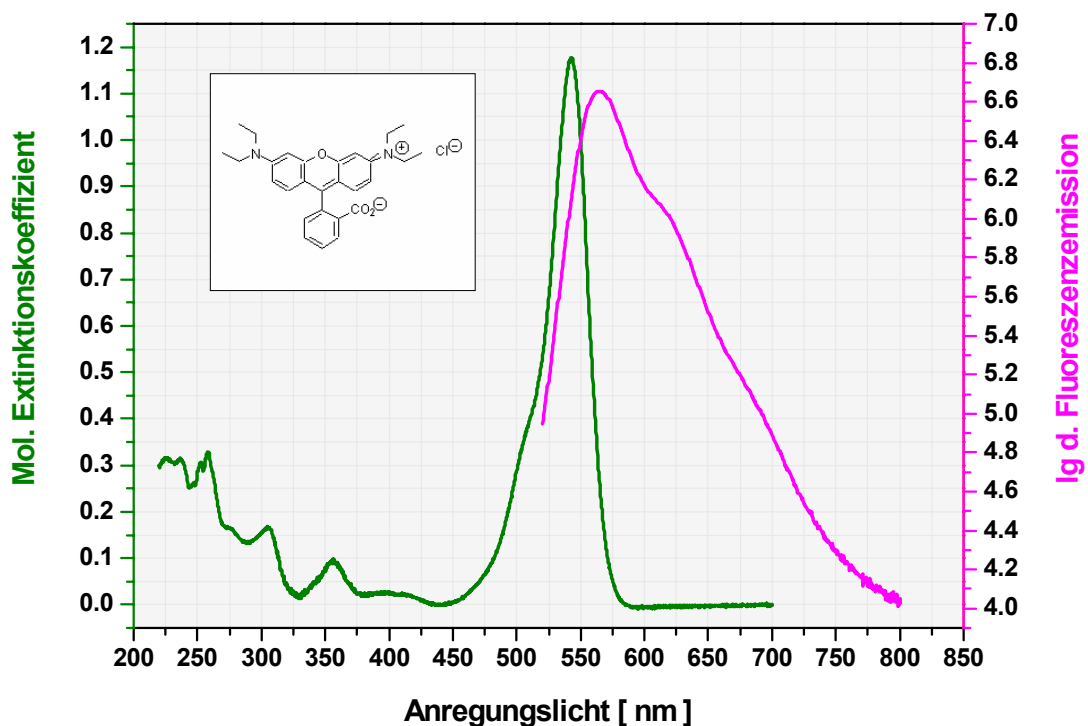


Abbildung 14 Spektrale Eigenschaften von Rhodamin B (in Ethanol) [14]

Um den Leakingeffekt zu verhindern, wird Rhodamin auf Kieselgel (Lichrosorb 100, Merck) adsorbiert. Dazu wird das Kieselgel zunächst über Nacht bei 120°C erhitzt, um dessen Oberfläche zu aktivieren. Anschließend wird das aktivierte Kieselgel in einer 20 millimolaren Rhodamin-Aceton-Lösung zugegeben und über Nacht gerührt. Nach Trocknung bei 50°C kann der so adsorbierte Farbstoff für die Herstellung der Optode verwendet werden. Dazu wird Rhodamin in mit Toluol verdünntem Silikon (RTV43, Wacker AG) gleichmäßig eingerührt und auf die Optodenspitze aufgetragen. Nach Aushärtung des Silicons wird zum Schutz vor Fremdlicht die Farbstoffmembran mit schwarzem Silikon überzogen.

4.3 Messung mit der Temperaturoptode

Zur Untersuchung der Optode auf ihre Temperatursensibilität wird ein NTC-Thermistor als Referenz verwendet. Die Messung erfolgt in einem thermostatisierten Wasserbad. Zur simultanen Datenaufnahme vom NTC-Thermistor und Optode werden beide Sensoren an dem Datalogger (Hewlett-Packard) angeschlossen, der über zwanzig Dateneingänge verfügt.

Bei der ersten Messung wird die Wassertemperatur von Null bis neunzig Grad erhöht. Um Null Grad zu erhalten wird zu Anfang das Wasserbad nur Eis gefüllt.

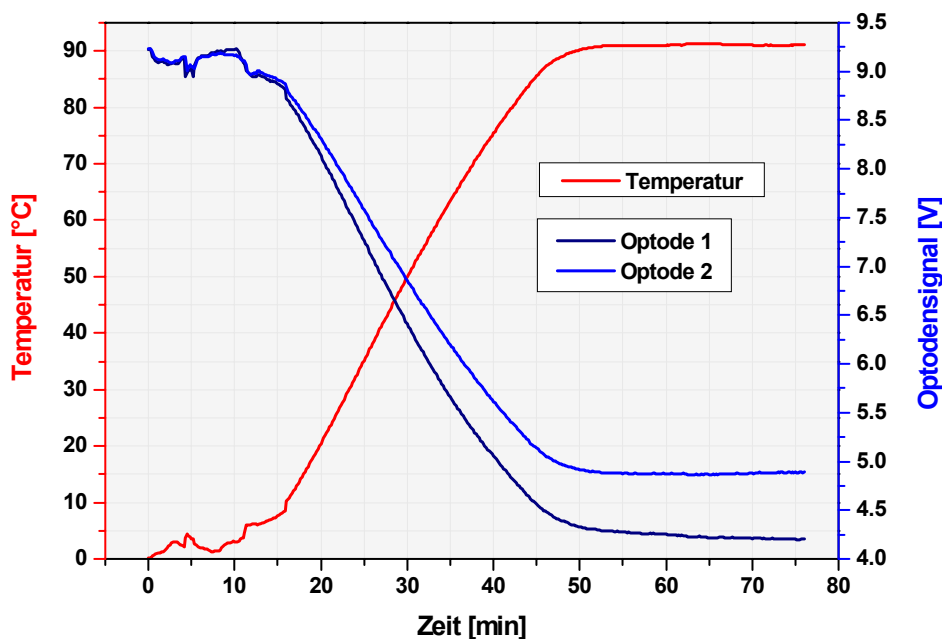


Abbildung 15 Kontinuierliche Temperaturmessung mit den Temperaturoptoden

Zu Anfang der Messung sind die Signale sowohl von den Optoden als auch vom Thermistor sehr instabil. Dies liegt daran, dass während dieser Phase das Eis nicht überall gleichmäßig schmilzt, sondern an den Heizflächen des Thermostaten mehr und je weiter davon entfernt, umso weniger. Auf diese Weise bestehen im Wasserbad lokale Temperaturunterschiede, die nicht schnell genug ausgeglichen werden kann, weil der Rührer des Thermostaten aufgrund der Behinderung durch die Eismasse das Wasser-Eis-Gemisch nicht gut vermischen kann. Nachdem das Eis vollständig geschmolzen ist, steigt die Temperatur stetig und stabilisiert sich bei voreingestellten Wert von neunzig Grad Celsius. Das Signal der Optoden fällt mit steigender Temperatur, da die Fluoreszenzemission mit zunehmender Temperatur zur strahlungslosen Deaktivierung des angeregten Fluorophors verschoben ist. Auffällig ist, dass die Signale beider Optoden den gleichen Trend aufweist. Jedoch ist der

Signalabfall der Optode 1 größer als der der zweiten Optode. Dies liegt zum einen daran, dass die Optoden hinsichtlich der Dicke der Fluorophormembran und die Fluorophorkonzentration unterschiedlich sind und daher unterschiedliche Fluoreszenzintensität haben und hinsichtlich der quantenmechanische Kinetik verschiedene Übergangskonstante haben (s. 20).

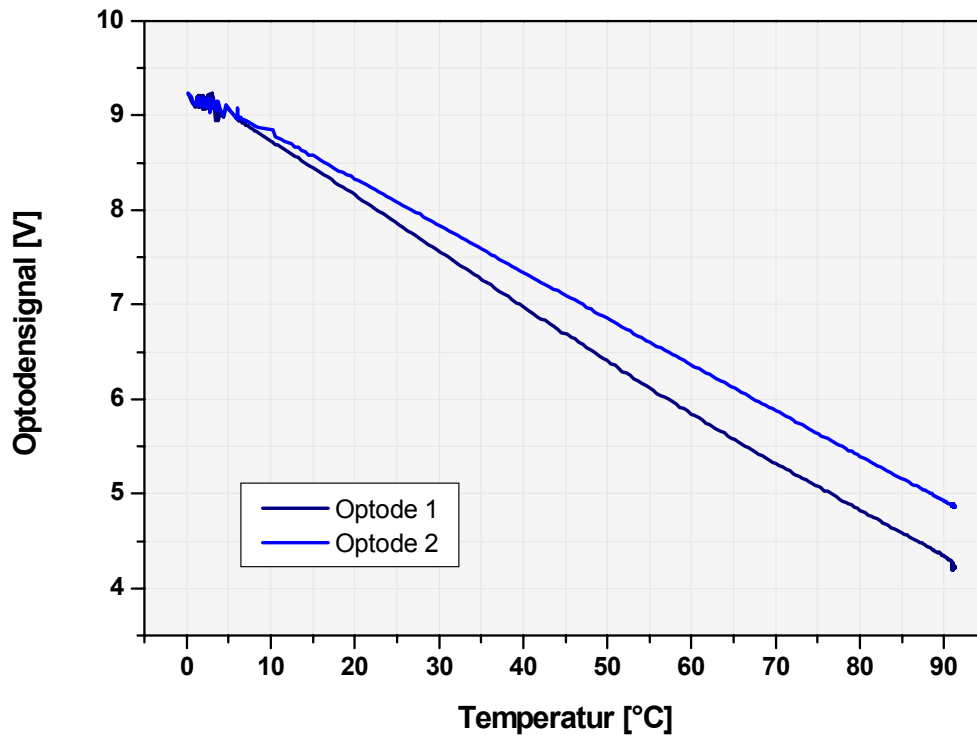


Abbildung 16 Korrelation zwischen Optodensignal und Temperatur

In Abbildung 16 werden die Signale der Optoden gegen die Temperatur aufgetragen, die vom NTC-Thermistor gleichzeitig aufgenommen wird. Beide Kurven haben einen linearen Verlauf, unterscheiden sich jedoch aufgrund des oben erwähnten Qualitätsunterschieds in ihrer Steigung. Die Signale zwischen Null und fünf Grad Celsius sind nicht stabil. Dies liegt daran, dass die flexible Siliconmembran der Optoden durch die Bewegungen des Eises zeitweise gequetscht wurde, wodurch das optische Verhalten der Membran temporär verändert wird.

Werden die beiden Kurven unter Verwendung des maximalen und minimalen Wertes normiert (Normierungsverfahren, s. 126), so nehmen die Kurven folgende Gestalt an:

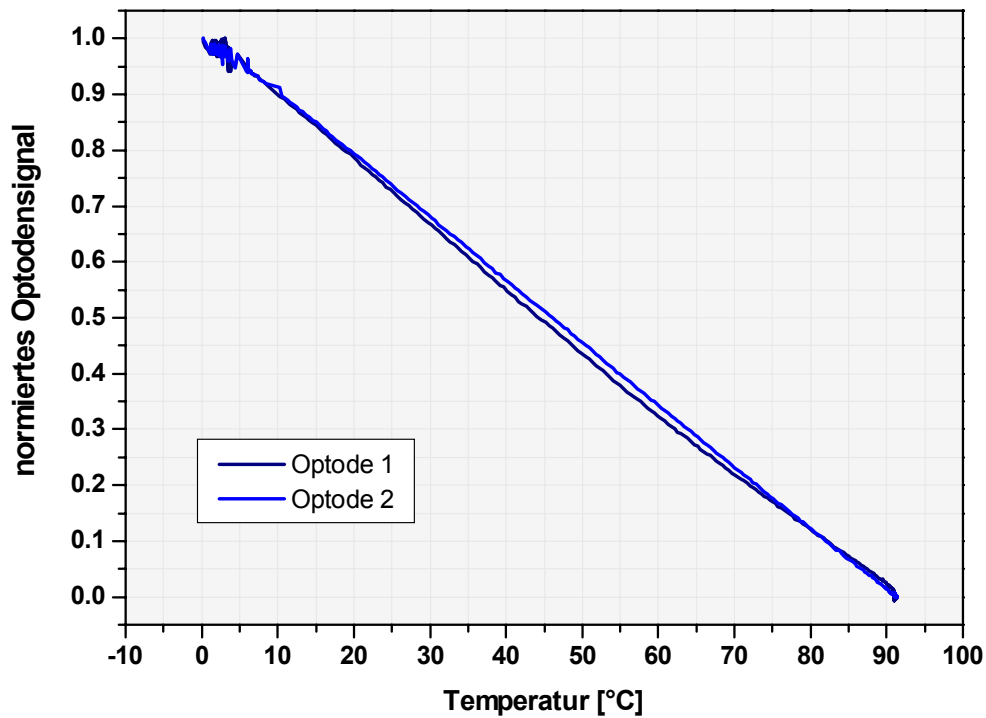


Abbildung 17 Korrelation zwischen normiertem Optodensignal und Temperatur

Die beiden normierten Kurven der Optoden in Abbildung 17, zeigen eine sehr gute Übereinstimmung, was durch die lineare Regressionsanalyse bestätigt wird:

	A	Fehler (A)	B	Fehler (B)	R	SD
Optode 1	1.00316	0.00044	-0.01102	0.00001	-0.99992	0.00503
Optode 2	1.00818	0.00091	-0.01105	0.00001	-0.99966	0.01032

Tabelle 9 Resultate aus der Regressionanalyse der normierten Kurven

Die vorausgegangene Messung wurde bei kontinuierlicher Temperatursteigerung durchgeführt. Es zeigt sich, dass die Optoden genügend schnell auf Temperaturänderung sich einstellen können. Da dabei pro Temperaturwert nur wenige Messwerte gemessen werden, lässt sich keine Aussage über die Stabilität des Signals machen. Dies wird durch eine stufenweise Steigerung der Temperatur ermöglicht:

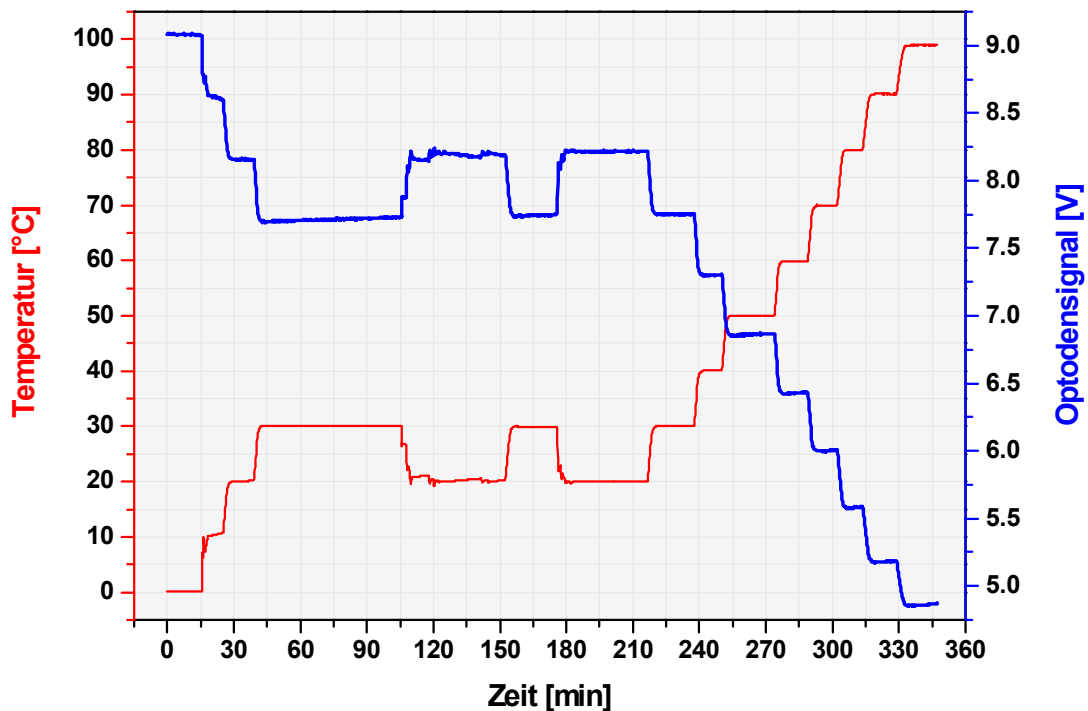


Abbildung 18 Reaktion der Optode auf einer stufenweise Temperaturerhöhung

Bei dieser Messung wird die Temperatur stufenweise um zehn Grad erhöht. Um kurz zu testen, ob die Werte reproduzierbar sind, wird die Temperatur bei zwanzig Grad Celsius wiederholt auf dreißig angehoben und wieder gesenkt. Wie zu sehen, zeigt sich bei der ersten Anhebung auf dreißig Grad ein geringfügiger Anstieg des Signals bei konstanter Temperatur. Ansonsten korrespondiert das Optodensignal sehr gut mit der vom NTC-Thermistor erfassten Temperatur. Desgleichen gilt auch für die Reproduzierbarkeit des Signals. In Abbildung 19 zeigt sich, dass das Signal in geringem Maße verrauscht ist, was auf die Elektronik des Sensors zurückzuführen ist. Das Rauschen ist unabhängig von der Proben temperatur und beträgt circa 0.02 Volt. Neben diesem Rauschen besteht ferner ein Driften des Signals. Dieser Effekt gilt jedoch nicht allgemein für alle verwendeten Optoden. Während die Optode 1 außer dem Rauschen ein stabiles und konstantes Signal zeigt, schwankt das Signal der Optoden 2 und 3 um 0.03 Volt.

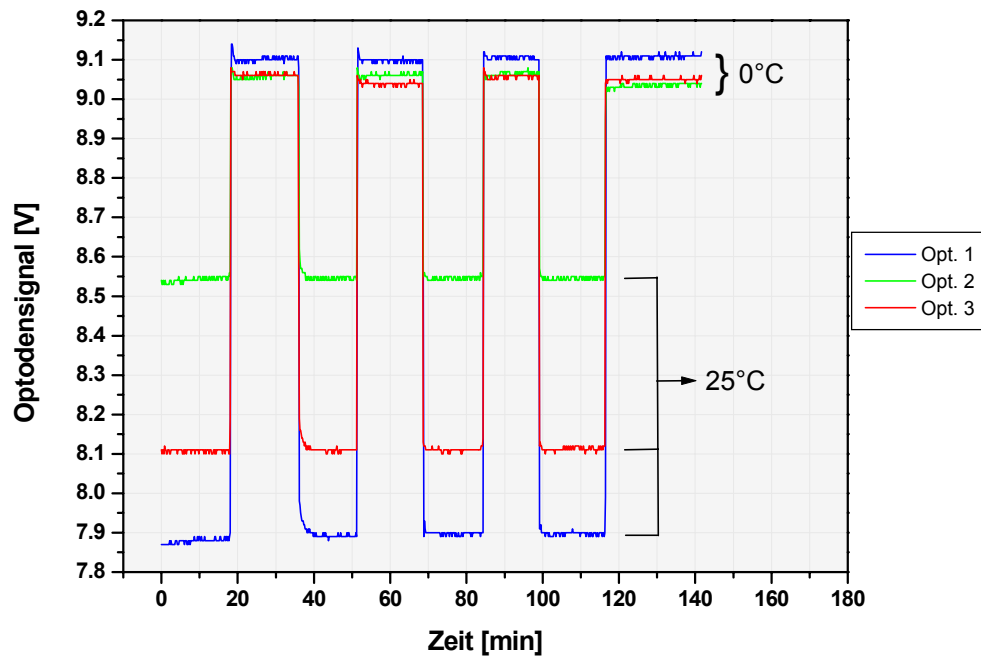


Abbildung 19 Wiederholbarkeit des Messsignals

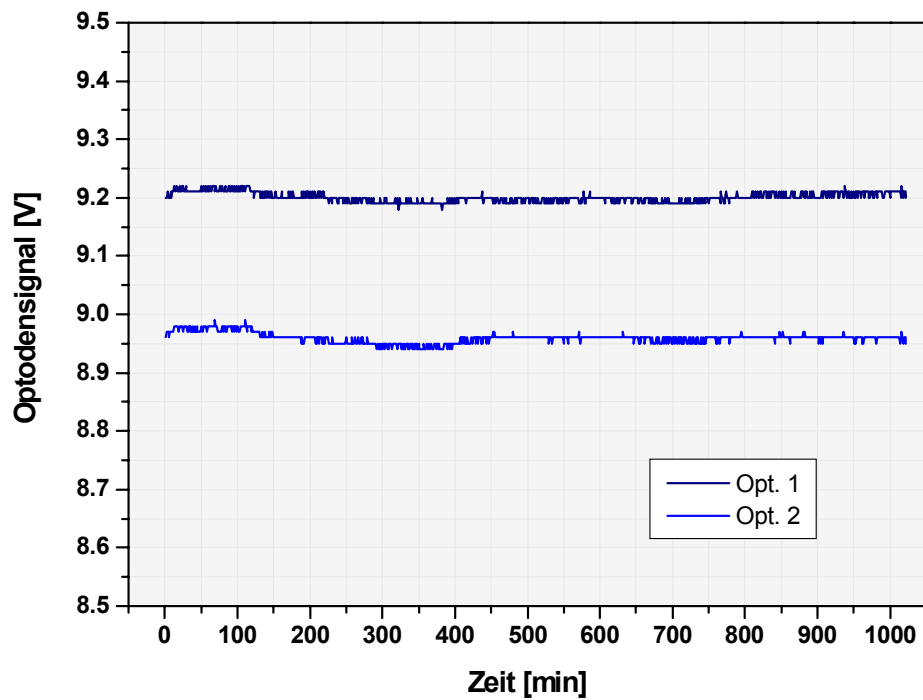


Abbildung 20 Langzeitmessung bei 25°C

Die Langzeitmessung wird bei 25°C über 17 Stunden im thermostatisierten Wasserbad durchgeführt. Die Messung zeigt zeitliche Schwankungen des Signals von beiden Optoden. Die Mittelwertbildung führt zu folgendem Resultat:

	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	Messanzahl
Optode 1	9.20	0.00800	2.50E-04	1022
Optode 2	8.96	0.00876	2.74E-04	1022

Tabelle 10 Mittelwerte der Langzeitmessung

Wie zu erkennen, ist der Fehler für beide Optoden klein. Die absolute Standardabweichung beträgt 0.008 (relative Abweichung: 0.087%) bzw. 0.00876 (rel. Abweichung: 0.098%).

4.4 Untersuchung auf eine mögliche pH-Abhängigkeit der Temperaturoptode

Rhodamin B weist ein pH-abhängiges Fluoreszenzspektrum auf.

Zur Untersuchung auf einer möglichen Querempfindlichkeit gegenüber flüchtiger Säure, die die Schutzmembran aus Silicon durchdringen kann, wird Kohlendioxid in die wässrige Probelösung eingeleitet. Als Maß für die Menge an gelöstem Kohlendioxid wird die Änderung des pH-Wertes herangezogen. Die Temperatur der Lösung wird bei 25°C konstant gehalten.

In Abbildung 21 ist zu sehen, dass der Kurvenverlauf aller drei Optoden nicht durch die Einleitung des Kohlendioxids, dessen Gehalt im Wasser durch den pH-Wert wiedergegeben wird, beeinflusst wird. Es bestehen Schwankungen im Kurvenverlauf der Optoden, welche aber nicht im Zusammenhang mit der Kohlendioxidkonzentration in der Probe stehen, wie in unterer Abbildung 22 zu sehen ist.

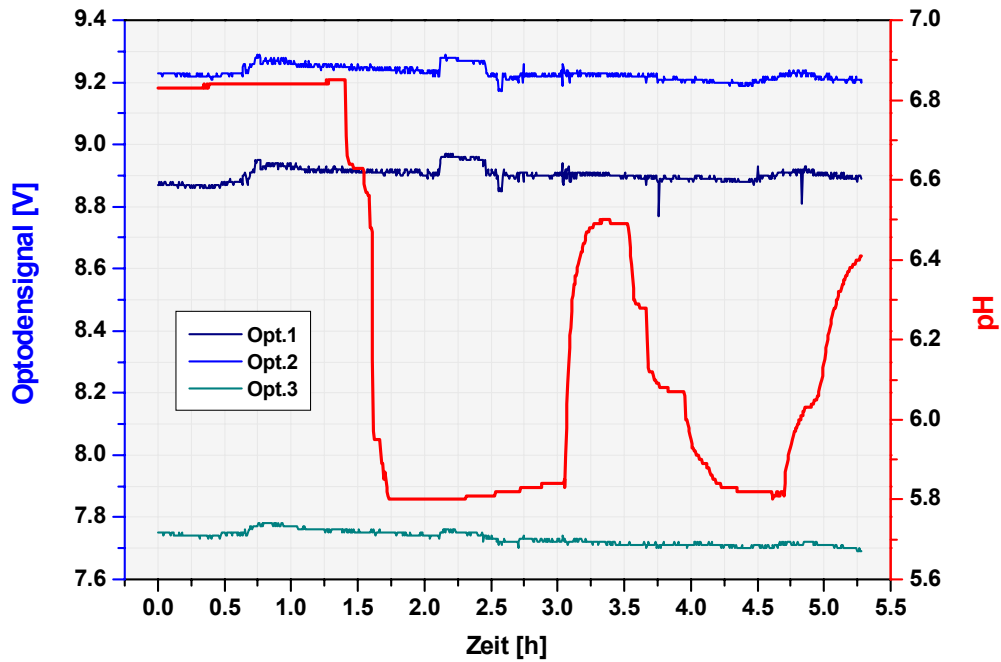


Abbildung 21 Untersuchung eines möglichen Driften der Optode durch Kohlendioxid

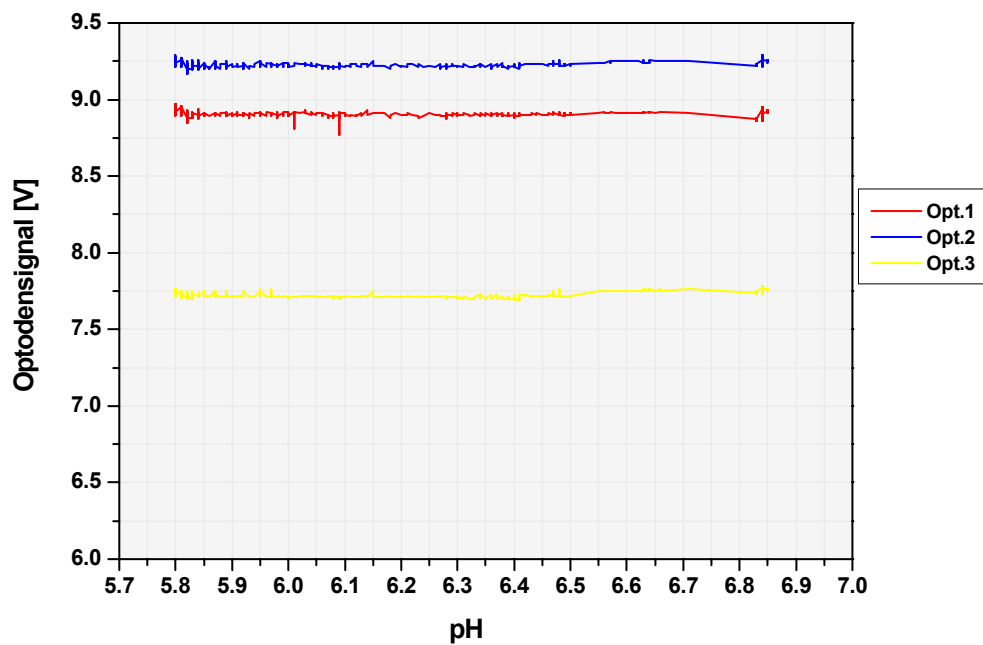


Abbildung 22 Verhalten der Optoden gegenüber pH-Änderung

	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	Messanzahl
Optode 1	8.90	0.02307	7.48E-04	952
Optode 2	9.23	0.02217	7.19E-04	952
Optode 3	7.73	0.02186	7.09E-04	952

Tabelle 11 Mittelwerte der Kurvenverläufe

4.5 Einfluss der Polymermatrix auf das Signalverhalten

Ist ein Fluorophor in einer Polymermatrix immobilisiert, so finden Wechselwirkungen zwischen beiden statt. Die zeitabhängige Wahrscheinlichkeit $p(t)$, einen angeregten Fluorophor zum Zeitpunkt t nach der Anregung im angeregten Zustand vorzufinden, wird durch Lösung der folgenden Differentialgleichung ermittelt:

$$-\frac{dp(t)}{dt} = p(t) * (k_r + k_{nr}) \quad \text{Gl. 22}$$

Dabei ist k_r die kinetische Konstante für den Lumineszenzprozess, während k_{nr} die strahlungslose Relaxation des Fluorophors beschreibt. Beide dieser Prozesse werden sowohl durch die Eigenschaften des Fluorophors selbst als auch durch die Charakteristika des umgebenden Mediums bestimmt. Nach Strickler und Berg [32] beeinflusst die Matrix die obigen Konstanten dadurch, dass das Absorptionsmaximum verschoben oder die Absorptionsbande verformt wird. Eine weitere Einflußgröße des umgebenden Mediums auf das Fluorophor stellt sein Brechungsindex dar, der das nahe elektrische Feld des Fluorophors wiedergibt, welches mit dem angeregten Fluorophor, der ein Dipol darstellt, wechselwirkt. Der entscheidende Einfluss des dem Fluorophor umgebenden Mediums ist seine Wirkung auf den Relaxationsprozess und damit auf den Lumineszenzprozess. Der Relaxationsprozess beinhaltet dabei die Interne Konversion, Intersystem Crossing und Quenching. Die Interne Konversion nimmt in einer starren Umgebung ab, weil die Beweglichkeit des Fluorophors reduziert ist. Viele Matrizen wirken selbst als Quencher und tragen daher einen Beitrag zur Reduzierung der Lumineszenz bei. Daher haben verschiedene Polymere unterschiedliche Wirkung auf das Lumineszenzverhalten des Farbstoffes.

Bei der Verwendung von Polysulfon und Polymethylsilan als Matrix für die Temperaturoptode stellt es sich heraus, dass die Matrizen starken Einfluss auf den Kurvenverlauf der Optode haben. Mit Polymethylsilan als Matrix ist der Kurvenverlauf im Bereich zwischen 0 und 100°C nicht linear, sondern durchläuft bei etwa 5°C ein Maximum. Bei Verwendung von Polysulfon ist das Optodensignal nicht konstant. Zwar ist eine Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzemission festzustellen, das Signal fällt jedoch bei konstanter Temperatur beträglich.

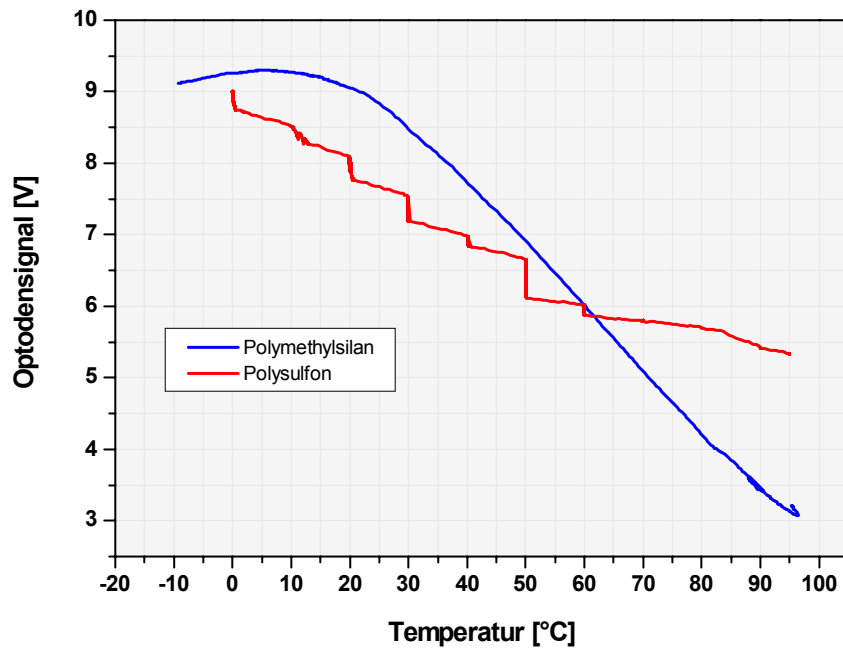


Abbildung 23 Einfluss der Matrix auf das Temperaturverhalten der Optode

5 Der faseroptische kombinierte Intensität- und Abklingzeitsensor für Sauerstoffmessung

Faseroptische Sauerstoffsensoren wurden für verschiedene Applikationen weltweit von verschiedenen Gruppen entwickelt. Fitzgerald et al. [15] konstruierten zur Blutgasmessung einen faseroptischen Intensitätssensor, der auf den Fluorophor Perylendibutarat (Solvent Green 5™) basiert. Dabei wurden als Anregungslichtquelle eine Deuteriumlampe und als Detektionseinheit ein PMT verwendet. Die Optode besteht aus zwei Lichtleiterfasern für die Lichtleitung von der Lichtquelle zum Fluorophor an der Optodenspitze und für die Lichtleitung vom Fluorophor zum PMT. Der Fluorophor wurde auf Kieselgel adsorbiert und in einer Kapsel aus porösem gaspermeablem Polypropylen eingeschlossen. Scheper et al. entwickelten 4-Kanal-Intensitätssensor, welcher blaue LED als Lichtquelle. Die Optode bestand aus einem einzigen Lichtleiter, an dessen Spitze sich der auf Kieselgel adsorbierte Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Ruthenium-Chlorid befindet und welcher in Silicon bzw. Polystyrol immobilisiert ist [20]. Die Optode ist heißdampfsterilisierbar und kann daher auch unter sterilen Prozesse eingesetzt werden. Tan et al. konstruierten einen faseroptischen Sauerstoffsensor unter Verwendung der preiswerteren Photodiode als Detektor [33]. Da Sensoren, die auf Intensitätsmessung basieren, aufgrund des Bleachingeffektes bei Langzeitmessung einen signifikanten Drift zeigen, wurden Abklingzeitsensoren entwickelt. Wolfbeis et al. konstruierten einen Abklingzeitsensor, der auf dem Prinzip der Phasendifferenzmessung beruht. Hierbei wurden verschiedene Ruthenium-Diiminkomplexe verwendet [34]. Papowsky et al. benutzten zur Sauerstoffmessung diverse Porphyrinkomplexe, die sich durch ihre relativ lange Abklingzeit von bis zu 65 μ s auszeichnen [28].

Sauerstoffmessung durch Intensitätsmessung lässt sich technisch relativ leicht realisieren. Für kurzzeitige Messungen lassen sich mit diesem Prinzip sehr genaue Messungen erzielen, da man das Fluoreszenzsignal durch die Bestimmung der Länge des Exzitationlichtpulses sehr groß gestalten kann und damit bis zu einem bestimmten Maße sehr präzise Messungen ermöglicht. Das größte Problem der Intensitätsmessung liegt im Ausbleichen des Farbstoffes, so dass mit zunehmender Länge der Messung das Signal wegdriftet. Sauerstoffmessungen nach dem Abklingzeitprinzip umgeht das Problem des Ausbleichens, da die Lebensdauer des angeregten Zustandes, die von der Intensität unabhängig ist, gemessen wird [7]. Der technische Aufwand ist jedoch sehr viel größer, insbesondere da die Abklingzeit der meisten Fluorophore in Nano- oder Pikosekunden liegen. Messungen in diesen Zeitbereichen sind zur Zeit nur mit teuren Fluorimeter möglich.

Im folgenden Kapitel wird daher ein System vorgestellt, das beide Prinzipien zu Nutze macht.

5.1 Abklingzeitmessung

Als Abklingzeit bzw. Lebenszeit wird die Zeitdauer τ bezeichnet, in der ein Fluorophor in seinem angeregten Zustand verweilt. Sie stellt für jeden Fluorophor eine charakteristische Größe dar, die eine Funktion der Temperatur und nach Stern-Volmer auch der Konzentration von anwesenden Quenchern ist. Im Idealfall lässt sich das gemessene Abklingen der Fluoreszenz mathematisch durch eine exponentielle Funktion erster Ordnung beschreiben [7]:

$$I(t) = I_A * e^{-\frac{t}{\tau}}$$

Gl. 23

I = momentane Lumineszenz

I_A = Anfangsintensität der Lumineszenz

τ = Abklingzeit

t = Zeit

Zur Ermittlung der Abklingzeit existieren zwei Verfahren, die auf zwei grundlegend verschiedenen Prinzipien basieren:

- Phasenmessung
- Impulsmessung

5.1.1 Phasenmessung

Bei diesem Verfahren wird der Fluorophor durch kosinusförmig moduliertes Licht $E(t)$ angeregt. Das resultierende Fluoreszenzsignal ist ebenfalls kosinusförmig, allerdings temporär um die Phase ϕ verschoben.

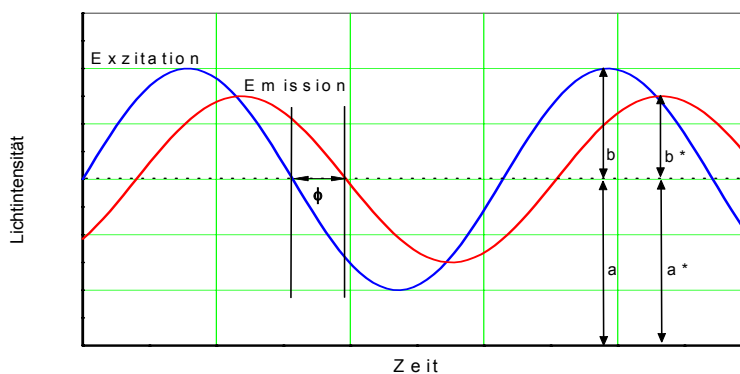


Abbildung 24 Prinzip der Abklingzeitbestimmung durch Phasenmessung [16]

Die obige Beziehung besteht zwischen Abklingzeit τ und der Phase ϕ deshalb, weil der Fluorophor unter bestimmten Bedingungen als LTI-System (Linear Time Invariant) betrachtet werden kann [24]. Danach ziehe jede zeitliche Verzögerung der Exzitation eine entsprechende Verzögerung der Emission nach sich und eine lineare Superposition der Anregung hätte als Konsequenz eine entsprechende Überlagerung der Emission. Als ein LTI-System ist es zur Berechnung des Fluoreszenzsignals mathematisch erlaubt, das Faltungsintegral zu verwenden.

Betrachtet man ein kosinusförmig moduliertes Exzitationssignal $E(t)$

$$E(t) = a + b \cdot \cos(2\pi f_0 t) \quad \text{Gl. 24}$$

so ergibt sich das Ausgangssignal, die Fluoreszenz $F(t)$, aus der Faltung des Eingangssignals $E(t)$ mit der Stoßantwort $I(t)$ des Systems Fluorophor:

$$g(t) = E(t) * I(t) \quad \text{Gl. 25}$$

Durch Fourier-Transformation und anschließende Rücktransformation resultiert folgende Gleichung:

$$g(t) = aI_0 + \frac{bI_0}{\sqrt{1 + (2\pi f_0 \tau)^2}} \cos(2\pi f_0 t - \arctan(2\pi f_0 \tau)) \quad \text{Gl. 26}$$

Diese stellt ein phasenverschobenes und amplituden- bzw. gleichanteil-geändertes Kosinus-Signal dar:

$$g(t) = a^* + b^* \cos(2\pi f_0 t - \phi) \quad \text{Gl. 27}$$

a^* = Gleichanteil des Ausgangssignals

b^* = Amplitudenanteil des Ausgangssignals

ϕ = Phasenverschiebung des Ausgangssignals

Durch Vergleich der beiden Gleichungen erhält man folgende Beziehung:

Gleichanteil des Ausgangssignals:

$$a^* = aI_0 \quad \text{Gl. 28}$$

Amplitude des Ausgangssignals:

$$b^* = \frac{bI_0}{\sqrt{1 + (2\pi f_0 \tau)^2}} \quad \text{Gl. 29}$$

Phasenverschiebung des Ausgangssignals:

$$\Phi = \arctan(2\pi f_0 \tau) \quad \text{Gl. 30}$$

Zwischen der Phase ϕ und der Abklingzeit τ besteht demnach folgende Beziehung:

$$\tau = \frac{\tan(\Phi)}{2\pi f} \quad \text{Gl. 31}$$

f = Modulationsfrequenz

Bei gegebener Modulationsfrequenz f erhält man durch Messung der Phase ϕ τ und somit auch die Konzentration des Quencher. ϕ ist keine physikalisch feste Größe, sondern sie lässt sich durch Auswahl der Modulationfrequenz f manipulieren. Diese ist dann optimal, wenn bei gegebener Abklingzeit τ_x die Phasenverschiebung 45° beträgt [5] [21]. Das bedeutet, dass für jede Abklingzeit τ eine optimale Modulationsfrequenz f_{opt} existiert. Da ein Sensor einen ganzen Bereich von Abklingzeiten erfassen muss, ist die ausschließliche Verwendung von f_{opt} technisch schwierig zu realisieren. Daher wendet man in der Praxis folgende Modulationsfrequenz an:

$$f_{opt} = \frac{1}{\pi(\tau_{max} - \tau_{min})} \quad \text{Gl. 32}$$

τ_{max} = Abklingzeit in Abwesenheit von Quencher

τ_{min} = Abklingzeit bei der größten zu interessierenden Konzentration von Quencher

5.1.2 Impulsmessung

Anders als bei der Phasenmethode wird bei diesem Verfahren der Fluorophor durch einen kurzen Lichtimpuls, der im Idealfall eine δ -Funktion ist, angeregt. Aus dem resultierenden Fluoreszenzsignal lässt sich die Abklingzeit τ direkt bestimmen:

$$\begin{aligned}
 I(t) &= I_A * e^{-\frac{t}{\tau}} \\
 \Leftrightarrow \frac{I(t)}{I_A} &= e^{-\frac{t}{\tau}} \\
 \Leftrightarrow \ln \frac{I(t)}{I_A} &= -\frac{t}{\tau} \\
 \Leftrightarrow \tau &= -t * \left(\ln \frac{I(t)}{I_A} \right)^{-1}
 \end{aligned}
 \tag{Gl. 33}$$

Technisch ist die Bestimmung der Abklingzeit τ rechenintensiv, da alle oben genannten Rechenschritte durchgeführt werden müssen. Zu einer hinreichend genauen Ermittlung der Abklingzeit bedarf es des Weiteren einer Mittelwertbildung über viele Werte. Ferner setzt diese Methode voraus, dass die Abklingzeit durch eine einfache Exponentialgleichung erster Ordnung beschreiben lässt, was jedoch nur im Idealfall zu beobachten ist. In den meisten Fällen jedoch beeinflusst die Mikroumgebung der Fluorophormoleküle dessen Abklingverhalten, so dass die obige Gleichung nicht mehr gültig ist. Die Bestimmung der Abklingzeit τ ist jedoch für die Ermittlung der Sauerstoffkonzentration nicht zwingend notwendig. Eine einfachere Methode besteht darin, das normierte Integral der Abklingkurve zu verwenden, und es dem Sauerstoffpartialdruck zuzuordnen. Dies verkürzt den Rechenweg und umgeht gleichzeitig die Problematik bei der Bestimmung der Abklingzeit. Wie in Abbildung 25 zu sehen, ergeben sich bei einer Integration der Kurven, die bei unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken aufgenommen sind, unterschiedliche Werte.

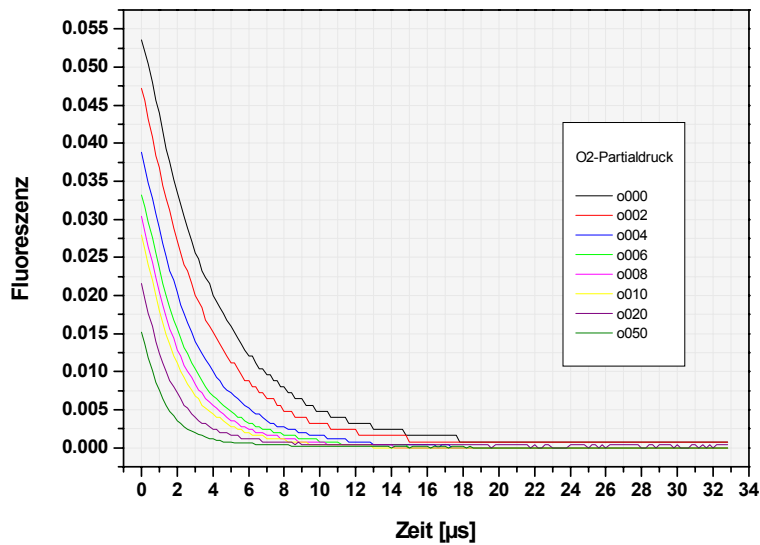


Abbildung 25 Abklingkurven bei verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken

Dies liegt daran, dass zum einen die Fluoreszenzintensität (Amplitude) und zum anderen die Abklingzeit vom Sauerstoffpartialdruck abhängen. Um die Sauerstoff abhängige Fluoreszenzintensität zu eliminieren, muss die Abklingkurve normiert werden. Die Normierung erfolgt durch Division des Integrals durch die Anfangsintensität I_A der Abklingkurve.

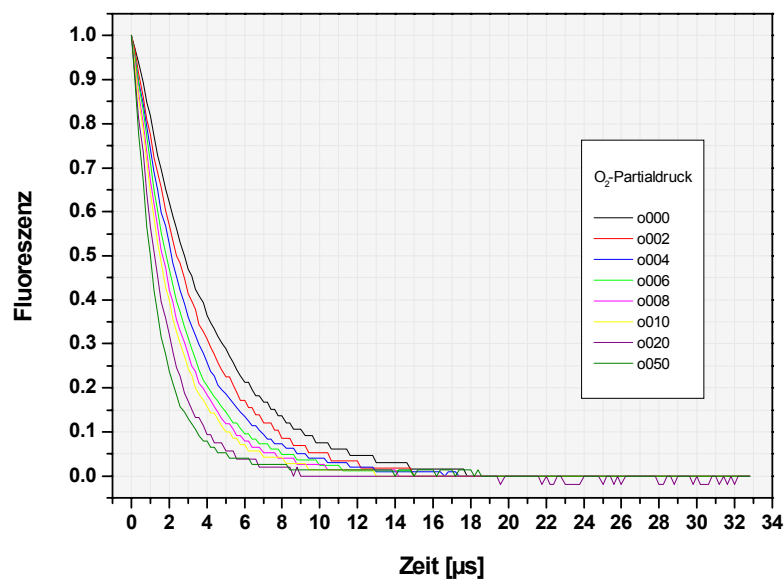


Abbildung 26 Normierte Abklingkurven bei verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken

5.2 Voruntersuchungen

Vor der endgültigen Fertigstellung des faseroptischen Sensorsystems wird das Abklingverhalten von RuDPP auf der optischen Bank untersucht, um genügend Informationen für die technische Auslegung des Sensors zu sammeln. Wichtig zu wissen, sind folgende Aspekte:

- ✚ Optimale Pulssfrequenz für die LED
- ✚ Abklingverhalten eines Fluorophorsystems unter realen Bedingungen
- ✚ Vergleich des Abklingverhaltens von RuDPP in unterschiedlichen Immobilisierungsmatrizen

Die optimale Pulsfrequenz der LED wird durch zwei Faktoren bestimmt. Ist die Pulsfrequenz zu kurz, so kann der Fluorophor nicht die maximale Fluoreszenzintensität erreichen, so dass das Messsignal schwach und die Messung unpräzise ist. Wird andererseits der Fluorophor zu lange Licht ausgesetzt, so bleicht er schneller aus, was sich wiederum negativ auf das Messsignal auswirkt [37] [36].

Das Abklingverhalten von Fluorophoren unter realen Bedingungen weicht von seinem idealen Verhalten auf Grund von Wechselwirkung mit der Umgebung ab. Ebenfalls wird das Quenching bei der Einbettung in einer Polymermatrix durch diese beeinflusst [36]. Daher gilt es, dies zu untersuchen, um die Elektronik auslegen zu können.

5.2.1 Versuchsaufbau

Die optische Bank ist sehr flexibel aufgebaut, so dass sie für unterschiedliche Versuche schnell entsprechend den Anforderungen des Experimentes umgebaut werden kann. Das gesamte System besteht aus einem PMT, Oszilloskop, Funktionsgenerator, einem V-Lichtwellenleiterbündeln, an dem eine Optode angedockt werden kann, sowie LED, Linse und Filter. Mit Hilfe des digitalen Oszilloskops wird die vom PMT ankommenden Messsignale aufgenommen, visualisiert und ausgewertet. Die Aufgabe des Funktionsgenerators besteht darin, die LED anzutreiben. Da man am Funktionsgenerator die Triggerfrequenz, Amplitude und Wellenform der Triggerung beliebig einstellen kann, lässt sich damit im Vorfeld die optimale Frequenz für die LED herausfinden.

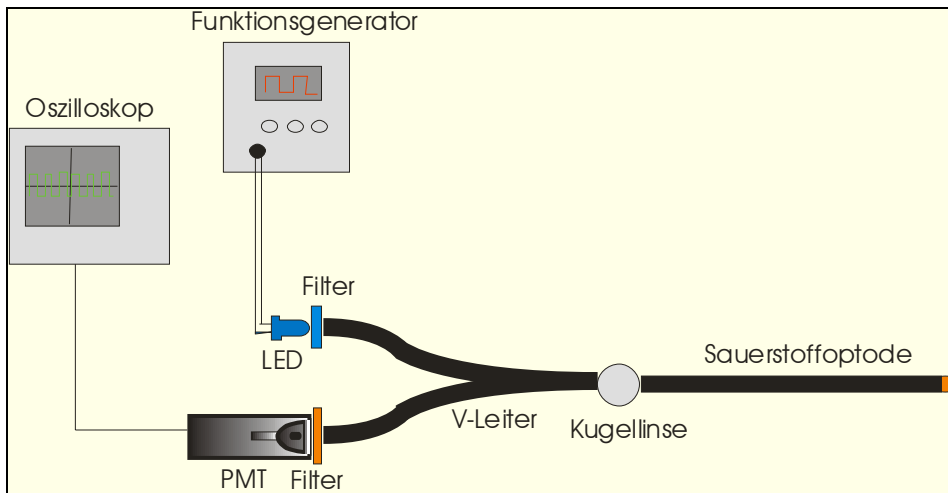


Abbildung 27 Schematischer Aufbau der optischen Bank

5.2.2 Optimale Triggerfrequenz der LED

Das Ausbleichen des Fluorophors ist auf die intensive Bestrahlung bei Anwesenheit von Sauerstoff zurückzuführen und ist unvermeidlich. Um diesen Effekt, der die Messgenauigkeit des Systems empfindlich beeinflusst, zu reduzieren, ist eine minimale Bestrahlungsdauer erforderlich. Welche Bestrahlungsdauer optimal ist, ist herauszufinden.

Mit Hilfe des Funktionsgenerators wird die Triggerfrequenz der LED auf 10 kHz eingestellt. Der Sauerstoffgehalt an der Optode wird mit Hilfe einer Gasmischapparatur (Bronckhorst F.201C) für jede Messung auf verschiedenen Level zwischen Null und Hundert Prozent konstant gehalten. Das Verhalten des Fluorophors wird auf dem Oszilloskop verfolgt. Bei Abwesenheit von Sauerstoff erhält man folgendes:

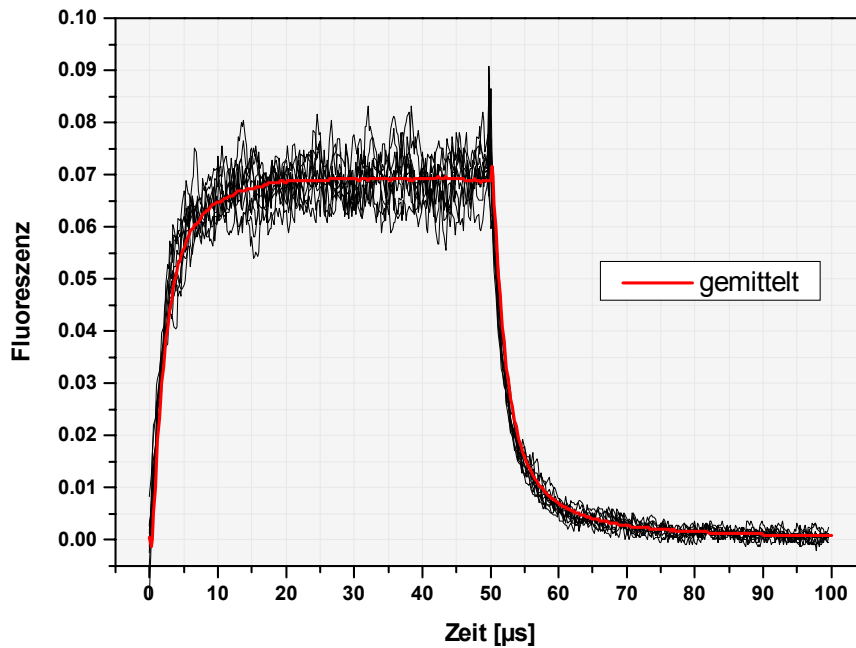


Abbildung 28 Oszillogramm der Anregungs- und Abklingkurve bei Abwesenheit von Sauerstoff

Abbildung 28 zeigt ein Oszillogramm von jeweils zehn Anregungs- und Abklingkurven, die übereinander gelegt sind, sowie die daraus gemittelte Kurve. Die Fluoreszenzkurve hat einen asymptotischen Verlauf. Sie steigt zu Anfang sehr rasch an und erreicht nach 10 μs 85% seines maximalen Wertes und nach ca. 27 μs das Maximum, was bedeutet, dass die optimale Triggerfrequenz für die LED 18.5 kHz ist. Entsprechend der Triggerfrequenzvoreinstellung wird die LED nach 50 μs abgeschaltet, und die Fluoreszenz klingt ab. Interessant ist die sehr große Ähnlichkeit zwischen der Anstieg- und Abklingkurve. Weitere Messungen bei verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken liefern folgendes Resultat:

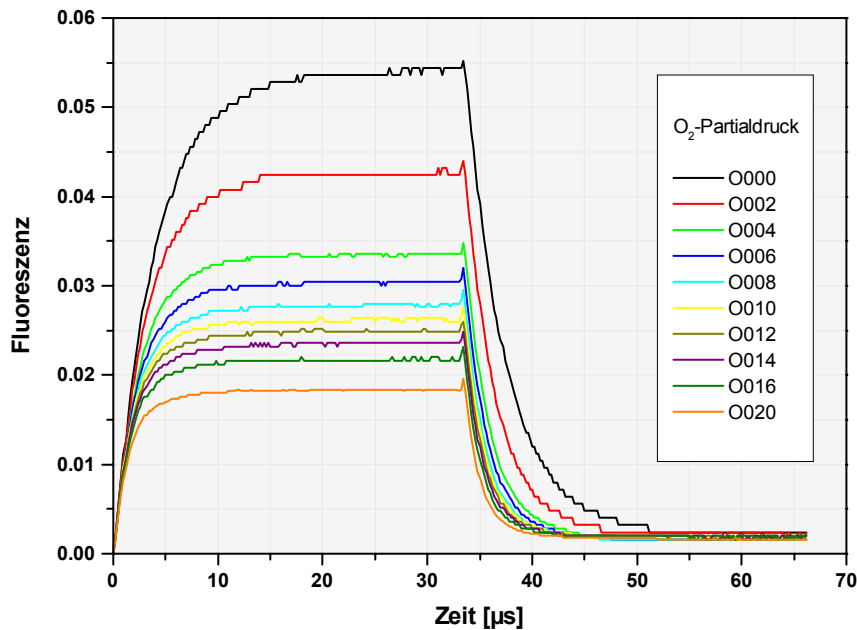


Abbildung 29 Anregungs- und Abklingkurve bei verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken

Die in der obigen Abbildung 29 wiedergegebene Periode, die sich aus der Anregungsphase und der Abklingphase zusammensetzt, enthält drei Parameter, die Rückschlüsse auf den Sauerstoffgehalt geben: die Fluoreszenzintensität, die Abkling- und Anregungszeit. Analog zur Abklingzeit ist die Anregungszeit bei Abwesenheit von Sauerstoff am größten und nimmt mit zunehmendem Sauerstoffpartialdruck ab. Sauerstoff beeinflusst als Quencher demnach nicht nur die Abkling-, sondern auch die Anregungszeit. Abbildung 30 zeigt neben der Intensitätskurve den Verlauf der beiden Kurven. Sie sind stetig, haben einen exponentiellen Charakter und zeigen dabei entsprechend der Theorie von Stern und Volmer einen identischen Verlauf. Ihr Verhalten lässt sich wie im Falle des Abklings damit erklären, dass das Fluorophormolekül eine bestimmte Zeit benötigt, die stoffspezifisch ist, um in den angeregten Zustand bzw. von diesem in den Grundzustand zu gelangen.

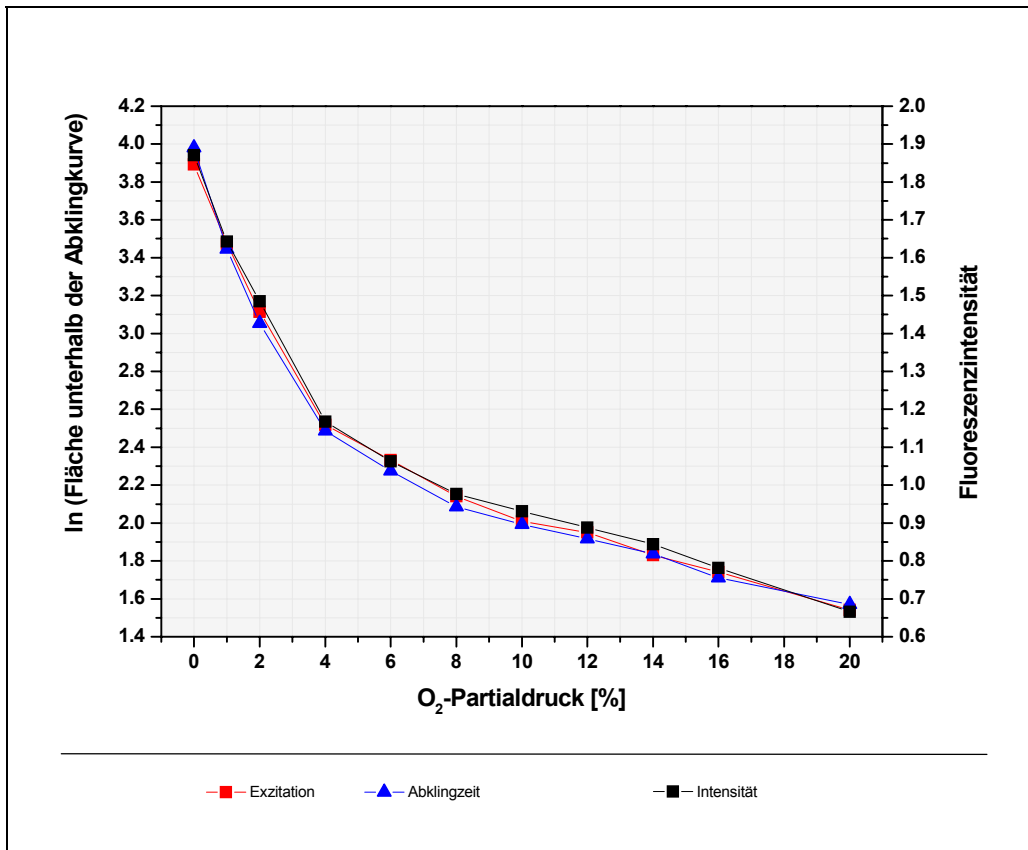


Abbildung 30 Sauerstoffabhängigkeit der Anregung, des Abklingens und der Fluoreszenzintensität des RuDPP

Die Möglichkeit, die Exzitationskurve zur Sauerstoffmessung zu nutzen, erwies sich jedoch als nicht sinnvoll, da das Signal der Exzitationskurve sehr stark verrauscht ist (s. Abbildung 28 oben) und eine sehr hohe Mittelwertbildung bedarf.

Da die Matrix, in der der Fluorophor eingebettet ist, einen Einfluss auf Fluoreszenz ausübt [17] [35], wird dieses Sachverhalten im Folgenden genauer untersucht. Bei diesem Versuch werden die Polymere Polystyrol (Sigma), Polysulfon (Sigma) und Polydimethylsiloxan (E43, Wacker GmbH) miteinander verglichen. Diese Polymere zeichnen sich durch ihre hohe optische Transparenz aus, wobei die Hitzebeständigkeit von Polysulfon (Schmelzpunkt 165°C) und Polydimethylsiloxan (180°C) ausreichend hoch ist, um eine Dampfsterilisation zu bestehen. Silicon weist außerdem hohe chemische Resistenz vor. Bei der Präparation der Fluorophormembran wird das Polymer in Toluol gelöst bzw. im Falle des Silicons verdünnt. Danach wird der auf Kieselgel (LichroSorb 100, Merck) adsorbierte Tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin)-ruthenium(II)chlorid in die Polymerlösung gerührt und auf die Spitze der Optode aufgetragen. Zum Schutz vor Fremdlicht werden nach Trocknung der Fluorophormembran die Optodenspitze mit schwarzem Silicon überzogen. Bei Verwendung der Polymeren als Matrix stellt es sich heraus, dass die Abklingzeit bei gegebenem Sauerstoffpartialdruck sich von einander

unterscheiden, wobei sowohl Position als auch Abnahme der Abklingzeit deutlich divergieren. Die Fluorophormembran aus Polydimethylsiloxan zeigt die größte Quenchingeffektivität. Während beim Polystyrol die Abnahme der Abklingzeit τ von $8.6\mu\text{s}$ auf $3.8\mu\text{s}$ und Polysulfon von $6.5\mu\text{s}$ auf $2.2\mu\text{s}$ fällt, beträgt die Abklingzeit für Polydimethylsiloxan bei Abwesenheit von Sauerstoff $11\mu\text{s}$ und bei 100% Sauerstoff $2.5\mu\text{s}$. Außerdem ist die Sensitivität des Polydimethylsiloxan-Fluorophor-Membrans bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck deutlich größer als bei den anderen Polymeren. Dies kehrt sich allerdings bei hohem Sauerstoffpartialdruck um. Die Normierung der Abklingkurven zeigt die signifikanten Unterschiede zwischen den Kurven. Während bei einem Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes von 0% auf 4% im Falle von Polydimethylsiloxan eine Abnahme der Abklingzeit um 42% ($3.6\mu\text{s}$) zu registrieren ist, fällt die Abklingzeit im Falle von Polysulfon und Polystyrol nur um 18% ($0.8\mu\text{s}$) bzw. 20% ($1\mu\text{s}$). Bei einer Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes von 20% auf 100% beträgt die Abnahme der Abklingzeit dagegen nur 12% ($1\mu\text{s}$) für Polydimethylsiloxan und 36.4% ($1.6\mu\text{s}$) für Polysulfon und 46% ($2.3\mu\text{s}$) für Polystyrol. Beschränkt man die Messung zwischen 0% und 21% Sauerstoff, was in der Biotechnologie normaler Weise der Fall ist, ist Polydimethylsiloxan die beste Wahl unter den drei Polymeren. Für Messung bei höheren Sauerstoffpartialdrücken ist Polystyrol besser geeignet.

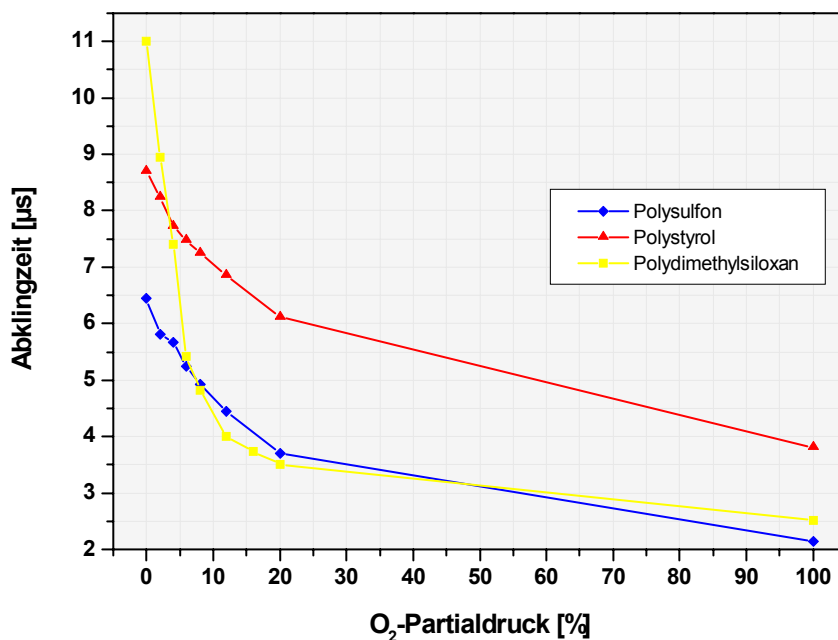


Abbildung 31 Kalibrationskurve für verschiedene Polymere

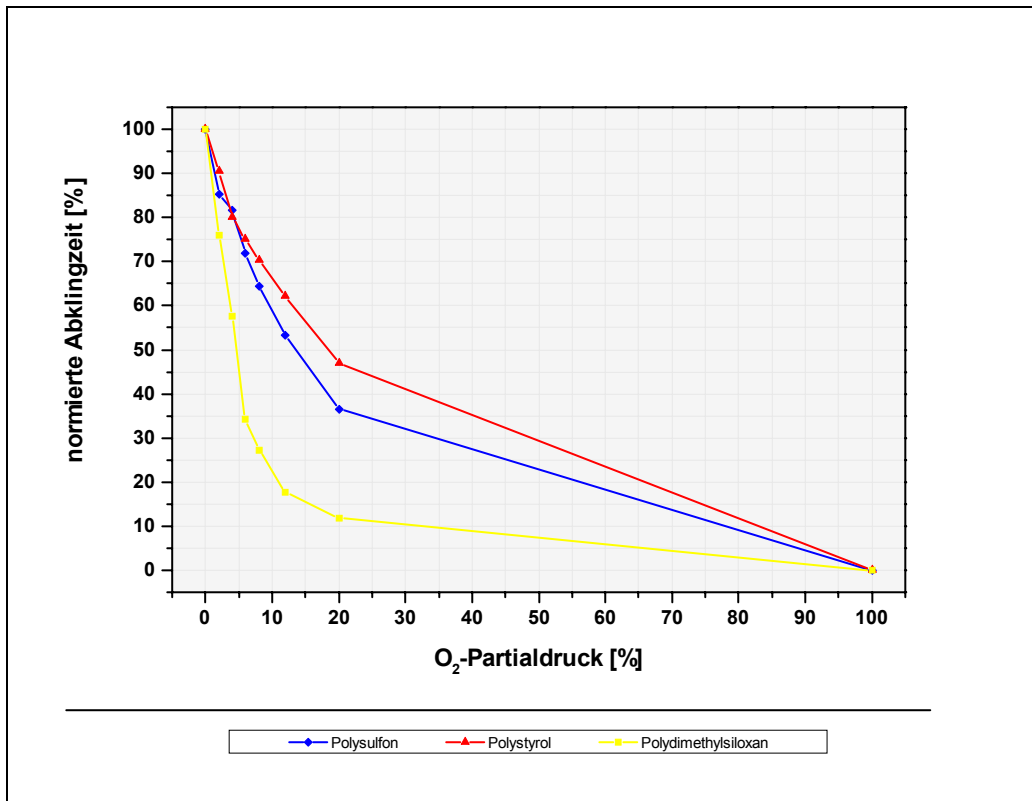


Abbildung 32 Normierte Kalibrationskurven für verschiedene Polymere

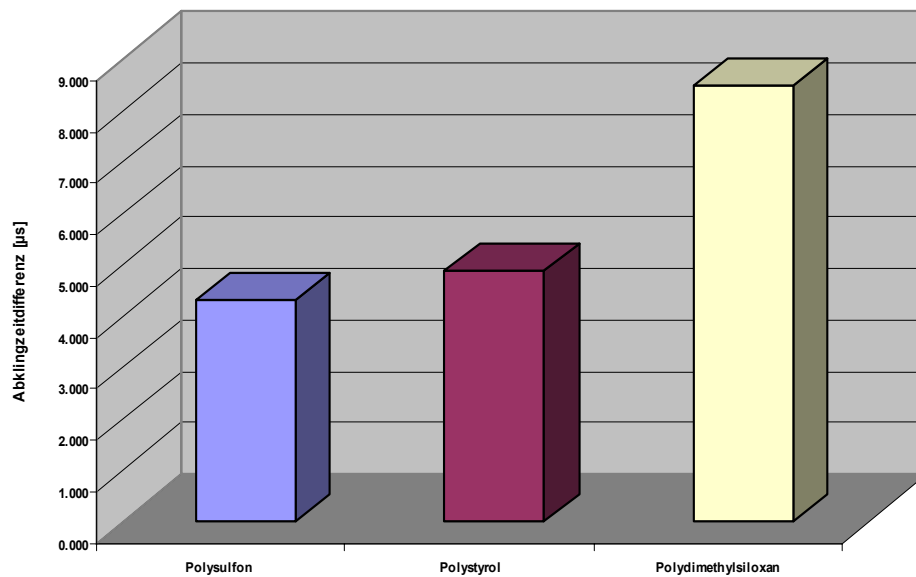


Abbildung 33 Abklingzeitdifferenz zwischen 0% und 100% Sauerstoff

5.3 Aufbau des optischen Systems

Der Sensor ist wie im folgenden Schema dargestellt aufgebaut:

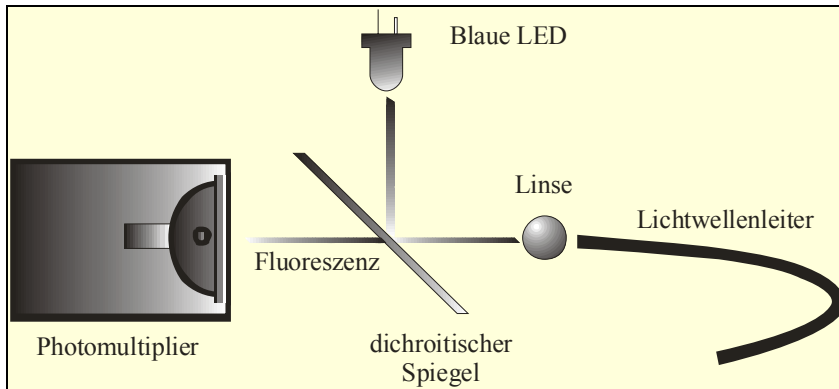


Abbildung 34 Aufbau der Sensoroptik

Das System besteht aus folgenden Komponenten:

- ✚ Lichtquelle
- ✚ Exzitationsfilter
- ✚ Dichroitischer Spiegel
- ✚ Emissionsfilter
- ✚ Trommellinse
- ✚ Lichtwellenleiter
- ✚ Photomultiplier

Das gepulste blaue Exzitationslicht der Lichtquelle, einer blauen LED wird mit Hilfe des Dichroitischen Spiegels in Richtung der Trommellinse gelenkt, wo es in den Lichtwellenleiter fokussiert wird. Am anderen Ende des Lichtwellenleiters trifft es auf die Fluorophormembran und regt den Farbstoff zur Fluoreszenz an. Ein Teil des orangeroten Lumineszenzlichtes gelangt auf demselben Wege zurück zum Dichroitischen Spiegel, wo es aufgrund seines längerwelligen Charakters diesen passiert und den Photomultiplier (PMT) erreicht. Um zu gewährleisten, dass das blaue Emissionslicht nicht in den PMT gelangt, ist vor diesem ein Emissionsfilter installiert, der auf das Fluoreszenzlicht abgestimmt ist. Der PMT wandelt das Fluoreszenzsignal in ein elektrisches Äquivalent um, das von der Elektronik weiterverarbeitet wird.

Im Folgenden wird genauer auf die einzelnen Komponenten eingegangen.

5.3.1 Lichtquelle

Unter Berücksichtigung der spektralen Eigenschaften des verwendeten Fluorophors kommen als Exzitationslichtquelle u.a. Halogenlampe, LASER, Laserdiode und LED. Halogenlampen haben den Nachteil, dass sie sehr viel Wärme erzeugen und nicht modulierbar sind. LASER und Laserdioden wären eigentlich optimal, da ihr Emissionsspektrum sehr engbandig ist. Allerdings sind ihre Preise sehr hoch, LASER wären für den Zweck zudem überdimensioniert. Blaue LED auf Basis von Galliumnitrid ist hierfür am besten geeignet, da sie modulierbar sind und für diese Anwendung über genügend Leuchtkraft verfügen. Ferner sind sie preiswert und klein. Die hier verwendete LED ist von Panasonic: LNG992CFB (Panasonic, Japan).

Serienbezeichnung	Lighting Color	Linsenfärbung	I_O	I_F	V_F		λ_P	$\Delta\lambda$	I_F	I_R	
					Typ	Max				Max	V_R
LNG992CFB	Blau	klar	1500	20	3.5	4.0	470	30	20	10	5
Einheit			mcd	mA	V	V	nm	nm	aA	μ A	V

Tabelle 12

Elektrooptische Charakteristiken der LED LNG992CFB (T = 25°C)

5.3.2 Filter

Da der verwendete Fluorophor bestimmte oben beschriebene Exzitations- und Emissionscharakteristika aufweist, müssen entsprechend dimensionierte Filter eingesetzt werden, um jede mögliche Störung zu vermeiden. Ein Exzitationsfilter (BP480ex, Delta Optics) findet bei dieser Applikation Anwendung. Das Spektrum der verwendeten LED ist zwar relativ engbandig und das Emissionsmaximum deckt sich sehr gut mit dem Exzitationsmaximum des RuDPP überein. Allerdings emittiert sie im orangefarbenen Bereich eine relativ zum Emissionsmaximum extrem geringe Lichtmenge, die jedoch im Vergleich zur Quantität des Fluoreszenzlichtes ein immenser Störfaktor darstellt. Daher wird vor der LED ein Kurzpassfilter vorgeschaltet, der nur das blaue Exzitationslicht passieren lässt. Zur Separation des Fluoreszenzsignals vom Exzitationslicht der LED wird ein Langpassfilter eingesetzt. Dieser hat im Vergleich zum Bandpassfilter zwar über ein breiteres Transmissionsspektrum, das bis in den infraroten Bereich hineinreicht, wodurch Fremdlicht dieses Bereiches den Filter passieren kann. Allerdings ist die Attenuation eines Bandpassfilters generell größer als die eines Langpassfilters, so dass auch das Fluoreszenzlicht in stärkerem Maße vom Filter absorbiert wird, was zur Signalabschwächung führt. Da

der verwendete PMT sehr unempfindlich gegenüber infrarotes Licht ist (s. unten), ist eine Ausfilterung des infraroten Lichtes nicht erforderlich.

5.3.3 Dichroitischer Spiegel

Dichroitische Spiegel haben die Eigenschaft, je nach Wellenlänge und entsprechend der Dimensionierung des Spiegels entweder das einfallende Licht zu reflektieren oder durchzulassen. Diese Eigenschaften sind neben der chemischen Zusammensetzung auch eine Funktion der geometrischen Ausrichtung des Spiegels relativ zum einfallenden Lichtstrahl. Der hier verwendete Spiegel reflektiert in 45°-Stellung blaues Licht, während er für Licht der Wellenlänge größer als 510nm durchlässig ist.

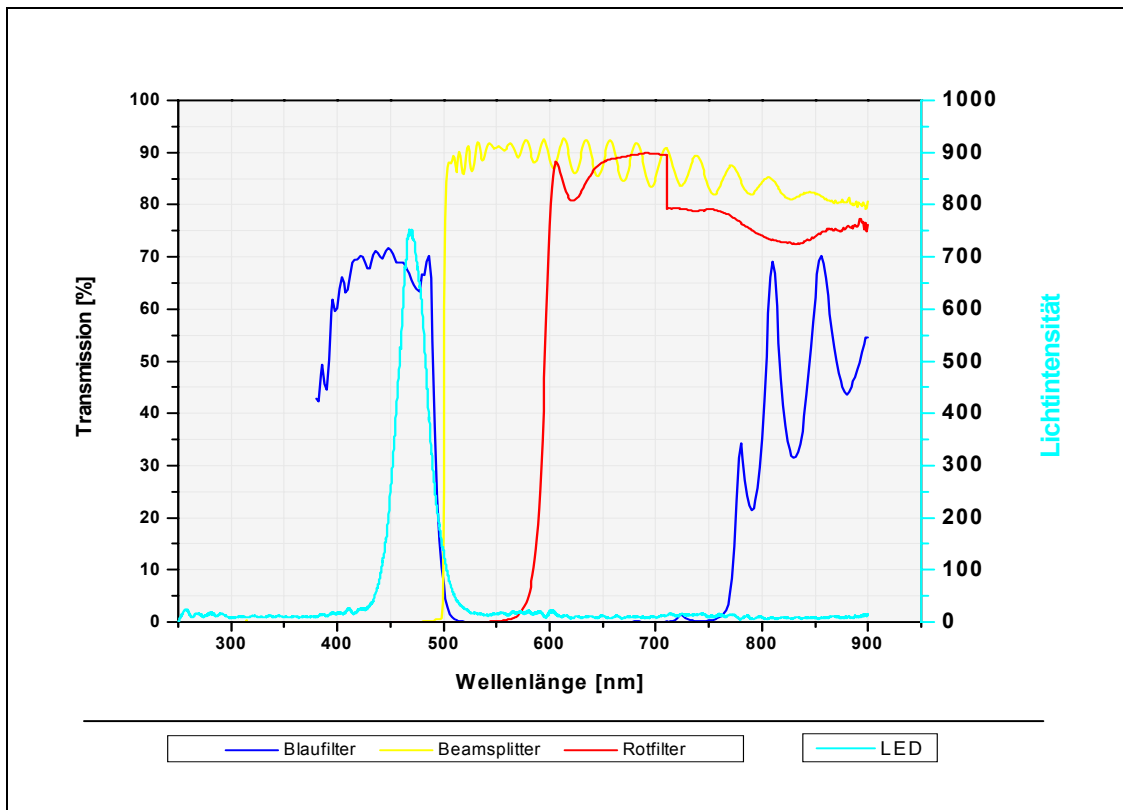


Abbildung 35 Spektrale Eigenschaft der optischen Komponenten

5.3.4 Photomultiplier (PMT)

Zur quantitativen Messung von Licht können im Allgemeinen drei Arten von Detektoren eingesetzt werden. Dies sind zum einen Pinphotodioden, Avalanche-photodioden (APD) und Photomultiplier. Pinphotodioden mit kleiner Sensorfläche sind zwar für Abklingzeitmessung ausreichend schnell, allerdings wegen der geringen Detektorfläche, nicht empfindlich genug. Da die Sensitivität mit Zunahme der photosensitiven Fläche wächst, gleichzeitig jedoch die Geschwindigkeit abnimmt, ist der Aufbau eines guten faseroptischen Systems, bei dem die Fluorophormembran nicht größer ist als 1mm^2 , nicht möglich.

Avalanche-photodioden sind im Vergleich zur Pindiode empfindlicher und schneller als diese, jedoch sind die Signale stärker mit Rauschen behaftet als es im Falle eines PMT und weniger sensitiv als dieser. Daher ist die Regelelektronik für eine Avalanche-Diode viel komplexer, um eine gute Signalqualität zu erhalten. PMT sind die empfindlichsten Detektoren. Zudem sind sie bei relativ geringem Rauschen extrem schnell. Für dieses System wird der PMT H6780-01 von Hamamatsu verwendet. Es handelt sich hierbei um einen PMT, bei dem die Dynoden senkrecht zur Achse der zylindrischen Röhre angeordnet sind und die Photokathode sich an der Stirnseite der Röhre befindet (Head-On). Zusammen mit der Hochspannungsversorgung ist die Photomultiplier-Röhre in ein stabiles Metallgehäuse eingebaut, so dass man von außen nur Kontakt zur Niederspannung hat. Im Gegensatz zum PMT mit der Photokathode an der Seite der Röhre (Side-On) eignen sich Head-On-PMT aufgrund der Zylindersymmetrie der Elektrodenanordnung besser zur Ankopplung an Lichtwellenleiter.

Photomultiplier	H6780-02 (Hamamatsu)
Betriebsspannung	11.5 – 15.5 V
Betriebsstrom (max.)	30 mA
Justierbare relative Sensitivität	1:10 000
Licht-Strom-Umwandlungsgeschwindigkeit	0.78 ns
Empfohlene Kontrollspannung	0.25-0.90 V
Spektrale Sensitivitätsbereich	300-650nm
Effektive lichtempfindliche Fläche (Durchmesser)	8mm
Gewicht	80g

Tabelle 13 Elektrooptische Eigenschaften des PMT [11]

5.3.5 Lichtwellenleiter/Trommellinse

Es werden im Allgemeinen sowohl Kunststofffaser als auch Quarzfaser verwendet. Kunststofffaser aus Polymethylmethacrylat (PMMA) sind preiswerter als Faser aus Quarz und die Dämpfung von sichtbarem Licht ist relativ klein. Ferner ist die Faser sehr biegsam. Für Applikationen, bei denen die Faser extreme Bedingungen (starke Lösungsmittel, saure oder basische Medien, hohe Temperatur) ausgesetzt sind, können PMMA-Faser nicht widerstehen und würden zersetzen. Im Fermentationsbereich können diese Faser nicht eingesetzt werden, da alle einzusetzenden Gerätschaften in der Regel vor Beginn der Fermentation einer Heißdampfsterilisation unterzogen werden. Für solche Zwecke wird Quarzfaser eingesetzt. Diese hat im Vergleich zur Kunststofffaser neben hoher Resistenz und Belastbarkeit auch eine niedrige optische Dämpfung, so dass die Lichtleitung mit minimalem Verlust verbunden ist.

Zur Ankopplung der Faser an das restliche optische System werden SMA-Stecker und –Buchse eingesetzt. Dabei wird das eine Ende der Faser fest eingeklebt. Die SMA-Buchse ist fest mit dem optischen Hauptbau integriert. Zur Einkopplung des Exzitationslichtes in die angeschlossene Faser wird eine Trommellinse innerhalb der SMA-Buchse installiert. Bei der Trommellinse handelt es sich praktisch um eine kugelförmige Linse, deren Kugelkappen um eine Achse herum abgeschliffen sind. Ihre optische Eigenschaft ist entlang einer Rotationsachse der der Kugellinse identisch. Der Vorteil einer Trommellinse besteht jedoch darin, dass sie sich aufgrund ihrer zylinderartigen Form einfacher in runden Röhren einbauen und fixieren lässt.

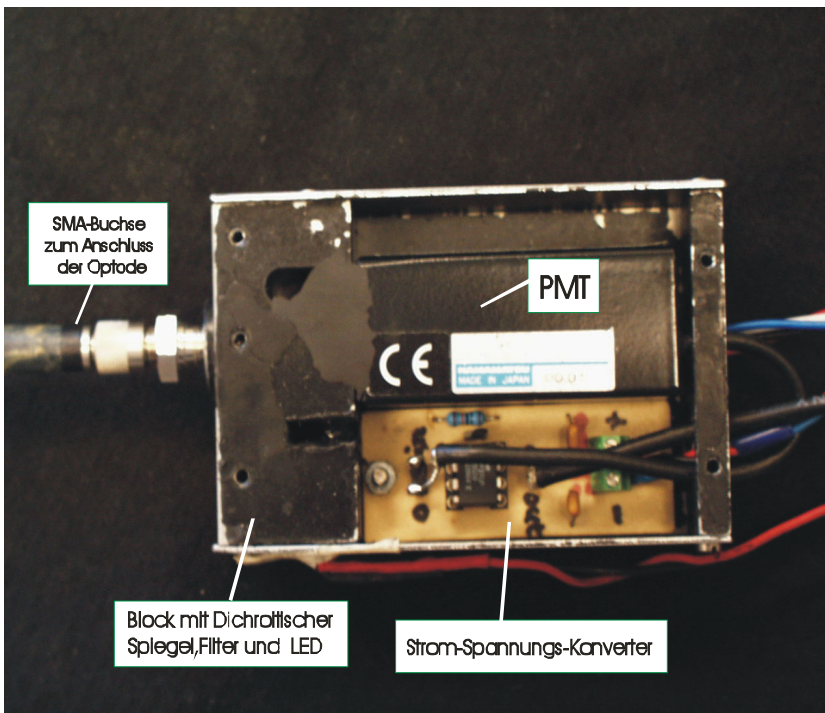


Abbildung 36 PMT, Strom-Spannungskonverter, Strahlenteiler, Optode

5.4 Elektronik

Elektronisch ist das faseroptische Sensorsystem aus zwei Hauptkomponenten aufgebaut. Dies sind zum einen die auf dem Mikrokontroller MC68HC11 von Motorola basierte Steuerkarte und zum anderen die Multifunktionskarte PCI 9812 von NuDAQ.

5.4.1 Mikrokontrollerboard

Das Herz des Mikrokontrollerboards bildet der Mikrokontroller MC68HC11 von Motorola. Er basiert auf einer 8-Bit-Architektur mit verschiedenen on-chip peripheren Funktionen. Die nominale Busgeschwindigkeit beträgt zwei Megahertz. Er verfügt über acht Kilobytes (KB) ROM, 512 Bytes EEPROM und 256 RAM. Die peripheren Funktionen umfassen die Analog-Digital-Konvertierung mittels eines on-chip 8-Bit-AD-Konverter, asynchrone und synchrone serielle Kommunikation über entsprechende Schnittstellen, sowie 16-Bit-Timer mit drei Input-Capture- und fünf Output-Compare-Funktionen. Über fünf Ports kommuniziert er mit der Peripherie. Das Board erweitert die Speicherkapazität des Mikrokontrollers extern auf 64 KB, wobei die eine Hälfte ROM, während die andere flüchtiges RAM oder Eprom ist. In diesem Baustein wird das Steuerungsprogramm abgelegt. Außerdem sind Schnittstellen für LCD-Display und RS232 standardmäßig enthalten.

Die Programmierung des Mikrokontrollers erfolgt mit Hilfe eines mitgelieferten Basicinterpreters und eines Assemblers. [25]

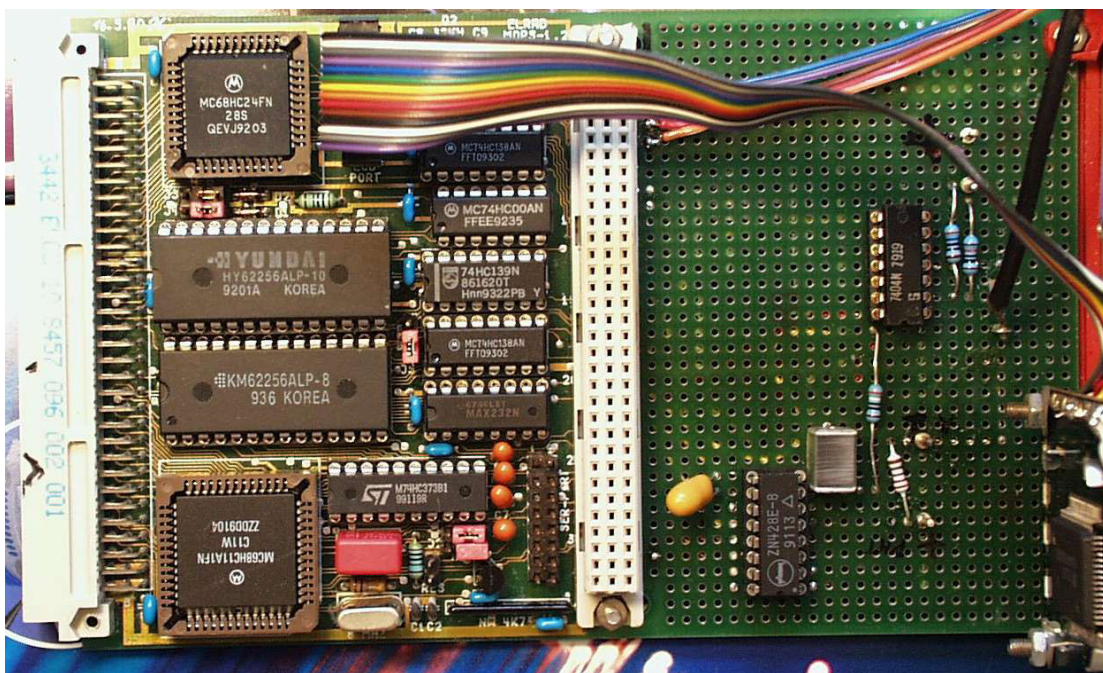


Abbildung 37 Mikrokontrollerboard MC68HC11

5.4.2 Multifunktionskarte

Die Multifunktionskarte NuDAQ PCI 9812 hat die Funktion, die vom PMT ankommenden analogen Signale zu digitalisieren. Da diese Daten mit einer sehr hohen Geschwindigkeit ankommen, muss die Verarbeitung sehr schnell erfolgen: die minimale Abklingzeit beträgt je nach verwendeter Matrix beim RuDPP ca. 2µs. Um einen einzigen Punkt dieser Kurve erfassen zu können, muss die Multifunktionskarte mit einer Mindestgeschwindigkeit von 500 kHz arbeiten. Diese Multifunktionskarte arbeitet mit einer maximalen Geschwindigkeit von 20 MHz bei einer Genauigkeit von zwölf Bits. Ferner verfügt sie insgesamt über vier analoge und drei digitale Signaleingänge sowie jeweils einen analogen bzw. digitalen Triggereingang. Sie ist außerdem kompatibel zu allen gängigen graphischen Programmiersoftware, wie Labview, HP-VEE, Visual Basic sowie Visual C und DASyLab, was die Entwicklung eines Auswerteprogrammes sehr erleichtert. In dieser Arbeit wird zur Auswertung und Visualisierung die Software DASyLab verwendet.

PCI-9812 PCI-Multifunktionskarte hat folgende Charakteristika [12]:

- ✚ 32-bit PCI-Bus, Bus Mastering DMA Datentransfer
- ✚ 12-bit analoge Eingangsauflösung
- ✚ On-board 32K words (samples) A/D FIFO memory
- ✚ Bis 20MHz A/D Datenaufnahmegeschwindigkeit
- ✚ 4 single-ended analoge Eingangskanäle
- ✚ Bipolare Eingangssignale
- ✚ Vier simultan arbeitende A/D-Konverter
- ✚ Fünf A/D Triggermodi: Software-Trigger, Vortrigger, Post-Trigger, Zwischentrigger und Verzögerungstrigger

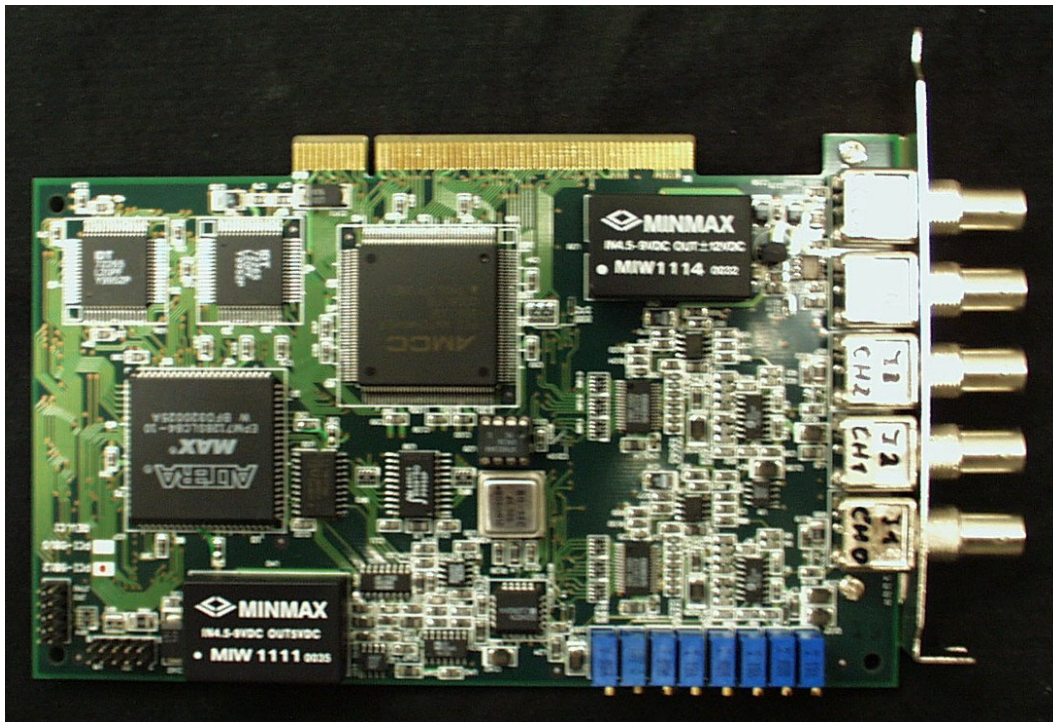


Abbildung 38 Multifunktionskarte NUDAQ PCI9812

5.4.3 DASyLab 5.6

Beim DASyLab® handelt sich um eine graphische Programmiersoftware von National Instruments für Windows-Betriebssysteme. Sie ist speziell entwickelt für Wissenschaftler und Ingenieure, die schnell und auf relativ einfache Weise komplexe Simulationen, Analysen oder Steuerungsalgorithmen entwerfen möchten.

Auf der Arbeitsoberfläche befinden sich zahlreiche graphische Elemente, die bestimmte Funktionen symbolisieren. Diese Funktionen dienen der Berechnung von Daten, wie Integrieren, Differenzieren, einfache Algebra bis hin zur komplexen FFT-Analyse. Des Weiteren erfüllen sie Aufgaben, wie der graphischen Darstellung von Daten, Speicherung von Daten, aber auch elektronische Filter, Relais und Triggerung, Internetfunktionen, Datenbank u.a. Vor Nutzung dieser Elemente müssen ihre Parameter festgelegt werden. Die Programmierung geht so vor sich, dass man graphische Elemente auf der Bedienoberfläche der Software logisch aneinander reiht, um so einen bestimmten Programmablauf zu ermöglichen.

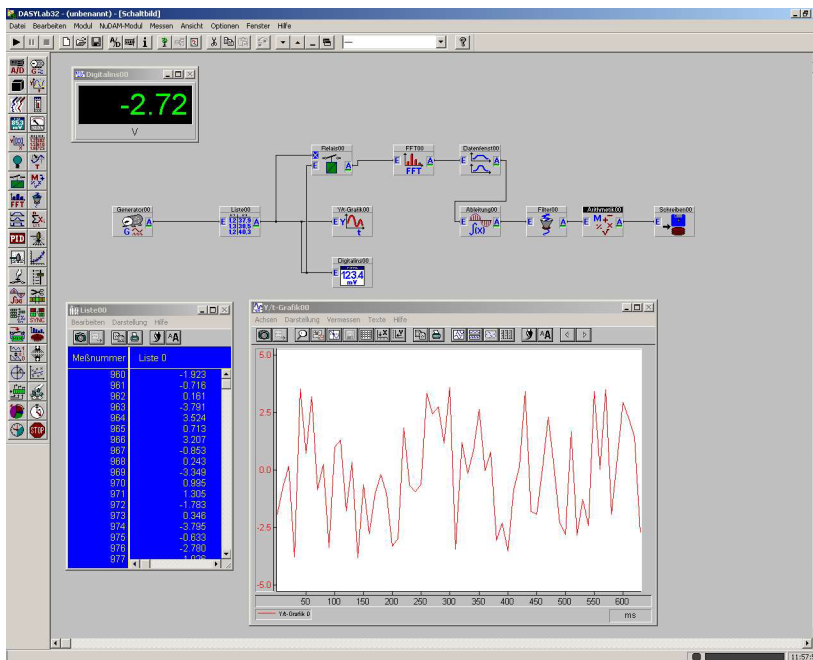





Abbildung 39 Programmieroberfläche von DASyLab 5.0®

5.5 Systemaufbau

Das Sensorsystem besteht vereinfachend aus drei Einheiten, die direkt miteinander verbunden sind:

-  Steuerungselektronik
-  Optik
-  Auswerteeinheit

Zur Steuerungselektronik gehören das Mikrokontrollerboard, LCD-Display und Tasten, Digital-Analog-Konverter (DAC) und Verstärker (AMP).

Das Mikrokontrollerboard hat bei diesem Sensorsystem die Funktion, mit Hilfe seines integrierten Timers die LED über einen Operationsverstärker, der das Signal des Timers stabilisiert, mit einer Frequenz von 20 kHz zu modulieren sowie über den DAC die Sensitivität des PMT festzulegen. Ferner übernimmt er die Vermittlerfunktion zwischen dem System und dem Anwender. Der Mikrokontroller ist so programmiert, dass er über ein LCD-Element den Anwender nach der gewünschten Messeinstellung, wie z.B. Messfrequenz und Sensitivität des PMT abfragt. Über Tasten legt der Anwender daraufhin alle gewünschten Einstellungen fest und gibt ebenfalls über eine Taste das Signal zum Starten einer Messung.

In der optischen Einheit, zu der die LED, der Dichroitische Spiegel, Linse, Optode und der PMT gehört, findet der eigentliche Messvorgang statt. Die vom Mikrokontroller kontrollierte LED regt den Fluorophor auf der Spitze der Optode zur Fluoreszenz an. Ein Teil des Fluoreszenzlichtes wird durch den

Lichtwellenleiter zum PMT geführt. Die Intensität des Lichtes wird dort in die äquivalente Stromstärke überführt und anschließend über ein BNC-Kabel zum Multifunktionskarte, die im Computer eingebaut ist, geleitet. Da diese Informationen nur in Form von Spannung und nicht Stromstärke verarbeiten kann, muss das Stromstärke-Signal vom Strom-Spannungswandler in elektrische Spannung konvertiert werden. Das so transformierte Signal wird von der Multifunktionskarte aufgenommen und mit Hilfe eines selbst entwickelten Programms auf der DasyLab-Plattform ausgewertet.

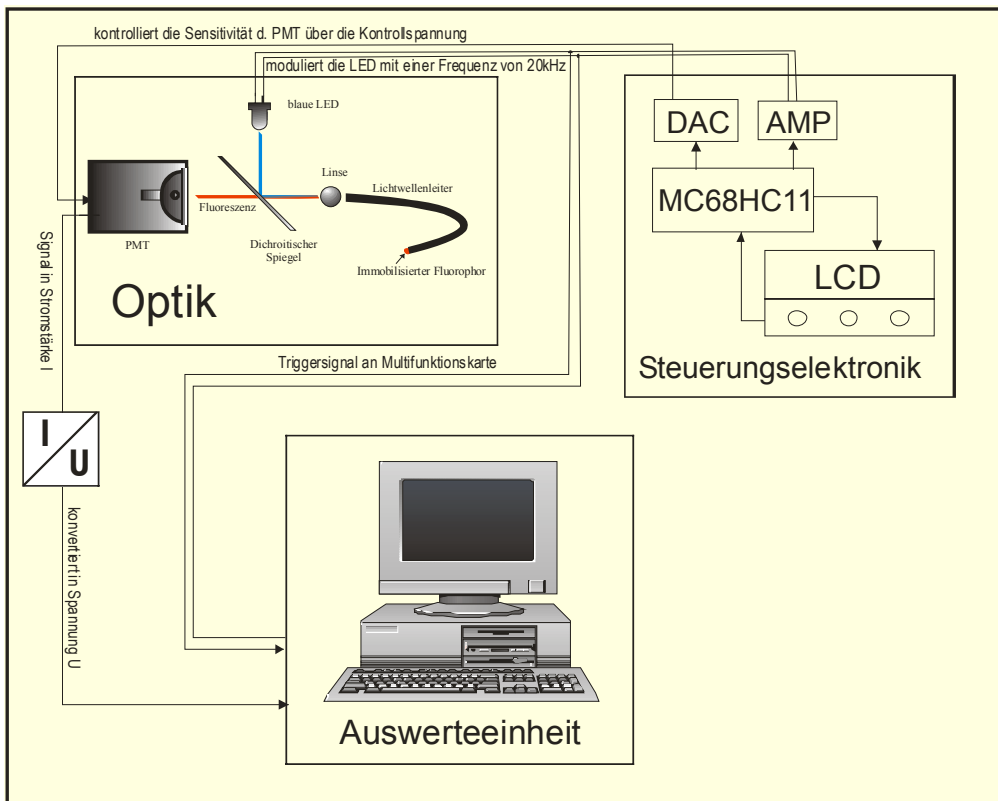


Abbildung 40 Schematischer Aufbau des Sensorsystems

5.6 Programmierung der Steuerungselektronik

Für die Entwicklung des Programms wird die Programmierplattform „MOPS 2.1“ (Himmeröder) verwendet. Diese enthalten neben dem Editor auch einen Compiler für Basic und Pascal sowie einen Assembler. Mit zum Umfang gehören ferner ein Monitor zur Betrachtung von Speicherzellen und Register sowie ein Epromer, mit dessen Hilfe das übersetzte Programm in ein eprom-konformes Format umgewandelt wird, so dass es in einem Eprom gespeichert werden kann. Wird das Mikrocontrollerboard eingeschaltet, so holt der Mikrocontroller die Algorithmen vom Eprom und führt sie aus.

Das Programm zur Steuerungselektronik wird in zwei verschiedenen Programmiersprachen geschrieben: Basic und Maschinensprache. Basic bietet als höhere Programmiersprache für die Entwicklung von Algorithmen, die keine hohe Durchführungsgeschwindigkeit erfordern, wie z.B. die alphanumerische Ausgabe an das Display, ein bequemes und gut überschaubares Werkzeug. Daher wird er für langsame Prozesse in diesem Steuerungsprogramm verwendet. Für die Modulation der LED bei einer Frequenz von 20 kHz wird der Mikrokontroller aufgrund des hohen Geschwindigkeitsbedarfs dagegen direkt in Maschinensprache programmiert. Das Programm fragt zur Anfang dem Anwender über das LCD-Display, ob er die voreingestellte maximale Kontrollspannung des PMT akzeptiere. Für den Fall, dass er eine andere Spannung haben möchte und die entsprechende Taste betätige, reduziert er den Wert um 0.1V und springt in einer Rückschleife zurück zur Abfrage. Bei einer Akzeptanz dagegen meldet er die Annahme und zeigt noch einmal die eingestellte Kontrollspannung an. Anschließend geht er über zur nächsten Abfrage nach der gewünschten Messfrequenz. Diese kann zwischen zehn Messungen pro Minute bis eine pro Stunde liegen. Der Auswahlprozess verläuft nach derselben Prozedur wie zuvor. Nachdem die gewünschte Frequenz eingestellt und dies dem Anwender mitgeteilt worden ist, wird um eine Bestätigung für den Start der Messung gebeten. Danach wird die Subroutine für die LED-Modulation gestartet.

Zur Generierung der LED-Modulation wird die Output-Compare-Funktion des im Mikrokontroller integrierten Timers verwendet. Das Timer-System basiert auf einen freilaufenden 16-Bit-Zähler, der sofort nach Hochfahren des Mikrokontrollerboards mit einer Taktfrequenz von 2 MHz hochläuft, bis sein 16-Bit-Register voll besetzt ist, worauf er mit einem neuen Zyklus wieder von neuem beginnt. Der momentane Wert des Registers kann jeder Zeit abgefragt werden. Dies wird von der Output-Compare-Funktion ausgenutzt, um u.a. ein TTL-Signal von fünf Volt an einem Pin des Ausgabeports zu kreieren. Dies geht so vor sich, dass man die Output-Compare-Funktion auf Generierung von TTL-Signalen einstellt und dann einen beliebigen Wert in eines der fünf Register der Output-Compare-Funktion ablegt. Mit Hilfe eines Komparators vergleicht die Output-Compare-Funktion diesen Wert mit dem momentanen Wert im Zähler. Stimmen beide Werte miteinander überein, so wird ein TTL-Signal von vier Volt ausgelöst, das die LED anschaltet und so lange andauert, bis ein Befehl es wieder deaktiviert. Die Deaktivierung erfolgt ebenfalls über die Output-Compare-Funktion. Dazu wird ein bestimmter fester Betrag zum Output-Compare-Register hinzuaddiert. Durch den fortlaufenden Vergleich mit dem Wert im Zähler wird bei Übereinstimmung das vorher erzeugte TTL-Signal gelöscht, womit die LED ausgeschaltet wird. Auf diese Weise wird ein Puls erzeugt. Entscheidend für die Höhe der Modulationsfrequenz ist diese Additionsbetrag. Je größer dieser ist, desto länger ist der Puls. Für eine Pulsbreite von 25 μ s beträgt dieser empirisch ermittelte Wert 40. Zur Erzeugung von einer bestimmten Anzahl von Pulsen wird der oben genannte Vorgang in einer Schleife stets wiederholt.

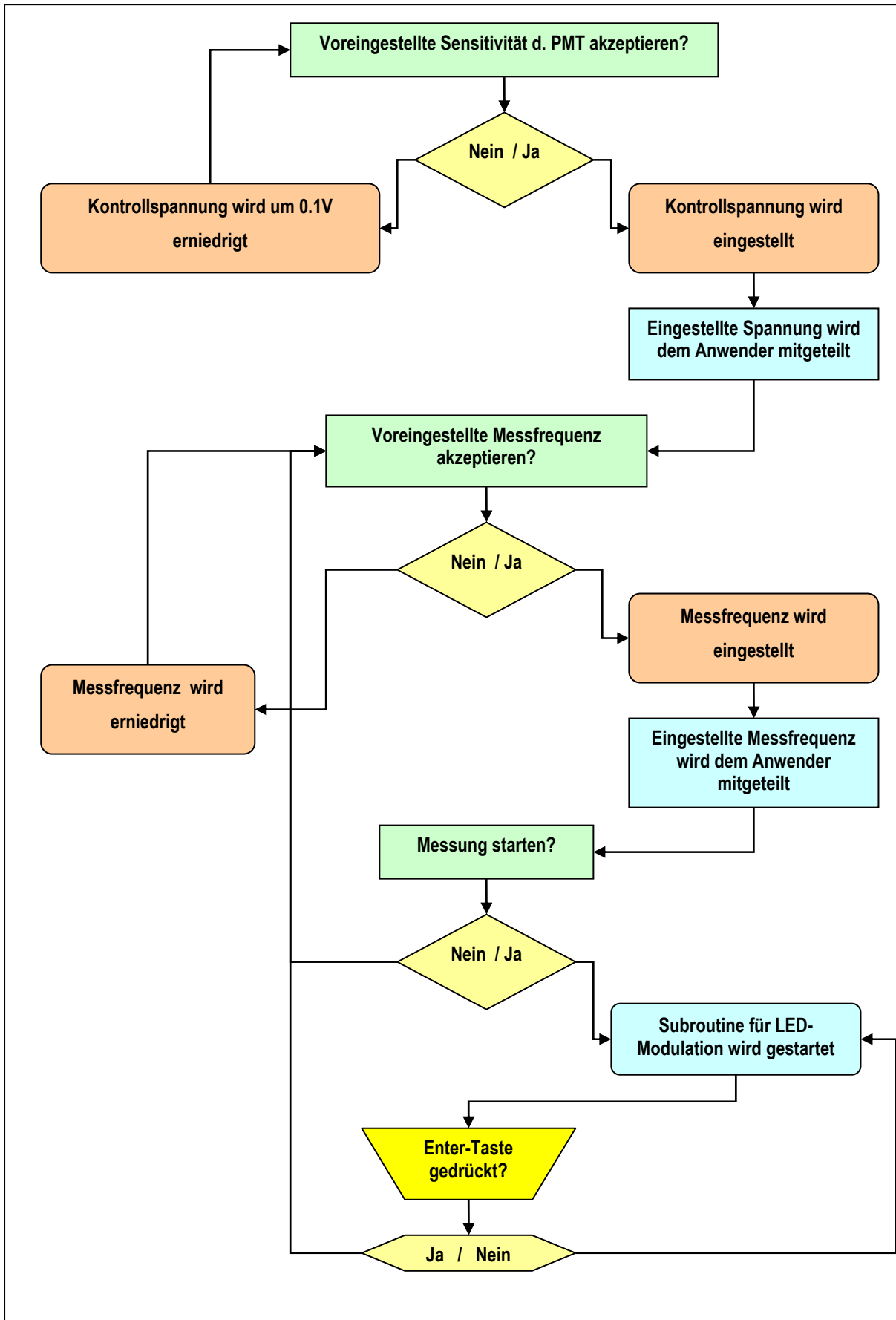


Abbildung 41 Flussdiagramm des Steuerungsprogramms

5.7 Auswerteeinheit

Die Auswerteeinheit besteht aus einem MS-Windows basierendem PC, in dem die Multifunktionskarte NUDAQ PCI9812 zur Akquisition der PMT-Daten eingebaut ist. Die Datenübermittlung vom PMT erfolgt über eine BNC-Verbindung zwischen der Multifunktionskarte und dem Strom-Spannungskonverter des PMT. Über ein weiteres Kabel werden die LED-Modulationspulse der Multifunktionskarte übermittelt. Zur Datenakquirierung wird diese Karte auf einer Arbeitsfrequenz von 10MHz eingestellt, die Datenblockgröße auf 1024 Samples und die Datenpuffer ebenfalls auf 1024 festgelegt. Zur Verarbeitung und Auswertung der PMT-Daten wird mit der Programmoberfläche DASYLab ein Programm entworfen, das in der Lage ist, sowohl die Fluoreszenzintensität als auch die Abklingzeit simultan zu ermitteln. Wie in Abbildung 45 zu sehen, verzweigt sich das Programm in zwei Ästen. Die untere Verzweigung stellt den Programmablauf zur Auswertung der Fluoreszenzintensität dar, während die obere für die Abklingzeitanalyse zuständig ist. Am Anfang des Programms wird das modulierte analoge Signal des PMT digitalisiert. Gleichzeitig werden die LED-Pulse in einem zweiten Kanal erfasst. Diese dienen im darauf folgenden Schritt als Triggersignal, das dem System Orientierungspunkte liefert, wann der Fluorophor zu fluoreszieren beginnt, wann das Ende der Exzitation und damit die Abklingzeit einsetzt.

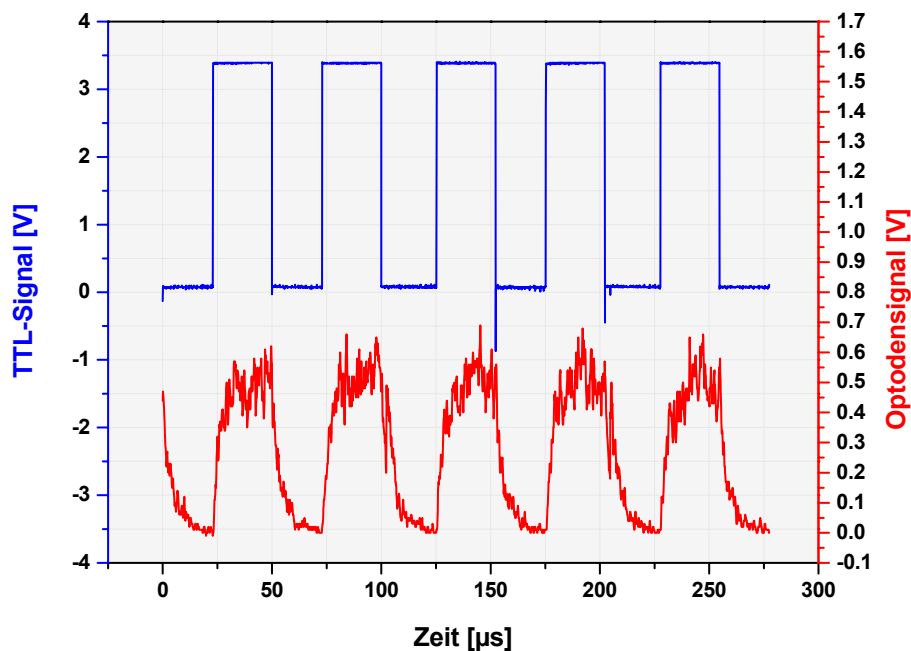


Abbildung 42 LED-Signal und Fluoreszenzsignal

Die Messsignale des PMT passieren nach ihrer Digitalisierung den Bandpassfilter, der Rauschen und eventuell eingekoppelte Netzfrequenzen herausfiltert. Die gefilterten Daten gelangen zum Relais 6 und 7. Mit Hilfe der Triggersignale wird das Relais 6 so eingestellt, dass nur die Fluoreszenzpulse durchgelassen werden, während die Pausen zwischen den Pulsen entfernt werden. Relais 7 dagegen lässt nur die Daten während der Pausen durch. Die Daten während den Pulspausen sind im Allgemeinen nicht gleich Null, was es im Idealfall wäre, wenn der Fluorophor nicht fluoresziert. Dies liegt zum einen daran, dass die Elektronik ein unvermeidbares Rauschen generiert, und zum anderen könnte Umgebungslicht in die Optode eindringen und das Signal um einen gewissen Betrag anheben. Die Werte innerhalb eines Pulses setzt sich zusammen aus den Anteilen Fluoreszenz, Rauschen und Fremdlicht, wogegen die Werte am Ende der Abklingkurve nur aus dem Rausch- und Fremdlichtanteilen bestehen. Durch Differenzbildung zwischen Pulswerten und dem mittleren Pausenwert erhält man den reinen Fluoreszenzanteil.

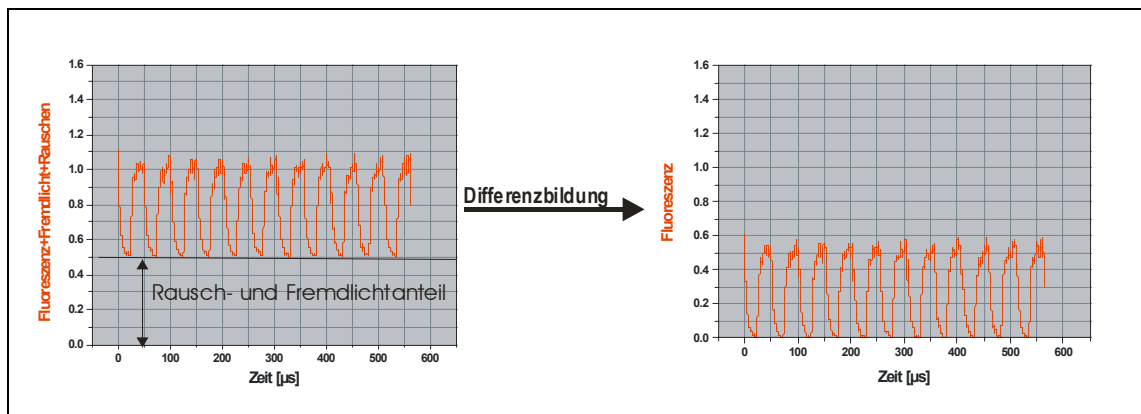


Abbildung 43 Eliminierung des Rausch- und Fremdlichtanteils

Die so bereinigten Fluoreszenzpulse werden in den darauf folgenden Schritten integriert. Das Integral gibt die Fluoreszenzintensität über einer definierten Anzahl an Pulsen für den vorherrschenden Sauerstoffpartialdruck wieder. Es wird in den darauf folgenden Schritten auf einem Digitaldisplay angezeigt und in einer Datei gespeichert. Gleichzeitig wird der Integralwert in einem Diagrammfenster, das den Kurvenverlauf der momentanen Messung wiedergibt, eingefügt. Für die Umrechnung der Fluoreszenzintensität in Sauerstoffpartialdruck wird das System vor einer Messung kalibriert. Der Algorithmus zur Steuerung der Kalibration befindet sich in der „Blackbox“. Über ein Schalterfeld bestimmt der Anwender den Modus. Es steht drei Modi zur Auswahl: Nullpunkt und 100%-Punkt-Kalibration sowie der Messmodus. Die Kalibrierwerte werden in globaler Variablen gespeichert. Mit ihnen wird der relative Sauerstoffpartialdruck von den darauf folgenden mathematischen Modulen berechnet, in einer Datei gespeichert und auf einem Digitaldisplay sowie Diagramm angezeigt.

Der Algorithmus für die Abklingzeitanalyse stimmt weitgehend mit dem für die Intensitätsbestimmung überein, unterscheidet sich aber im Wesentlichen in zwei Punkten: Während bei der Intensitätsbestimmung der ganze Fluoreszenzimpuls zur Berechnung herangezogen wird, ist bei der Abklingmethode nur die Abklingkurve von Interesse. Zur Isolierung der Abklingkurve ist der Trigger daher so eingestellt, dass er dem Relais dann ein Signal sendet, wenn die LED ausgeschaltet wird und die Fluoreszenz abzuklingen beginnt. Daraufhin lässt dieses Relais die Daten durch und sperrt den Datenfluss, sobald der Trigger meldet, dass die LED wieder eingeschaltet ist.

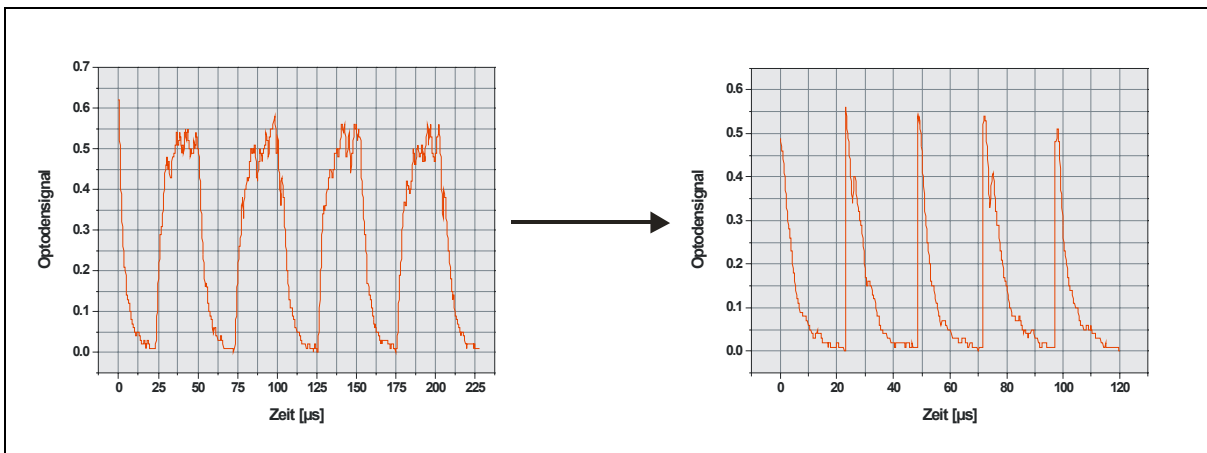


Abbildung 44 Isolierung der Abklingkurve unter Verwendung des LED-Signals als Trigger

Der zweite Unterschied zur Intensitätsanalyse besteht darin, dass wie schon erwähnt (S. 54) alle Werte auf den Anfangswert, der auch gleich das Maximum der Abklingkurve darstellt, zu normieren sind, um die Intensitätsabhängigkeit der Abklingkurve zu eliminieren.

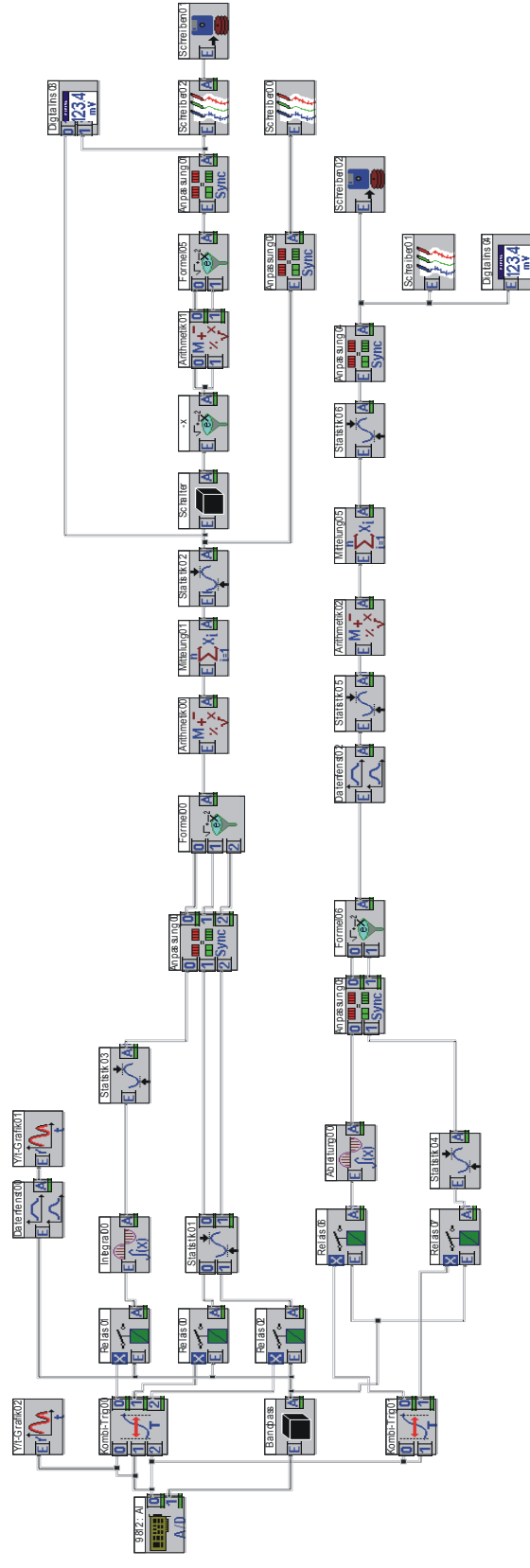


Abbildung 45 DASyLab-Programm zur Aufnahme und Verarbeitung des Sensorsignals

5.8 Ermittlung der Kalibrationskurve

Zur Ermittlung der Kalibrationskurve werden Optoden mit unterschiedlicher Fluorophorkonzentration verwendet. Der Fluorophor ist auf Kieselgel (Lichrosorb 100, Merck) adsorbiert und in Polydimethylsiloxan immobilisiert. Der Anteil des adsorbierten Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Rutheniums zur Fluorophormatrix beträgt 10, 15 bzw. 20 Gewichtsprozent. Dies dient zur Verifizierung, dass die Abklingzeitmessung im Gegensatz zur Intensitätsmessung weitgehend unabhängig von der Fluoreszenzintensität ist. Die Messung wird in wassergesättigten Sauerstoff-Stickstoff-Mischung, die mit Hilfe von zwei Massflowcontroller hergestellt wird, durchgeführt.

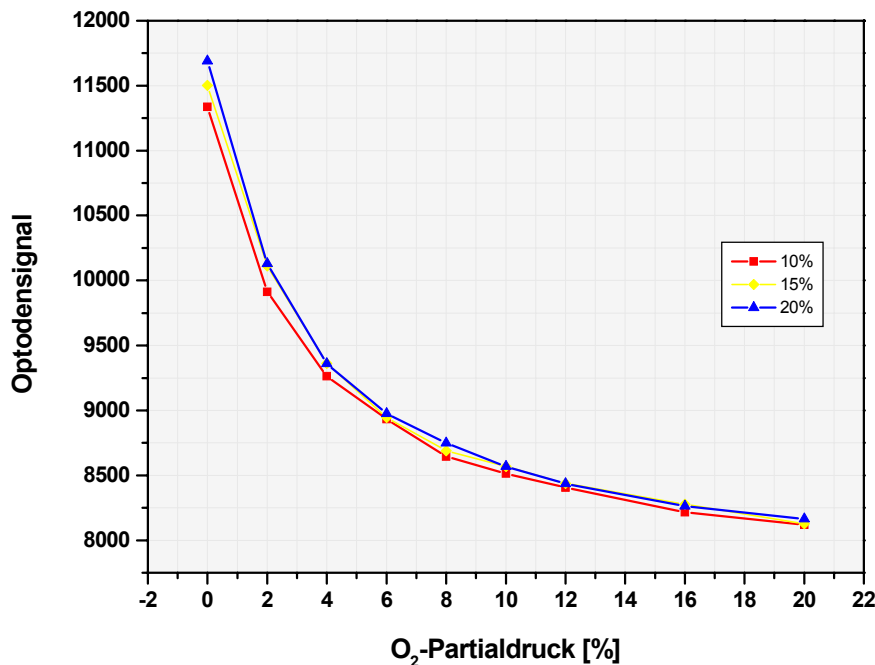


Abbildung 46 Kalibrationskurven des Abklingzeitsensors

Wie in Abbildung 46 zu erkennen, haben alle Kurven den gleichen Trend, weichen aber geringfügig von einander ab. Die Abweichung ist bei Abwesenheit von Sauerstoff am größten, nimmt jedoch mit zunehmendem Sauerstoffpartialdruck ab. So beträgt die Standardabweichung des Mittelwertes für Null Prozent Sauerstoff 1.5%, während sie 0.3% bei einem relativen Sauerstoffpartialdruck von 20% ist. Die Abweichung macht es erforderlich, dass man unter Verwendung der Grenzwerte die Kalibrationskurve normiert (Normierungsmethode, S.126). Die Normierung hat des Weiteren den Vorteil, dass bei Änderung der Pulsanzahlen, was mit einer Veränderung des Integrals mit sich bringt, keine neue mathematische Approximation für die Kalibrationskurve nötig ist.

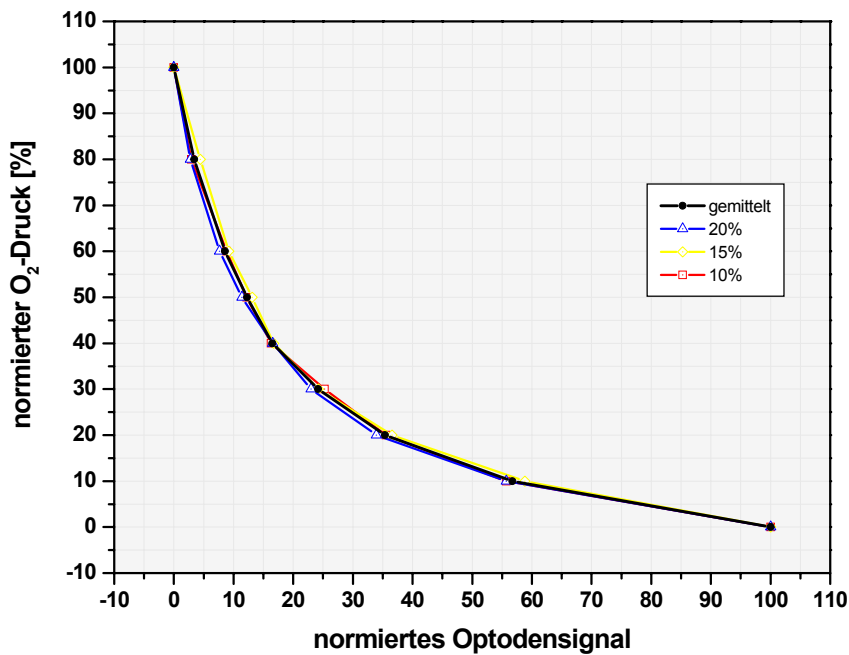


Abbildung 47 Normierte Kalibrationskurven des Abklingsensors

Die gemittelte normierte Kurve lässt sich durch eine Exponentialgleichung zweiter Ordnung beschreiben:

$$p(O_2) = -7.813 + 61.544 * e^{-\frac{x}{2.224}} + 46.279 * e^{-\frac{x}{11.197}}$$

Gl. 34

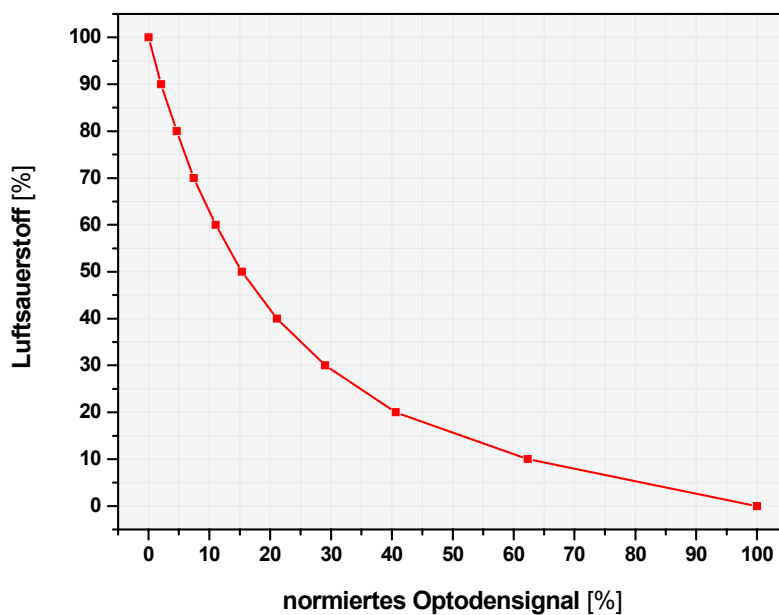


Abbildung 48 Kalibrationskurve der Intensitätsmessung

Aus den Intensitätsmessungen resultiert folgende Kalibrationskurve:

$$p(O_2) = -13.896 + 61.183 * e^{-\frac{x}{14.376}} + 52.555 * e^{-\frac{x}{75.065}} \quad \text{Gl. 35}$$

In beiden Fällen lassen sich die Kalibrationskurven durch eine exponentielle Funktion zweiter Ordnung beschreiben. Allerdings unterscheiden sich die Gleichungen durch die Koeffizienten und Konstanten. Dies liegt daran, dass die Matrix, in der der Farbstoff eingebettet ist, einen Teil des Fluoreszenzlichtes absorbiert, und die Lichtleitung vom Lichtleiter bis zum PMT durch Refraktion und Streuung mit Verluste verbunden ist.

5.9 Langzeitmessung mit dem kombinierten Sensor

Um die Auswirkung des Bleachingeffektes auf die Intensität bzw. Abklingzeit ermitteln, wird mit einer neuen Optode kontinuierlich über mehrere Tage hinweg in Luft bei Raumtemperatur gemessen. Täglich wird dabei die Intensität und Abklingzeit in Stickstoffatmosphäre gemessen. Theoretisch müsste die Abklingzeit sich völlig indifferent gegenüber dem Bleachingeffekt verhalten, während die Intensität mit der Zeit abnimmt.

Es stellte sich jedoch heraus, dass die Abklingzeit ebenfalls sich verringert. Im Vergleich zur Intensität ist die Abnahme jedoch wesentlich geringer. Nach 24 Stunden reduziert sich die Intensität von 100% auf 65%, während die Abklingzeit nur um 10% kleiner wird. Nach 170 Stunden beträgt die Fluoreszenzintensität nur noch 41%, wogegen die Abklingzeit noch 80% des Anfangswertes besitzt. Die Abnahme der Abklingzeit liegt wahrscheinlich darin begründet, dass die Matrix, welche entscheidend den Fluoreszenzprozess beeinflusst, durch die Bestrahlung spröde wird und eine andere Wechselwirkung auf den Fluorophor ausübt. Ein weiterer möglicher Grund könnte darin liegen, dass die ausgebleichten Fluorophormoleküle mit den noch intakten Fluorophormolekülen wechselwirkt.

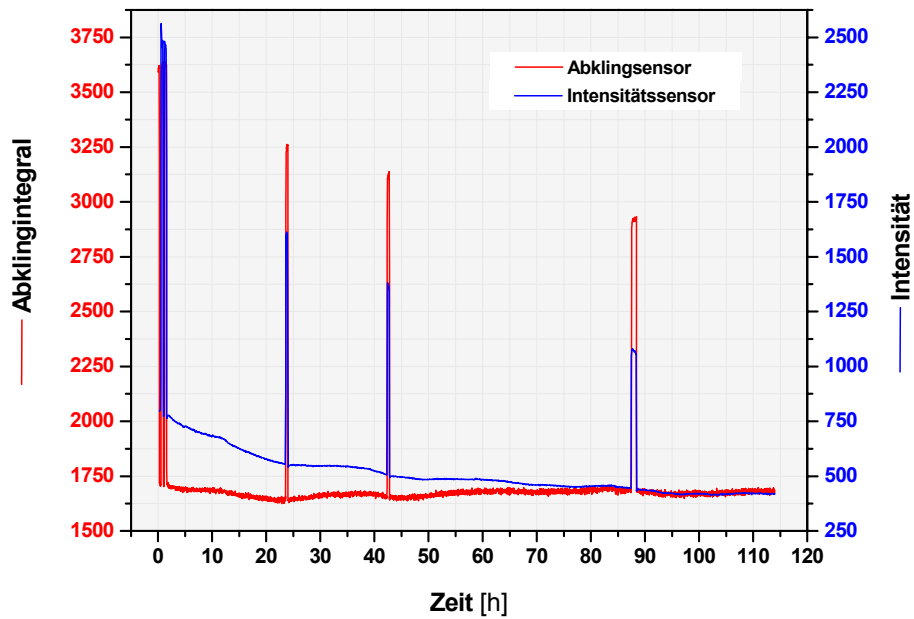


Abbildung 49 Vergleich des Abklingszeit- und Intensitätssensors bei einer Langzeitmessung

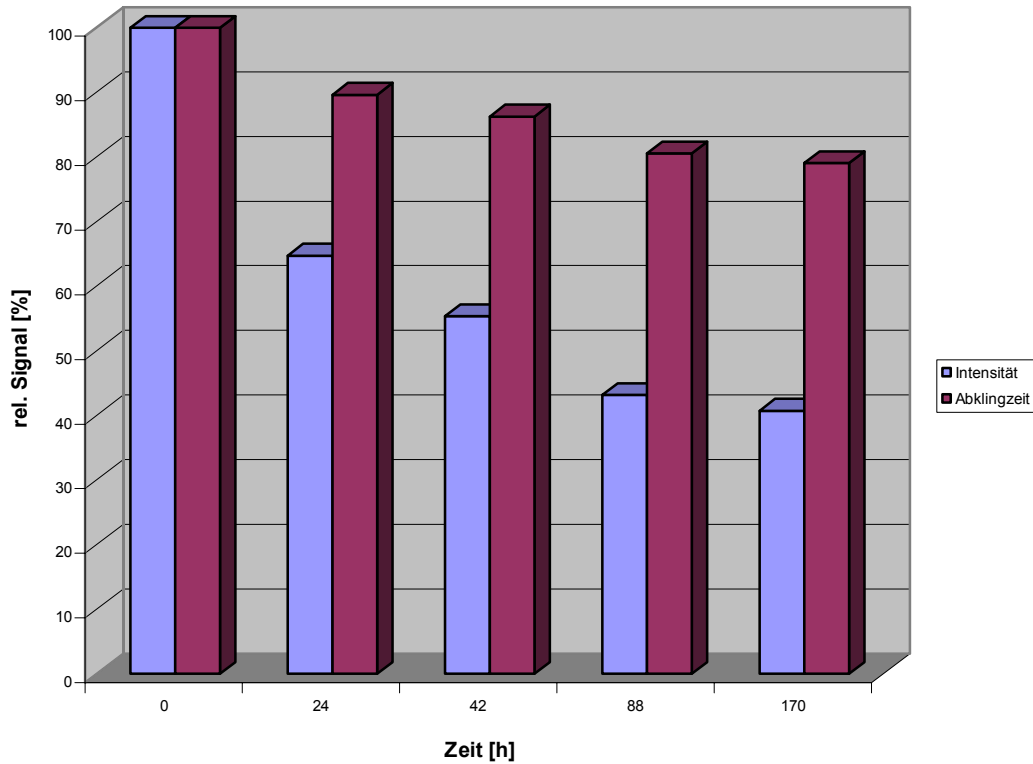


Abbildung 50 Relative Abnahme des Abklings- und des Intensitätssignals während einer kontinuierlichen Langzeitmessung

6 Online-Messungen mit dem faseroptischen Sauerstoffsensor

6.1 Online-Messung mit dem kombinierten Sensor bei einer Fermentation mit *Saccharomyces Cerevisae*

Zum Testen des kombinierten faseroptischen Sauerstoffsensors wird er in einer Hefefermentation zur alkoholischen Gärung eingesetzt. Die Fermentation wird bei Raumtemperatur in einem 1L-Reaktor durchgeführt. Die Rührgeschwindigkeit beträgt 600 rpm, beim Medium handelt es sich um ein modifiziertes Mineralmedium. Auf Begasung wird dabei verzichtet. Zusätzlich zur Sauerstoffoptode wird zum Vergleich eine Clark-Elektrode eingesetzt.

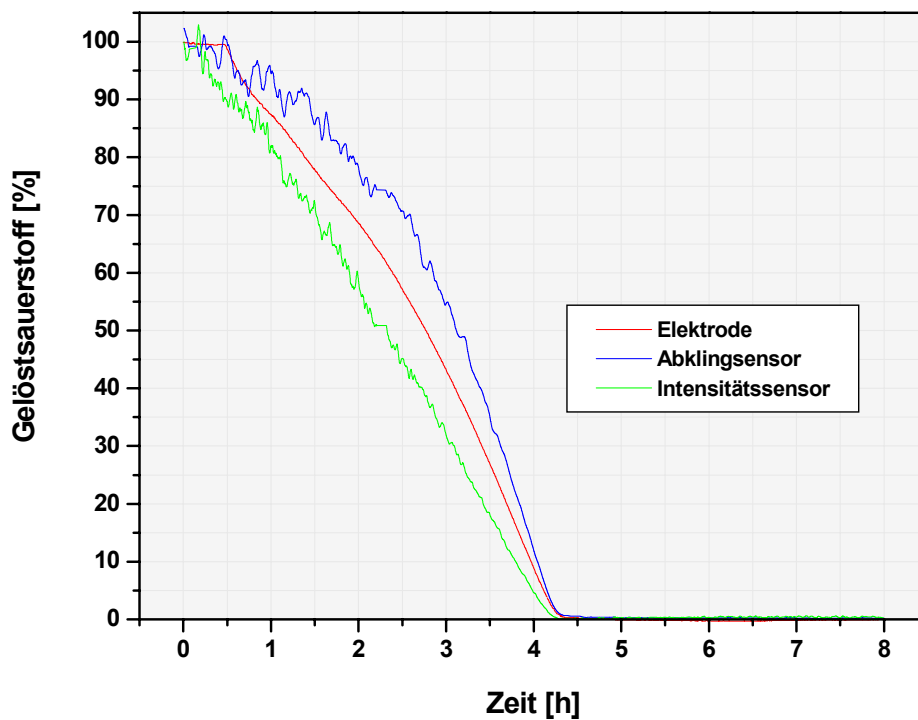


Abbildung 51 Sauerstoffverbrauch im Verlauf der Fermentation

Alle drei Sensoren zeigen den gleichen Trend an. Der Sauerstoffgehalt am Anfang nimmt mit der Vermehrung der Hefen allmählich ab und ist nach gut vier Stunden verbraucht. Die Messwerte vom Abklingsensor liegt dabei etwas höher als die Messwerte der Elektrode, während der Intensitätssensor kleinere Werte als die beiden anderen anzeigt.

6.2 Sauerstoffmessung bei der Kultivierung von *Acremonium chrysogenum*

Im Rahmen einer Kultivierung eines Hochleistungstammes des Schimmelpilzes *Acremonium chrysogenum*, der das Antibiotikum Cephalosporin C produziert, wird der Verlauf des Sauerstoffgehaltes mit Hilfe des faseroptischen und eines amperometrischen Sauerstoffsensors ermittelt.

Zur Vorbereitung der Kultivierung wird der Bioreaktor zusammen mit der Optode und Elektrode einschließlich des Nährmediums autoklaviert. Anschließend werden Sauerstoffoptode und -elektrode kalibriert.

Die Kultivierung wird in einem Reaktor mit einem Volumen von 10 Liter bei einer Temperatur von 25°C und einer Rührgeschwindigkeit von 600 min⁻¹ durchgeführt. Der pH-Wert liegt zwischen 5,8 und 6,4. Zur Versorgung der Kultur mit Sauerstoff wird während der Kultivierung kontinuierlich ein Preßluftstrom von 5,0 l*min⁻¹ in den Reaktor eingeleitet.

Der Verlauf des Sauerstoffgehaltes wird in Abbildung 46 wiedergegeben. Zum Vergleich werden Meßwerte der Optode und Elektrode im Diagramm aufgetragen.

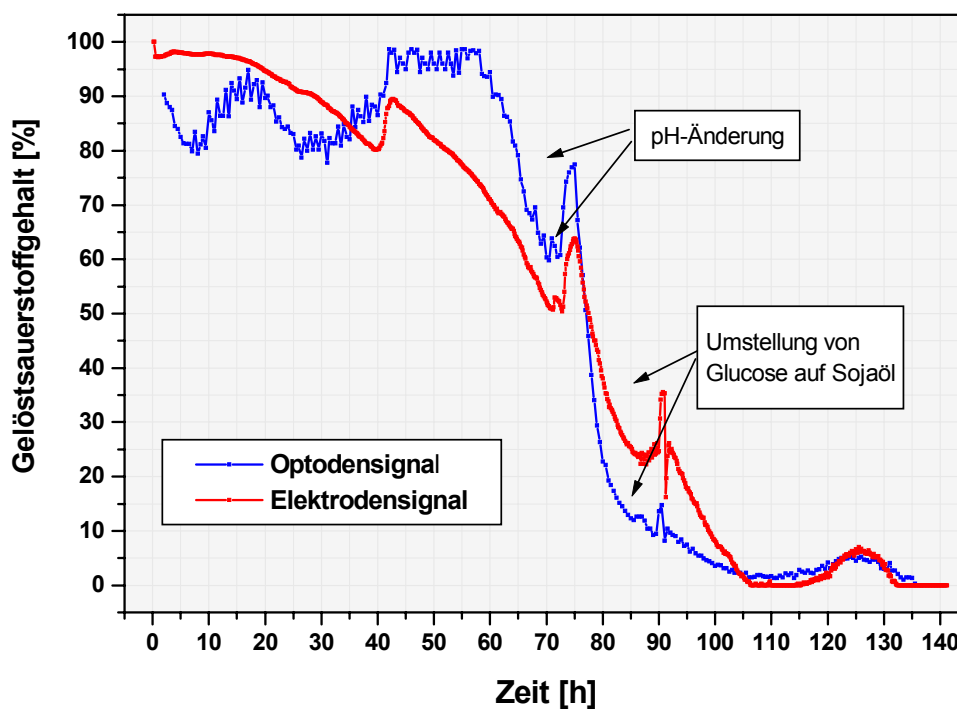


Abbildung 52

Sauerstoffgehalt im Laufe der Kultivierung von *Acremonium chrysogenum*

Im Verlauf der Kultivierung nimmt der Sauerstoffgehalt im Reaktor kontinuierlich ab. Dies liegt daran, daß bei konstanter Sauerstoffzufuhr infolge der Zunahme der Population mehr Sauerstoff verbraucht wird. Die Sauerstoffabnahme wird an zwei Stellen durch einen kurzzeitigen Anstieg des Sauerstoffgehaltes unterbrochen; die Sauerstoffzunahme nach 78 Stunden ist damit zu begründen, daß der pH-Wert sich geändert hat und die Mikroorganismen sich auf die Änderung umstellen müssen, was eine gewisse Adaptationszeit erfordert. Der kurzfristige Sauerstoffanstieg nach 88 Stunden hat die Nährstoffumstellung der Pilze von Glucose auf Sojaöl als Ursache.

Die Signale der Optode und Elektrode zeigen einen ähnlichen Verlauf. Am Anfang besteht eine starke Schwankung bei den Optodensignalen. Dies liegt wahrscheinlih daran, daß die Silikonmembran durch die Autoklavierung für gewisse Zeit reversibel verändert worden ist und erst im Laufe der Zeit seinen alten Zustand wieder annimmt.

6.3 Fed-Batch-Kultivierung von *E. coli JM 109 pcrash 2*

Beim *JM 109 pcrash 2* handelt es sich um ein genetisch manipuliertes *E.coli*-Bakterium. Durch den Einbau einer Gensequenz von der Qualle *Aquoria victoria* ist es in der Lage das grün fluoreszierende Protein GFP zu produzieren. GFP gewinnt als Markerprotein seit seiner Entdeckung zunehmend an Bedeutung, da es nicht invasive Online Analytik ermöglicht. So hat sich sein Einsatz in Aufreinigungsprozessen und Bioprozessbeobachtung bewährt. Ebenso ermöglicht es in der Zellbiologie und Biomedizin vielfältige Möglichkeiten durch den Einsatz von intakten lebenden Zellen und Organismen als experimentelle Systeme für biologische Screens.

Die Fermentation wird im Bioreaktor Biostat B mit einem Fassungsvermögen von zwei Litern durchgeführt, der Kultivierungsmodus ist Fed-batch. Die Betriebstemperatur wird während der gesamten Fermentationen auf konstant 30°C und der pH-Wert auf 7 gehalten. Beim Medium handelt es sich um Mineralmedium und als C-Quelle dient Glucose. Die Sauerstoffmessung erfolgt über eine Sauerstoffoptode sowie eine Clark-Elektrode als Vergleich. Wie in Abbildung 53 zu sehen ist, dauert die Lag-phase 15 Stunden, währenddessen die Biomasse nur sehr langsam ansteigt und die optische Dichte unter 5 bleibt. Während dieser Phase nimmt die Glucosekonzentration exponentiell ab und ist zu Beginn der exponentiellen Phase praktisch null. Während der etwa 15 stündigen exponentiellen Phase steigt die Biomasseproduktion drastisch an und erreicht am Ende einen Wert von etwa fünfzig. Zur Versorgung der Bakterien wird zu Beginn der exponentiellen Phase Glucose im Fedbatch-Betrieb zugeführt. Da die Population sehr hoch ist, wird die zugeführte Glucose momentan verbraucht, so dass die Glucosekonzentration nicht messbar ist.

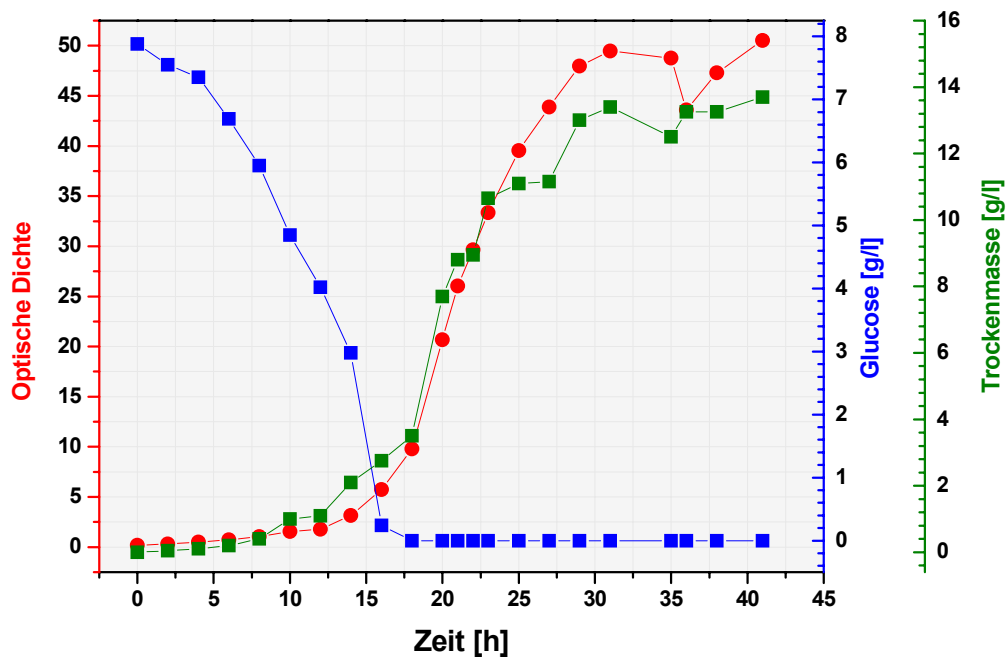


Abbildung 53 Biomasseproduktion und Glucoseverbrauch

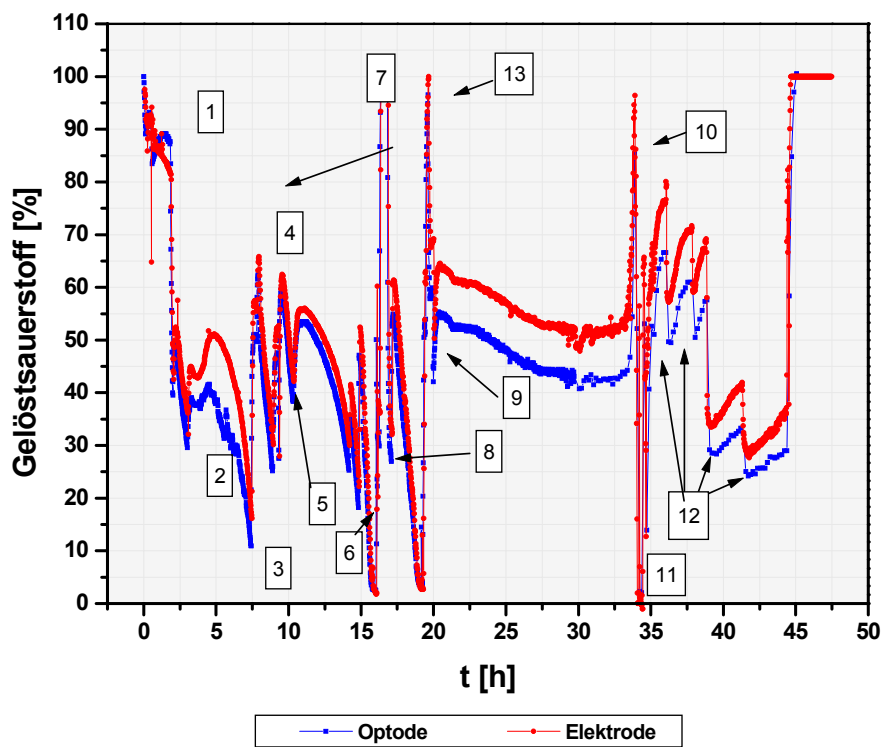


Abbildung 54 Gelöstsauerstoffgehalt während der Fermentation

Der Gehalt von gelöstem Sauerstoff im Bioreaktor ist bestimmt durch das Wachstum der Bakterienpopulation, die Rührergeschwindigkeit und den Antischaum. Zu Anfang der Fermentation wird zur Vermeidung von unnötigem Scherstress die Rührergeschwindigkeit niedrig gehalten. Die Reduzierung der Rührergeschwindigkeit von 250 auf 150 rpm bei Punkt 1 im Diagramm führt zur Verringerung des Sauerstoffgehaltes von 100 auf 90%. Die darauf folgenden zwei Stunden sinkt der Sauerstoffgehalt infolge des zunehmenden Stoffwechsels und Wachstums der Population auf 30%. Daher wird manuell die Rührergeschwindigkeit auf 200 rpm erhöht, worauf der Sauerstoffgehalt auf 50% ansteigt. Da am Punkt 3 der Sauerstoffgehalt nur bei 10% liegt, wird die Rührergeschwindigkeit auf 290 rpm erhöht, so dass die Sauerstoffkonzentration im Medium wieder ansteigt. Mit zunehmender Rührergeschwindigkeit und Zellpopulation entsteht viel Schaum, was eine Zugabe von Antischaummittel (Punkt 4) erforderlich macht. Dies hat eine Herabsetzung der Oberflächenspannung und der Sauerstofflöslichkeit zur Folge, weshalb die Rührergeschwindigkeit auf 400 rpm (Punkt 5) und anschließend auf 500 rpm (Punkt 6) erhöht werden muss. Mit Eintritt in die exponentielle Phase ist der Sauerstoffverbrauch so groß, dass die Rührergeschwindigkeit stufenweise letztendlich auf die maximale Rührergeschwindigkeit von 900 rpm erhöht (Punkt 7: 700rpm, Punkt 8: 800rpm, Punkt 9: 900rpm) wird. An den Punkten 8, 11 und 12 wird Antischaummittel zugegeben.

6.4 Bestimmung von Gelöstsauerstoff in NMR-Bioreaktoren

In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Schobert am Forschungszentrum Jülich wird im NMR-Bioreaktor die in-vivo-Aktivität des anaplerotischen Mechanismus in *Corynebacterium glutamicum* mit Hilfe der ^{13}C -Markierungsmethode untersucht.

Corynebacterium glutamicum hat eine ziemlich komplexe Konfiguration von Phosphoenolpyruvat, Oxalacetat- und Malat interkonvertierenden Enzymen, die alle in vergleichbaren Aktivitäten in zellfreien Extrakten präsent sind. Diese Enzyme spielen eine wichtige Rolle in der Aminosäureproduktion, weil sie die Synthese von Oxalacetat, dem Hauptprecursor für die Biosynthese von Aspartatderivaten (Lysin, Isoleucin, Threonin, Methionin) katalysieren. Mit Hilfe der online ^{13}C -NMR-Messung soll der Mechanismus aufgeklärt werden.

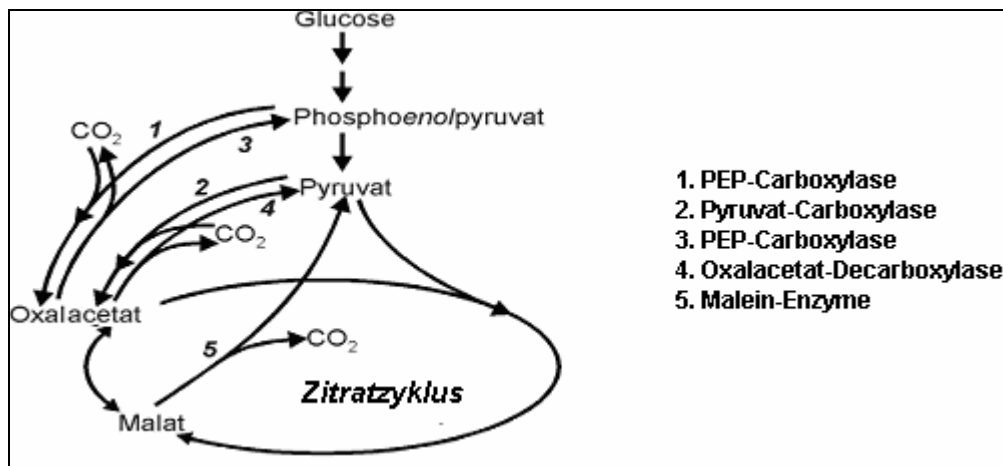


Abbildung 55 Wirkung der anaplerotischen Enzyme im *Corynebacterium glutamicum*

Für die Aufklärung dieses Mechanismus ist es wichtig, daß die Zellen während der Messung ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden. Während Elektroden aufgrund des starken Magnetfeldes (bis 9,7 Tesla) in einem NMR-Reaktor absolut unbrauchbar sind, wogegen Optoden störungsfrei funktionieren, eignet sich der faseroptische O₂-Sensor gut zur Sauerstoffüberwachung.

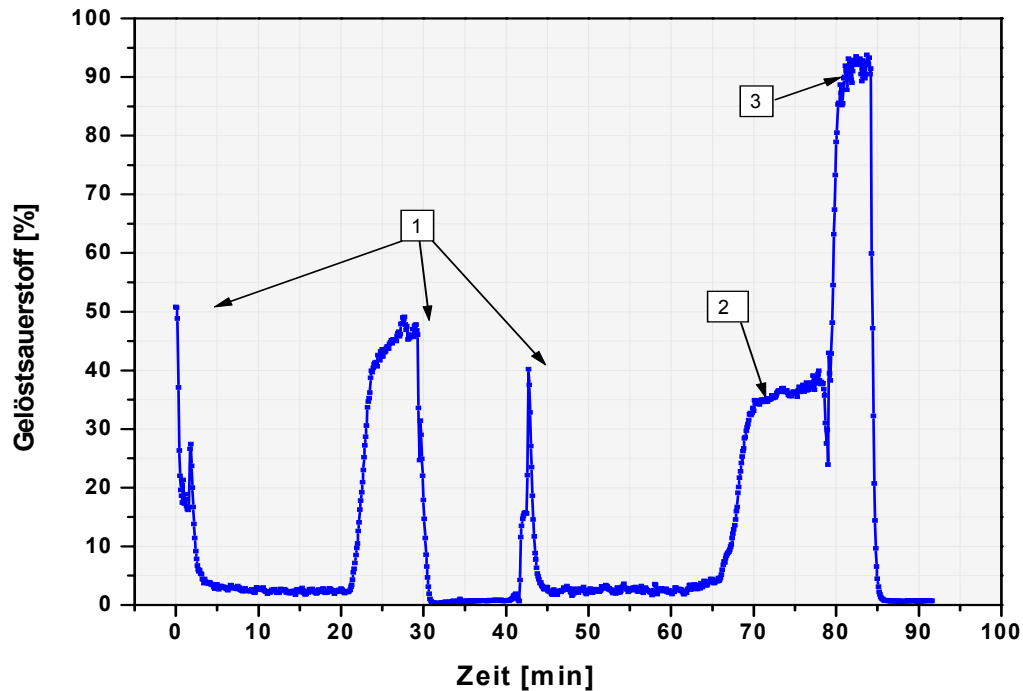


Abbildung 56

Gelöstsauerstoffmessung in NMR-Bioreaktor

Die Messung wird bei 25°C durchgeführt. Um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis für das NMR-Spektrometer erzielen zu können, wird dabei eine hochkonzentrierte Zellsuspension benutzt, zu der eine Glucoselösung zugegeben wird. Wie in Abbildung 56 zu sehen ist, wird die mit ^{13}C markierte Glucose innerhalb von zwei Minuten nach ihrer Zugabe und dem Einbau des Reaktionsgefäßes in den Reaktor (Punkt 1 in Abbildung 56) metabolisiert. Die NMR-Messung erfolgt kontinuierlich zwanzig Minuten lang, bevor eine neue Messung gestartet wird. Am Punkt 2 wird die Optode aus der Lösung genommen. Da an der Optode ein Biofilm sich gebildet hat, verbraucht er den Luftsauerstoff in der Mikroumgebung der Optode, so dass diese nicht den Sauerstoffgehalt der gesamten Lösung wiedergibt. Nach Reinigung der Optode in einer reinen Pufferlösung (Punkt 3) wird der luftgesättigte Gehalt der Lösung korrekt wiedergegeben.

6.5 Kinetische Messung der Oxidation von Ascorbinsäure und Ascorbat durch molekularen Sauerstoff

6.5.1 Theorie

Ascorbinsäure ist als Antioxidant in biologischen Systemen bekannt. Unter bestimmten Bedingungen jedoch wirkt sie als Prooxidant und trägt zur Oxidation von DNS in in-vivo-Systemen bei [29]. Untersuchungen von Deutsch [13] zeigen, dass die Reaktionen von Ascorbinsäure/Ascorbat stark abhängig vom pH-Wert sind. Die Reaktion mit Sauerstoff läuft nach Deutsch so ab, dass die Ascorbinsäure durch Reaktion mit Sauerstoff unter zweimaliger Decarboxilierung abgebaut wird:

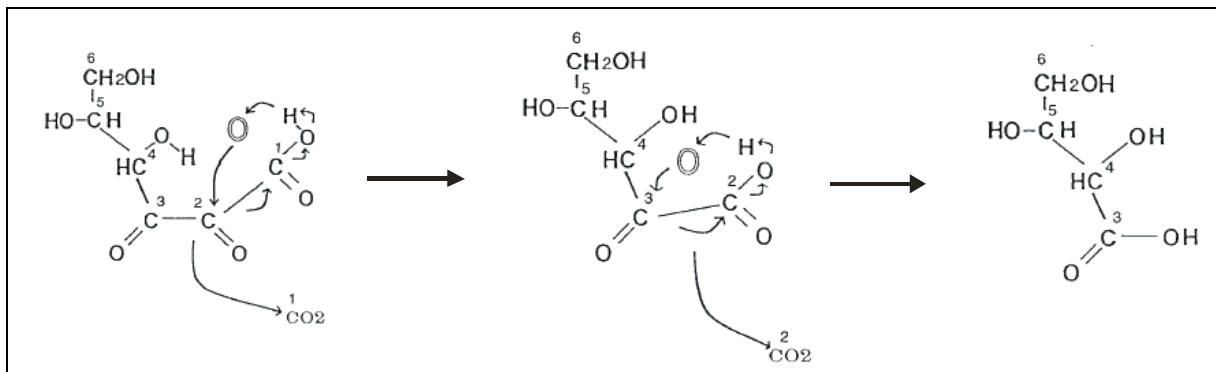


Abbildung 57 Mechanismus der Ascorbinsäureoxidation durch Sauerstoff

In diesem Versuch wird ermittelt, wie sich die Kinetik der Oxidation von Ascorbinsäure von Ascorbat durch molekularen Sauerstoff unterscheidet und in wie weit die Hydroxidkonzentration die Oxidation von Ascorbat beeinflusst.

6.5.2 Versuchsbeschreibung:

Die verwendeten Ascorbin- bzw. Ascorbatlösungen sind 0.1 molar. Die Ascorbatlösungen enthalten unterschiedliche Natriumhydroxidkonzentrationen. Als Sauerstoffquelle dient die Optode selbst, in deren Siliconmembran Sauerstoff gelöst ist. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Messung wird durch Eintauchen der Optode in die Probe gestartet, die während der gesamten Messung gerührt wird, und so lange fortgeführt bis der gesamte Sauerstoff in der Optodenmembran

durch die Ascorbin- bzw. Ascorbatlösungen vollständig reduziert worden ist. Sobald die Messung beendet ist, wird die Optode mit destilliertem Wasser gereinigt. Während des Reinigungsprozesses ist die Membran wieder mit Luftsauerstoff voll beladen und kann für die nächste Messung eingesetzt werden. Da die Optodenmembran bedingt durch deren Präparation von Optode zu Optode hinsichtlich ihrer Größe und Dicke voneinander unterscheidet, wird daher für alle Messung dieselbe Optode verwendet, um die Messungen in unterschiedlichen Proben miteinander vergleichen zu können.

6.5.3 Resultat:

Die Reduktion von Sauerstoff ist eine Reaktion zweiter Ordnung. Da die Konzentration von Ascorbin/Ascorbat in diesem Experiment sehr viel größer ist als die von Sauerstoff und während der Messung sich praktisch nicht ändert, kann von einer Reaktion pseudo-erster Ordnung ausgegangen werden:

$$\frac{d[O_2]}{dt} = -k * [A] * [O_2]$$

$$[A] \approx \textit{konstant}$$

$$k_1 \equiv k * [A]$$

$$\Rightarrow \frac{d[O_2]}{dt} = -k_1 * [O_2]$$

$$[O_2] = [O_2]_0 * e^{-k_1 t}$$

$[O_2]$ = laufende Sauerstoffkonzentration

$[O_2]_0$ = Anfangskonzentration

Die Messungen ergeben, dass die Reduktion von Sauerstoff durch Ascorbinsäure viel langsamer verläuft als durch Ascorbat. Während der Sauerstoff bei der Reaktion mit Ascorbat schon nach ca. ein Hundert Sekunden vollständig umgesetzt ist, benötigt Ascorbin dafür etwa 450 Sekunden. Es ist auch zu erkennen, dass eine gewisse Abhängigkeit zur Hydroxidkonzentration besteht. Bei einer Hydroxidkonzentration von 0.1 molar ist die Reaktion des Ascorbats deutlich langsamer als bei einer Konzentration von 0.6 molar.

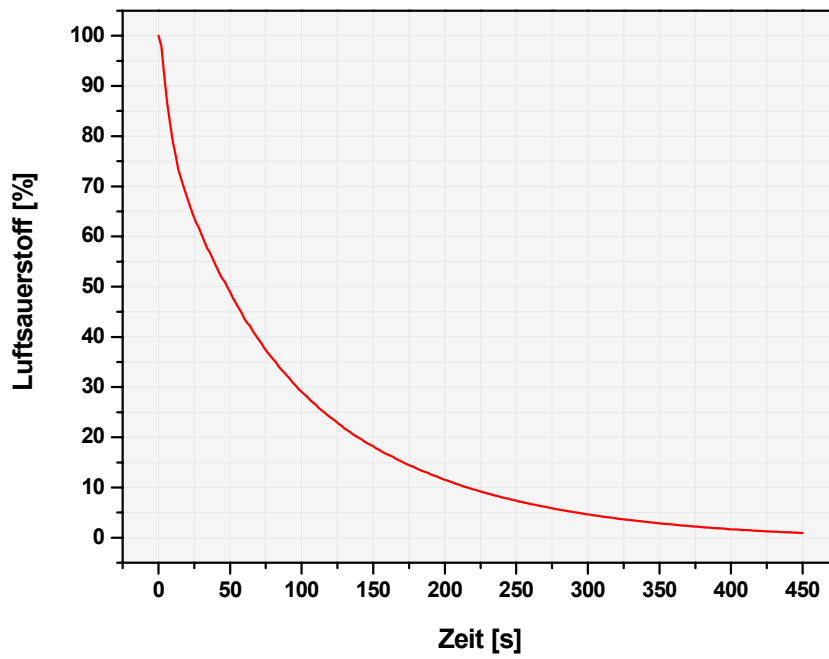


Abbildung 58 Reduktion von Luftsauerstoff mit Ascorbinsäure

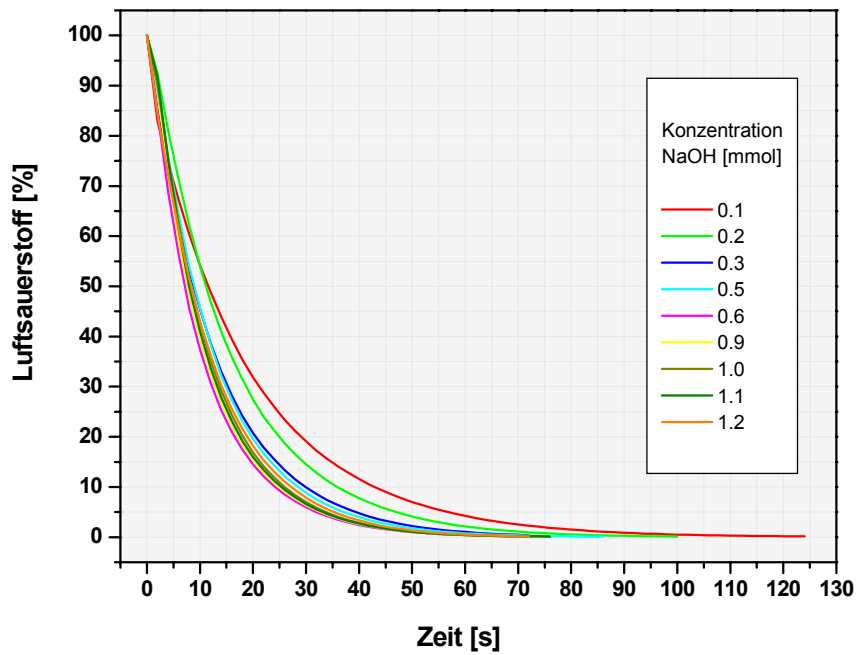


Abbildung 59 Reduktion von Sauerstoff durch alkalische Ascorbatlösung

Um die Kinetik der Reaktionen miteinander vergleichen zu können, wird die Geschwindigkeitskonstante k_1 der Reaktionen bestimmt. Unter der Annahme, dass die Reaktion eine pseudo-erste Ordnung ist, besteht demnach zwischen dem Sauerstoffgehalt und k_1 die lineare Beziehung:

$$\ln \frac{[O_2]}{[O_2]_0} = -k_1 t \quad \text{Gl. 36}$$

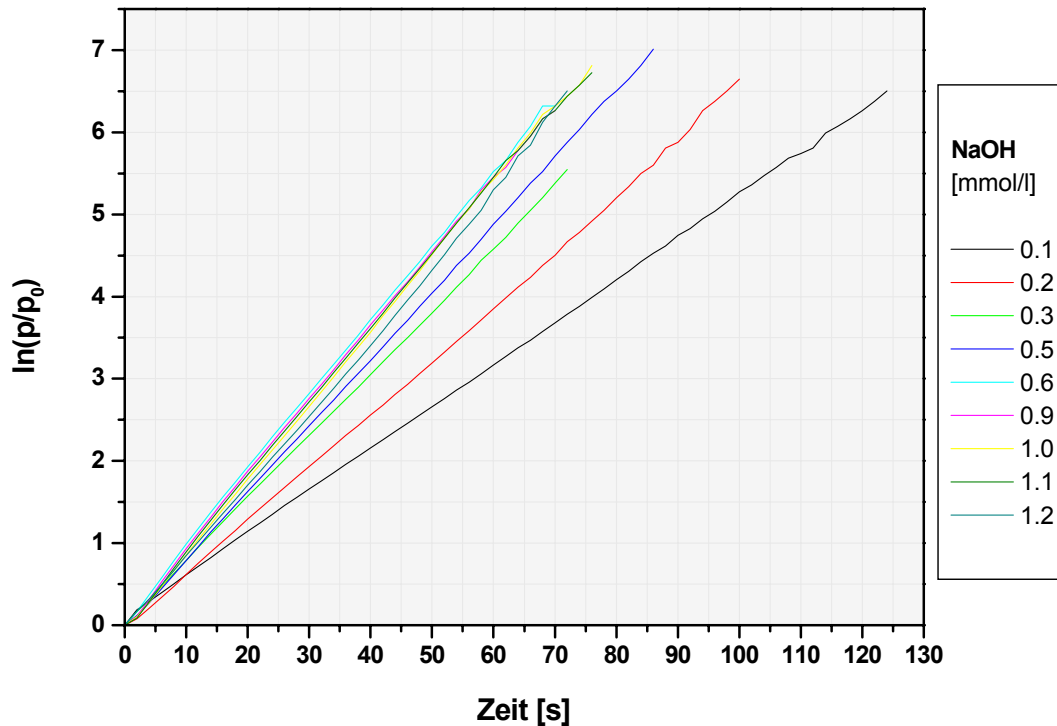


Abbildung 60 Logarithmische Auftragung der Reaktionskurven

Wie in Abbildung 60 zu sehen ist, besteht tatsächlich die oben angenommene lineare Abhängigkeit, was bestätigt, dass es um eine Reaktion pseudo-erster Ordnung handelt. Die aus der Steigung der Geraden erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten zeigen, dass die Geschwindigkeit mit dem Hydroxidgehalt bis zu einer Konzentration von 0.6 mmol wächst, dann aber eine asymptotische Grenze erreicht.

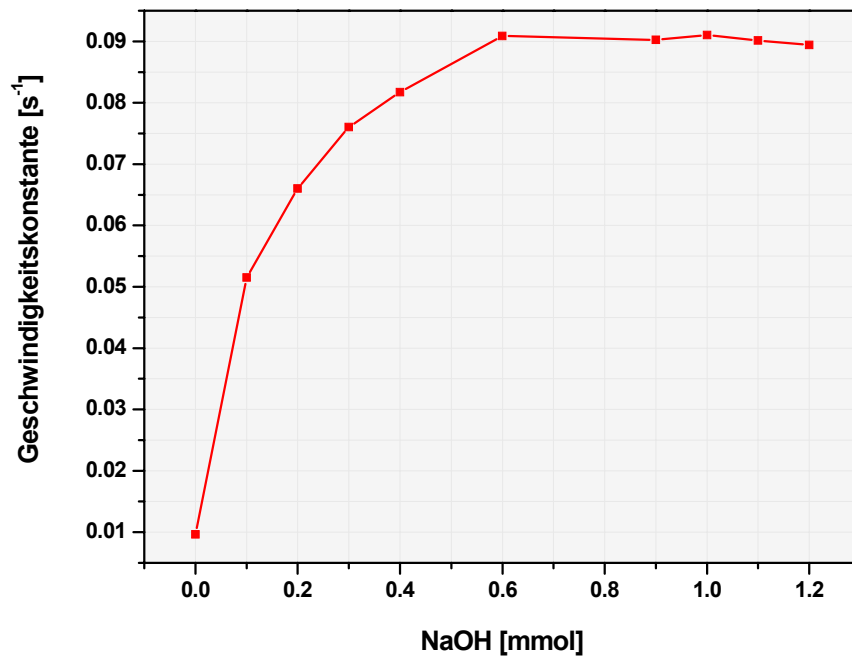
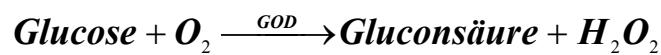


Abbildung 61 Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante von der Natriumhydroxidkonzentration

7 Der faseroptische Glucosesensor

7.1 Theorie

Die Detektion von Glucose spielt in der klinischen Analytik zur Diagnose und Therapie von Diabetes (Meyerhoff et al.), aber auch in der Biotechnologie und Lebensmittelindustrie (Wagner und Guibault) eine wichtige Rolle. Deshalb sind eine Reihe von Verfahren zu deren Detektion entwickelt worden, die alle im Allgemeinen auf folgendes Grundprinzip basieren:



β -Glucosidase (GOD) wirkt als Biokatalysator beim Abbau von Glucose unter Sauerstoffverbrauch und Bildung von Wasserstoffperoxid zu Gluconsäure. Da dieser katalytische Prozeß substratspezifisch verläuft, läßt sich GOD als Biosensor verwenden, um den Glucosegehalt einer Probe zu bestimmen, wenn man mit Hilfe eines sogenannten Transducers den Sauerstoffverbrauch oder die Bildung von Wasserstoffperoxid dieser Reaktion mißt. Es gibt daher zwei Hauptverfahren, Glucose zu analysieren, deren Unterschied in der Auswahl des zu detektierenden Stoffes und folglich des Transducers liegt.

Der erste Glucosesensor wurde von Clark und Lyons 1962 entwickelt [38]. Zahlreiche Fortschritte wurden hinsichtlich der Performance und Langzeitstabilität erzielt. Verschiedene Verfahren zur Immobilisierung der Enzyme auf Transducern wurden entwickelt. Die konventionellen Techniken besteht in der kovalenten Bindung der Enzyme auf der Transduceroberfläche [43]-[45], ihren Einschluß in Polymeren [47][46]-[48], Crosslinking durch Glutardialdehyd etc. [55][55]. Seit 1970 wurden verschiedene anorganische Materialien wie Silica, Aluminiumoxid, Glas, Zeolithe etc. aufgrund ihrer guten mechanischen, thermischen und chemischen Stabilität erfolgreich als Immobilisierungsmatrix eingesetzt [56]-[62].

Basierend auf der Sauerstoffoptode als Transducer werden im Folgenden Glucosesensoren entwickelt. Ziel ist es dabei, die Fähigkeit der Sauerstoffoptode als Transducer für Biosensoren zu untersuchen. Schematisch ist der Glucosesensor wie folgt aufgebaut:

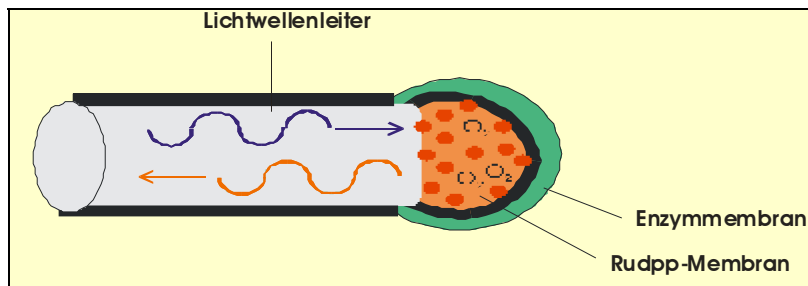


Abbildung 62 Aufbau des Glucosesensors

Der Siliconmembran der Sauerstoffoptode wird eine Enzymmembran überzogen. In Anwesenheit von Glucose wird diese unter Sauerstoffverbrauch abgebaut, der von der Sauerstoffoptode registriert wird. Ein präparatives Problem, das sich dabei ergibt, ist die hohe Trennwirkung des hydrophoben Silicons und die damit verbundene schlechte Haftung der meist hydrophilen Enzymmembran. Da Silicon jedoch für die Sauerstoffoptode hervorragend geeignet ist, wird nicht nach einem Ersatz dafür gesucht, sondern nach Methoden gesucht, die eine gute Haftung auf der Siliconmembran ermöglichen.

Es gibt die Möglichkeit, Enzyme auf Adsorbentien, wie z.B. Aktivkohle, Kieselgel, Zeolithe, etc. zu adsorbieren, welche durch Auftragen auf die feuchte Siliconschicht gut haften. Im Folgenden wird diese Methode untersucht.

7.2 Präparation der Glucosesensoren.

Bei der **Präparation** der Sauerstoffoptode (siehe Kapitel 2.5.4) wird auf die noch feuchte Siliconschutzmembran feinpulverige Adsorbentien aufgetragen und anschließend getrocknet. Nach Trocknung wird die modifizierte Optode mehrmals mit destilliertem Wasser und Ethanol gereinigt und für 24 Stunden in eine Enzymlösung getaucht. Abschließend wird der fertige optische Biosensor mit destilliertem Wasser von nicht immobilisierten Enzymen gereinigt und in Kaliumphosphatpuffer (pH 7) bei 4 °C aufbewahrt.

Diese GOD-Lösung enthält 1.5 Milligramm Glucoseoxidase (*Aspergillus niger* VIIS, Sigma), sechs Mikroliter einer Glutardialdehydlösung (2.5 %) und sechzig Mikroliter Kaliumphosphatpufferlösung (KPP) mit einem pH von 4.6 .

Glutardialdehyd hat dabei die Funktion, die Glucoseoxidasemoleküle untereinander per Crosslinking zu vernetzen und diese auf diese Weise zu stabilisieren.

Als Adsorbentien werden amorphes Kieselgel (Engelhardt, Nienburg), Aktivkohle (Merck, Darmstadt), DAY-Zeolith (Degussa AG) und Ti-Al-Zeolith (Engelhardt, Nienburg) verwendet.

7.3 Messung

Die **Messung** erfolgt durch Eintauchen der optischen Glucosesensoren in gepufferten Glucoselösungen verschiedener Konzentration. Sobald das Optodensignal sich stabilisiert hat, wird die Messung für die jeweilige Konzentration abgebrochen.

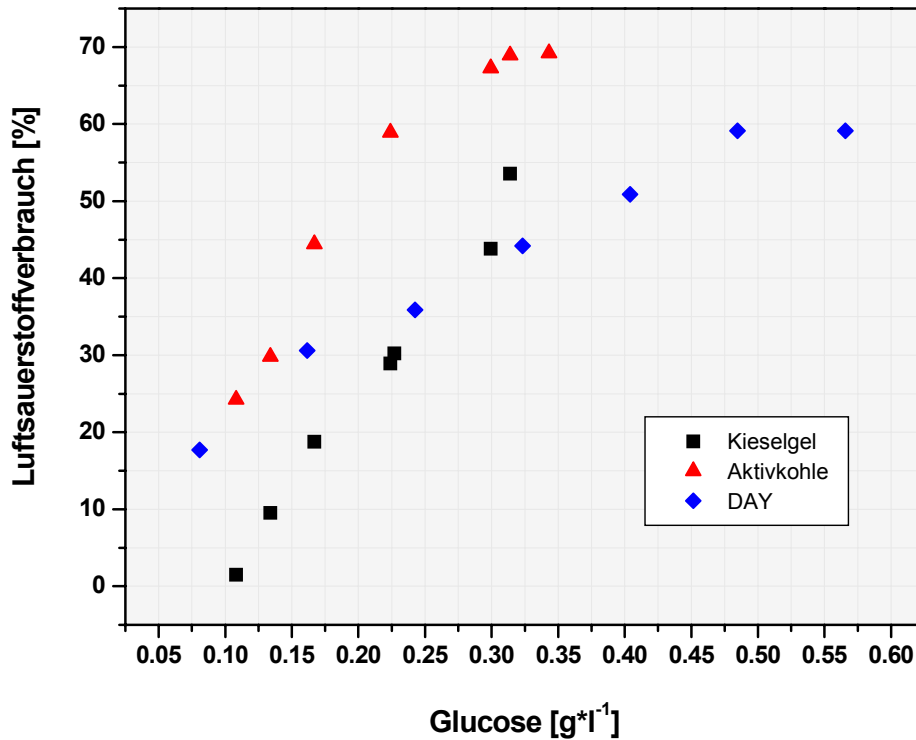


Abbildung 63 Kalibrierkurven der verschiedenen Glucoseoptoden

Der Sensor auf der Basis von Kieselgel hat im Vergleich zu den anderen den kleinsten Meßbereich von maximal 0.35 g·l⁻¹. Die Kurve verläuft zunächst linear, ihre Steigung wird jedoch mit zunehmender Glucosekonzentration immer kleiner. Der Sensor auf der Basis von DAY-Zeolith hat einen größeren linearen Meßbereich von bis etwa 0.5 g·l⁻¹. Die Substratsättigung erfolgt sehr abrupt. Mit Ti-Al-Zeolith als Adsorbens weist der Sensor eine gute Detektion auf. Seine Kalibrierkurve ist über einen großen Konzentrationsbereich linear. Im Folgenden wird daher dieser Glucosesensor genauer untersucht.

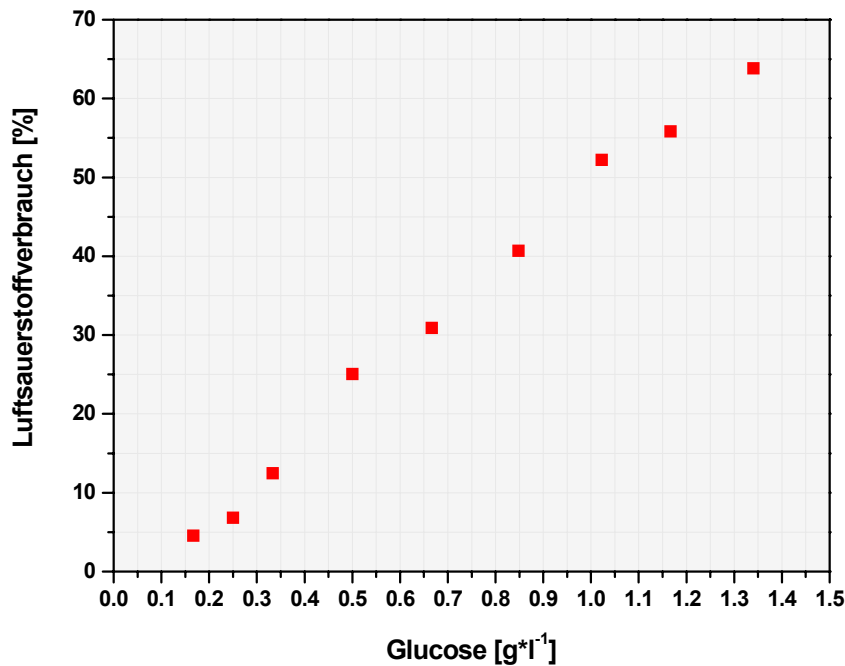


Abbildung 64 Kalibrierkurve des Glucosesensors auf Ti-Al-Zeolith-Basis

7.3.1 Glucosesensor auf Ti-Al-Zeolith-Basis

In unterer Abbildung 65 wird eine typische Kalibriermessung des Glucosesensors dargestellt. Es ist zu erkennen, daß bei geringer Glucosekonzentration und dem damit verbundenen geringen Sauerstoffverbrauch ein vergleichsweise starkes Rauschen des Signals besteht. Dies hängt damit zusammen, daß der optische Sauerstoffsensor bei hohen Sauerstoffkonzentrationen weniger empfindlich ist. Mit zunehmender Glucosekonzentration wird mehr Sauerstoff umgesetzt und dieses Rauschen nimmt ab. Die peakartigen Signale, die absichtlich herbeigeführt sind, dienen der eindeutigen Unterscheidung der Signale unterschiedlicher Konzentrationen. Die Antwortzeit des Glucosesensors beträgt etwa eine Minute.

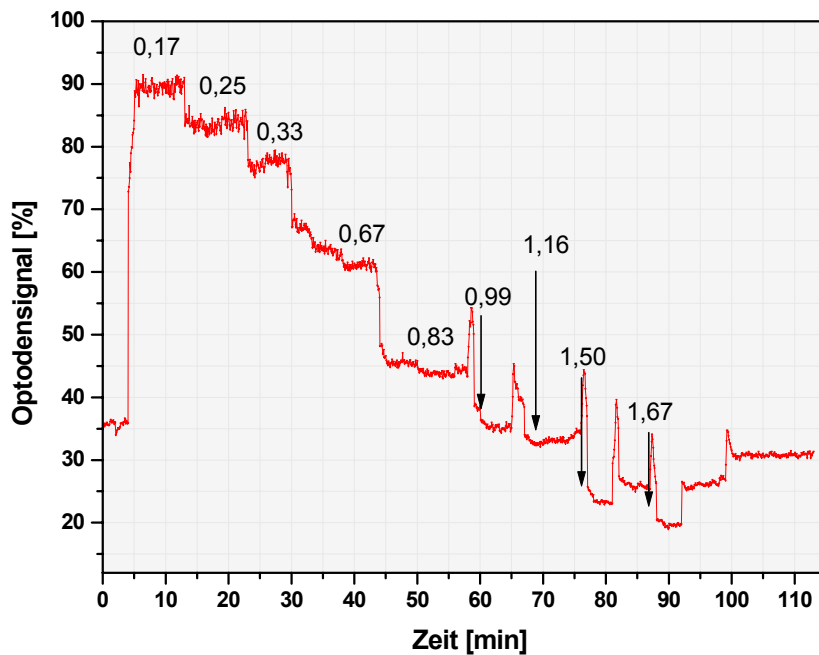


Abbildung 65 Meßkurve des Glucosesensors auf Ti-Al-Zeolith-Basis bei verschiedenen Glucosekonzentrationen

Die **Reproduzierbarkeit** der Messungen ist ein wichtiger Aspekt für einen zuverlässigen Sensor. Die Untersuchung der Reproduzierbarkeit erfolgt dadurch, daß mehrere Messungen in derselben Standardlösung vorgenommen werden. Durch Vergleich der einzelnen Messung kann man auf die Stabilität der Meßwerte schließen.

Wie aus Abbildung 66 ersichtlich ist, weist die Glucoseoptode eine sehr gute Reproduzierbarkeit auf. Die Abweichung beträgt maximal unter ein Prozent.

Die Stabilität eines Signals hängt u.a. auch vom Zustand des Meßmediums ab. Sind Konvektionsvorgänge vorhanden, so können sie störend auf die Signale wirken. Dies hängt damit zusammen, daß die Enzyme im konvektionsfreien Medium durch den Abbau von Glucose unter Sauerstoffverbrauch einen Sauerstoffgradienten um die Optode aufbauen, wobei die Enzymschicht die Senke in diesem Gradientenfeld bildet. Im stationären Zustand wird soviel Sauerstoff von den Enzymen verbraucht wie durch Diffusionsprozesse herantransportiert wird. Treten in diesem labilen Zustand Konvektionsvorgänge auf, die zusätzlich Sauerstoff zur Optode führen, detektiert die Sauerstoffoptode diesen Sauerstoffzusatz. Die Folge ist eine Verfälschung des Meßwertes.

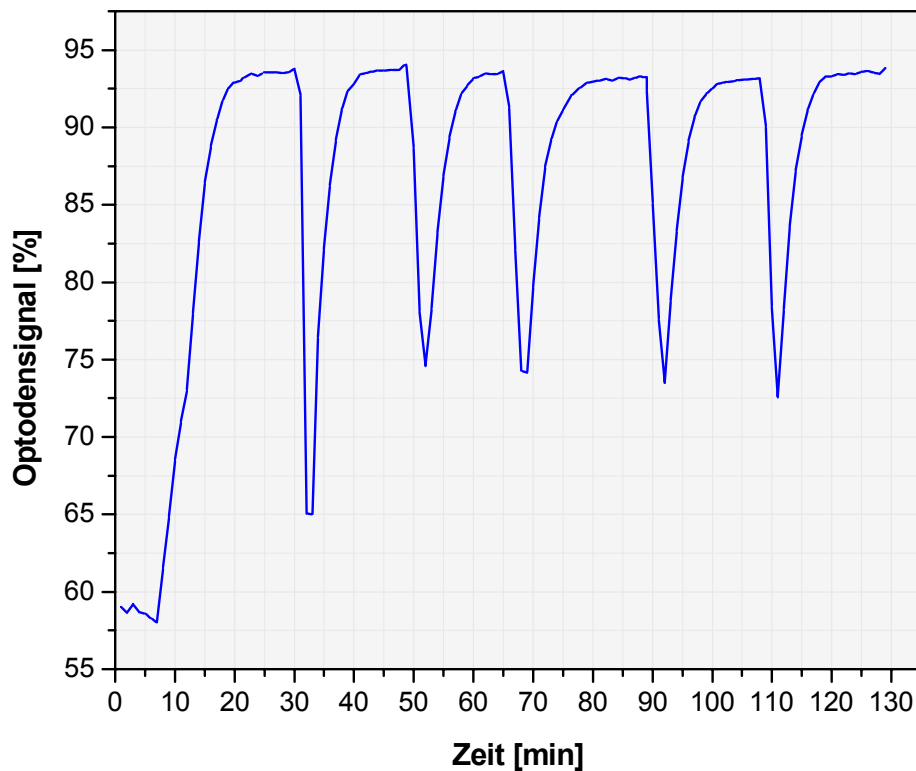


Abbildung 66 **Reproduzierbarkeit der Glucoseoptode**
Glucosestandardlösung: $0.17 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ in 0.04 molarer KPP-Lösung

Die Abhängigkeit des Enzymoptodensignals von Konvektionsvorgängen wird im Folgenden untersucht. Dabei wird die Glucosemessung in einer Standardlösung durch Variation der Rührergeschwindigkeit durchgeführt.

Abbildung 67 zeigt eine typische Meßkurve verschiedene Rührergeschwindigkeit [min^{-1}]. Es ist zu erkennen, daß das Optodensignal mit der Rührergeschwindigkeit ansteigt. Bei konstanter Rührergeschwindigkeit stabilisiert sich das Signal.

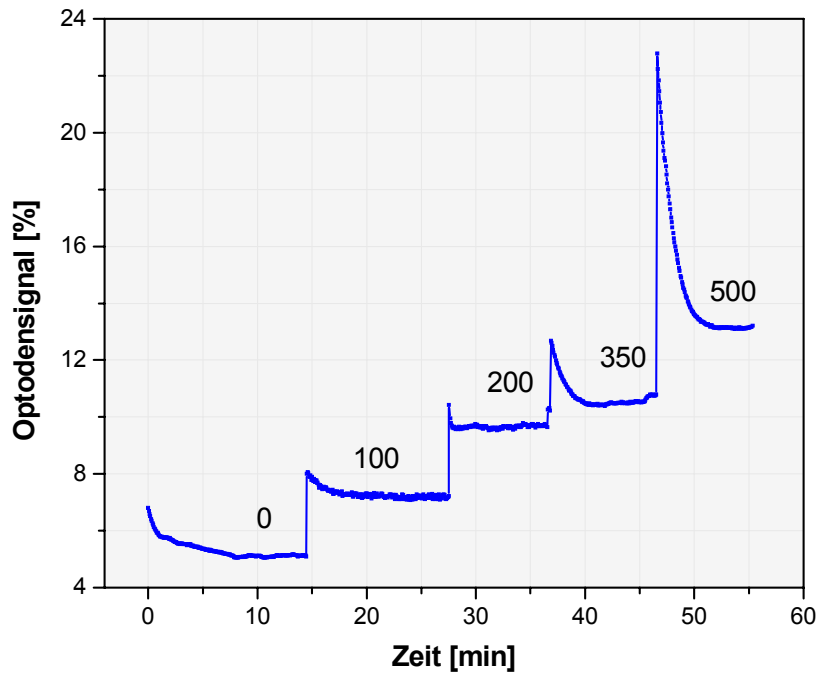


Abbildung 67 Abhängigkeit des Meßsignals der Glucoseoptode
von der Rührgeschwindigkeit, Glucosestandard: 0.036 g·l⁻¹

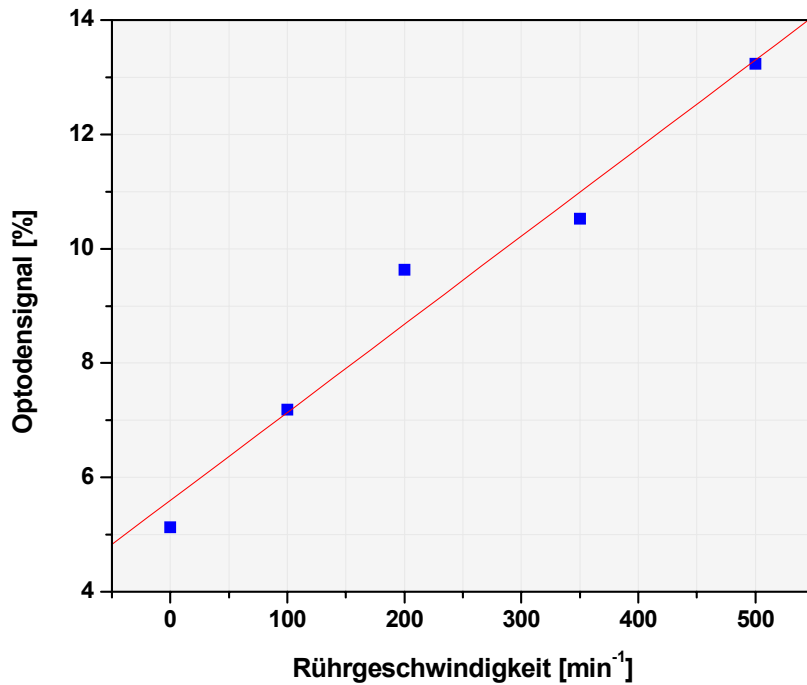


Abbildung 68 Abhängigkeit des Meßsignals der Glucoseoptode
von der Rührgeschwindigkeit, Glucosestandard: 0.036 g·l⁻¹

Es besteht eine lineare Abhängigkeit des Optodensignals von der Rührgeschwindigkeit. Die lineare Regressionsanalyse ergibt eine Steigung von 0.0154 min.

Das Experiment zeigt, daß bei der Messung konstante Strömungsverhältnisse aufrechterhalten werden müssen, da die Signale sonst nur einen sehr geringen Aussagewert besitzen.

Der Glucosesensor zeigt auch eine **pH-Abhängigkeit**. Dies ist damit zu erklären, daß Enzyme bei unterschiedlichen pH-Werten verschiedene Aktivitäten aufweisen. In vielen Untersuchungen hat sich gezeigt, daß immobilisierte Enzyme eine andere pH-Abhängigkeit besitzen als native Enzyme. Für den DAY-Zeolith wurde z.B. eine viel geringere Abhängigkeit festgestellt, als es beim nativen der Fall ist [22].

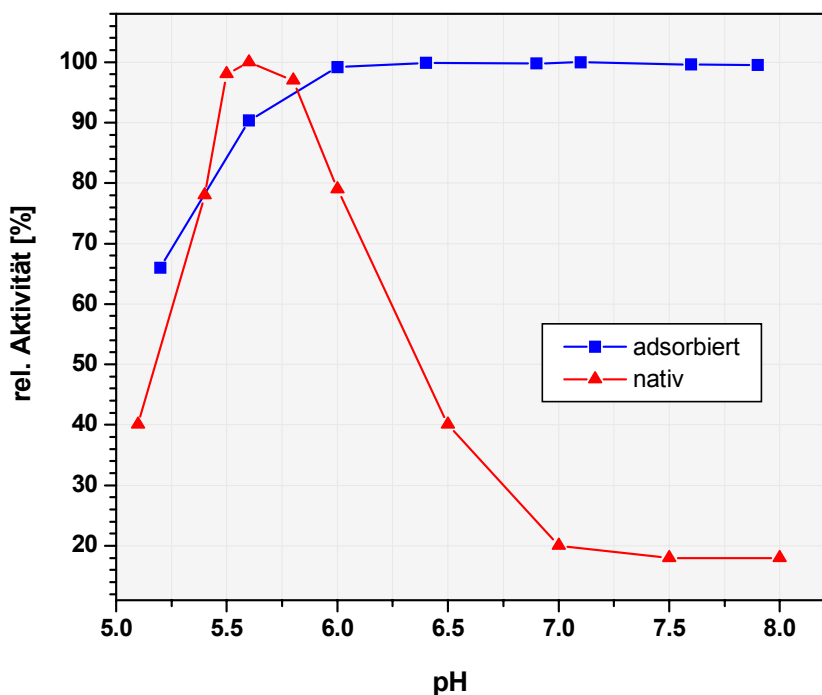


Abbildung 69

pH-Abhängigkeit des optischen Glucosesensors

0.35 g⁻¹ Glucosestandardlösung in 0.1 molarer KPP-Lösung

Wie in Abbildung 69 zu sehen ist, weisen die immobilisierten GOD ein weniger pH-empfindliches Verhalten auf. Es existiert ein breiter Bereich mit höchster Aktivität zwischen pH 6 und 8. Der Aktivitätsverlust nimmt im Vergleich zum nativen Enzym im unteren pH-Bereich nur langsam ab. Für dieses Verhalten sind keine eindeutigen Ursachen erkennbar. Möglicherweise hat der Zeolith eine puffernde Wirkung. Vorstellbar ist auch, daß die Immobilisierung auf dem Zeolith das Enzym stabilisiert.

Ein wichtiges Kriterium für einen guten Biosensor ist die **Langzeitstabilität**

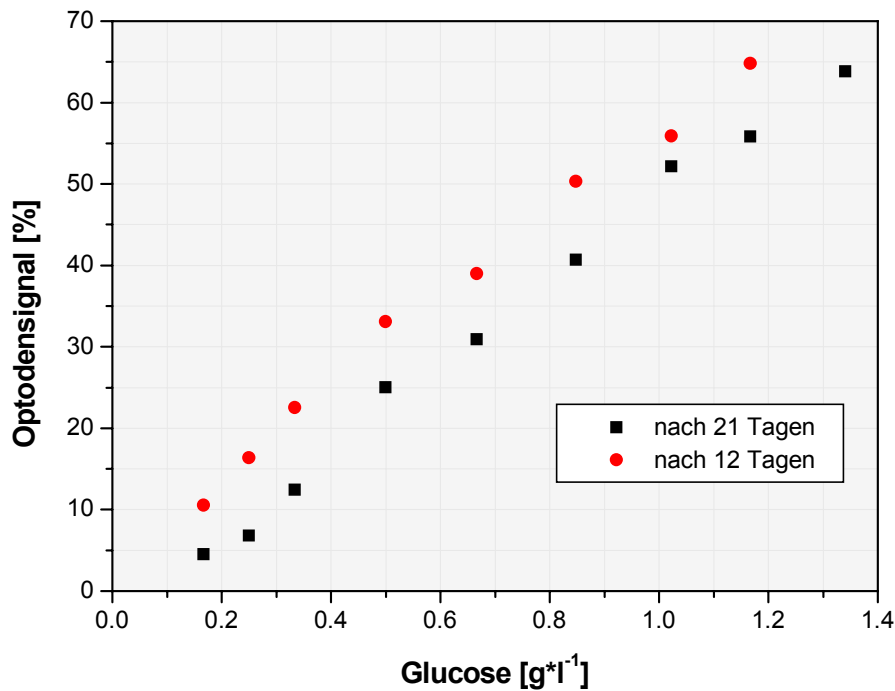


Abbildung 70 Langzeitstabilität des Glucosesensors auf Ti-Al-Zeolith-Basis

Abbildung 70 gibt die Langzeitstabilität des vorliegenden optischen Glucosesensors wieder. Die Messungen wurden nach vierzehn und nach einundzwanzig Tagen unter gleichen Bedingungen vorgenommen (Temperatur=23°C, Glucosestandardlösung mit 0.04 molare KPP-Lösung gepuffert). Die Meßwerte für die Messung 1 (14 Tage nach Präparation des Sensors) liegen etwa fünf Prozent unter denen der Messung 2 (nach 21 Tagen). Der Kurvenverlauf ist jedoch in beiden Fällen praktisch identisch. Beide Kurven sind bis zu einer Konzentration von etwa 1.2 g linear. Der Unterschied in der Steigung zwischen den beide Kurven sind zu vernachlässigen (Steigung=52.61 für Messung 1; Steigung=52.15 $\text{l}\cdot\text{g}^{-1}$ für Messung 2).

8 Der faseroptische auf GFP basierende Toxin-Sensor

8.1 Theorie

Grün-fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein, GFP) wurde erstmals 1962 in der Qualle *Aequorea victoria* gefunden. Angeregt mit ultraviolettem oder blauem Licht emittiert GFP grüne Fluoreszenz. Dies wurde ausgenutzt, um GFP als Sonde für die Proteinanalytik in verschiedenen Organismen einzusetzen. Genexpression und auch die Lokalisierung einzelner Proteine in lebenden Zellen wurde auf diese Weise mit GFP als fluoreszierendes Markerprotein, das für die Zellen nicht toxisch ist, durchgeführt [6]. Die Produktion von Proteinen spielt in der Biotechnologie eine entscheidende Rolle. Der Einsatz von GFP ermöglicht eine nicht invasive Online-Detektion. So erfordern beispielsweise Scale-Up-Prozesse eine schnelle Produktanalytik, die mit Hilfe von GFP ermöglicht werden soll. GFP-Expression wurde bereits in unterschiedlichsten Organismen (Bakterien, Hefen, filamentöse Pilze, Pflanzenzellen, Insektenzellen und Tierzellen) untersucht [SIEDENBERG et al., 1999]. Selbst die Produktion von Viren lässt sich mit Hilfe von GFP beobachten [8]. Nicht nur zur Bioprocessbeobachtung [31], sondern auch im Verlauf von Aufreinigungsprozessen hat sich der Einsatz von GFP bewährt [30]. Auch für die Zellbiologie und Biomedizin eröffnet GFP vielfältige Möglichkeiten durch den Einsatz von intakten, lebenden Zellen und Organismen als experimentelle Systeme für biologische Screens [26].

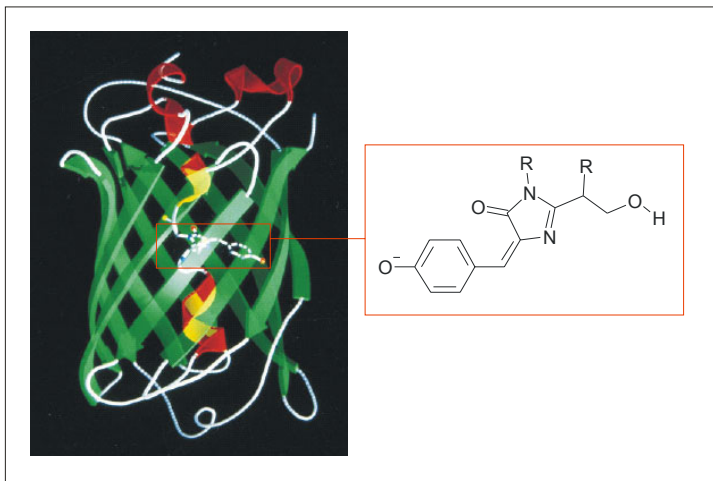


Abbildung 71 Räumliche Struktur des GFP, rechts: Molekülstruktur des chromophoren Zentrums

GFP ist ein relativ kleines Protein (27 kDa), das aus 238 Aminosäuren besteht. Wie in vitro Untersuchung ergab, ist es sehr stabil und lässt sich nicht durch Protease zersetzen. Die chromophore Gruppe, die für die Fluoreszenz verantwortlich ist, wird aus drei benachbarten Aminosäuren (Ser 65 - Tyr 66 – Gly 67) durch Zyklisierung und Oxidation mit atmosphärischem Sauerstoff gebildet. Ein Mechanismus für die Bildung des Chromophors wurde von CUBITT et al. vorgeschlagen [10]. Eine Abhängigkeit der Chromophorbildung von Cofaktoren ist nicht bekannt. Durch N- oder C-terminale Fusion mit dem markierten Protein werden die Fluoreszenzeigenschaften nicht verändert [23]. Verschiedene Mutationsvarianten von GFP mit unterschiedlicher Fluoreszenz sind hergestellt worden, die prinzipiell eine Markierung verschiedener Proteine in einem Organismus ermöglichen.

Die Verwendung des GFP als aktiver Indikator in Biosensorsystemen beruht prinzipiell darauf, GFP in ein System (z.B. induzierbare Promoter, Proteine u.ä.) einzugliedern, das bei Kontakt mit der zu untersuchenden Substanz, wie z.B. Genotoxin, eine messbare Änderung der GFP-Fluoreszenz hervorruft. Dabei spielt das GFP-Gen als Reporter gen. GFP übernimmt dabei die Funktion des Transducers. Knight et al. [19] berichteten von einem GFP-Sensor zu Genotoxizität-Monitoring, wobei zur Exzitation ein blauer LASER verwendet wird. Zur Trennung des polarisierten GFP-Fluoreszenzlichtes von der zellulären Autofluoreszenz kommen dabei Polarisationsfilter zum Einsatz. Eine andere Studie beschreibt die Entwicklung eines Online-GFP-Sensors zur Verfolgung von Fermentationprozessen unter Verwendung von einer blauen LED als Anregungslichtquelle.

In diesem Kapitel wird die Messung eines Genotoxins mit Hilfe eines selbst entwickelten faseroptischen Genotoxinsensorsystems beschrieben, dessen Messprinzip auf der Fluoreszenzmessung von GFP basiert, das vom rekombinanten *E.coli* UTL2 produziert wird. Neben der Messung mit dem faseroptischen Toxinsensor wird zur Referenz Messung mit einem 2D-Fluoreszenzspektrometer (Hitachi 4500) durchgeführt. Nalidixinsäure wird dabei als Genotoxin verwendet.

8.2 Das Rekombinante *E.coli* UTL2

Dieser *E.coli*-Stamm besitzt ein durch Toxin induzierbare *recA*-Promoter- und das GFP-Gen. Das *recA*-Protein vom *E.coli* ist bei der SOS-Gen-Induktion und DNA-Reparatur involviert. Bei intakter DNS ist der Repressor *lexA* am Operator gebunden, so dass die GFP-Expression inhibiert ist. Wird die DNS dagegen beschädigt, wird der Reparaturprozess durch Lösen des DNS-Doppelstranges in die Einzelstränge initiiert. Der Promoter *recA* bindet sich mit dem DNS-Einzelstrang und mit dem Repressor *lexA* zu einem Multiproteinkomplex. Diese Bindung mit *lexA* aktiviert die latente Proteaseaktivität, wobei *recA* als Koprotease fungiert. Dies führt letztendlich zur Abbau des *lexA*. Auf diese Weise werden die Repression des DNS-Reparaturgens und somit auch das damit gekoppelte GFP-Gen aufgehoben. Diese Gene werden exprimiert, GFP wird produziert, das sich durch seine Fluoreszenz bemerkbar macht.

Das ursprüngliche Plasmid (Abbildung 73) dieses Stammes ist das pGFPuv von der Firma Clontech Laboratories (Katalog #6079-1). Dieses Plasmid trägt die Erbinformation für die „cycle 3“-Variante des GFP, wie sie von Cramer et al. [9] beschrieben ist. Ursprünglich enthält das Plasmid an der Position 95-178 einen *lac*-Promoter, der mit Hilfe von Restriktionsenzyme Pvu II (57) und Hind III (236) entfernt wird. Ein *recA*-Promotor, der aus der DNS vom *E.coli* RFM 443 isoliert ist, wird an der Position 251-258 eingefügt. Das so modifizierte Plasmid (Abbildung 73) wird in das Wirtbakterium *E.coli* UTL2 [3] eingeführt.

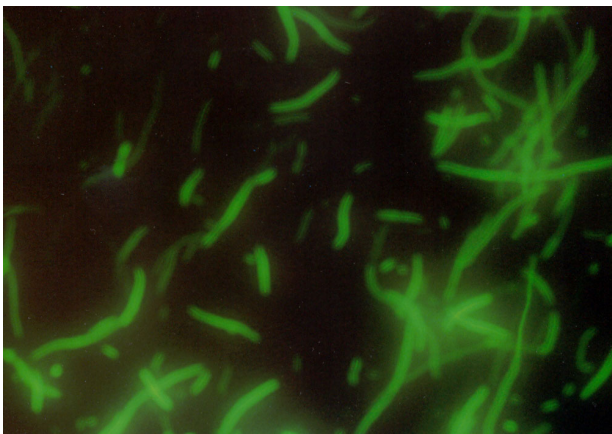


Abbildung 72 Photographische Aufnahme des UTL2-Stammes unter dem Fluoreszenzmikroskop, Exzitationwellenlänge 480nm.

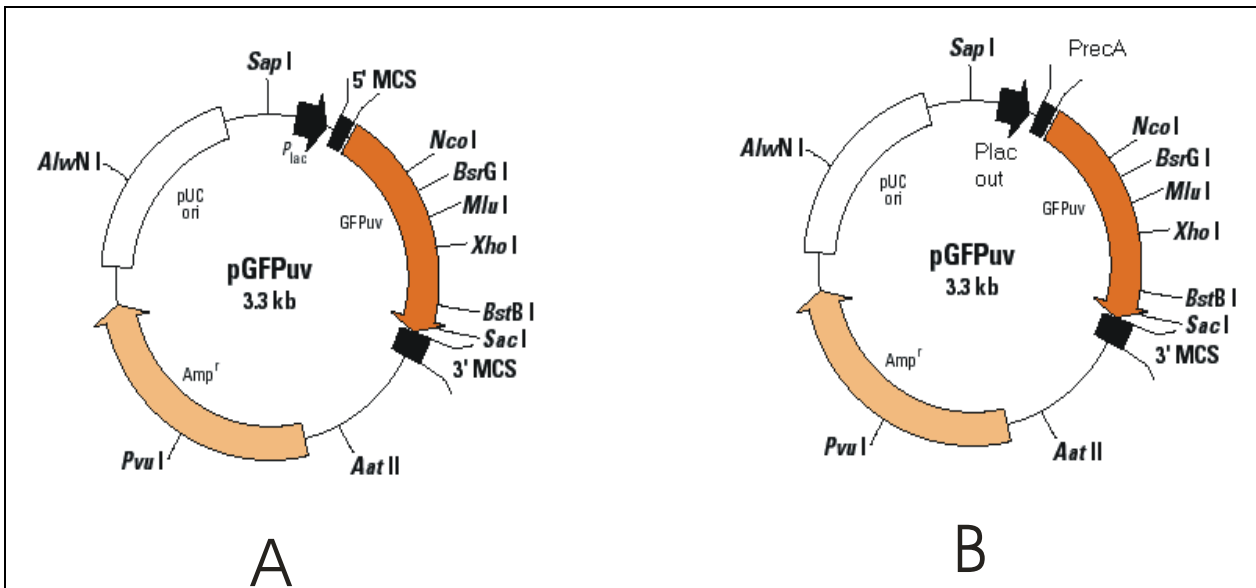


Abbildung 73 (A) ursprüngliche pGFPuv (Clontech); (B) modifizierte pGFPuv (University Hebron)

8.3 Fluoreszenz-Spektrophotometer F-4500 als Basiseinheit

Das in dieser Arbeit eingesetzte Prozessspektralfluorometer besteht aus einem kommerziell erhältlichen Fluoreszenz-Spektralphotometer (F-4500, Fa. Hitachi) als Basiseinheit, das für den Einsatz zur Online-Messung von 2D-Fluoreszenzspektren umgerüstet wurde [LINDEMANN, 1995; HILMER, 1995]. Als Spektrometer werden zur Wellenlängenbestimmung verwendete Geräte mit geeichter Skala bezeichnet. In Spektralphotometern (Spektrophotometern) wird ein Monochromator mit photoelektrischen Detektoren kombiniert [Schmidt]. Die Bezeichnung „Prozessspektralfluorometer“ (Prozessfluorometer) weist auf den Einsatz von Fluoreszenzmessungen am Bioprozess hin. Der Aufbau des Fluoreszenz-Spektrophotometer F-4500 ist im Diagramm (Abb. III.5.1) dargestellt. Als Lichtquelle dient eine 150 Watt Xenonlampe (Fa. Ushio, Japan), die ein nahezu kontinuierliches Spektrum liefert. Im Exzitationsmonochromator wird die Wellenlänge (durch ein Gitter) und die Bandbreite („slit“) eingestellt. Der Strahlteiler lenkt einen Teil des Anregungslichtes auf einen Referenzphotomultiplier, der die Möglichkeit bietet, Intensitätsschwankungen an der Lichtquelle zu kompensieren. Ein Verschluss („shutter“) sorgt dafür, dass die Probe nicht ständig angeregt wird, sondern lediglich während der Messungen. Das Fluoreszenzlicht passiert den Emissionsmonochromator, der nur die gewünschte Bandbreite und Wellenlänge des Lichtstrahls durchlässt. Die Monochromatoren lassen sich über die Steuereinheit unabhängig voneinander steuern. Ein Computer (PC 486 DX/2) dient zur Konfiguration des Gerätes, Datenaufnahme und -sicherung. Dies erfolgt unabhängig von der übrigen der von der übrigen Aufnahme der Kultivierungsdaten.

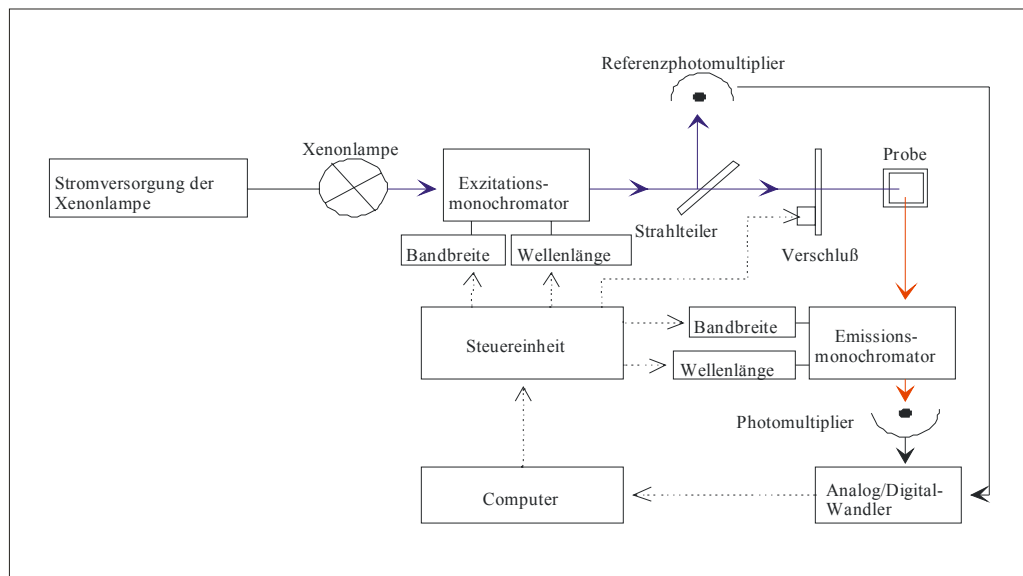


Abbildung 74 Blockdiagramm des Fluoreszenz-Spektrophotometers F-4500

8.4 Aufbau des faseroptischen GFP-Sensorsystems

Der hier beschriebene faseroptische Genotoxinsensor basiert auf den oben beschriebenen faseroptischen 4-Kanal-Sauerstoffsensoren. Da bei diesem Sauerstoffsensoren alle vier optischen Kanäle speziell für den Fluorophor Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Ruthenium ausgelegt sind und nur Licht ab einer Wellenlänge von 570nm durchlassen, wird durch den Einsatz eines anderen optischen Langpassfilters die Detektion von Licht ab einer Wellenlänge von 510nm ermöglicht. Der klassische optische Aufbau mit dem dichroitischen Spiegel als primärer Separator von Exzitations- und Emissionslicht werden nur für zwei der vier Kanäle beibehalten, die weiterhin zur Sauerstoffmessung verwendet werden.

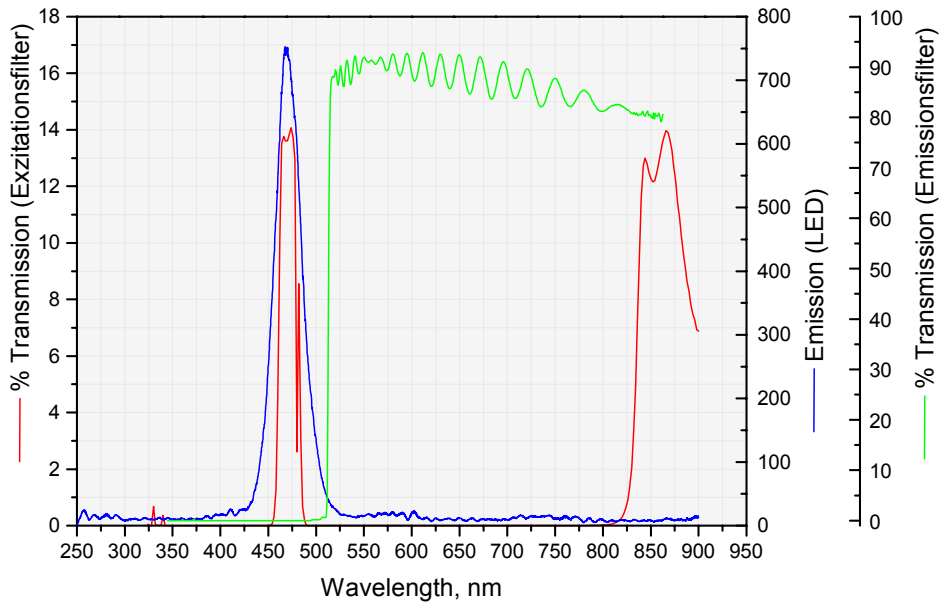


Abbildung 75 Spektrale Eigenschaften der optischen Komponenten des ersten Kanals für die GFP-Messung mit einer blauen LED als Exzitationslichtquelle

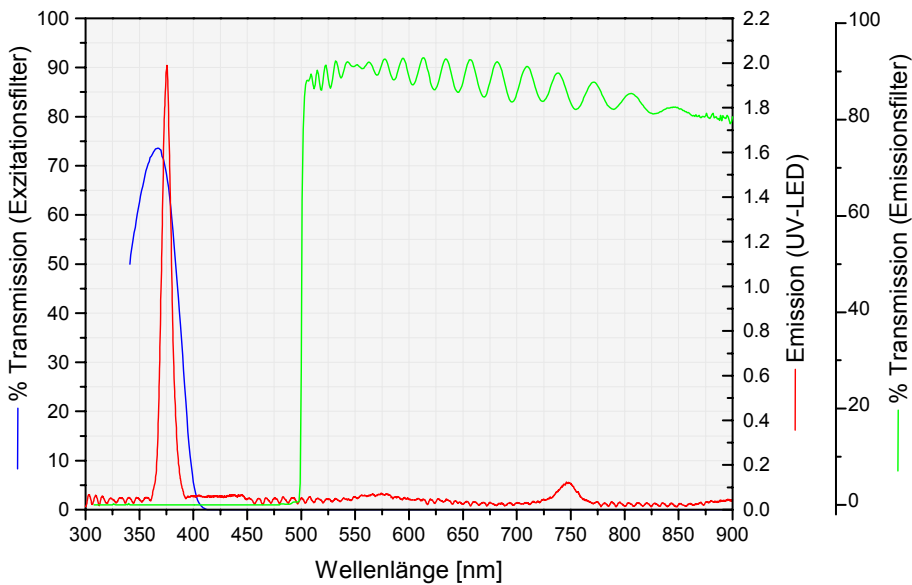


Abbildung 76 Spektrale Eigenschaften der optischen Komponenten des zweiten Kanals für die GFP-Messung mit einer UV-LED als Exzitationslichtquelle

Parameter	Exzitationsquelle	Exzitationsfilter
GFP-blue	Blaue LED LNG992CFB (Panasonic, Japan)	480 nm Bandpass (Delta Light and Optics, Denmark)
GFP-UV	UV-LED NSHU590E (Nichia, Japan)	365 nm Bandpass XF1005 (Edmund Scientific, Germany)

Tabelle 14 Optische Komponente des GFP-Sensors

Für die GFP-Messung, bei sehr niedrigen Fluoreszenzkonzentration hat es sich bei verschiedenen Untersuchungen ergeben, dass zu viel Exzitationslicht, das theoretisch durch den dichroitischen Spiegel hätte reflektiert werden müssen, trotzdem zum PMT gelangen. Für die Sauerstoffmessung mit Hilfe von Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Ruthenium stellt dieser Anteil einen vernachlässigbaren Betrag dar, da die Fluoreszenzintensität dieses Fluorophors relativ hoch ist. Bei der Messung von zellulärem GFP in Zellsuspensionen niedriger Dichte hat dieser Betrag dagegen einen stark verfälschenden Effekt auf das Messresultat. Daher wird für den optischen Kanal zur GFP-Messung der Strahlengang des Emissionslichtes vollständig von dem des Exzitationslichtes getrennt. Zur Separation wird die LED völlig getrennt vom PMT in einem eigenen Gehäuse untergebracht. Im ersten Kanal dient eine blaue LED als Exzitationslichtquelle, während im zweiten Kanal eine UV-LED die Lichtquelle ist. Die Leitung des Lichtes zur Zellsuspension erfolgt über ein Faserbündel aus Einzelfaser mit einem Durchmesser von 50µm. Das Bündel wird an einem Ende durch einen SMA-Stecker terminiert. Der SMA-Stecker wird über eine SMA-Buchse, die am LED-Metallgehäuse installiert ist, angeschlossen. Am anderen Ende wird das Faserbündel mit einem weiteren Faserbündel, das das Emissionslicht zum PMT zurückführt, zu einem doppelsträngigen V-förmigen Faserbündel verbunden. Der Abschluss dieses Endes wird durch einen Messingstecker mit Außengewinde bewerkstelligt. Mit Hilfe des Außengewindes wird das Faserbündel fest mit dem Deckel der Messzelle verschraubt.

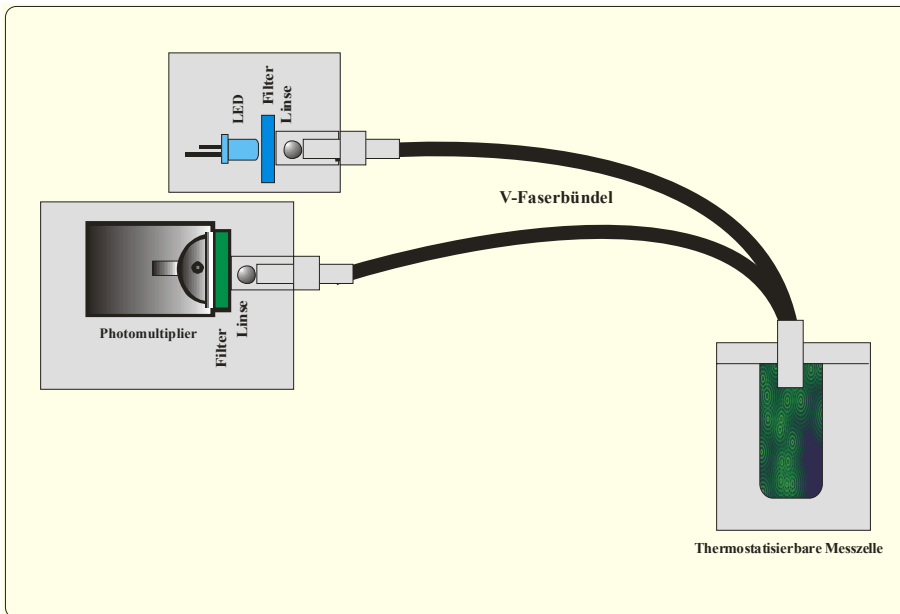


Abbildung 77 Optischer Aufbau des GFP-Sensors

Die **Messzelle** besteht aus einem zylindrischen Aluminiumblock mit einem Einlasskammer. Dieser Kammer ist so dimensioniert, dass ein Reaktionsgefäß mit einem Volumen von zwei Milliliter genau einpasst. Der Deckel enthält in der Mitte eine Öffnung mit einem Schraubgewinde, so dass das Faserbündel bei einer Messung fest justiert werden kann. Die Messzelle ruht auf einem Peltierelement, mit dessen Hilfe die Messzelle thermostatisiert wird. Zur thermischen Isolation ist die Messzelle in einem Kunststoffgehäuse untergebracht, das mit Isolationsmaterial ausgefüllt ist. Die gewünschte Temperatur lässt sich über eine Kontrolleinheit einstellen.

8.5 Kultivierung

Die *E.coli*-Kulturen für die Messung werden im Allgemeinen in zwei Schritten vorbereitet. Zunächst wird die Vorkultur angesetzt. Das Heranzüchten der Bakterien in der Vorkultur dauert acht Stunden, als Nährmedium wird LB-Medium verwendet, welches das Natriumsalz von Ampicillin (Sigma) in einer Konzentration von 100mg/l enthält. Die Bakterien werden nach der Zellernte in 25 ml LB-Medium zugegeben und gründlich gerührt. Die so erhaltene Kultur wird in 2ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Nalidixinsäure wird in verschiedenen Konzentrationen zu diesen Minikulturen hinzugefügt. Diese Kulturen werden dann bei 32°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 1400 rpm für fünf Stunden wieder aufgezüchtet.

8.6 Messverfahren

Die Bakterien werden nach einer fünfstündigen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet. Sie werden mehrmals mit einer 0.9% Natriumchloridlösung gewaschen und anschließend in einer Natriumchloridlösung gleicher Konzentration resuspendiert. Zur Ermittlung der Zelldichte wird mit Hilfe eines Photometers (Uvikon 940) die optische Dichte gemessen. Sie dient bei der späteren Berechnung als Normierungsfaktor, um den Einflussfaktor der unterschiedlichen Zelldichte auf die Fluoreszenzintensität zu eliminieren.

Für die Messung im 2D-Spektrometer wird die vorbereitete Zellsuspension in einer Quarzküvette gegeben, für die Messung mit dem faseroptischen Sensorsystem wird sie in einer 2ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf) eingefüllt und in die thermostatisierte Messzelle platziert.

8.7 Resultat

Messung mit dem Spektrometer zeigt, dass die GFP-Peaks im Bereich von 490-510nm liegen. Die dazu korrespondierenden Exzitationspeaks liegen im UV-Bereich ($\lambda_{\max}=395\text{nm}$) und blauen Bereich ($\lambda_{\max}=480\text{nm}$). Die Intensität des durch UV-Licht hervorgerufenen Fluoreszenzpeaks ist etwa dreimal so hoch wie die durch blaues Licht angeregte Fluoreszenz.

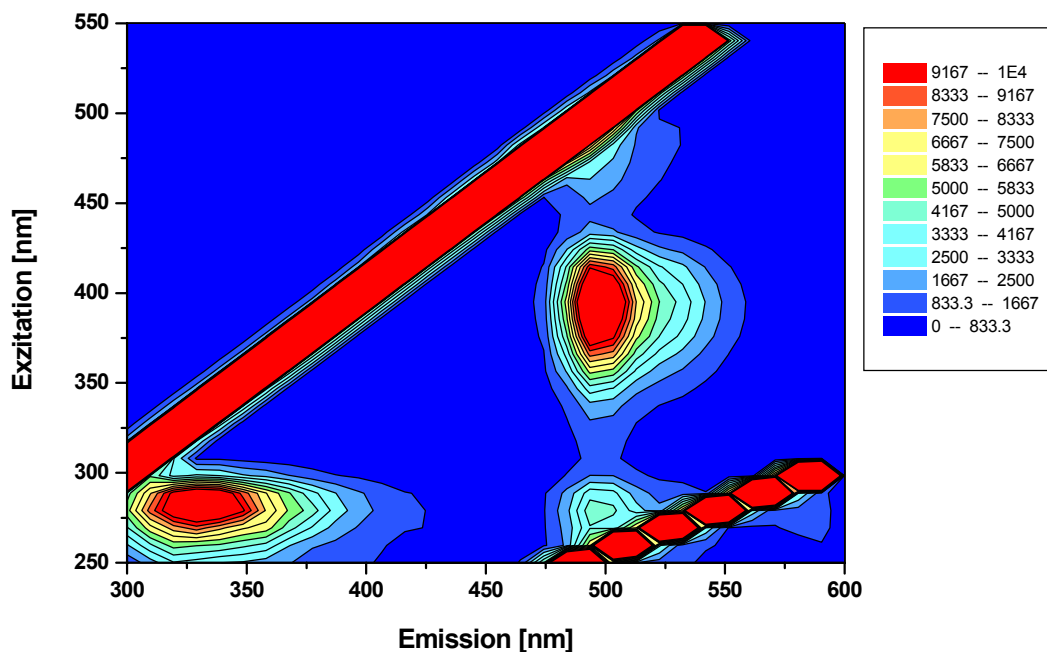


Abbildung 78- 2D-Fluoreszenzspektrum des in *E.coli* UTL2 exprimierten GFPuv

Zur Erstellung der Kalibrationskurve werden Messungen bei verschiedenen Nalidixinsäurekonzentrationen vorgenommen. Es zeigt sich, dass eine Abhängigkeit zwischen der GFP-Fluoreszenzintensität und der Nalidixinsäurekonzentration besteht. Zwischen 0.03ppm und 0.3 ppm ist eine gute Linearität für den Peak $\lambda_{\text{ex}}390\text{nm}/\lambda_{\text{em}}510\text{nm}$ zu beobachten. Die Steigung der Kurve beträgt $6.67 \cdot 10^4 \text{ ppm}^{-1}$. Die Auflösung beträgt 0.001ppm Nalidixinsäure. Für den Peak 480/510 ist die Linearität im Bereich 0.05 bis 0.3ppm Nalidixinsäure. Die Kalibrationskurve hat eine Steigerung von $1.23 \cdot 10^5 \text{ ppm}$, während die Auflösung 0.004ppm ist.

Das Signal ist gut reproduzierbar, was sich durch die niedrige Abweichung von 10% bei allen Messpunkten.

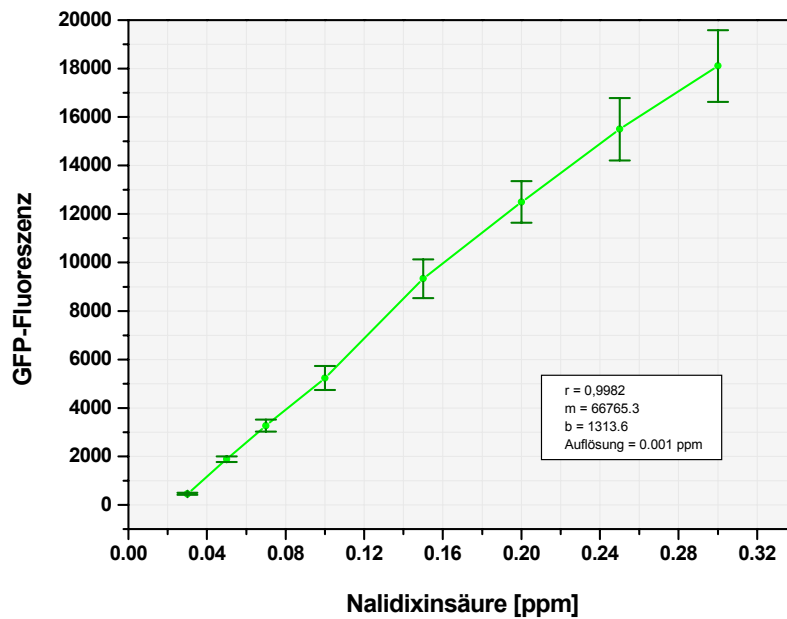


Abbildung 79 Kalibrationskurve des auf dem 2D-Spektrometer basierendem Toxin-Biosensor
(GFP peak: λ_{ex} at 390 nm λ_{em} 510 nm)

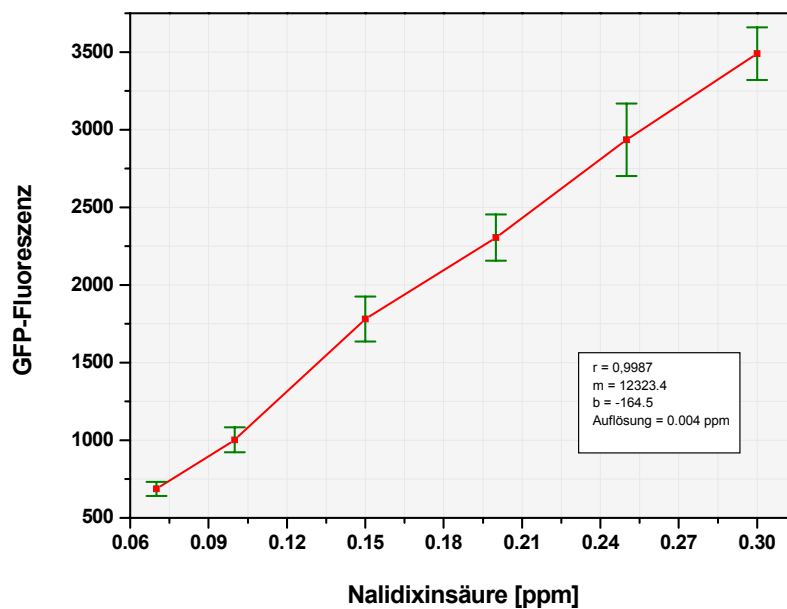


Abbildung 80 Kalibrationskurve des auf dem 2D-Spektrometer basierten Toxin-Biosensor; (GFP peak: λ_{ex} 480 nm λ_{em} 510 nm)

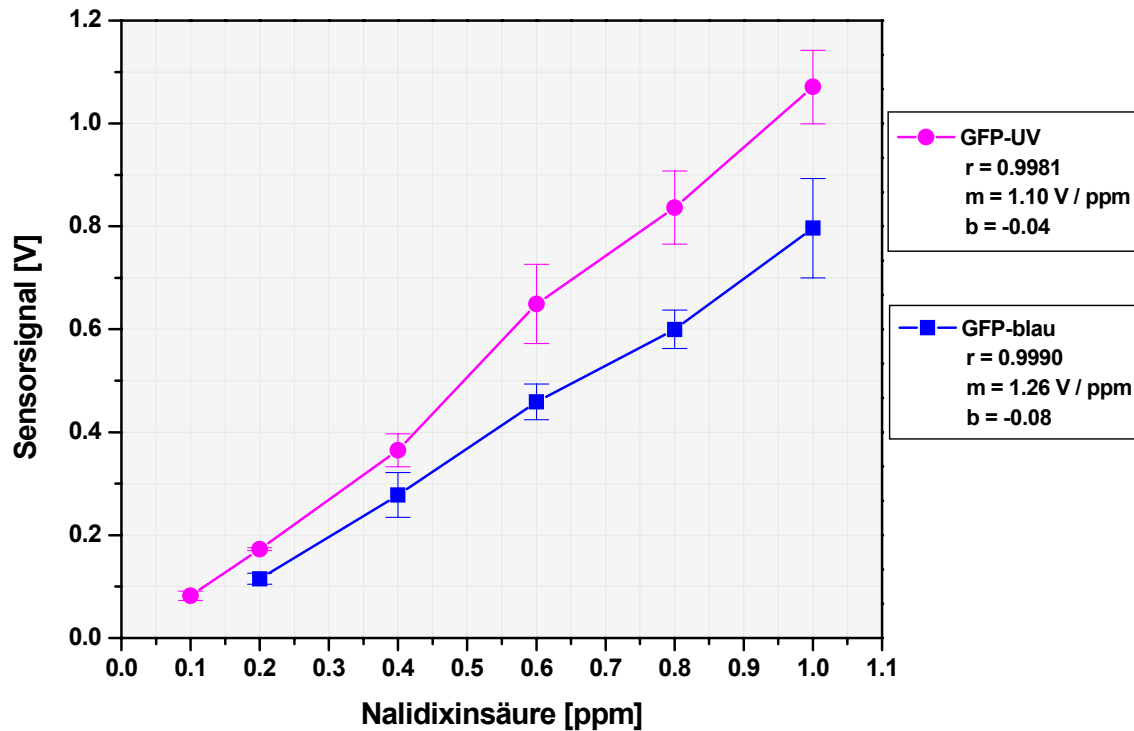


Abbildung 81 Kalibrationskurve des faseroptischen GFP-Sensors

Der faseroptische GFP-Biosensor ist weniger sensitiv als der Fluoreszenzspektrometer. Der lineare Detektionsbereich liegt zwischen 0.2 und 1.0 ppm Nalidixinsäure bei Verwendung der blauen LED als Exzitationslichtquelle bzw. 0.1 und 1.0 ppm beim Einsatz des UV-LED. Die Auflösung ist im unteren Bereich der Kalibrationskurve am größten, verschlechtert sich aber mit zunehmender Nalidixinsäurekonzentration. Sie beträgt minimal 0.1 ppm Nalidixinsäure (blaue LED) bzw. 0.07 ppm (UV-LED).

Offline- und Online-Messungen während einer Kultivierung zeigen gute Übereinstimmung zwischen den Kurven, die mit Hilfe des 2D-Fluoreszenzspektrometer und des faseroptischen GFP-Sensors aufgenommen sind. Bei dieser Kultivierung ist Nalidixinsäure nur einmal gleich zu Beginn hinzugegeben, Temperatur und pH werden konstant auf 32°C bzw. 7 gehalten. Die Kurven haben einen sigmoidalen Verlauf. Die Fluoreszenzveränderung ist in diesem Fall auf das Wachstum der Kultur zurückzuführen, was eine Erhöhung der GFP-Konzentration zu Folge hat.

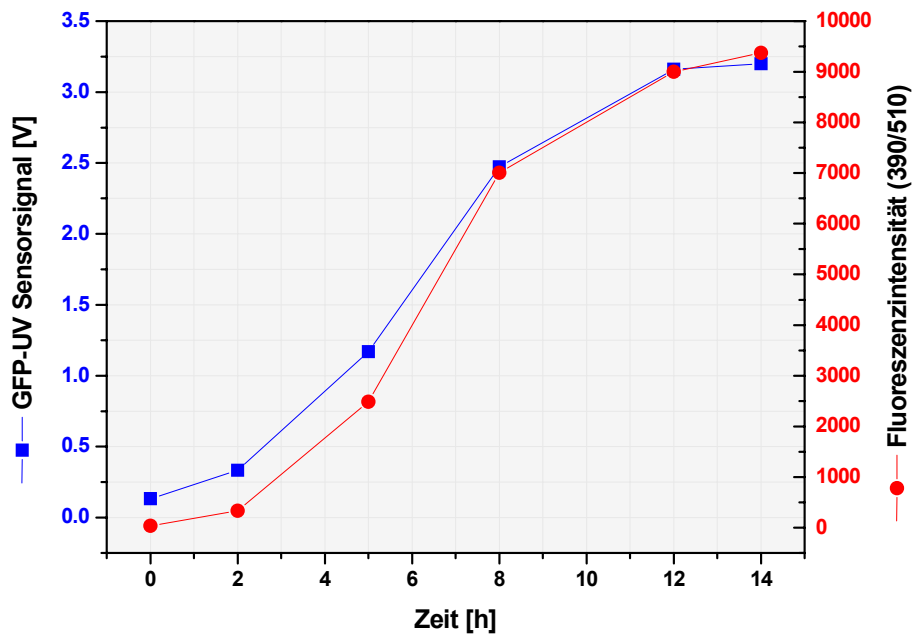


Abbildung 82 Vergleich zwischen der Online-Messung mit dem GFP-Sensor bei Verwendung der UV-LED als Anregungslichtquelle und der Offline-Messung mit dem 2D-Spektrometer.

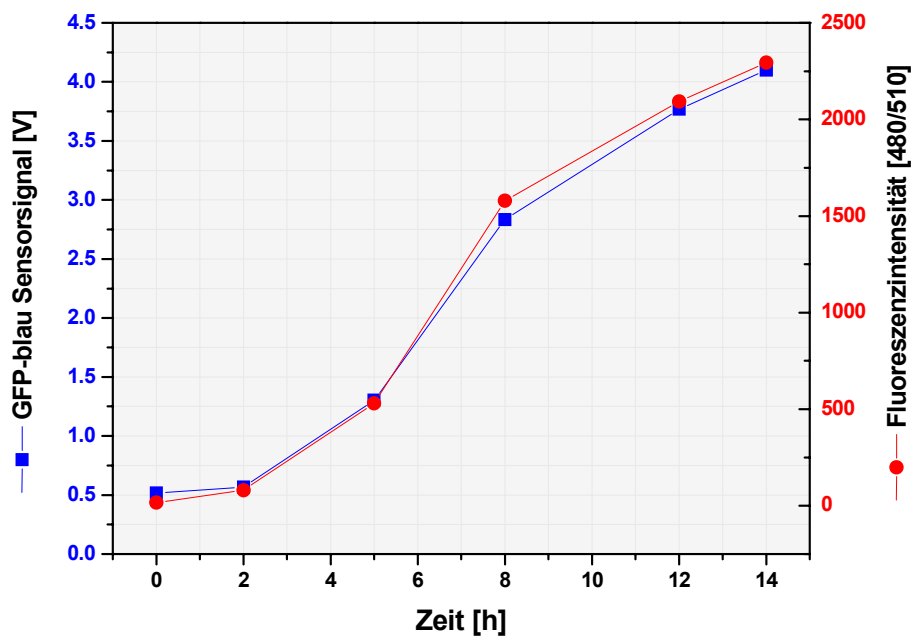


Abbildung 83 Vergleich zwischen der Online-Messung mit dem GFP-Sensor bei Verwendung einer blauen LED als Anregungslichtquelle und der Offline-Messung mit dem 2D-Spektrometer.

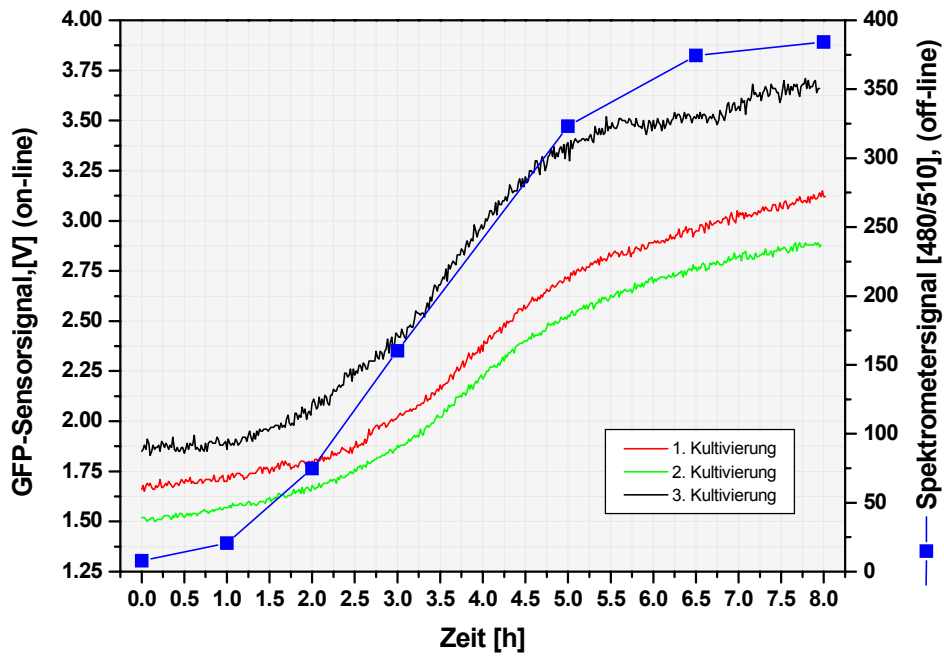


Abbildung 84 Vergleich zwischen der Online-Messung mit dem GFP-Sensor bei Verwendung der UV-LED als Anregungslichtquelle und der Offline-Messung mit dem 2D-Spektrometer. Kultivierungsbedingungen: MSN-Medium, pH 7, Temperatur 32°C, Rührgeschwindigkeit 200 rpm, 0.6ppm Nalidixinsäure

9 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden faseroptische Sensoren entwickelt, die auf dem Prinzip der Fluoreszenzmessung basieren. Dabei wurde ein bestehendes faseroptisches 4-Kanal-Fluoreszenzintensitätsmesssystem zur ausschließlichen Sauerstoffmessung so weiterentwickelt, dass zusätzlich Temperaturmessung und Toxinmessung mit Hilfe von GFP-produzierenden *E.coli* ermöglicht wurden. Basierend auf dem Sauerstoffsensor als Transducer wurde des Weiteren ein Glucosesensor entwickelt. Ferner wird die Temperaturabhängigkeit des faseroptischen Sauerstoffsensors genau untersucht und eine Strategie zu deren Kompensation ausgearbeitet. Ein weiteres Kapitel beschreibt die Entwicklung eines faseroptischen Sauerstoffsensors, dessen Messprinzip sowohl die Fluoreszenzintensität als auch die Abklingzeit des sauerstoffsensitiven Fluorophors Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Ruthenium-Chlorid ist.

Zur Sauerstoffmessung wurde der sauerstoffsensitive Fluorophor Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Ruthenium-Chlorid verwendet. Die Fluoreszenzintensität und die Abklingzeit des Fluorophors werden auf Grund des Quenching-Prozesses durch molekularen Sauerstoff verringert. Je größer die Sauerstoffkonzentration ist, umso kleiner die Intensität bzw. die Abklingzeit. Das kombinierte Intensität- und Abklingzeitsensor ist modular aufgebaut: Die Messeinheit ist in einem separaten Gehäuse untergebracht, während die Auswerteeinheit ein PC mit eingebauten Multifunktionskarte ist. Durch Verwendung einer grafischen Programmierenebene ist es möglich, einen Steuerungsalgorithmus zu entwickeln, der komplexe Abläufe kontrolliert. Für den Nutzer des Sensors ist die Handhabung des Steuerungsprogrammes einfach. Der momentane Messwert wird dabei auf einem Onscreen-Display angezeigt, der ganze Messverlauf in einem grafischen Fenster dargestellt und gleichzeitig in einer Datei gesichert.

Der Einsatz des faseroptischen Sauerstoffsensors in verschiedenen Fermentationen zeigten gute Übereinstimmungen mit den Resultaten von Sauerstoffelektroden. Ferner wies sein Einsatz im NMR-Bioreaktor, wo die Clarkelektrode versagen würde, seinen größeren Einsatzbereich. Die kinetische Messung der Redoxreaktion zwischen molekularem Sauerstoff und Ascorbin- bzw. Ascorbatlösungen lieferte die Erkenntnis, dass die Reaktion von Sauerstoff mit Ascorbat um ein Fünffaches schneller abläuft, als die gleiche Reaktion mit Ascorbinsäure. Außerdem stellte sich heraus, dass die Hydroxidkonzentration bis zu einem gewissen Grade die Kinetik der Reaktion beeinflusst: Eine alkalische Ascorbatlösung mit einer 0.6 millimolaren Hydroxidkonzentration reagiert fast doppelt so schnell wie eine neutrale Ascorbatlösung.

Die Temperaturabhängigkeit des Sauerstoffsensors wurde genau untersucht. Die Fluoreszenzintensität nimmt mit der Temperaturzunahme ab. Insgesamt lässt sie sich durch exponentielle Funktionen

beschreiben. Es stellte sich dabei heraus, dass der Fluoreszenz-, der Quenchingprozess und die Art des verwendeten Farbstoffmatrizen zur Fluoreszenzabnahme beiträgt. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen wurde eine Strategie zur Kompensation entwickelt. Der Verlauf der Kurven bei verschiedenen Temperaturen ist einander sehr ähnlich, jedoch nicht identisch, so dass sie nicht durch eine einzige Formel beschreiben ließ.

Zur Temperaturkompensation wurde ein faseroptischer Temperatursensor entwickelt. Der verwendete Fluorophor ist Rhodamin B. Das Messprinzip basiert auf dem Quenching der Rhodaminfluoreszenz durch die Temperatur. Die temperaturstabilen Polymere Polymethylsiloxan, Polydimethylsiloxan und Polysulfon wurden als Farbstoffmatrix getestet. Es stellte sich dabei heraus, dass die Matrix einen entscheidenden Einfluss auf den Signalverlauf hat. Bei einer Polymethylsiloxan als Matrix ist die Temperaturabhängigkeit des Signals nicht linear, die Messkurve durchläuft bei ca. 10°C ein Maximum, bei einer Polysulfonmatrix dagegen ist das Signal nicht stabil: das Signal schwankt bei konstanter Temperatur erheblich. Nur bei Verwendung von Polydimethylsiloxan ist eine lineare Temperaturabhängigkeit im Bereich 0-90°C zu verzeichnen. Die Reproduzierbarkeit ist gut. Bei einer kontinuierlichen Messung über 17 Stunden beträgt die Standardabweichung vom Mittelwert unter 0.1% des gemittelten Messwertes. Eine Querempfindlichkeit gegenüber Kohlendioxid existiert nicht.

Unter Verwendung des Sauerstoffsensors als Transducer wurden Glucosesensoren entwickelt. Glucoseoxidase wurde dabei auf die Adsorbentien Aktivkohle, Silicagel, DAY-Zeolith und Ti-Al-Zeolithpulver adsorbiert und mit Glutardialdehyd quervernetzt. Es stellte sich heraus, dass das Ti-Al-Zeolith am besten geeignet ist. Die Kalibrationskurve des Glucosesensors mit diesem Zeolith als Enzymträger ist bis zu einer Glucosekonzentration von 1.4 g·l⁻¹ linear. Die Aktivität der immobilisierten GOD ist im Vergleich zum nativen Enzym über einen weiten pH-Bereich von 6 bis 8 auf höchstem Niveau, während die Aktivität des nativen Enzyms nur bei einem pH-Wert von etwa 5.5 ein Maximum aufweist.

Zur Bestimmung von zellschädigenden Toxinen wurde der rekombinante E-Coli-Stamm *UTL2* eingesetzt, der in Anwesenheit dieser Toxine das GFP-Gen exprimiert und das grünfluoreszierende Protein GFP produziert. Diese Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines selbst weiterentwickelten faseroptischen Messsystems gemessen. Da die vorliegende Fluoreszenzintensität sehr niedrig war, wurde ein selbst entwickeltes V-förmiges Faserbündel eingesetzt, so dass Exzitations- und Emissionslicht vollkommen von einander separiert waren. Eine thermostatisierbare Messzelle wurde konstruiert, der Raum für ein 2ml großes Reaktionsgefäß mit der Probelösung bot. Als Modelltoxin wurde Nalidixinsäure verwendet. Die Kalibrationskurve zeigte, dass die GFP-Fluoreszenz mit der Konzentration von Nalidixinsäure korrespondiert. Der lineare Bereich liegt zwischen 0.5 und 1 ppm Nalidixinsäure.

10 Ausblick

Die Fluorophore Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Ruthenium-Chlorid und Rhodamin B haben ihre Hauptabsorptionsmaximum bei verschiedenen Wellenlängen. Während beim Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Ruthenium-Chlorid das Maximum im blauen Bereich (480nm) liegt, ist dieser im Falle Rhodamin B bei 540nm zu finden. Die beiden Fluorophore lassen sich daher durch eine blaue LED bzw. eine grüne LED anregen. Werden beide LED abwechseln eingeschaltet, so könnten unter Verwendung von passendem Doppelbandpassfilter die beiden Fluorophore abwechselnd anregen. Auf diese Weise können beide Fluorophore auf einer Optode immobilisiert sein und man hätte eine kombinierte Sauerstoff-Temperatur-Optode. Durch Messung der Temperatur könnte der Temperatureffekt bei der Sauerstoffmessung kompensiert werden. Eine kombinierte LED von der Firma Nichia, Japan, welche jeweils eine rote, grüne und blaue LED in sich vereint, wobei die drei LED getrennt von einander angesteuert werden können, kann hierbei eingesetzt werden. Momentan ist trotz intensiver Recherchen leider kein geeigneter Doppelbandpassfilter zu finden, der eine vollständige Trennung der Exzitation der Farbstoffe ermöglicht. Eine Einzelanfertigung wäre zwar technisch möglich, doch wären die Kosten viel zu hoch und daher nicht zu rechtfertigen. Dafür wäre die Verwendung eines Minispektrometers, das eine viel bessere Spektralanalyse ermöglicht, sinnvoller, zumal die Kosten nicht höher wären. In diesem Falle jedoch erfordert es eine völlig neue Sensorarchitektur. Da der Spektralsensor mit Zenerdiodenzeilen als Photodetektor und nicht mit einem PMT ausgestattet ist, ist die sehr gute Spektraltrennung allerdings mit einer geringeren Sensitivität verbunden. Eine weitere Optimierungsmöglichkeit ist die Substitution der LED durch eine LASER-Diode, die einerseits eine höhere Leuchtkraft und ein viel schmalbändigeres Spektrum als eine LED besitzt und dadurch eine bessere Filterung erlaubt. Diese Alternative hat den Vorteil, dass das System nicht stark verändert zu werden braucht. Hinzu führt der zunehmende Einsatz von blauen LASER-Dioden in der optischen Speicherindustrie zu Preissenkung, was seinen Einsatz in naher Zukunft attraktiv macht.

Durch die modulare Bauart des kombinierten Intensität- und Abklingsensor und durch Verwendung eines schnellen 12-Bit-Multifunktionskarte, welche mit Hilfe der Programmier Ebene DASYLab zu programmiert werden kann, ist es möglich, den Sensor mehrkanalig auszubauen. Dabei können durchaus mehrere simultane Messungen durch Verwendung der FFT-Technik durchgeführt werden. Erste Experimente hiermit zeigen gute Aussichten. Die Realisierung dieses Verfahrens ist aufgrund seiner Komplexität im Rahmen dieser Arbeit zeitlich nicht möglich. Weitere Funktionserweiterung könnte die Anbindung des Sensors an das Internet sein, was eine Fernkontrolle und Überwachung ermöglicht.

Dies wird dadurch vereinfacht, dass DASYLab® Internetfunktionen bietet, die verwendet werden könnten.

Der faseroptische GFP-Sensor lässt sich in Zukunft bei in-Situ-Messung einsetzen, um mutagene Substanzen in der Umwelt aufzuspüren. Dies könnte dadurch erreicht werden, dass die Mikroorganismen auf der Optodenspitze immobilisiert werden oder durch eine Art Käfig, der an der Optodenspitze fest installiert ist, mit einer semipermeablen Membran von der Umgebung getrennt wird. Durch Verwendung von möglichen transgenen Mikroorganismen, die spezifisch auf bestimmte Substanzen mit einer GFP-Produktion reagieren, könnte eine Reihe von Biosensoren entwickelt werden.

11 Kürzelverzeichnis

τ	Abklingzeit
a	Bunsenscher Absorptionskoeffizienten
AD	Analog-Digital-Wandler
c_Q	Konzentration des Quenchers
DA	Digital-Analog-Wandler
f	Frequenz
GFP	Green Fluorescent Protein
GOD	Glucoseoxidase
GOD	Glucoseoxidase
I	momentane Lumineszenz
I	Intensität
I_A	Anfangsintensität der Lumineszenz
I_A	Anfangsintensität der Lumineszenz
k_f	Übergangsrate für die Fluoreszenz
K_H	Henry-Konstante
k_i	Übergangsrate für die internal conversion
k_Q	Quenchingkonstante
K_{SV}	Stern-Volmer-Konstante
LTI	Linear Time Invariant
M	Molmasse
M^*	angeregtes (Fluorophor)Molekül
p	Druck
p^0	Normaldruck
$p_{H_2O}^0$	Wasserdampfdruck bei Normalluftdruck
PMT	Photomultiplier
Q^*	angeregtes Quenchingmolekül
R	universelle Gaskonstante
Rudpp	Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Ruthenium
T	Temperatur
t	Zeit
V	Molvolumen
x	Molenbruch
ΔH_v	Verdampfungsenthalpie
ϕ	Quantenausbeute
ϕ_0	Quantenausbeute bei Abwesenheit von Quenchemolekülen

12 Literatur

- [1] Anders, K.D.: „Entwicklung und Einsatz optischer Chemo- und Biosensoren zur Prozeßkontrolle in der Biotechnologie“, Dissertation 1991, Universität Hannover
- [2] Atkins P.W.: „Physical Chemistry“, 5th edition, 1994, Oxford
- [3] Be'ja', and E. Bibi: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1996) pp. 5969-5974
- [4] Beja, and E. Bibi; Proc. Natl. Acad. Sci.; USA 83 (1996), pp. 5969-5974
- [5] Berndt, K.W. und Lakowicz, J.R.: „Electroluminescent Lamp-Based Phase Fluorometer and Oxygen Sensor“; Analytical Biochemistry. 201 (1992), 319-325
- [6] Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W. und Prasher, D. C, “Green fluorescent protein as a marker for gene expression”, Science 263, 802-805, 1994
- [7] Comte A.: Optische Sauerstoffsensoren auf Basis von Intensitäts- und Lebenszeitmessungen, Dissertation, Universität Hannover, 1996
- [8] Cote, J; Bourget, L; Garnier, A. und Kamen, A, “Study of adenovirus production in serum-free 293SF suspension culture by GFP-expression monitoring”, Biotechnol. Prog., 13 (6), 709-714, 1998
- [9] Crameri, E.A. Whitehorn, E. Tate and W.P.C. Stemmer; “Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling”; Nature Biotechnol. 14 (1996), pp. 315-319
- [10] Cubitt, A. B.; Heim, R.; Adams, S. R.; Boyd, A. E.; Gross, L. A. und Tsien, R. Y., Understanding, improving and using green fluorescent proteins, Trends Biochem. Sci. 20, 448-455, 1995,
- [11] Datenblatt “Photosensor Modules H6779”, Hamamatsu Photonics, Japan
- [12] Datenblatt Nu2daq PCL9812
- [13] Deutsch J.C.: „Analytical Biochemistry“; 265, 238–245 (1998)
- [14] Du H., Fu R. A., Li J.,Corkan A., Lindsey J. S., "PhotochemCAD: A computer-aided design and research tool in photochemistry," *Photochemistry and Photobiology*, 68, 141-142, 1998
- [15] Fitzgerald R.V., Peterson J.I.; Anal. Chem. 1984, 56, 62-67
- [16] Holst, G.: Entwicklung und Erprobung einer Sauerstoff-Flux-Optode mit einem Sauerstoffsensoren nach dem Prinzip der dynamischen Fluoreszenzlöschung
- [17] Kaneko M., T. Takewawa, T. Asakura; Macromol. Symp.; 1992, 55, 183-197
- [18] Knight W., N.J. Goddard, P.R. Fielden, A.L. Gregson, N. Billiton, M.G. Barker, and R.M. Walsmley; Analyst 125 (2000), pp. 499-506

- [19] Knight W., N.J. Goddard, P.R. Fielden, M.G. Barker, N. Billiton, and R.M. Walsmley; *Meas. Sci. Technol.* 10 (1999) pp. 211-217
- [20] Kohls Oliver; Dissertation, Uni Hannover 1996
- [21] Lacowicz, J.R.: "Principles of Fluorescence Spectroscopy"; 3. Auflage. New York: Plenum Press 1986
- [22] Liu Baohong, Renqi Hu, Jiaqi Deng: *Analytical Chemistry*, 1997,69, 2343-2348
- [23] Lottspeich, F. und Zorbas, H; *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 1998
- [24] Lüke, H.D.: „Signalübertragung“. Berlin: Springer-Verlag 1985
- [25] Manual „Mops V1.2“
- [26] Misteli, T. und Spector, D.L., "Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology", *Nat. Biotechnol.* 15 (10), 961-964., 1997.
- [27] Naumer H., Heller W.: „Untersuchungsmethoden in der Chemie“; 2. und durchgesehene Auflage; Stuttgart, New York; Georg-Thieme-Verlag 1990
- [28] Papkovsky D.B.; *Sensors and Actuators B* 29 (1995) 213-218
- [29] Podmore, I. D., Griffiths, H. R., Herbert, K. E., Mistry, N., Mistry, P., and Lunec, J.; *Nature* 392, 559, (1998)
- [30] Poppenborg, L.; Friehs, K. und Flaschel, E., "The green fluorescent protein is a versatile reporter for bioprocess monitoring", *J. Biotechnol.* 58 (2), 79-88, 1997
- [31] Randers-Eichhorn, L.; Albano, C.R.; Sipior, J.; Bentley, W.E. und Rao, G., "On-line green fluorescent protein sensor with LED excitation", *Biotech. Bioeng.* 55 (6), 921-926, 1997.
- [32] Strickler, S.J.; Berg, R.A.; *A. J. Chem. Phys.*; 1962, 37, 14
- [33] Tan S.S.S., Hauser P.C.; *Analyst*, August 1993, Vol.118
- [34] Wolfbeis O.S., Papkovsky D.B., Ponomarev G.V.; *Spectrochimica Acta Part A* 52 (1996) 1629-1638
- [35] Wong, A. L.; Hunnicutt, M.L.; Harris, J.M.; *Anal. Chem.* 1991, 63,1081-1090
- [36] Xu Wenyin, R. Schmidt, M. Whaley, J.N. Demas, B.A. DeGraff, E.K. Karikari, B.L. Farmer; *Anal. Chem.* 1995, 67, 3172-3180
- [37] Xu Wenying, Robert Schmidt, M. Whaley, J.N. Demas, B.A. DeGraff, E.K. Karikari and B.L. Farmer; "Oxygen Sensors Based on Luminescence Quenching: Interactions of Pyrene with the polymer Supports"; *Anal. Chem.* 1995, 67, 3172-3180
- [38] Clark L., Lyons C.; *C. Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1962,102,29
- [39] Chudobova I., Vrbova e., Kodicek M., Jannovcova J.; Kas J.; *Anal. Chim. Acta* 319 (1996), 103-110

- [40] Zhou X.J., Arnold M.A.; *Anal. Chim. Acta* 304 (1995) 147-156
- [41] Li J.Zh., Zhang Zh.J., Li L.; *Talanta*, Vol. 41, No11, pp 1999-2002, 1994
- [42] Trettnak W., Leiner M.J.P., Wolfbeis O.S.; *Analyst*, October 1988
- [43] Narasimham K., Wingard L.B. Jr.; *Anal. Chem.* 1986, 58, 2984
- [44] Degani Y., Heller A.; *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 2615
- [45] Oisson B., Lundback H., Johansson G., Scheller F., Nentwig J., *Anal. Chem.* 1986, 58, 2984
- [46] McCurley M.F.; *Biosensors & Bioelectronics* 9 (1994), 527-533
- [47] Firtier G., Vaillancourt M, Belanger D; *Electroanalysis* 1992, 4, 275
- [48] Mizutani F., Yabuki S., Katsura T. ; *Anal. Chim. Acta* 1993,274, 201
- [49] Khan G.F., Kobatake E., Ikariyama Y. Aizawa M.; *Anal. Chim. Acta* 1993
- [50] Cosnier S., Innocent C.; *Anal. Lett.* 1994, 27,1429
- [51] Shaolin M.; *J. Electroanal. Chem.* 1994, 370, 135
- [52] Zhang Z., Bao W., Liu C.; *Talanta* 1994, 41, 875
- [53] Pandey P.C.; *J. Chem. Soc.; Faraday Trans* 1988, 84, 2259
- [54] Wang J., Wu H.; *Anal. Chim. Acta* 1993, 283, 683
- [55] Mascini M., Iannello M., Palleschi G.; *Anal. Chim. Acta* 1983, 146, 135
- [56] Liu Baohong, Hu Renqi, Deng Jiaqi; *Anal. Chem.* 1997, 69, 2343-2348
- [57] Moreno-Bondi, Wolfbeis O.S.; *Anal. Chem.* 1990, 62, 2377-2380
- [58] Dremel B.A.A., Schaffar B.P.H., Schmid R.D.; *Anal. Chim. Acta*, 225(1989), 293-301
- [59] Weetall H. H., Havewala N.B., Pitcher W. H., Detar C.C., Vann W.P., Yavebaum S.; *Biotechnol. Bioeng.* 1974, 16, 295
- [60] Lee Y.Y., Fratsche A.R., Wun K., Tsao G. T. *Biotechnol. Bioeng.* 1976, 18, 389
- [61] Johnson D.B., Thornton D., Ryan P.D.; *Biochem. Soc. Trans* 1974, 2, 494
- [62] Thornton D., Flynn A., Johnson D.B., Ryan P.D.; *Biotechnol. Bioeng.* 1975, 17,1679

13 Anhang

13.1 Temperaturabhängigkeit des Wasserdampfdruckes bei Normaldruck

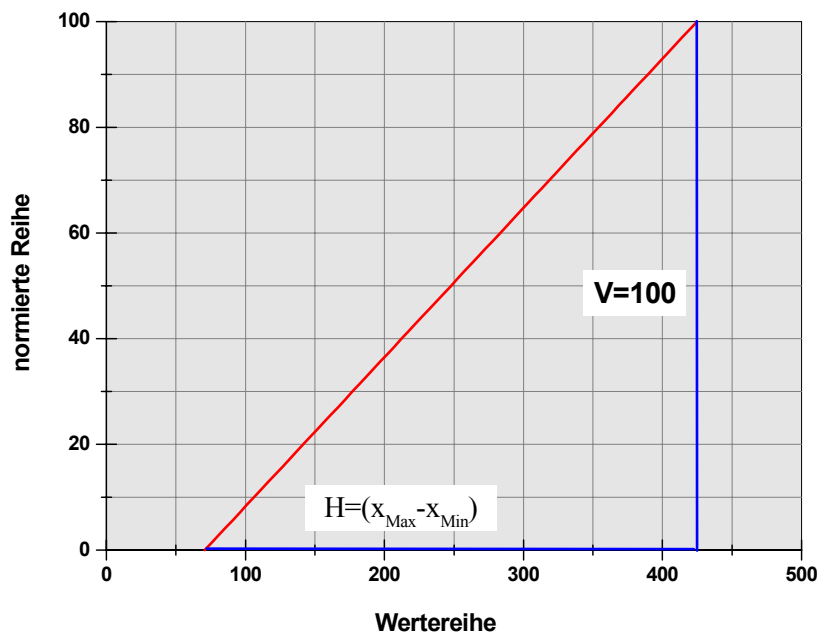
T [°C]	p [kPa]		T [°C]	p [kPa]
0	0.61129		50	12.344
1	0.65716		51	12.97
2	0.70605		52	13.623
3	0.75813		53	14.303
4	0.81359		54	15.012
5	0.8726		55	15.752
6	0.93537		56	16.522
7	1.0021		57	17.324
8	1.073		58	18.159
9	1.1482		59	19.028
10	1.2281		60	19.932
11	1.3129		61	20.873
12	1.4027		62	21.851
13	1.4979		63	22.868
14	1.5988		64	23.925
15	1.7056		65	25.022
16	1.8185		66	26.163
17	1.938		67	27.347
18	2.0644		68	28.576
19	2.1978		69	29.852
20	2.3388		70	31.176
21	2.4877		71	32.549
22	2.6447		72	33.972
23	2.8104		73	35.448
24	2.985		74	36.978
25	3.169		75	38.563
26	3.3629		76	40.205
27	3.567		77	41.905
28	3.7818		78	43.665
29	4.0078		79	45.487
30	4.2455		80	47.373
31	4.4953		81	49.324
32	4.7578		82	51.342
33	5.0335		83	53.428
34	5.3229		84	55.585
35	5.6267		85	57.815
36	5.9453		86	60.119
37	6.2795		87	62.499
38	6.6398		88	64.958
39	6.9969		89	67.496
40	7.3814		90	70.117
41	7.784		91	72.823
42	8.2054		92	75.614
43	8.6463		93	78.494
44	9.1075		94	81.465
45	9.5895		95	84.529
46	10.094		96	87.688
47	10.62		97	90.945
48	11.171		98	94.301
49	11.745		99	97.759

13.2 Methode zur Normierung von Kalibrierkurven

Gesetzt der Fall, dass man eine beliebige Wertereihe, deren Minimum und Maximum ungleich Null bzw. Hundert sind, auf den Bereich zwischen Null und Hundert Prozent normieren möchte, wobei als Bedingung gelten soll, dass alle Werte ihren relativen Abstand zueinander beibehalten. Diesem entspricht eine lineare Translation von einer Größenordnung auf eine andere. Der Operator Ω für diese Translation ist eine lineare Funktion:

Wertereihe Ω Normierte Reihe

$$y = b \cdot x + a$$

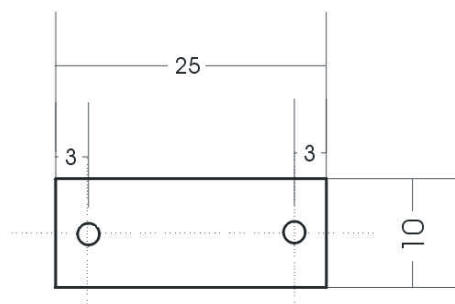
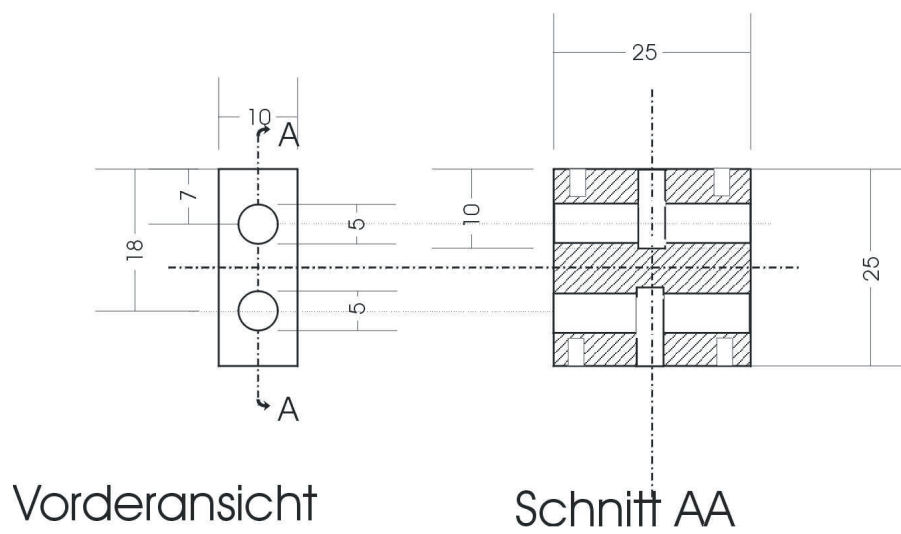
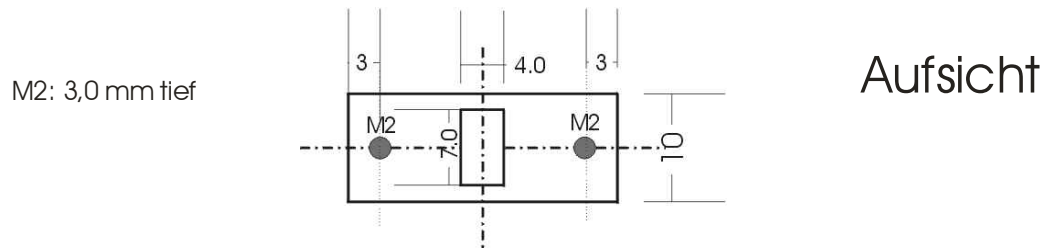


$$b = \frac{100}{(x_{Max} - x_{Min})}$$

$$a = -b \cdot x_{Min}$$

$$y = \frac{100}{(x_{Max} - x_{Min})} \cdot x - \frac{100}{(x_{Max} - x_{Min})} \cdot x_{Min}$$

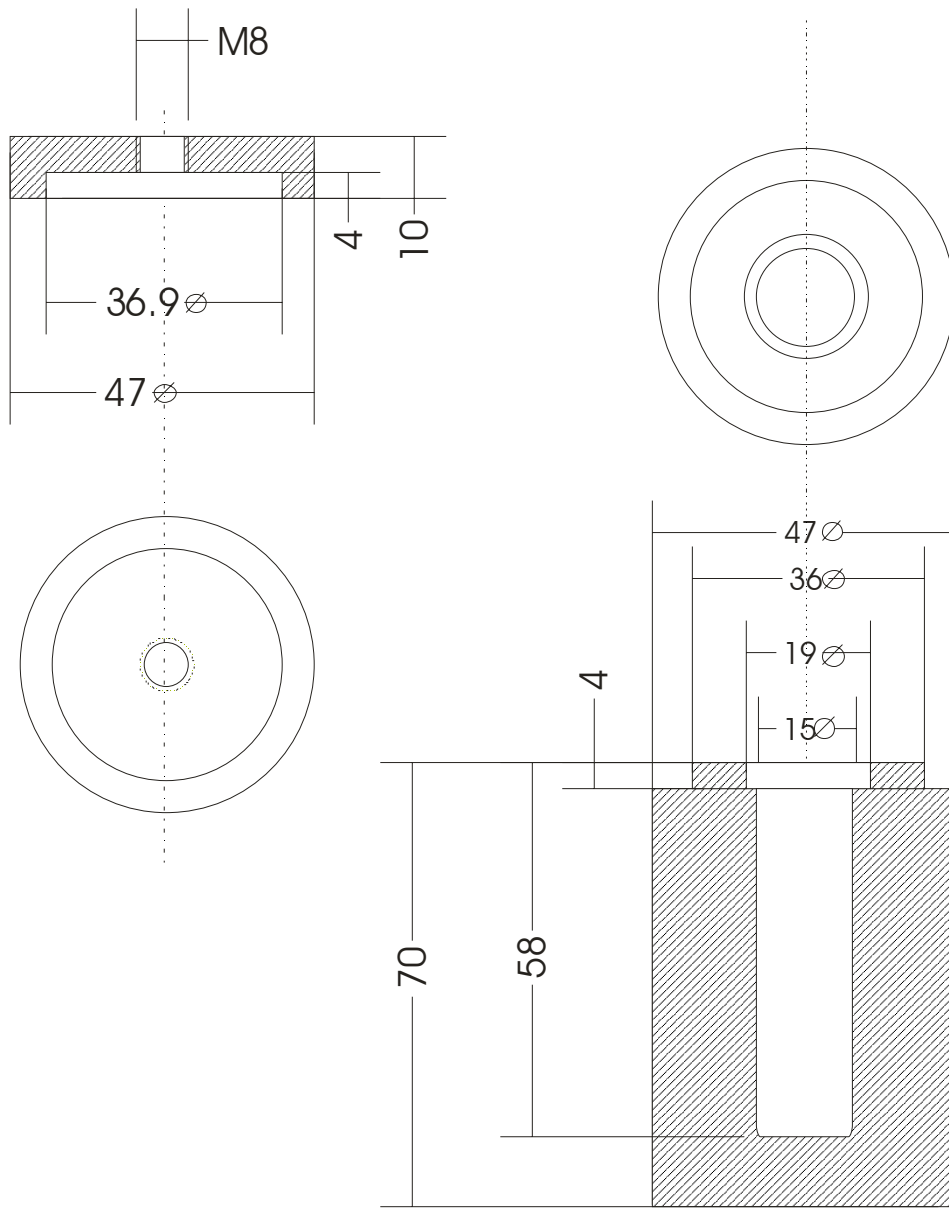
13.3 Konstruktionszeichnung des LED-Gehäuses



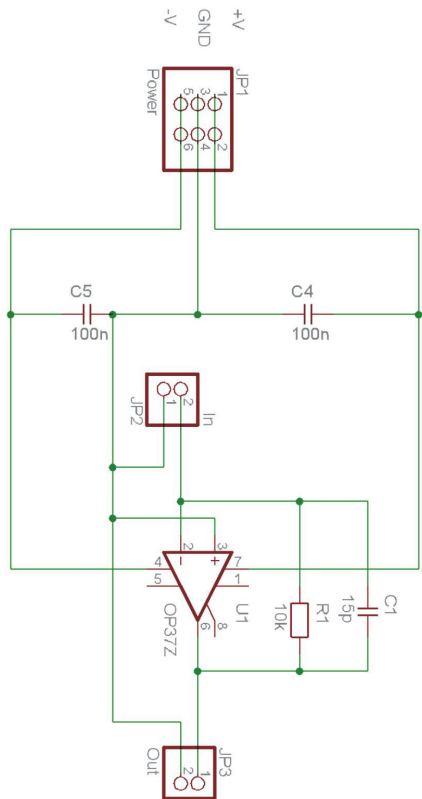
2 Bohrungen
d=2,5mm

Deckel (2x)
Dicke: 1mm

13.4 Konstruktionszeichnungen der GFP-Meßzelle



Material : Edelstahl
 Abmessungen: mm
 Toleranzen : $\pm 0,1$ mm
 Alle Kanten : Phase 0,1 mm
 Oberflächen : geschlichtert



I to U Converter

TITLE: I to U Converter

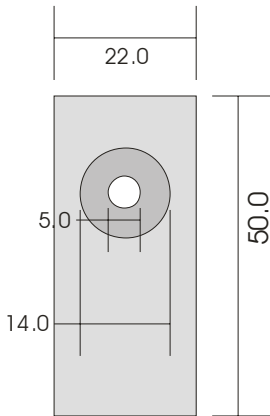
Document Number:

REV:

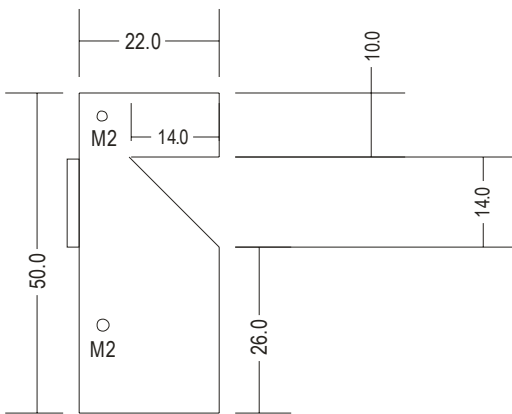
Date: 02.06.2001 02:16:08

Sheet: 1/1

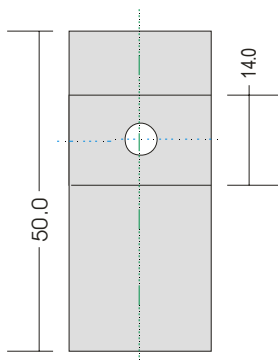
13.5 Konstruktionszeichnung des Strahlenteilers



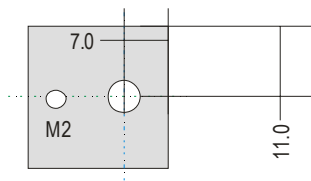
Frontansicht



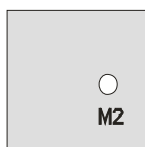
Seitenansicht



Rückansicht



Unten



Oben

Material:	Aluminium
Maße:	mm

13.6 Lebenslauf

Name: LÂM, Tuấn Hùng
Geboren 06. Juli 1972
Geburtsort BẾN TRE/ Vietnam

Schulischer Werdegang

1980-1984 Grundschule und Orientierungsstufe
1984-1991 Gymnasium

Studium

Okt. 1991- März 1994 Chemie-Grundstudium an der Universität Oldenburg
April 1994- Dez. 1997 Chemie-Hauptstudium an der Universität Hannover
Juni-Dez. 1997 Diplomarbeit
April 1998 Beginn der Promotion am Institut für Technische Chemie,
Universität Hannover

Diplomarbeit „Faseroptischer Sauerstoffsensoren und seine Applikation in der Biotechnologie“