
Entwicklung einer modellbasierten Hochdurchsatztechnik zur Enzymcharakterisierung mit Schwerpunkt auf Langzeitstabilität

Von der Fakultät für Maschinenwesen der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule
Aachen zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Ingenieurwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Kirill Rachinskiy
aus Charkow, Ukraine

Berichter: Universitätsprofessor Dr.-Ing. Jochen Büchs
Universitätsprofessor Dr.-Ing. Wolfgang Marquardt

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Oktober 2008

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Entwicklung einer modellbasierten
Hochdurchsatztechnik
zur Enzymcharakterisierung
mit Schwerpunkt auf Langzeitstabilität

Kirill Rachinskiy

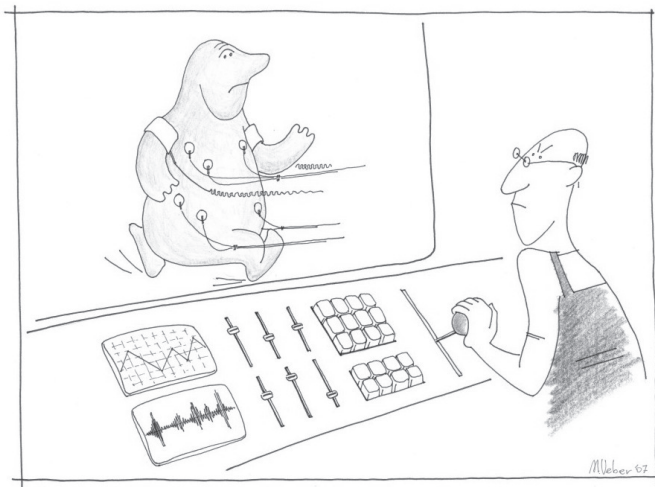
Development of a model based high throughput enzyme characterization technique with a focus on the long term stability

A new high throughput technique for enzyme characterization with specific attention to the long term stability, called “Enzyme Test Bench”, is presented. The concept of the Enzyme Test Bench consists of short term enzyme tests in 96-well microtiter plates under partly extreme conditions to predict the enzyme long term stability under moderate conditions. The technique is based on the mathematical modeling of temperature dependent enzyme activation and deactivation. Adapting the temperature profiles in sequential experiments by optimal non-linear experimental design, the long term deactivation effects can be purposefully accelerated and detected within hours. During the experiment the enzyme activity is measured online to estimate the model parameters from the obtained data. Thus, the enzyme activity and long term stability can be calculated as a function of temperature.

The engineered instrumentation provides for simultaneous automated assaying by fluorescent measurements, mixing and aeration as well as homogenous temperature control in the range of 10-85°C. Fluorescent assays for online acquisition of different reactions, e.g. hydrolysis reactions by pH-shift and oxidation reactions by DOT, are developed and established. The developed instrumentation and assay are applied to characterize two esterases and a complex, multi-stage laccase-mediator system.

The results of the enzyme characterization of both esterases, carried out in microtiter plates applying short term experiments of hours, are in good agreement with the results of long term experiments at different temperatures in 1L stirred tank reactors of a week. Thus, the new technique allows for both: the enzyme screening with regard to the long term stability and the choice of the optimal process temperature regarding such process parameters as turn over number, space time yield or optimal process duration. The comparison of the temperature dependent behavior of both characterized enzymes clearly demonstrates that the frequently applied estimation of long term stability at moderate temperatures by simple activity measurements after exposing the enzymes to elevated temperatures may lead to suboptimal enzyme selection. Thus, temperature dependent enzyme characterization is essential in primary screening to predict its long term behavior.

Wenn der Aufwand unter realen Betriebsbedingungen die vertretbaren, experimentellen Möglichkeiten übersteigt, packt ein Ingenieur den Gegenstand seiner Untersuchungen auf einen Prüfstand. Am Motorprüfstand wird z.B. eine schnelle Beschreibung des Motorverhaltens anhand einiger weniger, markanter Betriebspunkte erreicht und somit viele Kilometer aufwendiger Testfahrten gespart. Mechanistisches Verständnis der zu beschreibbaren Vorgänge und technischer Sachverstand bilden die Voraussetzung für diese Vorgehensweise.



Ein Enzymmolekül auf dem Prüfstand

Ähnlich komplex wie ein Motor, wenn auch viel kleiner, sind die Enzyme. Und auch hier sind wir dem Ingenieur-Ansatz treu geblieben und haben eine Technik entwickelt, welche die Beschreibung des Langzeitverhaltens anhand kurzer Experimente unter teils extremen Bedingungen im Mikroliterformat erlaubt. Der „Enzymprüfstand“ verdankt seinen Namen also der Analogie zum „Motorprüfstand“. Künstlerin Masha Veber hat den Zusammenhang karikaturistisch dargestellt.

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Rheinisch Westfälischen Technischen Hochschule Aachen.

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danke ich recht herzlich. Mein besonderer Dank gilt dabei:

Herrn Prof. Dr.-Ing. J. Büchs für die Möglichkeit der Promotion an seinem Lehrstuhl und seine fachliche Betreuung: Sie haben mich bereits im Studium in meinem Interesse für Bioverfahrenstechnik gestärkt, zur Promotion ermutigt und während meiner Zeit an Ihrem Lehrstuhl sowie darüber hinaus stets unterstützt,

Herrn Prof. Dr.-Ing. W. Marquardt für die Übernahme des Korreferats,

Herrn Prof. Dr.-Ing. D. Abel für die Übernahme des Vorsitzes,

Frau. Priv.-Doz. Dr. M. Pohl für die Übernahme des Beisitzes,

meinen Kooperationspartnern von der BASF AG, meinen Kollegen der Aachener Verfahrenstechnik und Studenten für die spannenden Projekte, fruchtbare Zusammenarbeit und abwechslungsreiche Freizeit. Ob beruflich oder privat, ich blicke sehr gerne auf die letzten vier Jahre zurück.

Mein ganz besonderer Dank gilt Xenia: Von der Vorbereitung der Weihnachtsfeier im ersten Promotionsjahr bis zu Fragen zur organischen Chemie im letzten, konnte ich immer auf Dich zählen.

Der größte Dank gehört meinen Eltern: Ihr habt mich in meinem Ehrgeiz und meiner Begeisterung für Wissenschaft geprägt. Und Ihr unterstützt mich seit nun 30 Jahren mit Rat und Tat, und zwar finanziell, moralisch und auf alle anderen erdenklichen Arten.

VERZEICHNIS DER FORMELZEICHEN	IV
1 EINLEITUNG	1
2 STAND DER TECHNIK	4
2.1 Enzymcharakterisierung mit hohem Durchsatz	4
2.2 Modellbasierte Enzymcharakterisierung	7
2.2.1 Modellierung des Enzymverhaltens	9
2.2.2 Experimente und ihre Auswertung	15
2.2.3 Numerische Planung und Auswertung von Experimenten	16
2.3 Verfahrenstechnisch definierte Versuchsführung in MTP'n	21
2.3.1 Verfahrenstechnische Charakterisierung der MTP'n	22
2.3.2 Temperierung von MTP'n	25
2.4 Reaktionsüberwachung in MTP'n	26
3 MATERIAL UND METHODEN	30
3.1 Enzymprüfstand	30
3.1.1 Mikrotiterplatten	30
3.1.2 Geräte	31
3.1.3 Software	33
3.2 Stoffsysteme	35
3.2.1 Esterasesystem	35
3.2.2 Oxidasesystem	37
3.2.3 Weitere Stoffsysteme	38
3.3 Methoden zur Validierung der Enzymprüfstandergebnisse	40
3.3.1 Validierung des pH-basierten Assays	40
3.3.2 Validierung der Langzeitvoraussagen im Esterasesystem	41
3.3.3 Validierung des pO ₂ -basierten Assays und der Langzeitvoraussagen im Oxidasesystem	42
4 APPARATIVE ENTWICKLUNG DES ENZYMPRÜFSTANDES	46
4.1 Herleitung und Definition der Apparaturanforderungen	46
4.1.1 Anforderungsspezifikation	46
4.1.2 Fachspezifikation	46

4.2	Entwicklung der Apparatur	47
4.2.1	Optische Messung	49
4.2.2	Temperierung	50
4.2.3	Modifizierung der Temperierung für begaste Stoffsysteme	56
4.2.4	Ausblick Temperierung	57
4.3	Verfahrenstechnisch definierte Versuchsführung	59
4.3.1	Durchmischung	59
4.3.2	Sauerstoffversorgung	61
4.3.3	Ausblick zur definierten Sauerstoffversorgung	68
4.4	Ansteuerung der entwickelten Apparatur	69
4.4.1	Ausblick Ansteuerung	70
5	ENTWICKLUNG UND ETABLIERUNG OPTISCHER METHODEN	72
5.1	pH-aktive Reaktionen	73
5.1.1	Optische pH-Messung	74
5.1.2	Berechnung der Produktkonzentration aus dem pH-Wert	76
5.1.3	Etablierung der Methode	80
5.2	Sauerstoffverbrauchende Reaktionen	85
5.2.1	Messprinzip zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration	85
5.2.2	Übertragung des Messprinzips auf den Enzymprüfstand	86
5.3	Weitere Messmethoden	92
5.3.1	Ergänzende Messungen der Enzymkonformationsänderungen über Tryptophanfluoreszenz	93
5.3.2	Beeinflussung von Fluorophoren durch ihre Umgebung	95
5.3.3	Optische Temperaturmessung	96
5.3.4	Ausblick Infrarotmessungen	97
6	MODELLBASIERTE ENZYMCHARAKTERISIERUNG	100
6.1	Auf Vorwissen basierte Modelle	101
6.1.1	Untermodell <i>Temperatur</i>	102
6.1.2	Untermodell <i>Deaktivierung</i>	102
6.1.3	Untermodell <i>Reaktionskinetiken</i>	103
6.1.4	Untermodell <i>Massenbilanz</i>	104
6.1.5	Untermodell <i>Sauerstofftransfer</i>	105
6.1.6	Untermodell <i>pH-Wert</i>	106
6.2	Intuitive Experimente	106

6.3	Parameterschätzung	111
6.4	Versuchsplanung und Crossvalidierung	112
6.5	Ausblick zur modellbasierten Enzymcharakterisierung	114
6.5.1	Modellreduktion	114
6.5.2	Modelldiskriminierung	115
6.5.3	Robuste Versuchsplanung	117
6.5.4	„Geregelte“ Versuchsplanung	118
7	ENZYMCHARAKTERISIERUNG AM ENZYMPRÜFSTAND	120
7.1	Esterasesystem	120
7.2	Oxidasesystem	125
7.2.1	Erstellung des Modells	125
7.2.2	Intuitive Experimente und ihre analytische Auswertung	128
7.2.3	Ergebnisse der Enzymcharakterisierung	131
7.2.4	Validierung der Ergebnisse anhand der Langzeitversuche	136
7.3	Weitere Ergebnisse	139
7.3.1	Lösungsmittelscreening	139
7.3.2	Mehrstufige Reaktionen	141
7.4	Fallstudie	144
8	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	148
	LITERATURVERZEICHNIS	152

Verzeichnis der Formelzeichen

Abkürzungen:

SMAS	Schnelle Methode zur Aktivitäts- und Stabilitätsbestimmung
MTP	Mikrotiterplatte
Trp	Tryptophan

Formelzeichen:

h	Modellantwort	
p	Modellparameter	
$q, u(T)$	Steuergrößen und Funktionen	
y	Differentieller Zustand	
z	Algebraischer Zustand	
η	Messgröße	
σ	Standardabweichung	
C	Kovarianzmatrix	
E_x	Enzymfraktion X	
Ψ	Zielfunktion der Versuchsplanung	
A	Grenzfläche	[m ²]
A_∞	Frequenzfaktor der Aktivierung	[mol / (g _{Enzym} · h)]
<i>Aktivität</i>	Enzymaktivität	[1/h]
a	volumenbezogene Diffusionsfläche	[1/m]
c	Wärmekapazität	[J/kg/K]
Do_2	Diffusionskoeff. von O ₂ in H ₂ O	[m ² /h]
d	Eindringtiefe	[nm]
do	Schütteldurchmesser	[cm]
E	Elastizitätsmodul	[kN/mm ²]
E_a	Aktivierungsenergie	[J/mol]
$E_{n,a}$	Aktivierungsenergie des Fraktionüberganges	[J/mol]
F	Fluoreszenzintensität	[-]
f	Resonanzfrequenz	[Hz]
H	Henrykoeffizient	[-]
Ha	Hatta-Zahl	[-]

h	Planck'sches Wirkungsquantum	[J·s]
I	Flächenträgheitsmoment	[kN/mm ²]
I	Intensität	[-]
K	temperaturabhängiger Koeffizient	[-]
K_a	Dissoziationskonstante	[mol/L]
K_m	Michaelis-Menten-Konstante	[mol/L]
k	Reaktionsgeschwindigkeit	[1/s]
k_B	Boltzmann-Konstante	[J/K]
k_L	Stoffübergangskoeff.	[m/h]
$k_L a$	vol. spez. Stoffübergangskoeff.	[1 / h]
$k_{n,\infty}$	Frequenzfaktor des Fraktionüberganges	[1/s]
Lo_2	Sauerstofflöslichkeit	[mol/L]
n	Schütteldrehzahl	[rpm]
n	Brechungsindex	[-]
OCR	volumetrischer Sauerstoffverbrauch	[mol / L / h]
OTR	volumetrischer Sauerstoffeintrag	[mol / L / h]
Q	Wärme	[J]
$\dot{Q}$	Wärmestrom	[J/s]
pH	pH-Wert	[-]
pO_2	Sauerstoffpartialdruck	[%]
R	Ideale Gaskonstante	[J/mol·K]
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute	[mol/L/h]
r_{max}	max. Reaktionsgeschw. bei Temperatur T	[mol /L/h]
T	Temperatur	[K]
TON	Turnover Number	[1/h], [mol/g/h]
$\dot{V}$	Volumenstrom	[m ³ /h]
V_L	Füllvolumen	[μL]
$[X]$	Konzentration der Substanz X	[mol/L]
α	Wärmeübergangskoeffizient	[W/m ² K]
ΔH	Aktivierungsenthalpie der Reaktion	[J/mol]
ΔS	Aktivierungsentropie der Reaktion	[J/mol·K]
δ	Wärmeleitstrecke	[m]
ε	Absorbanz der deprotonierten / protonierten HPTS-Form	[-]
λ	Wärmeleitkoeffizient	[W/m/K]
$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	Anregungs- / Emissionswellenlänge	[nm]
ρ	Dichte	[kg/m ³]
θ	Einfallswinkel	[°]

1 Einleitung

In der Natur spielen Enzyme eine tragende Rolle im Stoffwechsel lebender Organismen. Dabei zeichnen sie sich durch die Fähigkeit aus, komplexe Reaktionen unter physiologischen Umgebungsbedingungen in einem Schritt hochspezifisch zu katalysieren. Aus diesem Grund sind Enzyme auch industriell für Stoffumwandlungsprozesse von Interesse (Jaeger, 2004). Eine Reihe moderner Techniken, wie „*Directed Evolution*“, wurden auf dem expandierenden Gebiet der weißen Biotechnologie entwickelt, um der steigenden Nachfrage nach Enzymen gerecht zu werden (Jaeger and Eggert, 2004). Diese Techniken schafften erst eine hohe Diversität in Form von sog. Mutantenbibliotheken, um anschließend im Screening die besten Kandidaten auszusuchen und der Prozessentwicklung zur Verfügung zu stellen. Leistungsstarke Screeningtechniken stellen also eine wichtige Voraussetzung für die Findung neuer Biokatalysatoren dar (Reetz and Jaeger, 2002).

Um möglichst viele Kandidaten in einer möglichst kurzen Zeit messen zu können, wird durch Ansätze der Parallelisierung, Automatisierung und Miniaturisierung der Screeningdurchsatz maximiert. In diesem Zusammenhang wurde die sog. Mikrotiterplatte (MTP), eine definierte Anordnung von 48, 96, 384 oder 1536 Kavitäten im μL - oder mL -Format, als Plattform für Enzymtests etabliert. Eine Reihe von automatisierten, optischen Enzymtests wurde für die MTP'n entwickelt. In diesen Tests kann die Enzymanfangsaktivität verschiedener Kandidaten bzw. unter unterschiedlichen Bedingungen schnell getestet und verglichen werden. Allerdings lässt sich das komplexe Enzymverhalten in einem Prozess nicht anhand der Anfangsaktivität beschreiben. So verlieren Enzyme infolge der Deaktivierungsvorgänge im Laufe der Zeit ihre Aktivität. Vor allem die fehlende Prozessstabilität kann also bei zunächst vielversprechenden Kandidaten zu nicht ausreichenden Umsätzen und Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA) führen. Die vollständige Enzymcharakterisierung und die Messung des Aktivitätsverlustes auf der Zeitskala von Wochen oder Monaten sind jedoch mit dem angestrebten hohen Durchsatz nicht vereinbar. Die Screeningkriterien entsprechen somit nicht den Optimierungskriterien eines Industrieprozesses (Polizzi et al., 2007).

Boy et al. (1999), Boy et al. (2001) und Gibbs et al. (2005) schlugen mit der sog. „SMAS“ (Schnelle Methode zur Aktivitäts- und Stabilitätsbestimmung) erstmals eine Methode zur schnellen Enzymcharakterisierung vor, welche die Langzeitstabilität berücksichtigt. Vergleichbar mit Bruchtests in Materialwissenschaften werden Enzyme dabei teils extremen Bedingungen ausgesetzt, um das Langzeitverhalten unter moderaten Prozessbedingungen

vorherzusagen. Im Gegensatz zu einfachen Tests bei hohen Temperaturen basiert der Ansatz auf dem mechanistischen Verständnis der Aktivierungs- und Deaktivierungseffekte. Diese Effekte werden als temperaturabhängige Vorgänge mathematisch modelliert und durch die dynamische Temperaturführung im Experiment einzeln hervorgehoben und erfasst. Gelingt die vollständige Parametrisierung des mathematischen Modells, kann das Enzymverhalten analytisch berechnet oder simuliert werden. Somit lassen sich Prozessgrößen wie das TON oder die RZA als Funktionen der Prozessbedingungen voraussagen. Im Vergleich zu Langzeittesten wird also in wesentlich kürzerer Zeit die Prozessgröße nicht nur an einem Betriebspunkt ermittelt, sondern an allen Betriebspunkten innerhalb der Modellgültigkeit. Das SMAS-Prinzip wurde bisher in 1L-Rührreaktoren im kontinuierlichen Betrieb und im Fedbatch eingesetzt, sodass es sich zunächst nicht für das Hochdurchsatzscreening eignet.

Die Abbildung der Wirklichkeit eines Prozesses durch mathematische Gleichungen (mathematische Modellierung, SMAS) soll nun durch die definierte Übertragung der experimentellen Bedingungen ins praktikable Mikroformat (Modellierung durch Scale-Down) ergänzt werden. Eine solche komplementäre Modellierung der Prozesswirklichkeit durch mathematische Gleichungen und experimentelle Maßstabsübertragung zählt zu wichtigen Werkzeugen der Verfahrenstechnik (Vauck, 2000).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die SMAS in das screeningkompatible MTP-Format im Rahmen einer Kooperation zwischen der BASF AG und dem Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der RWTH-Aachen (BioVT) zu übertragen. Dabei bringt die BASF ihre Expertise in SMAS (Boy et al., 1999; 2001) sowie optimaler Versuchsplanung (Körkel, 2002) und Modellidentifizierung (Bock et al., 1981; 1987) in das Projekt mit ein. Die BioVT setzt ihre Expertise in der verfahrenstechnischen Charakterisierung von MTP'n (Hermann, 2001) und in der Entwicklung von online-Messtechniken im MTP-Format (Samorski et al., 2005) ein. Die SMAS-Technik im MTP-Format wird in Analogie zur Charakterisierung von Motoren am Motorprüfstand als „Enzymprüfstand“ bezeichnet.

Die Versuchsführung gemäß SMAS soll im MTP-Format erfolgen. Dabei bildet eine verfahrenstechnisch definierte Versuchsführung die Voraussetzung für die Übertragbarkeit der Screeningergebnisse in das Labor- bzw. Pilotformat. Unter Berücksichtigung der Experimentdauer von Stunden müssen die Fragestellungen des Stofftransfers, mögliche Limitierungen und Inhibierungen angegangen werden. Ferner soll die Regelung der Steuergröße Temperatur in MTP'n verwirklicht werden. Die technischen Voraussetzungen für

die online Überwachung der Reaktion sollen geschaffen werden. Schließlich soll durch die automatisierte Versuchsführung die Voraussetzung für die Etablierung einer Screeninganlage geschaffen werden. Die Ergebnisse der Apparaturentwicklung werden in Kap. 4, *Apparative Entwicklung des Enzymprüfstandes* präsentiert.

Für die online-Verfolgung der Reaktion im Reaktionsvolumen einer MTP von < 1 mL sind nicht invasive Enzymtests nötig. Entsprechende optische Assays sollen etabliert werden. Im Gegensatz zur üblichen Messung der Anfangsaktivität bei konstanter Temperatur im Minutenbereich sollen diese Assays im gesamten Temperaturbereich funktionieren und die Verfolgung der Reaktion während der gesamten Versuchsdauer von Stunden ermöglichen. Außerdem soll berücksichtigt werden, dass Substrate und Produkte einen Einfluss auf das Enzymverhalten besitzen (Zecchinon et al., 2005; Lejeune et al., 2001), sodass optisch aktive Modellsubstrate nicht in Frage kommen. Vielmehr sollen universelle Assays entwickelt werden, welche ganze Klassen von Reaktionen erfassen. Beispielhaft werden ein Assay für pH-aktive Reaktionen und ein Assay für sauerstoffverbrauchende Reaktionen entwickelt (Kap. 5, *Entwicklung optischer Methoden*).

Die ursprüngliche, intuitive Versuchsführung und –auswertung nach dem SMAS-Prinzip sollen durch ein iteratives Vorgehen aus optimaler Versuchsplanung, Experiment und Parameterschätzung ersetzt werden. Die Prozedur wird an Beispielen eines pH-aktiven Stoffsystems und eines sauerstoffverbrauchenden Stoffsystems in Kap. 6, *Modellbasierte Enzymcharakterisierung* erläutert.

Schließlich sollen im Kap. 7, *Enzymcharakterisierung am Enzymprüfstand*, die Ergebnisse der Enzymcharakterisierung beider Stoffsysteme anhand der Langzeitexperimente (1 Woche) im Laborformat (100 mL, 1000 mL) validiert und auf ihre zeitliche und räumliche Extrapolierbarkeit hin überprüft werden. An einem bekannten pH-aktiven Stoffsystem soll dabei getestet werden, inwiefern eine rationale Wahl des Enzyms aus mehreren Kandidaten, sowie der optimalen Prozesstemperatur anhand der modellbasierten Enzymcharakterisierung möglich ist. Im biochemisch nicht vollständig verstandenen, mehrstufigen, sauerstoffverbrauchenden System wird dagegen versucht das Verhalten eines Enzyms in Abhängigkeit von der Temperatur und der Konzentration anderer Reaktionsteilnehmer vorherzusagen.

2 Stand der Technik

2.1 Enzymcharakterisierung mit hohem Durchsatz

Eine Reihe moderner Techniken wurde auf dem expandierenden Gebiet der weißen Biotechnologie entwickelt, um der steigenden Nachfrage nach Biokatalysatoren gerecht zu werden (Jaeger, 2004; Jaeger and Eggert, 2004). Dabei wird die Verbesserung wirtschaftlich relevanter Enzymeigenschaften wie Aktivität, Selektivität und Stabilität angestrebt (Petrounia and Arnold, 2000; Bornscheuer, 2001; Robertson and Steer, 2004; Polizzi et al., 2007). Über die Mutation bereits vorhandener Enzyme schaffen solche Techniken, wie *Directed Evolution* (s. Abbildung 2.1) zunächst die notwendige Kandidatendiversität, um im nächsten Schritt die aussichtsreichsten rekombinanten Enzyme auszuwählen. Die Selektion der Kandidaten wird als „Screening“ bezeichnet. Die Wahl der Screeningparameter legt fest, welche Eigenschaften bei der *Directed Evolution* verbessert werden. Leistungsstarke Screeningtechniken sind also mitentscheidend für die Effizienz des gesamten Vorgangs (Reetz and Jaeger, 2002). Gleichzeitig wird im Screening ein hoher Durchsatz angestrebt.

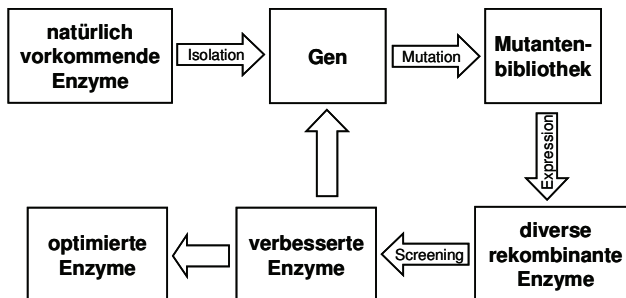


Abbildung 2.1: *Directed Evolution*: schematische Darstellung.

Yazbeck et al. (2003) liefern eine Übersicht über bestehende Screeningverfahren aus der Sicht der Pharmaindustrie. Nicht invasive optische Methoden spielen dabei eine bedeutende Rolle, da sie im Gegensatz zu invasiven Methoden, wie der Chromatographie, mehrfache Messungen in kleinen Probenvolumina erlauben. Heutzutage wird eine Reihe von Enzymassays in MTP'n eingesetzt, um die Enzymanfängsaktivität oder -selektivität mit hohem Durchsatz unter der Nutzung kommerzieller Fluoreszenz- oder Absorbanzreader zu

messen. Neben den Aktivitätsmessungen können auch Methoden zur Beurteilung der räumlichen Enzymstruktur (Konformation) Informationen über das Enzymverhalten liefern. Zu diesen Methoden zählen vergleichsweise einfache Techniken, wie Kalorimetrie oder Tryptophanfluoreszenz, aber auch komplexere, wie Kristallstrukturanalyse. Auf Grund des nicht ausreichenden Durchsatzes werden diese Methoden nicht im Enzymscreening angewandt. Die Entwicklung entsprechender Techniken stellt den Gegenstand der gegenwärtigen Forschung dar: Aucamp et al. (2005) haben ein Hochdurchsatzverfahren zur Bestimmung der Enzymstabilität gegenüber denaturierender Wirkung von Lösungsmitteln und Additiven etabliert, welches auf der Messung der Tryptophanfluoreszenz in 96-Well-MTP'n basiert.

Die *in situ* Bestimmung der Langzeitstabilität von Enzymen (Prozessstabilität) stellt nach wie vor eine Herausforderung dar. Bis dato wird sie im industriellen Screening trotz des entscheidenden Einflusses auf wirtschaftlich bedeutende Prozessgrößen wie die Turnover Number (TON) oder die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) nicht berücksichtigt (Polizzi et al., 2007). Auf dem jetzigen Stand der Technik sind ausschließlich Batchreaktionen in MTP'n realisierbar. Daher ist die *in situ* Bestimmung der Enzymstabilität durch die Messung der Enzymaktivität über einen langen Zeitraum auf Grund von Substratlimitierungs- oder Inhibierungseffekten nicht umsetzbar. Die wiederholte Messung der Aktivität oder der Konformationsänderungen des gelagerten Enzyms liefert lediglich Aussagen über die Lagerstabilität des Enzyms. Diese ist nicht mit der *in situ* Stabilität gleich zu setzen, da sie nicht die stabilisierende bzw. destabilisierende Wirkung des Substrats berücksichtigt (Zecchinon et al., 2005; Nikolova et al., 2007). Allein kontinuierliche Experimente mit immobilisiertem Enzym oder in Membranreaktoren erlauben die Bestimmung der Prozessstabilität. Der Betrieb solcher Reaktoren ist jedoch zu aufwendig, um im Screening für hunderte Enzymkandidaten eingesetzt zu werden. Das stärkste Argument gegen Langzeitexperimente ist jedoch ihre Dauer von Wochen oder Monaten, insbesondere für die stabilsten Kandidaten. Diese Experimentendauer ist mit dem angestrebten hohen Durchsatz im Screening nicht vereinbar.

Ein Versuch die Prozessstabilität in das Screening einzubeziehen wird unternommen, indem Enzymkandidaten vor Aktivitätstests für einige Minuten bis Stunden hohen Temperaturen von 50 - 70°C ausgesetzt werden. Dabei wird angenommen, dass ein Kandidat, welcher kurzzeitig eine hohe thermische Belastung übersteht, auch über eine hohe Langzeitstabilität unter moderaten Prozessbedingungen verfügt. Bisher wurde jedoch kein allgemeiner mechanistischer Zusammenhang zwischen der Thermostabilität und der Langzeitstabilität

gezeigt. Der Vorteil von thermostabilen Enzymen liegt vielmehr in der erhöhten Aufreinigungs- und Prozesstemperatur (Zamost et al., 1991).

Zielfunktion (z.B. RZA)

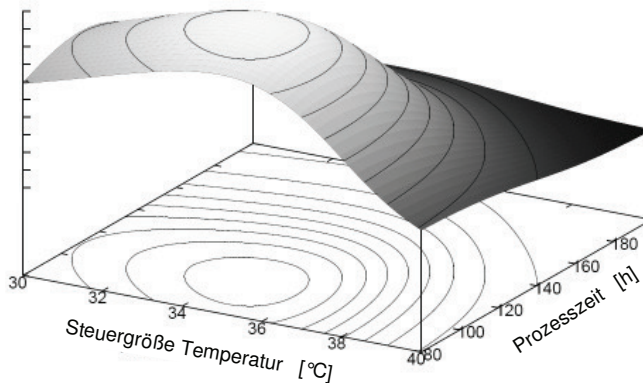


Abbildung 2.2: Das SMAS-Prinzip: Enzymverhalten wird als Funktion der Steuergröße Temperatur und der Zeit modelliert. Aus dem parametrisierten Modell lassen sich unterschiedliche Zielfunktionen berechnen und optimieren.

Boy et al. (1999), Boy et al. (2001) und Gibbs et al. (2005) schlagen mit der sog. *SMAS* (Schnelle Methode zur Aktivitäts- und Stabilitätsbestimmung) erstmals eine Methode zur schnellen Enzymcharakterisierung vor, welche die Langzeitstabilität berücksichtigt. Vergleichbar mit Bruchtests in Materialwissenschaften werden Enzyme dabei teils extremen Bedingungen ausgesetzt, um das Langzeitverhalten unter moderaten Prozessbedingungen vorherzusagen. Im Gegensatz zu einfachen Tests bei hohen Temperaturen basiert dieser Ansatz auf dem mechanistischen Verständnis der Aktivierungs- und Deaktivierungseffekte. Als temperaturabhängige Vorgänge mathematisch modelliert, werden sie durch die dynamische Temperaturführung im Experiment einzeln hervorgehoben und erfasst. Gelingt die vollständige Parametrisierung des mathematischen Modells (s. Abbildung 2.2), lässt sich das Verhalten des Enzyms analytisch berechnen oder simulieren. Somit lassen sich Voraussagen über die Prozessgrößen wie TON oder RZA als Funktionen der Prozessbedingungen treffen. Im Vergleich zu Langzeitexperimenten wird also in wesentlich kürzerer Zeit die Prozessgröße nicht nur an einem Betriebspunkt ermittelt, sondern an allen Betriebspunkten innerhalb der Modellgültigkeit. Das SMAS-Prinzip wurde bisher in 1L-Rührreaktoren im kontinuierlichen Betrieb und im Fedbatch eingesetzt, sodass es sich zunächst nicht für das Screening mit hohem Durchsatz eignet. Es ist jedoch wichtig

festzuhalten, dass mit SMAS erstmals die Möglichkeit besteht, die Zeit zur Bestimmung der Langzeitstabilität entscheidend zu reduzieren.

In Kap. 2.2 wird die modellbasierte Charakterisierung von Enzymen gemäß SMAS im Detail behandelt. In Kap. 2.3 wird auf den Stand der Technik auf dem Gebiet der verfahrenstechnisch definierten Versuchsführung in MTP'n eingegangen. Diese bildet die Voraussetzung für die Maßstabsübertragung von SMAS in ein Screeningkompatibles Format. In Kap. 2.4 wird der Stand der Technik in der online Versuchsüberwachung in MTP'n im Hinblick auf die Einsetzbarkeit für die SMAS-Methode diskutiert.

2.2 Modellbasierte Enzymcharakterisierung

Betrachtet wird eine enzymatisch katalysierte Reaktion. Das Systemverhalten wird über die fehlerbehaftete Messgröße (η) *Produktbildung* beobachtet. Die *Produktbildung* wird als Summeneffekt mehrerer Vorgänge, z. B. der *Enzymfaltung*, der *Produktbildungskinetik* und der irreversiblen *Enzymdeaktivierung*, modelliert. Diese Vorgänge sind im Modell über den Verlauf bestimmter differentieller (y) und algebraischer (z) Zustandgrößen beschrieben. Bestimmte Größen (z. B. die Temperatur in einem Versuchsaufbau mit Temperaturregelung) können vom Experimentierenden dem System aufgeprägt werden. Solche Größen werden als Steuergrößen bzw. Steuerfunktionen bezeichnet ($q, u(t)$). Neben den Zustandgrößen enthalten die Modellgleichungen Naturkonstanten sowie systemspezifische Koeffizienten: Modellparameter p . In den Grenzen der Modellgültigkeit bildet das Modell die Messgröße η durch die Modellantwort h ab. Die Identifizierung der Modellgleichungen und der Modellparameter, die das System ausreichend genau abbilden, wird als Enzymcharakterisierung bezeichnet. Bei der Enzymcharakterisierung werden also folgende Größen betrachtet:

Differentielle Zustände:	$y(t)$,
algebraische Zustände:	$z(t)$,
Steuergrößen und Funktionen:	$u(t), q$,
Modellparameter:	p ,
Messgröße :	η .
Modellantwort:	$h(t, y(t), z(t), u, q, p)$,
Messfehlermodell:	$\sigma(t, y(t), z(t), u, q, p)$,
einschränkende Bedingungen bezüglich:	$u(t), q, h(t, y(t), z(t), u(t), q, p)$.

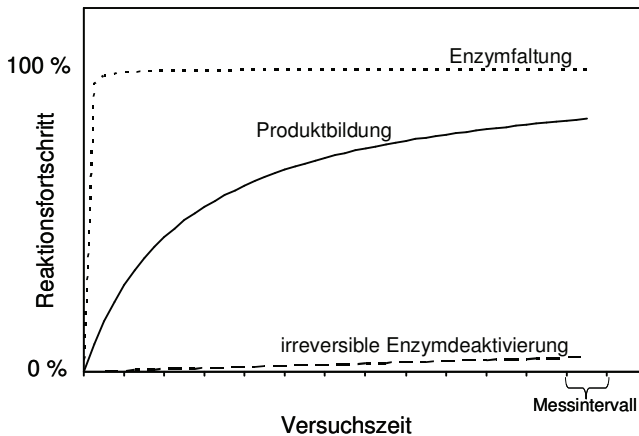


Abbildung 2.3: Enzymverhalten als multi-rate Prozess.

Bei der Modellierung muss berücksichtigt werden, dass das zeitliche Systemverhalten einen sog. *multi-rate* Prozess darstellt. Im Vergleich zur Dauer des Experiments und zum Intervall zwischen den Messungen sind die einzelnen Vorgänge unterschiedlich schnell. Dies wird in Abbildung 2.3 veranschaulicht. *Enzymfaltung* findet auf der Zeitskala von 10^{-9} - 10^{-3} s statt. Dies bedeutet, dass die Enzymfaltungskinetik im Vergleich zum Messintervall schnell ist und nicht beobachtet werden kann. Daher kann sie als ein sich unendlich schnell einstellendes Gleichgewicht angesehen werden. Schnelle Reaktionen werden also als algebraische Gleichungen modelliert.

Durch die Wahl der Enzymkonzentration wird die Reaktionsgeschwindigkeit der *Produktbildung* so eingestellt, dass im Rahmen der Messempfindlichkeit die Reaktion verfolgt werden kann. Da *Produktbildung* als Messgröße für die Systembeobachtung benötigt wird, darf die Reaktion während der Versuchsdauer nicht das Gleichgewicht erreichen. Der dynamische Prozess der Produktbildung wird als differentielle Gleichung modelliert.

Die irreversible *Enzymdeaktivierung* kann einen so langsamen Prozess darstellen, dass er auf der Zeitskala eines Experiments im Minuten- oder Stundenbereich nicht beobachtet werden kann. Im industriellen Prozess von Wochen oder Monaten ist der Einfluss dieser langsamen Deaktivierung jedoch nicht vernachlässigbar. Um die Deaktivierung im Experiment zu erfassen, muss sie beschleunigt werden. Dazu bedarf es einer Steuergröße, welche den Deaktivierungsvorgang beeinflusst. Die Temperatur stellt eine solche Steuergröße dar. Des

Weiteren kann dieser Einfluss, z. B. in Form des Arrheniusgesetzes (vgl. Kap. 2.2.1), mathematisch formuliert und somit im Modell abgebildet werden.

Beschleunigung langsamer Reaktionen ist jedoch nicht die einzige Bedeutung der Steuergröße Temperatur. Im Experiment werden nicht die einzelnen modellierten Vorgänge *Enzymfaltung*, *Reaktionskinetik* und *Enzymdeaktivierung*, sondern deren Summeneffekt *Produktbildung* beobachtet. Um den Einfluss der einzelnen Vorgänge zu erfassen, wird durch die Variation der Steuergrößen eine Vielfalt der im Experiment beobachteten Systemzustände angestrebt. Die Temperaturabhängigkeit einzelner Vorgänge ist im Allgemeinen unterschiedlich. Daher eignet sich auch an dieser Stelle die Temperatur als Steuergröße.

2.2.1 Modellierung des Enzymverhaltens

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur ist mikroskopisch gesehen eine komplexe Funktion der temperaturabhängigen Faltung des Enzyms und des Verhaltens der einzelnen Aminosäuren oder gar Atome im aktiven Zentrum. Auch das Substratmolekül verändert seine Eigenschaften unter dem Einfluss der Temperatur. Auf dem jetzigen Stand der Technik ist es nicht möglich die temperaturabhängige Wechselwirkung zwischen dem Enzym und dem Substrat so genau zu berechnen, dass ein vollkommener mechanistischer Zusammenhang formuliert werden kann (Roccatano et al., 2004):

$$\begin{aligned} \text{Aktivität} &= f(\text{Faltung}) \\ \text{Faltung} &= f(T) \end{aligned} \quad (2.1)$$

Des Weiteren liegt nicht für jeden industriell interessanten Enzymkandidaten die 3D-Struktur vor, welche die Voraussetzung für eine solche Beschreibung bilden würde.

Alternativ zu der mikroskopischen Beschreibung steht die Vorstellung, dass die unterschiedlichen Enzymfaltungen als diskrete Zustände (Fraktionen) angesehen werden können (Abbildung 2.4). Der Übergang von Zustand zu Zustand kann folglich als chemische, im Allgemeinen reversible Reaktion modelliert werden. Jedem dieser Zustände E_i entspricht eine bestimmte Aktivität.

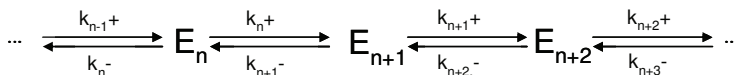


Abbildung 2.4: Vorstellung der diskreten Faltungszustände.

Ein Enzym lässt sich also durch die Angabe aller Reaktionskonstanten k_i sowie spezifischer Aktivität eines jeden Zustandes E_i beschreiben. Sowohl die Reaktionskonstanten der

Zustandswechsel als auch Reaktionskonstanten der Produktbildung (die Aktivitäten) sind dabei als Funktionen mehrerer Faktoren, vor allem der Temperatur, anzusehen. Alle Temperaturabhängigkeiten werden nach dem Arrheniusgesetz modelliert. Für die temperaturabhängige Produktbildung gilt:

$$r_{\max} = [E_n] \cdot A_{\infty} \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (2.2)$$

$r_{\max}$	max. Reaktionsgeschw. bei Temperatur T	[mol /L/h]
$[E_n]$	Enzymkonzentration	[g/L]
A_{∞}	Frequenzfaktor der Aktivierung	[mol / (g _{Enzym} · h)]
R	Ideale Gaskonstante	[J/mol·K]
E_a	Aktivierungsenergie	[J/mol]
T	Temperatur	[K]

Für den Übergang von Fraktion E_n zu Fraktion E_{n+i} in Abbildung 2.4 gilt:

$$k_n = k_{n,\infty} \cdot e^{-\frac{E_{n,a}}{RT}} \quad (2.3)$$

k_n	Reaktionsgeschw. des Fraktionüberganges	[1/s]
$k_{n,\infty}$	Frequenzfaktor des Fraktionüberganges	[1/s]
$E_{n,a}$	Aktivierungsenergie des Fraktionüberganges	[J/mol]

Das Arrheniusgesetz besagt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit exponentiell mit der Temperatur zunimmt. Die Aktivierungsenergie E_a ist dabei das Maß für die Temperaturempfindlichkeit der Reaktion. Allerdings gilt das Arrheniusgesetz für die Temperaturabhängigkeit der Reaktionen zwischen einatomigen Gasen. Es wurde aus der Vorstellung hergeleitet, dass Moleküle mit einer bestimmten kinetischen Energie E_a zusammenstoßen müssen, um den Übergangszustand ihrer Reaktion zu bilden. Tatsächlich erscheint es zunächst widersinnig, dass die Produktbildungsrate mit steigender Temperatur unbegrenzt zunimmt. Schließlich deaktivieren sogar die Enzyme thermostabiler Organismen bei Temperaturen um 100°C. Zumindest phänomenologisch lässt sich dieses Verhalten jedoch mit dem Arrheniusgesetz und dem Schema aus Abbildung 2.4 beschreiben. So wird bei wachsender Temperatur die stets steigende Enzymaktivität einer Fraktion (z. B. E_n) durch den Übergang zu einer anderen, wenig aktiven Fraktion (z. B. E_{n+i}) kompensiert. Bei hohen Temperaturen liegen somit nur wenige Enzymmoleküle im Zustand E_n vor. Die beobachtete Produktbildung ist dementsprechend niedrig. Das Arrheniusgesetz hat sich also in der Praxis als eine gute Näherung erwiesen. Ebenfalls gebräuchlich ist die Beschreibung der Reaktionsgeschwindigkeit nach Eyring:

$$r_{\max} = [E_n] \cdot \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot e^{\frac{\Delta G}{RT}} = [E_n] \cdot \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot e^{-\frac{\Delta H - T\Delta S}{RT}} \quad (2.4)$$

ΔH	Aktivierungsenthalpie der Reaktion	[J/mol]
ΔS	Aktivierungsentropie der Reaktion	[J/mol·K]
k_B	Boltzmann-Konstante	[J/K]
h	Planck'sches Wirkungsquantum	[J·s]

Die Eyring-Formel ist aus der Betrachtung der Thermodynamik von Reaktionen mit vorgelagertem Gleichgewicht hergeleitet worden. Daher beschreibt sie Enzymreaktionen mechanistisch korrekter als das Arrheniusgesetz. In dem für Enzymreaktionen interessanten Temperaturbereich zeigen die beiden Ansätze jedoch ein sehr ähnliches Verhalten. So lassen sich die beiden Formeln ineinander überführen:

$$\begin{aligned}
 A_\infty \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} &= \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot e^{-\frac{\Delta H - T\Delta S}{RT}} \\
 \Rightarrow A_\infty &= \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot e^{\frac{\Delta S}{R}} \\
 -\frac{E_a}{RT} &= -\frac{\Delta H}{RT}
 \end{aligned} \tag{2.5}$$

Formal ist es zwar nicht richtig, den temperaturunabhängigen Frequenzfaktor A_∞ mit dem temperaturabhängigen Term $\frac{k_B T}{h} e^{\frac{\Delta S}{R}}$ gleich zu setzen. Jedoch ist der Einfluss dieses Terms auf die Reaktionsgeschwindigkeit in dem für die Enzymkatalyse relevanten Temperaturbereich von 283 – 363 K vernachlässigbar gegenüber dem Einfluss des Exponentialterms. Wenn die thermodynamischen Parameter ΔS und ΔH bekannt sind, beispielsweise durch kalorimetrische Messungen, ist die Beschreibung nach Eyring sinnvoll (Collins et al., 2003). Wenn jedoch die Parameter A_∞ und E_a nur indirekt über die temperaturabhängige Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt werden können, ist es gerechtfertigt, das Arrheniusgesetz anzuwenden.

Die Vorstellung nach Abbildung 2.4 führt in der Praxis zu großen, nicht parametrisierbaren Modellen. Daher wird eine Reihe von vereinfachenden Annahmen benötigt. Eine solche Annahme ist die Einführung der irreversibel deaktivierten Enzymfraktion E_D (vgl. Abbildung 2.5). Der Übergang zu dieser nicht aktiven Fraktion entspricht einer für das Enzymmolekül energetisch günstigen Faltung, sodass die Wahrscheinlichkeit der Rückfaltung zur aktiven Fraktion vernachlässigbar klein ist. Daher werden weitere Umwandlungen der irreversibel deaktivierten Fraktion nicht berücksichtigt. Vielmehr werden die unterschiedlichen irreversibel deaktivierten Zustände zu einer Fraktion zusammengefasst. Auf diese Weise wird das komplexe Modell nach Abbildung 2.4 auf den für die Aktivität des Enzyms wesentlichen

Teil reduziert. Die einzelnen Reaktionskonstanten der irreversiblen Deaktivierung (vgl. Abbildung 2.5, $k_{n,D}$, $k_{n+1,D}$, $k_{n+2,D}$, etc.) können dagegen nicht gleichgesetzt werden.

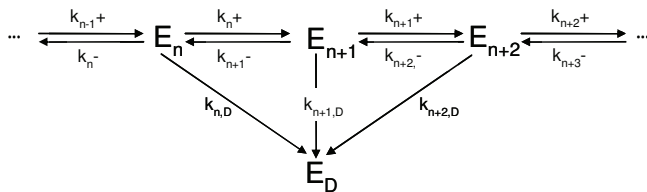


Abbildung 2.5: Vorstellung der diskreten Zustände nach Einführung des irreversibel deaktivierten Enzymzustandes E_D .

Weitere Vereinfachungen werden erreicht, indem die Zahl der berücksichtigten Fraktionen eingeschränkt wird oder manche Fraktionen als nicht aktiv („reversibel deaktiviert“) angenommen werden. In diesem Fall wird das Modell um die temperaturabhängige Aktivität dieser Fraktionen reduziert. Des Weiteren wird angenommen, dass sich das Gleichgewicht zwischen einzelnen Fraktionen E_n und E_{n+1} unendlich schnell einstellt. Diese Modellvorstellung ist mechanistisch sinnvoll. Lumry und Eyring (1953) zeigten, dass reversible Deaktivierung auf schnelle, spontane Veränderungen in der Tertiärstruktur (Enzymfaltung) zurückgeführt werden können, während irreversible Deaktivierung mit langsameren Veränderungen in der Sekundärstruktur einhergehen. Dementsprechend können die Reaktionskonstanten $k_{n,+}$ und $k_{n+1,-}$ zu einem Koeffizienten K zusammengefasst werden:

$$E_n \longleftrightarrow E_{n+1}$$

$$\frac{[E_{n+1}]}{[E_n]} = K(T) \quad (2.6)$$

Die Temperaturabhängigkeit des Koeffizienten K lässt sich unter Definition des Frequenzfaktors $A_{\infty,rev}$ und der Aktivierungsenergie E_{rev} der reversiblen Deaktivierung formulieren:

$$K(T) = \frac{[E_{n+1}]}{[E_n]} = \frac{k_{n+}}{k_{n+1-}} = \frac{A_{\infty,n+}}{A_{\infty,n+1-}} \cdot e^{-\frac{E_{a,n+1-} - E_{a,n+}}{RT}} = A_{\infty,rev} \cdot e^{-\frac{E_{rev}}{RT}} \quad (2.7)$$

Im Folgenden werden anhand von Beispielen aus der Literatur unterschiedliche, erfolgreich eingesetzte Modelle nach dem Schema in Abbildung 2.5 vorgestellt. Der einfachste Deaktivierungsweg beinhaltet die aktive Fraktion E_N , die deaktivierte Fraktion E_D und den Übergang von E_N zu E_D über eine Reaktion 1. Ordnung mit der temperaturabhängigen

Reaktionsrate k_D . Dieses Modell wurde für die Penicillin-G-Amidase verwendet (EC 3.5.1.11, Boy et al., 1999).



Hey and Clark (1993) schlagen ein Modell für die β -Galactosidase (EC 3.2.1.23) vor, welches die irreversible Deaktivierung und die reversible Deaktivierung vorsieht. Das Modellschema ist in Abbildung 2.6 gezeigt. Hierbei stehen eine aktive und eine reversibel deaktivierte Enzymfraktion im thermodynamischen Gleichgewicht. Die reversibel deaktivierte Fraktion geht über eine irreversible Reaktion 1. Ordnung in die vollständig denaturierte Form über. Die reversibel deaktivierte Fraktion stellt also eine Zwischenstufe auf dem Weg zur irreversiblen Deaktivierung dar. Die Summe aus reversibel deaktiverter und aktiver Fraktionen wird als „potentiell aktive Fraktion“ bezeichnet. Das Gleichgewicht zwischen nativer Enzymfraktion und reversibel deaktiverter Fraktion wird durch die Gleichgewichtskonstante $K(T)$ beschrieben (vgl. Gl. 2.6). Das Modell wird durch Gl. 2.9 mathematisch formuliert.

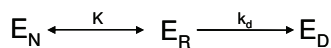


Abbildung 2.6: Schema der irreversiblen Deaktivierung aus dem reversibel deaktivierte Zustand.

$$K(T) = \frac{[E_R]}{[E_N]} \quad (2.9)$$

$$\frac{d([E_N] + [E_R])}{dt} = -k_d(T) \cdot [E_R]$$

Hei und Clark (1993) führten des Weiteren den Begriff der „Schmelztemperatur“ T_m ein, bei der nach einem 1-minütigen Inkubieren die Hälfte der Anfangsaktivität vorliegt. Ferner zeigten die Autoren, dass sich die Schmelztemperaturen eines spezifischen Enzyms je nach Medium um bis zu 10°C und die Aktivierungsenergien der irreversiblen Deaktivierung um den Faktor 2 unterscheiden können. Damit wurde bestätigt, dass es sich bei der temperaturabhängigen Enzymaktivität keineswegs um eine reine Stoffeigenschaft handelt, vielmehr stellt sie ein Ergebnis der Enzyminteraktion mit seiner Umgebung dar.

Das Deaktivierungsschema aus Abbildung 2.6 ist in der Lage eine Reihe von Phänomenen wie die Reversibilität der Deaktivierung bzw. schnelle und langsame Aktivitätsverluste abzubilden. Dieses Schema findet eine weite Verbreitung. Peterson et al. (2004) haben das Modell erfolgreich auf unterschiedliche Enzyme (Phosphatase EC 3.1.3.1, Adenosin-Deaminase EC 3.5.4.4, Aryl-Acylamidase EC 3.5.1.13, β -Lactamase EC 3.5.2.6) aus Pflanzen, Säugern sowie Mikroorganismen angewandt. Die Abkömmlinge dieses Modells,

z. B. aus Boy et al. (2001), sehen die irreversible Deaktivierung nicht ausschließlich aus der reversiblen, sondern auch aus der aktiven Fraktion vor (Abbildung 2.7a). Im allgemeinen Fall (Nikolova et al., 1997, Abbildung 2.7b) erfolgen die Deaktivierung aus der nativen und reversibel deaktivierten Fraktion mit unterschiedlichen Reaktionsraten.

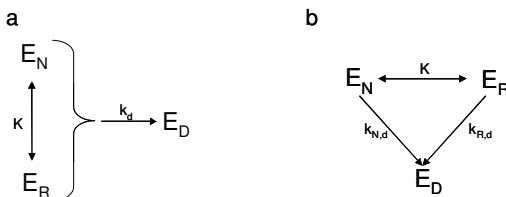


Abbildung 2.7: Schemen der irreversiblen Deaktivierung aus dem nativen und dem reversibel deaktivierten Zustand mit gleicher (a) und unterschiedlicher (b) Reaktionsrate.

Inwiefern die Annahme mechanistisch vertretbar ist, dass die irreversible Deaktivierung aus mehreren Fraktionen mit derselben Geschwindigkeit abläuft, hängt vom Stoffsystem ab. In Abbildung 2.7a wird angenommen, dass sich die aktive und die reversibel deaktivierte Form sehr ähnlich und somit im gleichen Maße dem irreversiblen Deaktivierungsvorgang unterworfen sind. Eine solche Vorstellung ist z. B. dann realistisch, wenn die Deaktivierung durch die chemische Interaktion mit einer im System vorliegenden, reaktiven Substanz erfolgt. Eine solche Reaktion ist häufig unabhängig vom Faltungszustand.

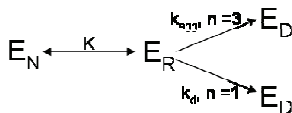


Abbildung 2.8: Schema eines Deaktivierungsmechanismus mit Agglomerationsanteilen.

Baptista et al. (2002) präsentierten eine Modellvorstellung, welche die Enzymdeaktivierung durch Agglomeration, also mit einer Reaktionsordnung >1, vorsieht. In Abhängigkeit von der Enzymkonzentration wird der Deaktivierungsvorgang (Abbildung 2.8) von der Reaktion 1. Ordnung oder 3. Ordnung dominiert. Durch aufwendige Messungen der Aktivität, der Tryptophanfluoreszenz und der Größenverteilungen sowie Maßnahmen zur Enzymstabilisierung wiesen die Autoren beide Deaktivierungswege nach. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die dynamische irreversible Deaktivierung aus einer reversibel deaktivierten Zwischenstufe stattfindet.

Vor allem unter Berücksichtigung der Tatsache, dass industriell eingesetzte Enzyme häufig nicht pur, sondern in Form von Mischungen aus mehreren verwandten Formen vorliegen, kann die Modellkomplexität beliebig erhöht werden. Auch die Berücksichtigung von Enzymaggregaten unterschiedlicher Größe, welche ein von Einzelmolekülen unterschiedliches Aktivitäts- und Deaktivierungsverhalten aufweisen, führt zu sehr komplexen Modellen. Polakovic and Vrabec (1996), Polakovic and Bryjak (2002), Azevedo et al. (1999) stellen Beispiele für die mögliche Modellvielfalt dar. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein beinahe universelles Enzymdeaktivierungsmodell nach dem Schema in Abbildung 2.5 existiert. In der Praxis wird das Schema jedoch meist auf < 6 Fraktionen eingeschränkt, um das Modell identifizierbar zu gestalten.

2.2.2 Experimente und ihre Auswertung

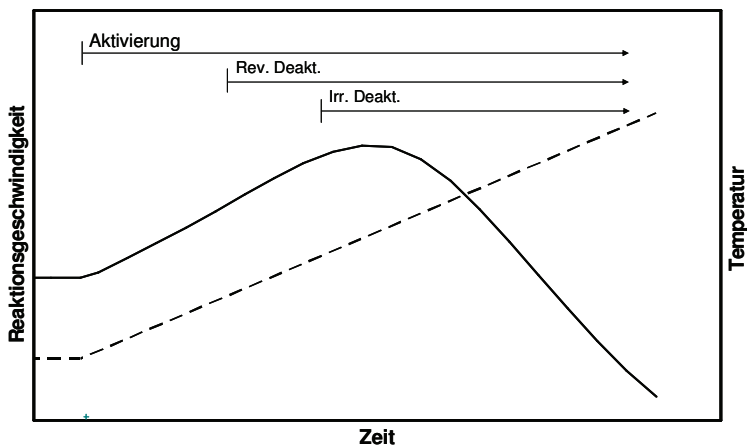


Abbildung 2.9: Qualitativer Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit (*durchgezogene Linie*) für das aufgeprägte Temperaturprofil einer Rampe (*gestrichelte Linie*). Einzelne modellierte Effekte werden jeweils ab einer bestimmten Temperatur beobachtet (*Pfeile*).

Die Experimente nach dem SMAS-Prinzip erfolgten bisher meist kontinuierlich in 1L-Rührreaktoren (Boy et al., 1999; Boy et al., 2001; Gibbs et al., 2005). Aus der Annahme, dass jeder modellierte Effekt sein spezielles Temperaturverhalten nach Arrhenius aufweist und bis zu einer bestimmten Temperatur nicht in Erscheinung tritt, resultiert das Temperaturprofil einer Rampe (Abbildung 2.9). Angefangen bei einem niedrigen Wert wird die Temperatur (*gestrichelte Linie*) langsam gesteigert. Die Reaktionsgeschwindigkeit (*durchgezogene Linie*) bei niedrigen Temperaturen wird dabei zunächst durch einen Effekt, die Aktivierung,

abgebildet. Ihre Arrhenius-Parameter werden ermittelt. Wenn das Verhalten bei höheren Temperaturen nicht mehr der reinen Aktivierung folgt, wird zusätzlich die reversible Deaktivierung berücksichtigt und entsprechende Parameter bestimmt. Bei weiterer Temperatursteigerung werden schließlich die Parameter der irreversiblen Deaktivierung identifiziert.

In der Praxis ist das Vorgehen gemäß Abbildung 2.9 mit Schwierigkeiten verbunden, da sich einzelne Effekte in ihrem Temperaturverhalten häufig ähneln. Daher wird in Experimenten versucht, einzelne Effekte anhand anderer Merkmale wie die *Reversibilität* oder die *Dynamik* zu identifizieren. Zu diesem Zweck eignen sich Profile mit sich periodisch wiederholender Temperatur (Identifizierung der Reversibilität) oder Bereiche konstanter Temperatur (Identifizierung dynamischer Vorgänge).

Die implementierten Temperaturprofile haben folgende Aspekte gemeinsam:

- Sie beginnen bei niedrigen Temperaturen, um das sofortige spontane Schmelzen bei Fehleinschätzung des Temperaturverhaltens zu vermeiden.
- Sie basieren zwar auf der Modellanalyse, stellen jedoch nicht die Lösung eines Optimierungsproblems im Sinne der Versuchsplanung dar.
- Sie haben zum Ziel, einzelne Effekte getrennt zu betrachten und getrennt, Schritt für Schritt auszuwerten.

Die letzten beiden Punkte hängen zusammen und offenbaren eine wichtige Einschränkung der Methode: Der Informationsgehalt der Experimente ist nicht optimal, da er einer oberflächlichen Betrachtung des Modells und nicht der Lösung eines Optimierungsproblems entspringt. Gleichzeitig basiert die Auswertung der Experimente auf einer gleichermaßen oberflächlichen Modellanalyse, sodass das Ergebnis einer komplexeren Versuchsplanung trotz seines höheren Informationsgehaltes nicht auswertbar wäre. Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der numerischen Planung und Auswertung optimierter Experimente.

2.2.3 Numerische Planung und Auswertung von Experimenten

Parameterschätzung

Um ein Modell für eine realistische Simulation eines Prozesses verwenden zu können, ist eine genaue Kenntnis der Parameter erforderlich. Zu ihrer Bestimmung werden Experimente durchgeführt und mit den Methoden der Parameterschätzung ausgewertet. Das Parameterschätzproblem besteht in der Minimierung von gewichteten Fehlerquadraten auf

den Differenzen der Messwerte und der Modellantworten (Bard, 1974; Körkel, 2002, Gl. 2.10). Die Gewichte sind die Standardabweichungen:

$$\min \frac{1}{2} \sum_{i=1}^M \left(\frac{\eta_i - h_i(t_i, y(t_i), z(t_i), p, q)}{\sigma_i} \right)^2 \quad (2.10)$$

Allgemein formuliert, sucht der Algorithmus einen Parametersatz p , welcher die durch Messwerte η repräsentierten Messgrößen durch die Modellantwort h möglichst gut beschreibt. Dabei wird berücksichtigt, dass die fehlerbehafteten Messwerte keineswegs mit dem Verlauf der Messgrößen identisch sind. Vielmehr stellt ein Fehlermodell einen Zusammenhang zwischen dem „naturgegebenen“ Wert der Messgröße und der Wahrscheinlichkeitsverteilung der Messwerte her. Dem Fehlermodell der Messung steht also eine entscheidende Bedeutung in der Gewichtung von Messdaten zu, welche in der Praxis häufig unterschätzt wird. Im Rahmen dieser Arbeit finden sich Beispiele für unterschiedliche Fehlermodelle (vgl. Kap. 5.1.3, 5.2.2). Der Erfolg der Parameterschätzung lässt sich über drei Kriterien bewerten:

1. Ist die Qualität der Anpassung ausreichend?
2. Ist die Parametersignifikanz ausreichend?
3. Ist das Modell prädiktiv (in der Lage experimentelle Ergebnisse vorherzusagen)?

Das erste Kriterium prüft, ob das Modell und der Schätzalgorithmus in der Lage sind einen Parametersatz zu finden, welcher im Rahmen des definierten Fehlermodells das im Experiment beobachtete Verhalten beschreibt. Qualitativ liefert die Überlagerung der mit Fehlerbalken versehenen Messwerte und der Anpassung die erste Bewertung der Schätzgüte („overlay chart“). Eine zusätzliche Information bietet die Verteilung der Residuen („residual chart“). Eine nicht zufällige Verteilung der Residuen deutet auf Unzulänglichkeiten im Modell oder systematische, nicht normal verteilte Messfehler hin. Z. B. kann auf Grund des pH-Elektrodrifts der gemessene pH-Wert den wahren pH-Wert systematisch überschätzen.

Das zweite Kriterium beschäftigt sich mit der Frage, wie genau die Parameter geschätzt sind. Die Bewertung der Signifikanz erfolgt anhand der Konfidenzen von geschätzten Parametern. Die Konfidenz definiert Grenzen, in denen der wahre Parameterwert mit einer festgelegten Wahrscheinlichkeit liegt. Häufig werden 95% oder die Standardabweichung (ca. 68%) gewählt. Abbildung 2.10 verdeutlicht die Begriffe Signifikanz und Konfidenz. Zwei Ergebnisse der Parameterschätzungen sind als Wahrscheinlichkeitsverteilungen dargestellt. Der geschätzte Parameterwert $P_{1,2}$ ist bei beiden Schätzungen gleich. Die Signifikanz der Schätzung 2 (*durchgezogene Linie*) ist jedoch höher als die der Schätzung 1 (*gestrichelte Linie*). Mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 68% liegt der wahre Parameterwert P_2 im

Konfidenzintervall $(-\sigma_2; \sigma_2)$, während P_I in einem größeren Intervall $(-\sigma_1; \sigma_1)$ liegt und somit weniger genau bekannt ist.

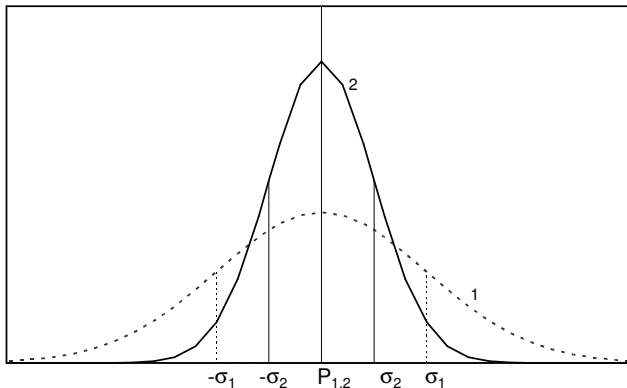


Abbildung 2.10: Wahrscheinlichkeitsverteilung zweier Parameterschätzungen. Beide Schätzungen liefern gleichen Parameterwert $P_{1,2}$. Die Signifikanz der Schätzung 2 (*durchgezogene Linie*) ist höher als die Signifikanz der Schätzung 1 (*gestrichelte Linie*).

Der Grund für fehlende Parametersignifikanz kann die Parameterkorrelation sein. Mit Konfidenzellipsen für bestimmte Parameterpaare, den Varianz-Kovarianz-Matrizen sowie den Korrelationsmatrizen (vgl. Anderson et al. 2003; Blobel and Lohrmann, 1998; Körkel, 2002) besteht eine Reihe von Instrumenten, welche die Erkennung der Korrelationen zwischen Parametern ermöglichen. Parameterkorrelationen können, zum einen, durch Fehlmodellierungen entstehen. Zum anderen werden die Parameterkorrelationen beobachtet, wenn das Experiment nicht in der Lage ist, die Wirklichkeit in der modellierten Komplexität abzubilden. Zum Beispiel, wenn isotherme Prozesse mit einem temperaturabhängigen Modell beschrieben werden. So ist es nicht möglich die Parameter A_∞ und E_a der Arrhenius-Beziehung (vgl. Gl. 2.2) anhand der Messung von r_{max} bei konstanter Temperatur zu schätzen. Entweder müssen die Experimente bei unterschiedlichen Temperaturen erfolgen, oder das Modell muss vereinfacht und um einen Parameter reduziert werden.¹ Dieses triviale Beispiel zeigt, dass die Schätzbarkeit der Parameter von der Gestaltung des Experiments abhängt, und führt somit auf das Problem der modellbasierten Versuchsplanung.

¹ Wenn Simulationen bei derselben konstanten Temperatur durchgeführt werden, wie die Experimente zur Bestimmung der Modellparameter, ist das Modell trotz fehlender Parametersignifikanz prädiktiv. Parametersignifikanz allein kann also nicht als Maß zur Bewertung der Voraussagekraft eines Modells gelten.

Die Prädiktivität eines Modells kann geprüft werden, indem die Modellvoraussagen mit experimentellen Ergebnissen verglichen werden, welche nicht für die Parameterschätzung verwendet wurden.

Versuchsplanung

Die Güte der Parameterschätzung, gekennzeichnet durch Konfidenzgebiete, wird in Abbildung 2.11 am Beispiel der Arrhenius-Parameter illustriert. Die Größe und Gestalt der Konfidenzgebiete hängt von den experimentellen Bedingungen ab. Experimente bei konstanter Temperatur liefern unsichere Parameterwerte (*grau hinterlegte Konfidenzellipse*), während Experimente bei unterschiedlichen Temperaturen in wesentlich sichereren Parameterwerten (*weiß hinterlegte Konfidenzellipse*) resultieren.

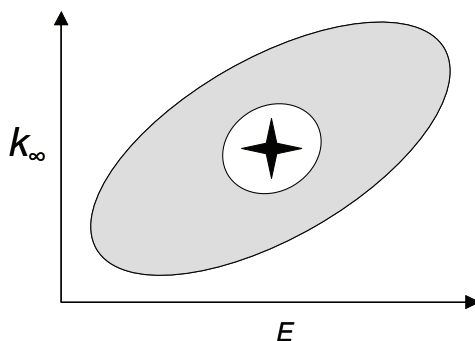


Abbildung 2.11: Einfluss des Experiments auf die Güte der Parameterschätzung kann durch die Konfidenzgebiete veranschaulicht werden. Grau: schlechteres Experiment, weiß: besseres Experiment.

Nach Körkel (2002) ergibt sich das Problem der Versuchsplanung aus dem modifizierten Parameterschätzproblem, das im Gegensatz zur Formulierung gemäß Gl. 2.10 den Einfluss der experimentellen Bedingungen und der Messwerte auf die Standardabweichung der Messung berücksichtigt:

$$\min \frac{1}{2} \sum_{i=1}^M \left(\frac{\eta_i - h_i(t_i, y(t_i), z(t_i), p, q)}{\sigma_i(y(t), z(t), q)} \right)^2 \quad (2.11)$$

Vereinfacht ausgedrückt ist es günstig, Experimente im Bereich der hohen Messgenauigkeit durchzuführen. Aus der Jacobimatrix im Lösungspunkt des Parameterschätzproblems wird die Kovarianzmatrix C (Körkel, 2002) berechnet:

$$C = f(\text{Jacobimatrix}) \quad (2.12)$$

Das Problem der Versuchsplanung liegt in der Minimierung der Funktion $\Psi(C)$ durch die Wahl der geeigneten Steuervariablen q und $u(t)$. Funktion Ψ kann unterschiedlich formuliert werden:

- das A-Kriterium, Minimierung der Spur der Varianz-Kovarianz-Matrix, bzw. der Summe aller Parametervarianzen:

$$\Psi_A(C) = \frac{1}{N_\theta} \sum_{\mu=1}^{N_\theta} (V_\theta)_{\mu,\mu}$$

- das D-Kriterium, Minimierung der Determinante der Varianz-Kovarianz-Matrix:

$$\Psi_D(C) = \det(V_\theta)^{\frac{1}{N_\theta}}$$

- das E-Kriterium, Minimierung des höchsten Eigenwertes der Varianz-Kovarianz-Matrix:

$$\Psi_E(C) = \lambda_{\max}(V_\theta).$$

Die Wahl der Funktion Ψ ist für den zweidimensionalen Fall in Abbildung 2.12 illustriert. Sie hängt mit der Gewichtung und der Skalierung einzelner Parameter zusammen.

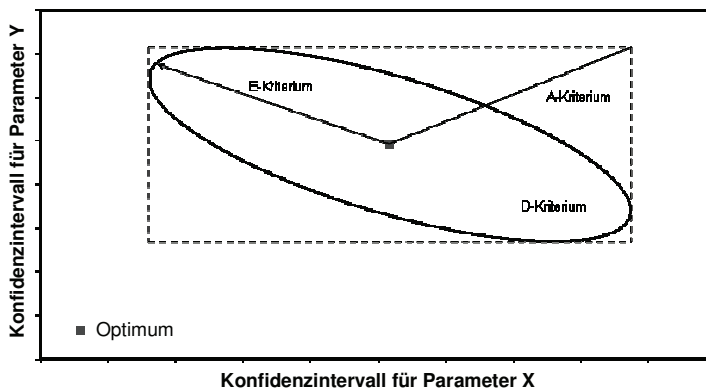


Abbildung 2.12: Geometrische Interpretation verschiedener Kriterien der Versuchsplanung für den zweidimensionalen Fall. A-Krit.: Rechteckdiagonale, D-Kriterium: Fläche der Ellipse, E-Kriterium längere Ellipsenachse.

Das der Versuchsplanung zugrunde liegende Gleichungssystem beinhaltet neben der Beschreibung des beobachteten Systems und des Fehlermodells auch die Einschränkungen des experimentellen Aufbaus (z. B. die maximale Messhäufigkeit oder maximal erreichbare

Temperatur). Im industriellen Umfeld kann der Messvorgang darüber hinaus mit erheblichem Aufwand und zeitabhängigen Kosten (Tagschicht / Nachtschicht) verbunden sein. In diesem Fall werden diese Faktoren in das Versuchsplanungsproblem integriert (Körkel, 2002).

Sowohl die Modellstruktur als auch der aktuelle Parameterwert (basierend auf vorherigen Schätzungen oder Vorwissen) spielt für die Versuchsplanung eine Rolle. Die Güte der Parameterschätzung hängt also von der Güte der Versuchsplanung ab und umgekehrt. Daher ist die Anwendung der Versuchsplanung und der Parameterschätzung im iterativen Verfahren sinnvoll.

Numerisch günstige Formulierung der Modelle

Der Erfolg der numerischen Parametrisierung hängt im hohen Maße von der Problemformulierung ab. Das Arrheniusgesetz wird durch einen mathematisch äquivalenten, jedoch numerisch stabileren und besser skalierbaren Ausdruck nach Bock et al. (2004) ersetzt:

$$k_{\infty} \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} = e^{(k_1 \frac{T_2^{-1} - T_1^{-1}}{T_2^{-1} - T_1^{-1}} + k_2 \frac{T_2^{-1} - T_1^{-1}}{T_2^{-1} - T_1^{-1}})} \quad (2.13)$$

$T_{1,2}$	frei wählbare Referenztemperaturen	[K]
$k_{1,2}$	natürliche Logarithmen der Reaktionsraten bei $T_{1,2}$	[1/s]

Algorithmen und Softwarepakete

Unterschiedliche Algorithmen zur numerischen Behandlung von Parameterschätzungs- und Versuchsplanungsproblemen (Gl. 2.10 und 2.11) sind in verschiedenen wissenschaftlichen und kommerziellen Softwarepaketen implementiert. Da der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit in der apparativen und bioverfahrenstechnischen Gestaltung des Enzymprüfstandes liegt, fand die Auseinandersetzung mit verschiedenen Algorithmen und Softwareplattformen auf reiner Anwenderebene statt. Daher wird an dieser Stelle kein Überblick über den Stand der Technik auf diesen Gebieten gegeben. In Kap. 3.1.3 wird ein knapper, Praxis orientierter Vergleich eingesetzter Softwarepakete aus der Sicht des Anwenders präsentiert.

2.3 Verfahrenstechnisch definierte Versuchsführung in MTP'n

Die Voraussage des Langzeitverhaltens durch die SMAS-Methode stellt eine zeitliche Extrapolation der Kurzzeiterperimente dar. Analog ist die Voraussage des Verhaltens im Labor- oder Pilotreaktormaßstab durch Experimente in MTP'n als eine räumliche Extrapolation anzusehen. Diese ist nur dann möglich, wenn Experimente in MTP'n unter verfahrenstechnisch definierten Bedingungen stattfinden. Dabei sind solche Aspekte wie die definierte Durchmischung oder die Sauerstoffversorgung in sauerstoffverbrauchenden

Stoffsystemen, aber auch Verdunstung zu berücksichtigen. Ferner ist die Regelung der Steuergröße Temperatur technisch zu verwirklichen.

Im Gegensatz zu vielen Enzymtests, welche die Enzymfangaktivität in der Zeitskala von Minuten messen und daher nicht an Fragestellungen der Stofftransport-, der Substratlimitierung und der Produktinhibierung stoßen, muss für SMAS die Reaktion über mehrere Stunden aufrechterhalten werden. Eine definierte Versuchsführung im Bereich von Stunden und Tagen in MTP'n wird bei der Kultivierung von Mikroorganismen verwirklicht. Der Stand der Technik auf diesem Gebiet wird in Kap. 2.3.1 erläutert. Die hohen Anforderungen von SMAS an die Temperaturregelung unterscheiden sich wesentlich von denen in den mikrobiellen Kultivierungen. Auf den Stand der Technik zur Temperierung von MTP'n wird daher gesondert in Kap. 2.3.2 eingegangen.

2.3.1 Verfahrenstechnische Charakterisierung der MTP'n

In den letzten Jahrzehnten wurde die Bioverfahrenstechnik vor die Aufgabe gestellt, Hochdurchsatzverfahren mit einhergehender Automatisierung zu entwickeln, um die durch die Molekularbiologie ermöglichten Proteinbibliotheken zu generieren und zu screenen. Seitdem wurde eine Reihe von Fortschritten in der verfahrenstechnisch definierten Durchführung und Überwachung von Kultivierungen mit hohem Durchsatz erzielt. Dieser hohe Durchsatz wird erst durch konsequente Miniaturisierung (Füllvolumen: 10^1 - 10^3 μ L) und Automatisierung ermöglicht.

Dabei werden prinzipiell zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Einerseits wird vielfach der Versuch unternommen einen miniaturisierten Rührkessel zu etablieren, welcher über die Möglichkeit des Feedings von Substrat und Stellmitteln, aber auch eine ausgereifte Messtechnik verfügt. Vorteile solcher Systeme liegen in der geometrischen Ähnlichkeit zum Laborfermenter, welche das Scale-Up erleichtert, in hohen erreichten Sauerstoff- und Leistungseinträgen und in der Regelbarkeit. Der Nachteil sind die enormen Kosten, die mit der Miniaturisierung und Parallelisierung einhergehen. Als kommerzialisiertes Beispiel für diesen Ansatz sei an dieser Stelle auf den Block aus 48 x 10 mL Reaktoren verwiesen (Weuster-Botz, 2005, Weuster-Botz et al., 2005). Der zweite Ansatz liegt in der Kultivierung in geschüttelten MTP'n mit Füllvolumina von 20 – 600 μ L. Die Vorteile dieses Ansatzes liegen in der Verwendung von sehr kostengünstigen MTP'n (~0,1 €/MTP), welche steril zu beziehen sind und als Einwegartikel verwendet werden. Als oberflächenbegaszte Reaktoren bedürfen sie keiner aktiven Begasung, sodass eine Schüttelmaschine ausreicht, um dutzende MTP'n zu durchmischen und mit Sauerstoff zu versorgen. Fernandes and Cabral, (2006)

betonen die Vorteile der Kostengünstigkeit, der einfachen Handhabung und der Einbindbarkeit von MTP'n in automatisierte Systeme. Tatsächlich hat sich das MTP-Format als Standard für automatisierte Pipettiersysteme durchgesetzt (Betts and Baganz, 2006). Somit entspricht es der Vision der kompletten Bioprozessentwicklung auf der Arbeitsfläche eines Pipettiersystems (Lye et al., 2003). In diesem Zusammenhang ist mit Systemen für die Aufreinigung von mikrobiellen Brühen (Lario et al., 2000, kommerzielle Lösung durch Fa. Qiagen, Hilden) die Grundlage für die vollautomatisierte Kultivierung mit Wirkstoffexpression, Aufreinigung und anschließende Analyse der expremierten Zielproteine im MTP-Format geschaffen. Mit slow-release Substraten besteht eine bereits kommerzialisierte Möglichkeit Fed-Batch-Reaktionen in MTP'n zu realisieren (Jeude et al., 2006, Jeude 2007). Darüber hinaus verspricht der Ansatz der Mikrofluidik mit vertretbarem apparativen Aufwand eine hochpräzise Zudosierung und Probenahme in MTP'n zu verwirklichen. Da die Mikrofluidik noch nicht zum etablierten Stand der Technik gehört, sei an dieser Stelle lediglich auf Büttgen et al. (2006) verwiesen.

Zum gravierenden Nachteil der MTP zählte bis vor einigen Jahren die fehlende verfahrenstechnische Charakterisierung, welche das Scale-Up erschwerte. Durch konsequente Untersuchungen konnte jedoch eine Reihe entscheidender Fortschritte erzielt werden. So haben Duetz et al., 2002 und John et al., 2003 mit Hilfe am Boden der MTP immobilisierter pH- und pO₂-Fluorophore die Durchmischung und den Sauerstoffeintrag erforscht. In Hermann et al., 2003, Hermann et al., 2001 wurde der Einfluss des MTP-Designs auf die Strömungsverhältnisse unter zahlreichen Betriebsbedingungen erfolgreich untersucht. In denselben Arbeiten sowie Kensy et al., 2005 wurde der maximale Sauerstoffeintrag in verschiedenen MTP'n charakterisiert. Durch die gewonnenen Erkenntnisse lassen sich Kultivierungen in MTP'n verfahrenstechnisch definiert durchführen. Der Nachteil für sehr weit verbreitete 96-Well-MTP'n ist dabei der relativ niedrige maximale Sauerstoffeintrag, welcher nicht an den in Rührkesseln heranreicht (Betts and Baganz, 2006). In diesem Zusammenhang werden neuartige Wellgeometrien entworfen und charakterisiert, welche die Hydrodynamik im Hinblick auf den Sauerstoffeintrag vorteilhaft verändern.

Neben der verfahrenstechnischen Charakterisierung von Mikrobioreaktoren wird auch verstärkt an online Messtechniken gearbeitet. Auf Grund der kleinen Reaktionsvolumina werden dazu nicht invasive, optische Verfahren bevorzugt. Abbildung 2.13 zeigt die Messanordnung aus Samorski et al., 2005, welche inzwischen zum kommerzialisierten Gerät *Biolector* (Fa. M2P-Labs, Aachen) entwickelt wurde. Bei dieser Messanordnung wird das Licht einer Xenonlampe durch einen optischen Filter geleitet und in ein Y-Lichtleiterbündel

eingekoppelt. Das Einzelfaser-Ende des Y-Lichtleiterbündels ist auf einen Mikrobioreaktor ausgerichtet. Das in Folge der Lichteinstrahlung von den Zellen und Metaboliten emittierte Nutzsignal (Streulicht und Fluoreszenz) wird in das Einzelfaser-Ende eingekoppelt. Das Nutzsignal wird dann durch das Y-Lichtleiterbündel zurück zum optischen Lesegerät geleitet, optisch gefiltert und von einem Photomultiplier detektiert.

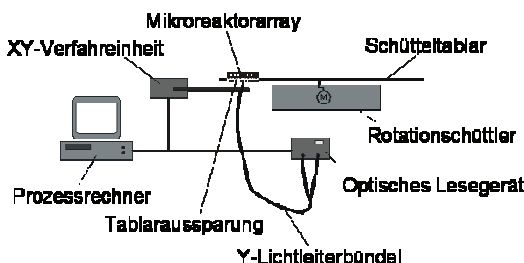


Abbildung 2.13: Schematische Darstellung des Messaufbaus für das geschüttelte Mikrobioreaktorsystem mit online Sensorik aus Samorski et al., 2005.

Zum Abscannen aller Reaktoren ist das Einzelfaser-Ende an eine XY-Verfahreinheit gekoppelt, die es erlaubt jedes Well der MTP einzeln anzufahren und zu vermessen. Um eine Messung ohne Unterbrechung der Schüttelbewegung zu ermöglichen, wird die XY-Verfahreinheit mit dem Schütteldurchmesser und der Reaktorgeometrie so abgestimmt, dass der Lichtfokus während der Messung in dem jeweils zu vermessenden Reaktor bleibt. Die Technologie erlaubt es quantitative online Daten aus MTP'n während der Kultivierung zu generieren.

Die beschriebenen Vorteile der MTP bei der mikrobiellen Kultivierung fallen beim Enzymtest noch stärker ins Gewicht. So ist die Kostengünstigkeit pro Reaktor ein entscheidender Faktor, wenn z. B. durch die *Directed Evolution* produzierte „nutzlose“ Klone in großen Zahlen aussortiert werden müssen. In Abwesenheit von Sterilitätsanforderungen vereinfacht sich die Automatisierung stark, sodass der Vorteil der Kompatibilität mit Pipettiersystemen von einer noch größeren Bedeutung ist, als bei mikrobiellen Kultivierungen. Der begrenzte Sauerstoffeintrag spielt bei sauerstoffverbrauchenden enzymatischen Reaktionen eine untergeordnete Rolle. Bei einer Hochzelldichtekultivierung werden die maximal mögliche Biomasse und die damit einhergehende hohe Atmung angestrebt. Bei Enzymreaktionen entscheidet dagegen der Anwender, wie hoch die Enzymkonzentration und somit wie hoch der Sauerstoffverbrauch eingestellt werden.

Die 96-MTP als Reaktorplattform und die Apparatur aus Abbildung 2.13 stellen die Grundlage für die Entwicklung des Enzymprüfstandes dar.

2.3.2 Temperierung von MTP'n

Der Stand der Technik in mikrobieller Kultivierung stellt eine solide Grundlage für die apparative Entwicklung des Enzymprüfstandes dar. Die Anforderung an die Temperierung am Enzymprüfstand ist jedoch einzigartig. So ist es ungewöhnlich die MTP einem Temperaturprofil auszusetzen. Für die meisten Anwendungen muss die Temperatur lediglich konstant gehalten werden. Darüber hinaus muss für die angestrebte Anwendung parallel zur Temperierung eine optische Messung erfolgen. Da die Messung von oben zum Beschlagen der Optik bei erhöhten Temperaturen führen würde, muss die MTP für den optischen Zugang unten offen bleiben. Daher ist das Eintauchen der MTP in ein Wasserbad oder ein Formschluss mit einem wärmeleitenden Gegenstück, wie sie bei einigen PCR-Modellen Anwendung finden, nicht möglich.

Bethge, 2002 setzt sich ausgiebig mit der Aufgabe der homogenen MTP-Temperierung bei gleichzeitiger optischer Messung auseinander. Dabei weichen die Anforderungen allerdings deutlich von denen des Enzymprüfstandes ab. Als Aufgabe wird eine möglichst schnelle, homogene Temperierung auf 37°C definiert. Das SMAS-Prinzip verlangt hingegen Temperaturen von bis zu 85°C sowie Aufprägung von steigenden und fallenden Temperaturprofilen. Auf dem jetzigen Stand der Technik werden die MTP-Reader mit Widerstandheizern temperiert und verwenden Luft als Wärmeübertragungsmedium. Dabei wird keine Konvektion erzwungen. Die Temperaturmessung (Ist-Temperatur für den Regelkreis) erfolgt außerhalb der MTP im Luftraum. In einer Reihe von Patenten (Hiroyuki, 1995; Horn et al., 1992; Verbruggen, 1989; Yamamoto, 1998) werden alternative Lösungen wie die Erwärmung über die erzwungene Konvektion, Verwendung einer elastischen Heizfolie für den Formschluss und Einbauten in den Wells oder Wellwänden vorgeschlagen. Zum Teil werden auch Lösungen vorgeschlagen, welche MTP'n aus wärmeleitenden Stoffen oder Einprägungen von Wärmeleitern in die MTP-Wände vorsehen. Solche Lösungen würden die wichtigsten Vorteile der MTP, die Kostengünstigkeit und die Einsetzbarkeit als Einwegartikel stark einschränken. Daher werden sie nicht näher betrachtet.

Neben der Erwärmung mit Widerstandheizern, werden in Bethge (2002) strahlungsbasierte Heizverfahren untersucht. Dazu zählen die Infrarotstrahlung unterschiedlicher Wellenlängen und die dielektrische Erwärmung. Diese Heizarten sind aus unterschiedlichen Gründen (z. B. Inhomogenitäten, Wärmeschäden an der MTP) weniger geeignet als die

Widerstandserwärmung. Beim Enzymprüfstand sind generell alle strahlungsbasierten Temperieransätze auf Grund des fehlenden Kühlpotentials ausgeschlossen. Alternativ erfolgt die Heizung in Bethge (2002) über eine Heizplatte, welche an den Boden der MTP gepresst wird und somit ausschließlich den optischen Zugang von oben zulässt. Dabei wird durch die Verwendung einer Dachheizung, welche eine höhere Temperatur als die MTP besitzt, das Beschlagen der Optik vermieden. Diese bei relativ niedriger Temperatur von 37°C funktionierende Maßnahme ist nicht auf den Enzymprüfstand mit Spitzentemperaturen um 85°C übertragbar. Die bei Bethge (2002) des Weiteren vorgeschlagene Erwärmung über die Außenwände der MTP bei offen bleibenden Ober- und Unterseite führt bei ausreichender Isolierung zur homogenen Temperaturverteilung beim Erreichen des thermodynamischen Gleichgewichts. Bei dynamischer Temperaturveränderung, hingegen, würden sich über die MTP Temperaturgradienten einstellen.

Neben verschiedenen Heizprinzipien werden in Bethge, 2002 unterschiedliche optische Temperaturmessmethoden getestet und diskutiert, welche eine nicht invasive und einfache Bestimmung der Temperaturverteilung in MTP'n erlauben. Eine dieser Methoden wird in modifizierter Form zum Nachweis der Homogenität der Temperaturverteilung am Enzymprüfstand eingesetzt (Schilling et al., 1993, Wolfbeiss et al., 1983, vgl. Kap. 5.3.3).

2.4 Reaktionsüberwachung in MTP'n

Optische Methoden zur online Überwachung von biochemischen Reaktionen im MTP-Format zeichnen sich durch ihre Nichtinvasivität aus. Dies ist wichtig, da das Reaktionsvolumen von 200 µL (vgl. Kap. 3.1.1) nicht für mehrfache Probenahmen geeignet ist, wie invasive, z. B. chromatographische Methoden sie verlangen würden. Der Nachteil optischer Methoden hingegen liegt in der begrenzten Universalität. Zumindest im sichtbaren Bereich besitzt nur die Minderheit der Substanzen eine messbare optische Aktivität und dementsprechend ist die Zahl der optischen Anwendungen und deren Informationsgehalt begrenzt. Einen alternativen Ansatz zu optischen Methoden bieten seit einigen Jahren intensiv entwickelte elektrochemische Sensoren (vgl. Krommenhoek et al., 2007) im MTP-Format. Sie ermöglichen beispielsweise die online Messung von pH-Wert, Sauerstoffkonzentration und Temperatur. Zu den Nachteilen elektrochemischer Sensoren zählt in erster Linie der Bedarf nach speziellen MTP'n mit eingebauten Sensoren. Auf dem jetzigen Stand der Technik ist es schwer abzusehen, ob solche MTP'n künftig zu konkurrenzfähigen Preisen angeboten werden können. Die optischen Methoden hingegen funktionieren mit gewöhnlichen MTP'n. Es werden lediglich Anforderungen an ihre Transparenz gestellt.

An dieser Stelle soll eine Übersicht über die optischen Methoden und ihre Anwendbarkeit gegeben werden. Grundsätzlich lassen sich folgende Anforderungen an eine geeignete Messmethode in MTP'n definieren:

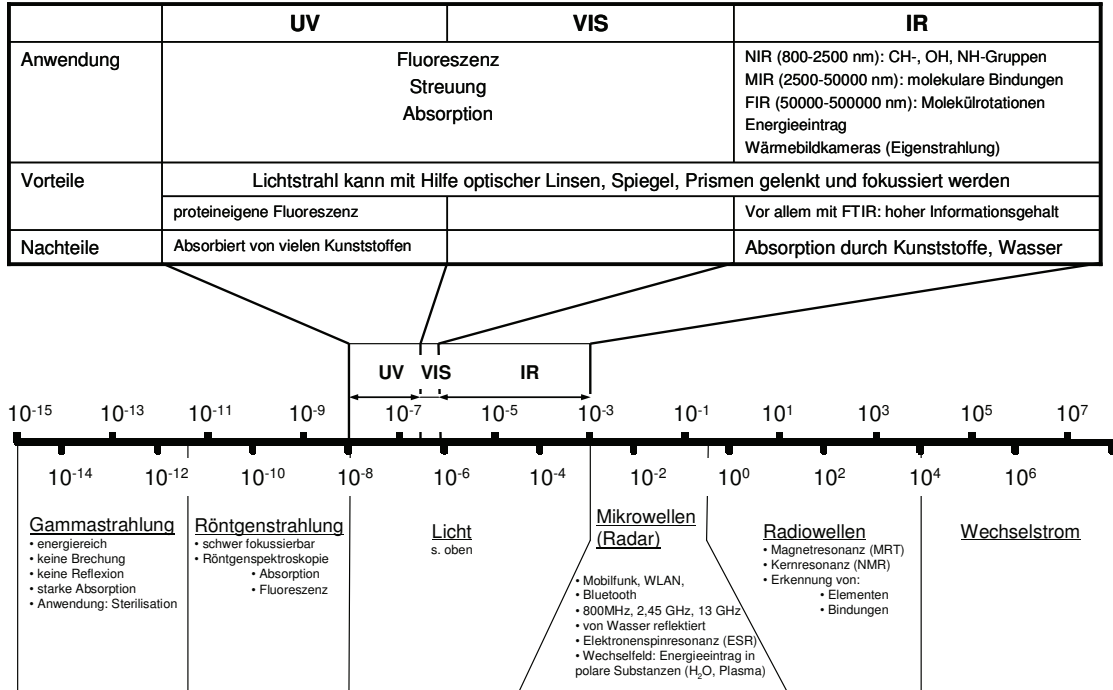
- Das Licht gelangt in das zu vermessende MTP-Well.
- Das Licht interagiert mit dem Reaktionssystem im Well und ändert dabei seine Eigenschaften (z. B. spektrale Eigenschaften, Intensität, Polarisation).
- Das Wellgut erfährt keine makroskopisch messbaren Veränderungen (Nichtinvasivität).
- Das Licht verlässt das Well, wird erfasst und ausgewertet.

Abbildung 2.14 bietet eine Übersicht über das Potential elektromagnetischer Strahlung verschiedener Wellenlängen für biotechnologische Messungen im MTP-Format. Die logarithmische Achse in der Mitte der Abbildung zeigt die Aufteilung der elektromagnetischen Wellen in Gammastrahlung, Röntgenstrahlung, Licht, Mikrowellen und Radiowellen. Im unteren Teil der Abbildung sind einige Eigenschaften dieser Wellen aufgelistet. Niedrige Wellenlängen sind zu energiereich, um als nicht invasiv zu gelten. Gammastrahlen werden beispielsweise zum Abtöten von Mikroorganismen eingesetzt. Die Wellenlängen höher als die des Lichts sind vom Informationsgehalt her sehr interessant. Z. B. werden die Radiowellen in solch informationsreichen Methoden, wie die Kernresonanz- und Magnetresonanztomographie eingesetzt. Auf der Größenskala eines MTP-Well (<1 cm, vgl. Kap. 3.1.1) sind diese Wellen jedoch im Nahfeldbereich und daher schwer handhabbar. Das Licht hingegen (10^7 - 10^4 nm, vergrößert dargestellt im grau hinterlegten Bereich in der Mitte der Abbildung) lässt sich fokussieren und wird in der Messtechnik im MTP-Format breit eingesetzt (Übersicht im oberen Teil der Abbildung). So bestehen eine Reihe von Assays, welche im sichtbaren Bereich solche Effekte wie Lichtabsorption, Lichtstreuung sowie Fluoreszenz nutzen. Im UV-Bereich werden proteineigene Fluoreszenzen wie Tryptophan- oder Tyrosinfluoreszenz gemessen (Lackowitz, 1999). Die Einschränkung bildet dabei begrenzte Transparenz vieler Kunststoffe für das UV-Licht (vgl. Tabelle 3.1). Auf dem jetzigen Stand der Technik nicht etabliert, jedoch sehr interessant sind Anwendungen im IR-Bereich. Erschwert durch die starke Absorption von IR-Licht durch die meisten MTP-Materialien sowie wässriges Wellgut besitzt IR den Reiz praktisch alle Stoffe auf Grund ihres besonderen „Absorptionsfingerabdrucks“ mit Hilfe von FTIR (Griffith, 1986) detektieren zu können. Unterschiedliche molekulare Bindungen, -OH, -CH oder -NH Gruppen besitzen ein wellenlängenabhängiges Absorptionsverhalten. Mit ATR („Attenuated Total Reflection“, vgl. Ausblick in Kap. 5.3 und Mirabella, 1998) besteht ein vielversprechender Ansatz IR-Messungen in Mikrotiteplatten zu verwirklichen (Perkin Elmer, 2005). Zurzeit ist jedoch nicht

absehbar, inwiefern sich die dazu notwendigen Materialanforderungen zu vertretbaren Preisen erfüllen lassen. Eine andere Anwendung des IR-Lichts liegt in Wärmebildkameras. Diese besitzen das Potential, eine jede wärmeaktive Reaktion zuverlässig zu erfassen und somit einen Enzymassay von hervorragender Universalität zu etablieren. Diese Technik ist allerdings am Enzymprüfstand nicht anwendbar, da die Temperatur hier gezielt von außen aufgeprägt wird.

Auf Grund ihrer zahlreichen Vorteile werden am Enzymprüfstand optische Assays zur Überwachung von Reaktionen in MTP'n etabliert, welche nach dem Stand der Technik den UV- und VIS-Bereich nutzen. In Kap. 4 wird auf die Eignung bestehender optischer Assays für die speziellen Anforderungen am Enzymprüfstand eingegangen und die Massnahmen zur Etablierung der gewählten Methoden beschrieben.

Abbildung 2.14: Übersicht über die elektromagnetischen Wellen und ihre potentialen messtechnischen Einsatz in biotechnologischen Anwendungen im MTP-Format.



3 Material und Methoden

3.1 Enzymprüfstand

3.1.1 Mikrotiterplatten

Als Reaktoren werden am Enzymprüfstand MTP'n, 96-Well-Mikrotiterplatten, eingesetzt. Diese stellen eine Anordnung aus 8 x 12 Kavitäten dar. Die Abmessungen von MTP'n sind gemäß ANSI-Standard auf Empfehlung der Society of Biomolecular Screening genormt: Länge 127,76 mm, Breite 85,48 mm, Höhe 14,35 mm. Das Nennvolumen einer jeden Kavität (im Folgenden wird die in der Biotechnologie etablierte Bezeichnung „Well“ verwendet) beträgt 370 μ L. Der Welldurchmesser beträgt 6,96 mm, die Höhe des Wells: 10,9 mm. MTP'n verschiedener Hersteller unterscheiden sich in ihren Fertigungsverfahren. Während die oben beschriebenen Abmessungen davon unberührt bleiben, ist die Gestaltung der Wellzwischenräume unterschiedlich. Aus technischen Gründen (vgl. Kap. 4.2.2) werden am Enzymprüfstand ausschließlich MTP'n mit flachem Boden (*F-Boden*) eingesetzt, deren Wellzwischenräume nach oben offen sind. Solche MTP'n aus Polystyrol werden vom Hersteller Greiner Bio-One (Solingen, technische Zeichnung in Abbildung 3.1) angeboten.

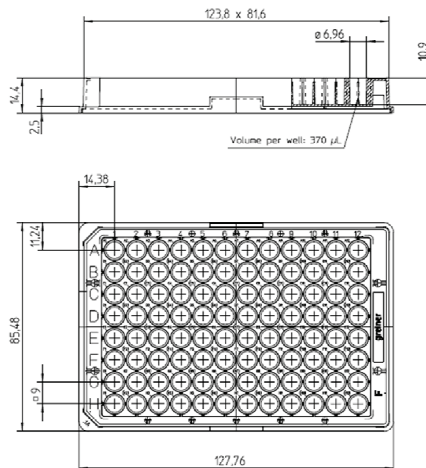


Abbildung 3.1: MTP-Zeichnung des Herstellers Greiner Bio-One.

Je nach Anwendung wurden unterschiedliche Ausführungen der MTP'n eingesetzt (s. Übersicht in Tabelle 3.1). Für die Messungen der Gelöstfluoreszenz im sichtbaren Bereich (Kap. 5.1.1) wurden Platten mit optisch klarem Boden und schwarzen Wellwänden gewählt, um die Beeinflussung des optischen Signals in einem Well durch das aus einem anderen Well transmittierte Licht (*Crosstalk*) zu vermeiden. Für Tryptophan-Messungen im UV-Bereich (Kap. 5.3.1) wurden spezielle Platten mit UV-durchlässigem Boden verwendet, dessen Eigenfluoreszenz im Vergleich zu Polystyrol gering ist. Für die Messungen des Sauerstoffpartialdrucks pO_2 (Kap. 5.2.1) wurden MTP'n mit immobilisierten Sauerstoffsensoren (OxoPlate, Fa. PreSens, Regensburg) eingesetzt.

Tabelle 3.1: Übersicht über die eingesetzten MTP'n.

Anwendung	Beschreibung	Bezeichnung
Messungen im VIS-Bereich	Schwarze Platten mit klarem Boden	µclear, 96-schwarz, 655087, Greiner Bio-One
Messungen im UV-Bereich	Platten mit UV-durchlässigem Boden	96-UV-star, 655801, Greiner Bio-One
pO_2 -Messungen	Platten mit immobilisierten O_2 -Sensoren	Flat-bottom OxoPlate OP96C, Fa. PreSens, Regensburg, auf Basis von MTP'n von Greiner Bio-One-Platten

3.1.2 Geräte

Die entwickelte Apparatur stellt ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit dar. Ihre Beschreibung ist der Gegenstand von Kap. 4: *Apparative Entwicklung des Enymprüfstandes*. Hier werden lediglich die verwendeten Apparate aufgelistet und anhand ihrer wichtigsten technischen Merkmale beschrieben.

Um eine Durchmischung in MTP'n zu gewährleisten, wird die Schüttelmaschine der Fa. Kühner (Modell LS-W, Birsfelden, Schweiz) eingesetzt, welche ungewöhnlich hohe Drehzahlen von bis $n = 1000$ rpm und einen ungewöhnlich kleinen Schütteldurchmesser $d_0 = 3$ mm ermöglicht. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Schüttelbedingungen sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Tabelle 3.2: Übersicht über die verwendeten Schüttelbedingungen in MTP-Experimenten.

Schüttelparameter	Wert	
Schütteldrehzahl n	600 rpm (Oxidasesystem, vgl. Kap. 3.2.2)	800 rpm, alle anderen Stoffsysteme
Schütteldurchmesser d_0	3 mm	
Füllvolumen V_L	200 µL	

Die Temperierung der MTP'n erfolgt mit dem Thermostat Ecoline E306 (3,5 L, Lauda, Lauda-Königshofen). Die Ist-Temperatur für den Regelkreis des Thermostaten wird in einem

MTP-Well mit einem Pt - 100 Mini-Temperatursensor gemessen (T092, Heraeus, Hanau). Sämtliche Funktionen des Gerätes sowie die Abfrage von aktuellen Temperaturwerten werden über die Schnittstelle RS-232 angesteuert.

Die automatische Vorlage von Proben erfolgt mit Hilfe des Pipettierroboters MultiProbe IIex (Perkin Elmer, deutsche Vertretung in Rodgau-Jügesheim). Für die Pipettieraufgaben stehen an dem verfahrbaren Arm vier Pipettierspitzen zur Verfügung. Diese können über einen jeweils eigenen Motor unabhängig voneinander in vertikaler Richtung bewegt werden. Zudem besteht die Möglichkeit den Abstand zwischen den einzelnen Spitzen zwischen 9 und 20 mm über einen weiteren Antrieb zu variieren. Das Pipettieren erfolgt über eine peristaltische Pumpe, die primär für Flüssigkeitsmengen im ml-Bereich verwendet wird. Für das Pipettieren kleinerer Flüssigkeitsmengen bis in den einstelligen μL -Bereich wird für die vier Spitzen jeweils eine Spritzenpumpe eingesetzt. Die Kommunikation zwischen PC und Roboter findet über eine CAN-Bus Schnittstelle statt.

Für Fluoreszenzmessungen wird das Fluoreszenzspektrometer FP-6300 (Jasco-Germany, Gross-Umstadt) eingesetzt. Dieses Gerät verfügt mit stufenlos verstellbaren Monochromatoren (200 – 750 nm, Bandbreite 2,5 – 20 nm) auf der Anregungs- und Emissionsseite über die notwendige Flexibilität, um unterschiedliche optische Messmethoden im UV- und VIS-Bereichen zu verwirklichen. Die Signalerfassung erfolgt in einem Photomultiplier. Das Gerät wird über das direkte Senden und Empfangen von Befehlen über die Schnittstelle RS-232 angesteuert. Um die Messung außerhalb der Messkammer des Fluoreszenzspektrometers in einer MTP zu ermöglichen, wird ein Lichtwellenleiter verwendet. Ein Fabrikat aus Quarz der Fa. Prinz Optics GmbH (Stromberg) wurde auf Grund seiner Transmissionseigenschaften im Bereich UV - NIR gewählt. Der Bündeldurchmesser des Lichtwellenleiters liegt mit 5 mm ungewöhnlich hoch, um den Lichtdurchsatz zu maximieren. Der vergrößerte Bündeldurchmesser geht mit erhöhter Steifigkeit des Lichtwellenleiters einher, sodass ein Umlenkspiegel eingesetzt werden muss, um den Lichtstrahl auszurichten. Ein Umlenkspiegel mit einer für die Reflexion von UV-Licht konzipierten Oberfläche aus „RAL UV“ der Firma LINOS (Göttingen) wurde auf Grund des hohen Reflexionsgrades von mindestens 80% im ungewöhnlich breiten Wellenlängenbereich von 200 - 800 nm gewählt.

3.1.3 Software

Ansteuerung der Apparatur und Auswertung der Messsignale

Zur Bedienung des Pipettierroboters wird die Software *WinPREP* (Version 1.16.0209, Perkin Elmer) verwendet. Diese Software zeichnet sich durch einen hohen Flexibilitätsgrad aus. So können neben vordefinierten Standard-Aufbauten (MTP'n, Pipettierspitzenboxen etc.) auch spezielle Konstruktionen, wie die in die Arbeitsfläche hineinragenden, externen Geräte, mit geringem Aufwand definiert und über ein Hilfsprogramm etabliert werden. Ferner sieht die Software neben der sequentiellen Benutzung der vordefinierten Funktionen die Möglichkeit der Eigenprogrammierung vor. In Abbildung 3.2 ist der Strukturbaum eines *WinPREP*-Programms beispielhaft gezeigt. Standardpipettieraufgaben werden zusammen mit selbst programmierten Skripten sequentiell abgearbeitet. Für das Schreiben der Skripte muss die von Perkin Elmer entwickelte Programmiersprache *MSL* verwendet werden. *MSL* basiert auf dem C-Interpreter *CEL*, ist aber in wesentlichen Punkten im Vergleich zu *ANSI C* nach Standard ISO/IEC 9899:1999 eingeschränkt. Im Gegenzug ist eine Auswahl von ca. 40 der meistverwendeten C-Funktionen bereits implementiert. Darüber hinaus steht eine breite Palette an *WinPREP*-spezifischen Funktionen zur Verfügung. Diese so genannten *MSL*-Funktionen dienen vor allem der Ansteuerung der Motoren und Pumpen des Roboters, der COM-Schnittstellen sowie der Erstellung grafischer Bedienoberflächen. Die Quellcodes der implementierten Funktionen sind Anhang D, *Software zur Ansteuerung des Enzymprüfstandes*, zu entnehmen.

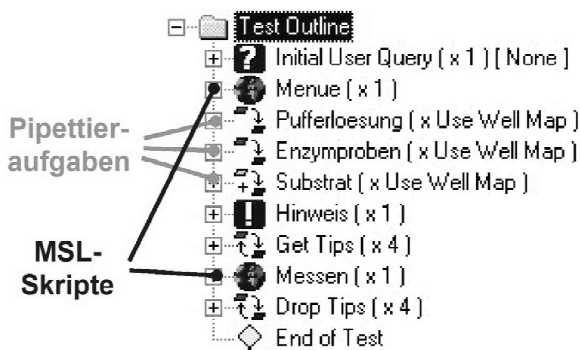


Abbildung 3.2: Strukturbaum eines *WinPREP*-Programms. Die Standardpipettieraufgaben (graue Pfeile) und selbst geschriebene Funktionen (schwarze Pfeile) werden sequentiell abgearbeitet.

Die Möglichkeiten von *MSL*-Funktionen im Bereich der Erstellung graphischer Bedienoberflächen sind stark eingeschränkt. Dieser Teil der Applikation, z. B. Auswahl der zu vermessenden Wells, wurde mit der Software *Microsoft Excel 2003* sowie *Microsoft Excel VBA* realisiert. *Excel VBA* ist eine eingeschränkt objektorientierte, von *Visual Basic* abgeleitete Programmiersprache, welche einen Zugriff auf *Excel*-Objekte wie Tabellenblätter, oder Zellen ermöglicht. Die Datenübergabe zwischen *Microsoft Excel* und *WinPREP* erfolgt über Textdateien. Die automatisierte Auswertung der Messsignale über die in Kap. 5.1 und 5.2 vorgestellten Schemata erfolgt ebenfalls über *Excel VBA*. Entsprechende Quellcodes sind Anhang D, *Auswertesoftware*, zu entnehmen.

Software zur Simulation, Parameterschätzung, Versuchsplanung

Mathematische Modelle zur Beschreibung untersuchter Stoffsysteme wurden bei der BASF unter den am Interdisziplinären Zentrum für Wissenschaftliches Rechnen, der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (IWR) entwickelten, nicht kommerziellen Softwarepaketen *PARFIT* (Bock et al., 1981; Bock et al., 1987) und *VPLAN* (Bauer et al., 1999; Körk, 2002) implementiert. Die Softwarepakete wurden in enger Zusammenarbeit mit der BASF entwickelt und anhand verfahrenstechnischer Fragestellungen validiert. Die für wissenschaftliche bzw. wissenschaftlich hochqualifizierte industrielle Anwendungen konzipierten Softwarepakete bieten im Vergleich zu üblichen kommerziellen Standards eine geringere Bedienerfreundlichkeit und erfordern ein höheres Maß am numerischen Verständnis. Gleichzeitig bietet die Software einem qualifizierten Benutzer mehr Flexibilität in der Wahl der Algorithmus-Einstellungen.

Bei BioVT wurden die mathematischen Modelle unter der kommerziellen Software *gPROMS* (Version 3.0.3, PSE, London, Großbritannien) zur dynamischen Simulation verfahrenstechnischer Prozesse implementiert. Im Vergleich zu den Softwarepaketen des IWR stellt *gPROMS* ein Kompromiss aus Bedienerfreundlichkeit und Leistungsfähigkeit dar (Schultze, 2007). So verfügt *gPROMS* über eine übersichtliche Architektur, eine einfache Syntax, eine Bibliothek aus vorprogrammierten Basismodellen und Schnittstellen zu anderen gängigen Softwarepaketen. Die implementierten Algorithmen haben sich bei der dynamischen Simulation unterschiedlichster verfahrenstechnischer Systeme bewährt. Auf verschiedenen Algorithmen basierende Funktionen, wie Simulation, Parameterschätzung und Versuchsplanung lassen sich von derselben Oberfläche aus aufrufen.

Während die Weiterentwicklung von IWR-Softwarepaketen in erster Linie in der Verbesserung eingesetzter Algorithmen besteht, wird bei *gPROMS* vordergründig an der

Bedienerfreundlichkeit gearbeitet (Schultze, 2007), die Modellbibliotheken werden erweitert und die Schnittstellen zur Kommunikation mit anderen Softwareplattformen geschaffen.

Für die beiden untersuchten Stoffsysteme (*Esterasesystem*, Kap. 3.2.1 und *Oxidasesystem*, Kap. 3.2.2) erfolgte die Implementierung und die Simulation mathematischer Modelle sowohl bei der BioVT als auch bei der BASF. Die Versuchsplanung und die Parameterschätzung für beide Stoffsysteme erfolgten jeweils unter *VPLAN* und *PARFIT* bei der BASF. Zusätzlich wurde an der BioVT unter *gPROMS* für das Oxidasesystem geprüft, ob diese Aufgabenpakete von einem nicht speziell ausgebildeten Anwender bearbeitet werden können. Die positive Antwort auf diese Frage bildet eine wichtige Voraussetzung für die routinemäßige Anwendung der Technik im industriellen Screening.

3.2 Stoffsysteme

Im Rahmen der Arbeit wurden zwei Stoffsysteme am Enzymprüfstand charakterisiert. In diesem Kapitel werden diese beiden Systeme, im Folgenden das *Esterasesystem* (Kap. 3.2.1) und das *Oxidasesystem* (Kap. 3.2.2), beschrieben. Weitere Stoffsysteme, welche z. B. zur optischen Temperaturmessung und zur Charakterisierung des Sauerstoffeintrages in MTP'n verwendet wurden, sind in Kap. 3.2.3 zusammengefasst.

3.2.1 Esterasesystem

Die Charakterisierung von pH-aktiven Reaktionen erfolgte am Beispiel der Esterase-katalysierten Hydrolysereaktion eines Esters zu einer Säure und einem Alkohol gemäß Gl. 3.1.



Als Modellsystem wurde dabei die Reaktion von Phenylelessigsäureethylester zu Phenylelessigsäure und Ethanol gewählt. Bei den beiden Modellesterasen von *Bacillus subtilis* aus der Arbeitsgruppe U. Bornscheuer (Institut für Biochemie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald) handelte es sich um die mesophile Esterase BpNBE (Henke et al., 2002) und die thermophile Esterase Bste (Henke and Bornscheuer, 2002), welche im Folgenden jeweils als *mesophile Esterase* und *thermophile Esterase* bezeichnet werden. Die Reaktanden wurden im Phosphatpuffer vorgelegt. Tabelle 3.3 bietet eine Übersicht über das Stoffsystem und die im Rahmen der Arbeit gewählten Konzentrationen.

Tabelle 3.3: Übersicht über das Esterasesystem.

Substanz	Summenformel	Standardkonz.	Konzentrationsbereich	Hersteller
Na-Phosphatpuffer	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$	30 mM	-	Roth, T877.1, K300.2
Phenyllessigsäureethylester	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$	30 mM	20-30 mM	Fluka, 78500
Phenyllessigsäure	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$	0 mM	0-10 mM	Fluka, 78490
Ethanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	10 % vol.	-	Merck, 1.00974.1011
HPTS	$\text{C}_{16}\text{H}_7\text{Na}_3\text{O}_{10}\text{S}_3$	20 μM	4-40 μM	Fluka, 56360
Esterase BpNBE	-	0,02 g/L	0-0,5 g/L	Gruppe Bornscheuer
Esterase Bste	-	0,08 g/L	0-0,5 g/L	Gruppe Bornscheuer

Die pH-abhängige Enzymaktivität (Reaktionsumsatz pro Enzymmenge und Zeiteinheit) jeder Charge wurde bei 25°C über die Titrationsmethode (vgl. Kap. 3.3.1) bestimmt. Sie betrug im optimalen pH-Bereich von $7,4 < \text{pH} < 8,3$ durchschnittlich:

$$\text{Aktivität}_{\text{mesophile Esterase}} = 0,37 \text{ [mol}_{\text{produkt}} / \text{g}_{\text{enzym}} / \text{min}]$$

$$\text{Aktivität}_{\text{thermophile Esterase}} = 0,10 \text{ [mol}_{\text{produkt}} / \text{g}_{\text{enzym}} / \text{min}]$$

Die ca. 4-fache Aktivität der mesophilen Esterase im Vergleich zur thermophilen erklärt das Verhältnis der Standardkonzentrationen beider Enzyme von $\frac{1}{4}$ in Tabelle 3.3. Die minimale Enzymkonzentration von 0 g/L bezieht sich auf Experimente zur Quantifizierung der nicht katalysierten Autohydrolysereaktion. Die maximale Konzentration von 0,5 g/L wurde bei den Messungen der enzymeigenen Tryptophanfluoreszenz (vgl. Kap. 5.3.1) eingesetzt. Die hohen Konzentrationen wurden benötigt, um die ausreichende Sensitivität der optischen Methode zu erreichen. Die chargenabhängige Variation der Enzymaktivität betrug ca. 20%. Beide Enzyme zeigten bei Raumtemperatur und Substratkonzentrationen $15 \text{ mM} < [\text{S}] < 50 \text{ mM}$ ein konstantes Aktivitätsverhalten. Bei niedrigeren bzw. höheren Substratkonzentrationen war die Aktivität herabgesetzt, was auf Limitierungs- bzw. Inhibierungseffekte hinweist. Da der pH-Wert im Laufe der Hydrolysereaktion abnimmt, wurde in fast allen Experimenten ein Start-pH-Wert von 8,2 gewählt, welcher im oberen Bereich des pH-Optimums liegt. Ausnahme bildeten Experimente, in denen der Einfluss des pH-Wertes auf das Enzymverhalten untersucht wurde. Auf Grund der nicht ausreichenden Substratlöslichkeit in Wasser, musste das Substrat in einem Lösungsmittel vorgegeben werden. Das Substrat wurde in Ethanol gelöst, und diese Lösung (10% vol.) dem Stoffsystem zupipettiert. Das Ethanol stellt im Esterasesystem nach Gl. 2.1 neben Phenyllessigsäure ein Reaktionsprodukt dar. Daher wäre ein kompetitiv inhibierender Einfluss auf die Reaktion zu erwarten. In Vorversuchen zeigte sich jedoch, dass bis zu einer Ethanolkonzentration von 10% keine Reaktionsverlangsamung stattfindet. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Ethanol in Abwesenheit von

Phenylelessigsäure nicht an das Enzym binden und inhibierend wirken kann. Der pH-abhängige Fluoreszenzfarbstoff HPTS nahm nicht an der Reaktion teil und diente als pH-Indikator (vgl. Kap. 5.1.1).

3.2.2 Oxidasesystem

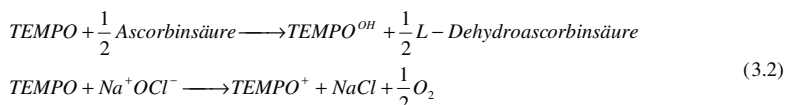
Beim untersuchten Stoffsystem handelt es sich um das sog. LMS: Laccase-Mediator-(Substrat) System. Dieses besteht aus folgenden Reaktanden: dem Enzym Laccase (eine Multi-Kupfer-Oxidase, Solomon et al., 1997; Grosser, 1985, Piontek et al., 2002, Bertrand et al., 2002), dem Mediator und dem Substrat. Ein Beispiel für den industriellen LMS-Einsatz ist das Lignozym-Verfahren zum Entfärben von Altpapier (Ligninabbau, Call and Mucke, 1997). Eine Reihe von Mechanismen für die Interaktion zwischen der Laccase, dem Mediator und dem Substrat wird in der Literatur beschrieben (Übersicht in Potthast, 1998). Bei dem im Rahmen des Oxidasesystems relevanten Mechanismus wird das Mediatormolekül durch die Laccase oxidiert. Das oxidierte Mediatormolekül reagiert anschließend mit dem Substrat und wird in einer weiteren Reaktion regeneriert. Der Mediator tritt also im LMS in unterschiedlichen Formen auf, welche die Zwischenprodukte des Reaktionssystems darstellen. Die Verwendung von Mediatoren besitzt zwei entscheidende Vorteile gegenüber der direkten Oxidation des Substrates durch Laccase:

- Im Gegensatz zur Laccase können die Mediatoren auch mit nicht phenolischen Substraten reagieren.
- Mit nicht wasserlöslichen oder stark polymerisierten Substraten können kleine, evtl. lösungsmittelbeständige Mediatormoleküle wesentlich effektiver reagieren als Laccase.

Tabelle 3.4: Übersicht über das Oxidasesystem. Mit *-Zeichen sind Stoffe markiert, welche zur Synthese eigentlicher Reaktanden des Oxidasesystems benötigt werden.

Substanz	Bedeutung	Summenformel	Standard-konz.	Konz-bereich	Hersteller
Acetat	Puffer	$C_2H_4O_2$	200 mM, pH 5	-	Roth, T133.1,
TEMPO	Mediator	$C_4H_{11}NO_3$	-	0-48 mM	Roth, 9090.3
TEMPO ⁺ BF ₄ ⁻ *	Mediator ⁺	$C_4H_{12}NO_3^+BF_4^-$	0 mM	0-12 mM	BASF
Methyl- α -D-Glucopyranosid	Substrat	$C_8H_{18}O_8$	-	0-10 mM	Sigma, M9376
Ascorbinsäure*	Herstellung von Mediator-OH	$C_6H_8O_6$	-	-	Roth, 3525.1
Natriumhypochlorit*	Herstellung von Mediator ⁺	NaOCl (10-13 %) + H ₂ O	-	-	Sigma 425044
Laccase	Katalysierendes Enzym	-	0,2 μ M	0,1-5 μ M	EC 1.10.3.2 BASF

Bei einem Teil der Stoffe (*-Zeichen in Tabelle 3.4) handelt es sich um Zwischenprodukte des LMS oder Chemikalien, welche zur Synthese solcher Zwischenprodukte benötigt werden. Der komplexe, biochemisch nicht restlos verstandene Reaktionsmechanismus des LMS spielt eine wichtige Rolle für die Versuchsplanung und das Verständnis der experimentellen Ergebnisse. Daher wird dieser Mechanismus und die Bedeutung der Zwischenprodukte im Zusammenhang mit experimentellen Ergebnissen in Kap. 7.2 diskutiert. An dieser Stelle werden lediglich die Reaktionsgleichungen zur Synthese der Zwischenprodukte aus dem Mediator TEMPO (Bobbit, 2005; Studer, 2001) präsentiert:



Bemerkung: Die Reaktion zur Herstellung von TEMPO⁺ sollte in flüssiger Umgebung stattfinden; bei Kontakt von Feststoffen besteht Explosionsgefahr.

3.2.3 Weitere Stoffsysteme

Sulfitsystem

Der Sauerstoffübergangskoeffizient k_{La} wird bei Temperaturen von ~30 - 40°C mit Hilfe des sog. Sulfitsystems bestimmt (Gl. 3.3).



Die entsprechende Methode basiert auf dem stoffübergangslimitierten Verbrauch des Sauerstoffs durch das Sulfitsystem. Die Zeit, die zum Verbrauch einer bestimmten Substratkonzentration benötigt wird, ist dabei proportional zum Sauerstoffübergangskoeffizienten. Das Verhalten des Sulfitsystems ist in starkem Maße temperaturabhängig, sodass es nicht im gesamten für den Enzymprüfstand relevanten Temperaturbereich eingesetzt werden kann (Linek and Vacek, 1981). So wäre z. B. bei einer Temperatur von 60°C die Reaktion im Sulfitsystem ohne Zugabe von Katalysator so schnell, dass der gesamte eingetragene Sauerstoff in der Grenzschicht zwischen Gasphase und Flüssigphase verbraucht werden würde. Das Sulfitsystem wurde nach Hermann et al. (2003) und John et al. (2003) angewandt. Tabelle 3.5 bietet eine Übersicht über die im Sulfitsystem eingesetzten Stoffe und deren Konzentrationen.

Tabelle 3.5: Übersicht über das Sulfitsystem.

Substanz	Bedeutung	Summenformel	Konz.	Hersteller
Na-Phosphat-puffer	Puffer	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 8	500 mM	Roth, T877.1, K300.2
Natriumsulfit	Reaktand	Na_2SO_3	500 mM	Roth, 8637.1
Cobaltsulfat	Katalysator	$\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	50 μM	Fluka, 60860

Optische Temperaturmessung

Die optische Temperaturmessung erfolgte in Anlehnung an Schilling (1993), Bethge (2002). Ihre Funktionsweise und Etablierung am Enzymprüfstand ist in Kap. 5.3.3 detailliert beschrieben. In der Tabelle 3.6 ist das Stoffsystem zur optischen Temperaturmessung vorgestellt.

Tabelle 3.6: Stoffsystem zur optischen Temperaturmessung.

Substanz	Bedeutung	Summenformel	Konz.	Hersteller
TRIS-Puffer	Puffer	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{-HCl}$	100 mM	Roth, 9090.3
HPTS	Fluoreszenz-farbstoff	$\text{C}_{16}\text{H}_7\text{Na}_3\text{O}_{10}\text{S}_3$	20 μM	Fluka, 56360

Umesterungssystem

Neben der Esterhydrolyse im Esterasesystem wurde eine weitere Esterase katalysierte Reaktion, die Umesterung, gemäß Gl. 3.4 betrachtet.



In Kap. 5.3.2 werden die Möglichkeiten zur Verfolgung dieser Reaktionsklasse diskutiert. In Tabelle 3.7 werden die im Umesterungssystem eingesetzten Stoffe aufgeführt. Die Experimente fanden ohne Enzym unter stöchiometrischer Variation der Edukte und Produkte statt. Unterschiedliche Lösungsmittel und Fluoreszenzfarbstoffe wurden getestet.

Tabelle 3.7: Übersicht über das Umesterungssystem.

Substanz	Bedeutung	Summenformel	Konzentration	Hersteller
n-Hexan	Lösungsmittel	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$	-	Fluka, 52770
Cyclohexan	Lösungsmittel	C_6H_{12}	-	Fluka, 28940
Na-Phosphat-puffer	Puffer	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 8	100 mM	Roth, T877.1, K300.2
Ethylacetat	Edukt 1	$\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$	0-50 mM	Fluka, 45780
Isoamyl-Alk.	Edukt 2	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	0-50 mM	Aldrich, W205702
Isoamylacetat	Produkt 1	$\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	0-50 mM	Aldrich, W205508
Ethanol	Produkt 2	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	0-50 mM	Merck, 1.00974.1011
2-Acetylanthracen	Fluoreszenzfarbstoff	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}$	0,1 g/L	Aldrich, 566780
Tryptophan	Fluoreszenzfarbstoff	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$	0,5 g/L	Sigma, T0254

Zweistufige Reaktion

Neben dem LMS im Oxidasesystem (vgl. Kap. 3.2.2) wurde ein weiteres, Oxidase katalysiertes Reaktionsschema gemäß Gl. 3.5 betrachtet (Groen et al., 1997).



Dabei können unterschiedliche Substanzen für R stehen. Das bei der Reaktion entstehende Wasserstoffperoxid H_2O_2 kann inhibierend bzw. deaktivierend auf die Oxidase wirken (Kleppe, 1966; Altomare et al., 1974), sodass es in einer Katalase katalysierten Folgereaktion entfernt werden muss:



In Kap. 7.3.2 wird auf die Problematik bei der Untersuchung solcher zweistufigen Reaktionssysteme am Beispiel des in Tabelle 3.8 vorgestellten Stoffsystems eingegangen.

Tabelle 3.8: Im zweistufigen Reaktionssystem eingesetzte Stoffe.

Substanz	Bedeutung	Summenformel	Konzentration	Hersteller
Glucose	Edukt	$C_6H_{12}O_6$	25-200 mM	Sigma, G8270
Hexose-Oxidase	Katalysator 1	-	6-12 U/mL	EC 1.1.3.5
Katalase	Katalysator 2	-	120-240 U/mL	EC 1.11.1.6

3.3 Methoden zur Validierung der Enzymprüfstandergebnisse

Die am Enzymprüfstand erzielten Ergebnisse wurden anhand von Methoden auf dem Stand der Technik validiert. Erstens wurden die entwickelten optischen Assays sowie Auswerteschemata zur Bestimmung der Enzymaktivität anhand von Standardmethoden geprüft. Zweitens wurden die Voraussagen des Enzymprüfstandes über das Langzeitverhalten untersuchter Stoffsysteme mit den Ergebnissen von Langzeitexperimenten verglichen (s. Kap. 7).

3.3.1 Validierung des pH-basierten Assays

Zur Validierung der entwickelten optischen pH-Messmethode zur Erfassung der Säurebildung im Esterasesystem wurden vergleichende pH-Wert-Messungen in einem gerührten 40 mL Becherglas bei einem Füllvolumen $V_L = 20$ mL mit einer pH-Elektrode (Mettler-toledo, Giessen, Drift: $\sigma_{pH} = 0,05$) durchgeführt. Zur Überprüfung des Auswerteschemas für die Berechnung der Produktbildung aus dem gemessenen pH-Abfall wurden darüber hinaus Titrationsexperimente durchgeführt. Dabei wurde die pH-senkende Wirkung des sauren Reaktionsproduktes durch die Titration einer Base (Ammoniak bei $pH < 8,5$, Natronlauge bei $pH > 8,5$) ausgeglichen. Über das zur pH-Aufrechterhaltung notwendige Basenvolumen

wurde die Produktbildung und somit die Enzymaktivität aufgezeichnet und mit den Ergebnissen der entwickelten Methode verglichen. Die Titrationsexperimente erfolgten im ungepufferten System unter Benutzung eines mit magnetischem Rührer ausgestatteten Titrators Titroline Alpha (Schott, Mainz).

3.3.2 Validierung der Langzeitvoraussagen im Esterasesystem

Die Voraussagen zum Langzeitverhalten des Enzymprüfstandes wurden mit Langzeitexperimenten bei unterschiedlichen Temperaturen validiert. Die festgelegte Dauer von einer Woche stellt einen Kompromiss aus vertretbarem Aufwand (z. B. Reaktorverfügbarkeit) und dem angestrebten Unterschied ($\sim$ Faktor 25) in der Dauer des Experiments am Enzymprüfstand (3 - 6 h) und des Langzeitexperiments (168 h) dar. Experimente wurden bei konstanten Temperaturen im 1L-Rührreaktor (Biostat M, Braun Biotech, Melsungen, eine nicht maßstabsgetreue Skizzenzeichnung in Abbildung 3.3) mit Temperatur-Regelung und pH-Messung im sog. Pulsed-Fedbatch-Modus durchgeführt.

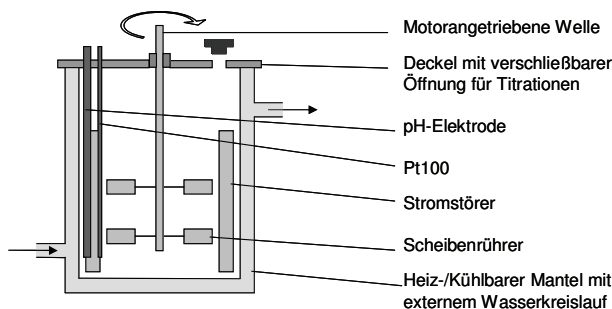


Abbildung 3.3: 1L-Rührreaktor für Langzeitversuche im Pulsed-Fedbatch-Modus mit Aufbau (Skizze).

Da die Enzyme bei Charakterisierung am Enzymprüfstand in Gelöstform vorlagen, konnten sie auch für die Validierungsversuche nicht immobilisiert werden. Die potentiell stabilisierende Wirkung der Immobilisierung (Polizzi, 2007) würde zu nicht vergleichbaren Ergebnissen führen. Ein Fedbatch mit kontinuierlicher Substratzugabe würde bei der Versuchsdauer von einer Woche in erheblichen Volumenänderungen und somit in sich ändernden Versuchsbedingungen resultieren. Beim Pulsed-Fedbatch, hingegen, wurden die Substratkonzentration und der pH-Wert durch die tägliche pulsartige Zugabe hochkonzentrierter Substratlösungen und pH-Stellmittel (Natronlauge, 1 M) mit einem Volumen von 100 – 500 μ L/Tag im optimalen Bereich (vgl. Kap. 3.2) gehalten. Auf diese Art

konnten das Füllvolumen und die Enzymkonzentration fast konstant gehalten werden. Der maximale Gesamtfeed pro Experiment lag bei 10 mL und betrug somit 1% des Gesamtvolumens. Die notwendige Substrat- und pH-Stellmittel-Zugabe wurden basierend auf dem pH-Modell (vgl. Kap. 5.1.2) berechnet. Die Enzymzugabe erfolgte jeweils nach einer ca. 24-stündigen Messung ohne Enzym, welche zur Einstellung des Fließgleichgewichts und der Erfassung der Autohydrolyse-Reaktion diente.

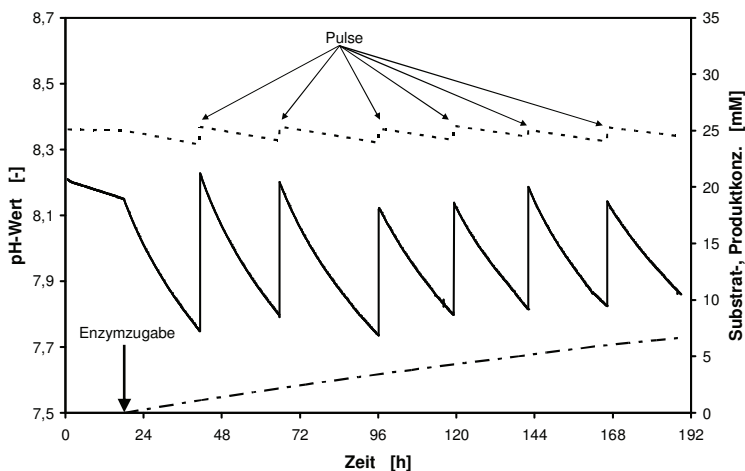


Abbildung 3.4: Beispielhafter Verlauf des pH-Wertes (*durchgezogene Linie*), der Substratkonzentration (*gestrichelte Linie*), sowie der Produktkonzentration (*punkt-gestrichelte Linie*) eines Pulsed-Fedbatch Versuchs. Die Zeitpunkte der Enzymzugabe sowie der Substrat- und Titrationsmittel-Pulse sind durch Pfeile gekennzeichnet. $T=25^{\circ}\text{C}$.

In Abbildung 3.4 wird der Pulsed-Fedbatch-Versuch beispielhaft am Verlauf des pH-Wertes (*durchgezogene Linie*), der berechneten Substratkonzentration (*gestrichelte Linie*), sowie der berechneten Produktkonzentration (*punkt-gestrichelte Linie*) bei 25°C illustriert. Die Enzymzugabe sowie Zeitpunkte der Pulse sind durch Pfeile gekennzeichnet.

3.3.3 Validierung des pO_2 -basierten Assays und der Langzeitvoraussagen im Oxidasesystem

Referenzmessungen für das Oxidasesystem erfolgten in der sog. RAMOS-Anlage. Diese wurde im Rahmen von Anderlei (2001) entwickelt und ist inzwischen kommerzialisiert. Die ausführliche Beschreibung der RAMOS-Technik ist Anderlei and Büchs (2001) zu entnehmen. An dieser Stelle soll lediglich das Messprinzip erklärt werden.

Die RAMOS-Apparatur (Abbildung 3.5a) dient der online Bestimmung der Sauerstofftransferrate in bis zu 8 parallel betriebenen Schüttelkolben. Das Messprinzip und das Auswerteverfahren sind jeweils in Abbildung 3.5b und Abbildung 3.5c skizziert. Der Gasraum des zu vermessenden Kolbens wird vom Luftvolumenstrom $\dot{V}$ durchflossen. In der Flüssigphase findet eine sauerstoffverbrauchende Reaktion statt (OCR). Der Sauerstoff aus dem Gasraum wird in die Flüssigkeit eingetragen (OTR). Durch das Schließen von Ventilen wird die Luftzufuhr unterbrochen, sodass der Sauerstoffpartialdruck pO_2 im Gasraum abfällt (Messphase in Abbildung 3.5c).

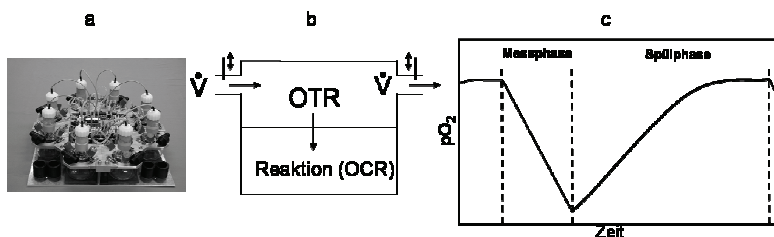


Abbildung 3.5: RAMOS-Anlage (a). Schematische Darstellung des Messprinzips in einem Schüttelkolben (b). Schematische Darstellung der Auswerteverfahrens (c).

Der Sauerstoffverbrauch wird über die Steilheit dieses Abfalls berechnet. In der anschließenden Spülphase wird der Gasraum wieder mit Sauerstoff gesättigt. Durch die zyklische Wiederholung der Mess- und Spülphasen wird der Sauerstoffverbrauch aufgezeichnet. Die Messung des zeitaufgelösten Sauerstoffverbrauchs eignet sich sowohl zur Validierung des am Enzymprüfstand etablierten pO_2 -basierten Assays für das Oxidasesystem (vgl. Kap. 5.2) als auch zur Validierung der Langzeitvoraussagen des Enzymprüfstandes. Die Langzeitexperimente im Rührreaktor würden dagegen bei sauerstoffverbrauchenden Systemen nur eine begrenzte Vergleichbarkeit mit MTP'n besitzen. Rührreaktoren sind blasenbegaste Systeme, welche an der Grenzfläche zwischen Luftblasen und Flüssigkeit eine zusätzliche, potentielle Enzymdeaktivierungsquelle aufweisen. Bei den in der RAMOS-Anlage eingesetzten Schüttelkolben handelt es sich, wie auch bei MTP'n, um oberflächenbegaste Reaktoren, welche untereinander eine bessere Vergleichbarkeit besitzen.

Im Folgenden wird beispielhaft ein RAMOS-Versuch mit der Gesamtdauer von einer Woche beschrieben. Die RAMOS-Anlage wird meist zur Bestimmung der Atmungsaktivität von Mikroorganismen während einer mikrobiellen Kultivierung eingesetzt. Dabei gilt es, auch bei hohen Biomassenkonzentrationen die Sauerstofflimitierung zu vermeiden. Im vorliegenden Fall einer enzymkatalysierten Reaktion konnte der Sauerstoffverbrauch hingegen vom

Experimentierenden über die Wahl der Enzymkonzentration eingestellt werden. Um eine Substratlimitierung in Langzeitexperimenten im Batch-Modus zu vermeiden, wurde ein möglichst niedriger und dennoch im Rahmen der Apparatur-Sensitivität erfassbarer Sauerstoffverbrauch angestrebt. Die Sensitivität der Apparatur wurde durch ein ungewöhnlich hohes Füllvolumen von 100 mL in einem Schüttelkolben mit einem Nennvolumen von $V_K = 250$ mL erreicht (10-25 mL sind bei Mikroorganismenkultivierungen üblich). Durch das erhöhte Füllvolumen-Gasraum Verhältnis wurde bei gleichem volumetrischem Sauerstoffverbrauch in der Flüssigkeit ein höherer Abfall von pO_2 im Gasraum und somit eine höhere Sensitivität der Apparatur erreicht. Um das Überschwappen der Flüssigkeit beim Schüttelvorgang zu vermeiden, wurde mit einer niedrigen Schüttlerdrehzahl von $n = 150$ rpm gearbeitet. Der Schütteldurchmesser betrug $d_0 = 5$ cm. Um die Schädigung der Ventile durch das hochreaktive Reaktionszwischenprodukt $TEMPO^+$ (vgl. Kap. 3.2) zu vermeiden, wurden zwischen dem Gasraum und den Ventilen $2\text{ }\mu\text{m}$ -Filter eingesetzt.

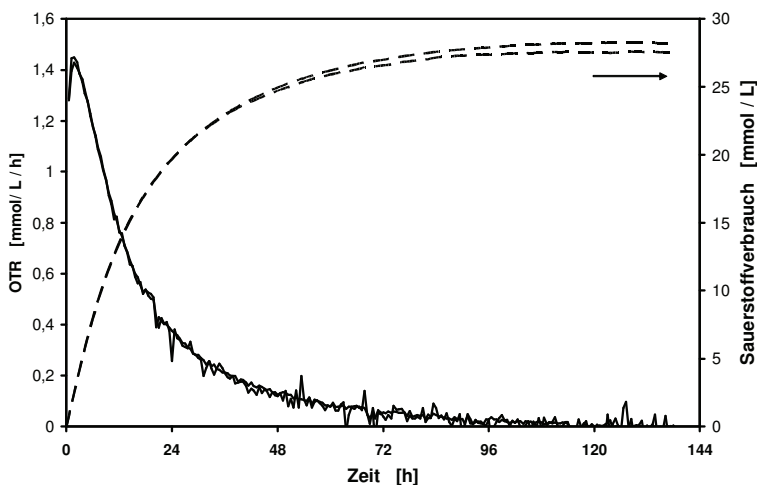


Abbildung 3.6: Sauerstofftransferate (*durchgezogene Linie*) und Gesamtsauerstoffverbrauch (*gestrichelte Linie*) eines Langzeitversuchs bei $T=24^\circ\text{C}$, $d_0=5$ cm, $V_K=250$ mL, $V_L=100$ mL, $n=150$ rpm, $[TEMPO]=24$ mM, $[Laccase]=0,125$ μM , $[Substrat]=200$ mM in zwei Reproduzierbarkeitsexperimenten.

In Abbildung 3.6 ist der Verlauf der Sauerstofftransferate (*durchgezogene Linie*) und des insgesamt verbrauchten Sauerstoffs (*gestrichelte Linie*, berechnet aus geglätteten Verläufen der Sauerstofftransferate) im Laufe eines Pilot-Langzeitversuchs bei 24°C , $[TEMPO]=24$ mM, $[Laccase]=0,125$ μM , $[Substrat]=200$ mM zweier Reproduzierbarkeitsexperimente präsentiert. Die Sauerstofftransferate fällt mit der Dauer des

Experiments und signalisiert damit eine Enzymdeaktivierung. Nach 90 h wird fast kein Sauerstoffeintrag mehr beobachtet. Die Option mehrere Kolben simultan zu betreiben, wird dazu genutzt, parallele Reproduzierbarkeitsexperimente durchzuführen und den Einfluss verschiedener Reaktandenkonzentrationen auf das Stoffsystem zu untersuchen. Durch hochkonzentrierte Modellsubstratpulse nach dem Vorbild des Pulsed-Fedbatch (vgl. Kap. 3.3.2) wird die Substratlimitierung vermieden.

4 Apparative Entwicklung des Enzymprüfstandes

In diesem Kapitel werden ausgehend von den Anforderungen an die Apparatur die Maßnahmen zu ihrer technischen Umsetzung beschrieben. Dabei wird besonderer Wert auf die Diskussion verschiedener Lösungswege und die Begründung der jeweils gewählten Lösung gelegt. Somit soll der Nachbau der Apparatur unter Berücksichtigung sich ändernder Anforderungen (z. B. Erweiterung der Gerätemöglichkeiten, aber auch potentielle Entwicklung eines Seriengeräts) erleichtert werden. Am Ende einzelner Abschnitte werden explizit Maßnahmen zur Weiterentwicklung der Apparatur vorgeschlagen.

4.1 Herleitung und Definition der Apparaturanforderungen

4.1.1 Anforderungsspezifikation

Bei der apparativen Entwicklung des Enzymprüfstandes ließen sich vier Zielsetzungen definieren:

1. Regelung der Steuergröße Temperatur für die Umsetzung des SMAS-Prinzips;
2. verfahrenstechnisch definierte Versuchsführung als Voraussetzung für die Maßstabsübertragung;
3. online Versuchsüberwachung zur Erfassung der Messgrößen als Funktion der Steuergröße und der Zeit;
4. Maximierung des Screeningdurchsatzes durch Automatisierung und Parallelisierung der Experimente.

4.1.2 Fachspezifikation

Basierend auf den Anforderungen wurde eine Spezifikation definiert, welche die Grundlage für die technische Implementierung der Apparatur bildet. 96-MTP'n stellen zurzeit ein gängiges Format für Enzymtests dar und bilden bereits jetzt die gängige Screeningplattform (vgl. Kap. 2.1). Im letzten Jahrzehnt wurden wichtige Schritte in Richtung verfahrenstechnischer Charakterisierung von MTP'n gemacht und optische Systeme zur nicht invasiven Messung in MTP'n entwickelt (vgl. Kap. 2.3.1). Somit entsprach die 96-MTP der angestrebten Parallelisierbarkeits-, Miniaturisierungs- und Automatisierbarkeitsanforderung und wurde als Reaktorplattform für die Apparentwicklung gewählt.

Die Temperierung von Proben wurde von mehreren Aspekten bestimmt:

- Der angestrebte Temperaturbereich wurde zu 5 - 85°C definiert. Dieser Temperaturbereich deckt für die meisten Enzyme die Zustände von nicht vorhandener Aktivität bei tiefen Temperaturen, über den aktiven Bereich bis zum spontanen Schmelzen bei hohen Temperaturen ab. Deutlich niedrigere bzw. höhere Temperaturen würden zum Einfrieren bzw. Verdampfen des wässrigen Probeguts in MTP'n führen. Die Standard-MTP'n sind bis ca. 90°C einsetzbar; somit würden höhere Temperaturen die Nutzung von Sonderanfertigungen voraussetzen.
- Eine wichtige Voraussetzung für die verfahrenstechnisch definierte Versuchsführung ist die Homogenität der Temperaturverteilung in der MTP. Als Richtwert wurden die in MTP-Readern übliche Temperaturhomogenität von $\pm 0,5^\circ\text{C}$ im gesamten Temperaturbereich gewählt. Der Temperaturbereich überstieg dabei deutlich den Temperaturbereich der meisten Reader von 25-40°C.
- Der Enzymprüfstand sieht dynamische Temperaturänderung als wichtigen Teil des Experiments vor. Sowohl beim Erhitzen als auch beim Kühlen wurde eine Temperiergeschwindigkeit von $1^\circ\text{C}/\text{min}$ angestrebt. Bei dieser Temperiergeschwindigkeit kann innerhalb eines 3-stündigen Experiments der gesamte Temperaturbereich mehrfach durchlaufen werden.

Die online Erfassung der Enzymaktivität für eine Versuchsdauer von mehreren Stunden schließt invasive Probenahmen aus. Basierend auf dem Stand der Technik in der Verfolgung von Reaktionen im MTP-Format (vgl. Kap. 2.4) sollte eine optische Messung etabliert werden. Dabei sollte diese Messung bei verschiedenen, flexibel verstellbaren Lichtwellenlängen und Bandbreiten verwirklicht werden, um die Universalität der Messtechnik sicherzustellen.

Abschließend konnte die folgende Apparatspezifikation formuliert werden:

Eine automatisierte Apparatur wird entwickelt, welche eine homogene ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) Temperaturregelung im Temperaturbereich von 5-85 °C mit einer Temperiergeschwindigkeit von min. $|dT/dt|=1^\circ\text{C}/\text{min}$ bei gleichzeitiger Führung von enzymatischen Reaktionen unter verfahrenstechnisch definierten Bedingungen und ihrer optischen online Erfassung in kommerziell erhältlichen MTP'n erlaubt.

4.2 Entwicklung der Apparatur

Abbildung 4.1 bietet eine Übersicht über die entwickelte Apparatur. In Abbildung 4.1a ist die Apparatur als Fotografie präsentiert, wichtige Bestandteile der Apparatur sind mit

Positionsnummern versehen und teils vergrößert dargestellt. Abbildung 4.1b zeigt eine schematische Skizze der Apparatur. Diese besteht aus einer MTP (Pos. 1), welche mit dem zu vermessenden Probegut gefüllt ist. Die MTP ist auf dem Tablar der Schüttelmaschine (Pos. 3) positioniert.

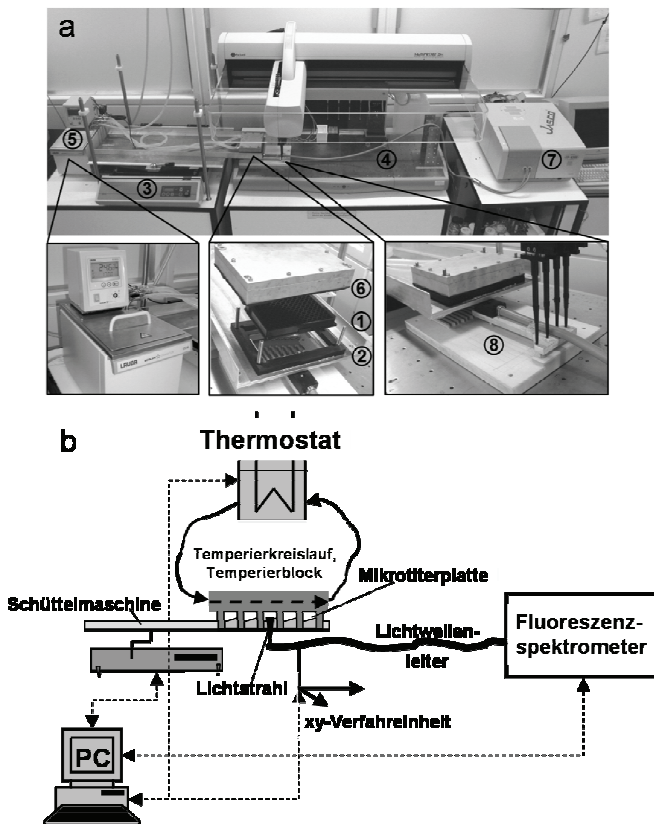


Abbildung 4.1: Entwickelte Messapparatur. Fotografisches Bild mit nummerierten Bestandteilen (a). Schematische Skizze (b).

Von oben steht die MTP im Kontakt mit einem Aluminiumblock (im Folgenden: Temperierblock, Pos. 6), welcher vom Heiz-/ Kühlwasser aus dem Thermostat (Pos. 5) durchflossen wird. Zusammen mit dem Thermostat und den Verbindungsschläuchen bildet der Temperierblock den Temperierkreislauf. Im Tablar der Schüttelmaschine unter der MTP

ist eine Öffnung ausgefräst, sodass ein optischer Zugang zum MTP-Boden besteht (Pos. 2). Die Übertragung der optischen Signale zwischen den einzelnen Wells der MTP und dem Fluoreszenzspektrometer (Pos. 7) erfolgt mit Hilfe eines Lichtwellenleiters. Die MTP befindet sich im Arbeitsbereich des Pipettierroboters (Pos. 4), welcher der Vorlage von Proben dient. Außerdem wird der Pipettierkopf des Pipettierroboters als XY-Verfahreinheit benutzt, um den Lichtwellenleiter unter den einzelnen Wells der MTP zu positionieren (Pos. 8, vgl. Kap. 4.2.1). Alle Geräte werden von einem PC aus über die Plattform der Pipettierrobotersoftware *WinPREP* über *MSL*-Skripte (vgl. Kap. 3.1.3) angesteuert.

4.2.1 Optische Messung

Die optische Messung im Well einer MTP kann prinzipiell von oben, von unten oder im Durchlicht erfolgen. Allerdings würde die Messung von oben bei erhöhten Temperaturen auf Grund der Verdunstung aus der MTP zum Beschlagen der Optik bzw. der MTP-Abdeckung führen und somit die Messung verfälschen. Der Boden eines Wells der 96-MTP ist bei den relevanten Schüttelbedingungen (vgl. Hermann, 2003) mit Flüssigkeit bedeckt und bietet damit eine definierte Fläche für den optischen Zugang. Daher wird die optische Messung von unten durch den MTP-Boden gewählt. Diese Messung erfolgt nach dem Vorbild (Samorski et al, 2005) und ist in Abbildung 4.2 schematisch dargestellt.

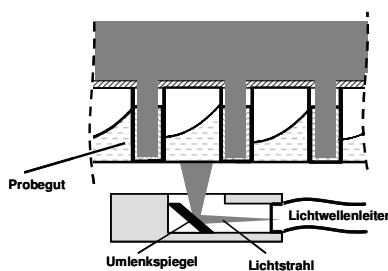


Abbildung 4.2: Optische Messung.

Das Anregungslicht aus dem Fluoreszenzspektrometer wird in einen Lichtwellenleiter eingekoppelt und über einen Umlenkspiegel auf das zu vermessende Well der MTP ausgerichtet. Das in Folge der Lichteinstrahlung emittierte Nutzsignal (Fluoreszenz) wird ebenfalls über den Umlenkspiegel in das Einzelfaser-Ende eingekoppelt. Das Nutzsignal wird dann durch den Lichtwellenleiter zurück zum Fluoreszenzspektrometer geführt und vom Photomultiplier detektiert. Das Fluoreszenzspektrometer (Pos. 7 in Abbildung 4.1a) besitzt mit anregungs- und emissionsseitigen Monochromatoren die Möglichkeit zur flexiblen

Einstellung der Wellenlängen und Bandbreiten im UV- und VIS-Bereich. Neben Einzelmessungen bei unterschiedlichen Wellenlängen, bietet das Gerät die Möglichkeit Spektren aufzunehmen und damit eine vollständigere Information über die Fluoreszenzeigenschaften des Probegutes zu erlangen. Somit erfüllt das Fluoreszenzspektrometer die Anforderungen an die Universalität.

Zum Abscannen einzelner Wells einer MTP sind das Einzelfaser-Ende und der Umlenkspiegel an eine XY-Verfahreinheit gekoppelt, die es erlaubt, jedes Well der MTP einzeln anzufahren und zu vermessen. Um eine Messung ohne Unterbrechung der Schüttelbewegung zu ermöglichen, wird die XY-Verfahreinheit mit dem Schütteldurchmesser und der Reaktorgeometrie so abgestimmt, dass der Lichtfokus während der Messung in dem jeweils zu vermessenden Reaktor bleibt (vgl. Samorski et al., 2005). Der Pipettierroboter (Pos. 4 in Abbildung 4.1a) besitzt zur Positionierung des Pipettierkopfes eine präzise XYZ-Verfahreinheit. Vor dem Experiment wird der Pipettierroboter zur Vorlage von Proben verwendet. Während des Experiments jedoch fallen keine Pipettierschritte an. Daher wurde eine Vorrichtung (Pos. 8 in Abbildung 4.1a) zum Verfahren und Positionieren der Optik unter der MTP mit Hilfe des Pipettierkopfes konstruiert. Die genaue Beschreibung dieser Vorrichtung ist dem Anhang C, *Mechanische Komponenten / Technische Zeichnungen*, zu entnehmen. Die Nutzung des Pipettierroboters als XY-Verfahreinheit bietet eine Reihe von Vorteilen. So werden der Platz zum Unterbringen einer externen Verfahreinheit und der Programmieraufwand zu ihrer Einbindung in das Gerätenetzwerk gespart.

4.2.2 Temperierung

Zum Temperieren von MTP kommen grundsätzlich drei Wärmetransportmechanismen in Frage:

- Wärmestrahlung;
- Konvektion;
- Wärmeleitung.

Wärmestrahlung bedarf keines Übertragungsmediums. Somit kann die zu temperierende MTP offen für den optischen bzw. mechanischen Zugang bleiben. Allerdings hat Wärmestrahlung einen entscheidenden, nicht zu kompensierenden Nachteil. Sie besitzt kein Kühlpotential und erfüllt somit nicht die Anforderungen an die Temperierung. Ebenfalls von Interesse hinsichtlich des optischen Zuganges ist der Wärmetransport mittels temperierter Luft. Auch bei diesem, Konvektion als Wärmetransportmechanismus nutzenden Ansatz, können beide Seiten einer MTP offen bleiben. Auf Grund der geringen Wärmekapazität und des langsamen

Wärmeüberganges von Luft (vgl. Tabelle 4.1) würden hohe Strömungsgeschwindigkeiten und Temperaturgradienten zwischen Luft und MTP notwendig sein, um die entsprechende Temperierung technisch zu verwirklichen. Des Weiteren könnten die Inhomogenitäten in der Temperatur- oder Geschwindigkeitsverteilung der Luftströmung zu Temperaturinhomogenitäten in der MTP führen. Schließlich müssten besondere Maßnahmen getroffen werden, um die Optik in der Nähe der MTP vor der Einwirkung heißer Luft zu schützen. In Anbetracht dieser Fragestellungen und knapper Entwicklungszeit wurde das Konzept der Lufttemperierung verworfen. Die prinzipielle Machbarkeit ist jedoch in Kap. 4.2.4 in einer Übersichtsrechnung gezeigt und die notwendigen Massenströme und Temperaturen berechnet.

Nachdem die auf Strahlung und Konvektion basierenden Wärmetransportmechanismen zur Temperierung der MTP verworfen wurden, wurde die Wärmeleitung gewählt. Da die Unterseite der MTP für den optischen Zugang offen sein musste, wurde eine Temperierung von der Oberseite der MTP entwickelt. Die nahe liegende Art der Temperierung ist ein Temperierblock mit Rippen, welche in die Wells hineinragen und den Wellinhalt direkt temperieren. Allerdings würden solche Rippen als Stromstörer wirken und zu einer undefinierten Flüssigkeitsströmung im Well führen. Daher wurde eine nicht invasive Temperierung angestrebt, bei der das Innere der MTP-Wells nicht mit dem Temperierblock im Kontakt steht. Eine solche Temperierung wurde durch die Wellwand verwirklicht. Die Temperierrippen befinden sich in den Wellzwischenräumen und übertragen die Wärme über die Wellaußenwand in die Wells. Die Kontakttemperierung ist umso effektiver je höher die Kontaktfläche (A) zwischen dem temperierenden und dem temperierten Objekt ist. Daher wurde sie durch den Formschluss maximiert.

Die verwirklichte Temperierung ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Die Rippen des Temperierblocks (Abbildung 4.3b) sind so konstruiert, dass sie einen Formschluss mit der eingesetzten MTP (Abbildung 4.3a) bilden (Abbildung 4.3c). Auf diese Weise ummanteln die Temperierrippen die Wells und sorgen damit für einen effizienten Wärmeübergang. Außerdem werden 40 μL Wasser in die Wellzwischenräume pipettiert, um die wärmeisolierende Wirkung der Luft zwischen Temperierrippen und Wells auszuschließen. Um die Verdunstung aus der MTP zu vermeiden, wurde zwischen dem Temperierblock und der Oberseite der MTP eine Gummidichtung eingespannt (vgl. Abbildung 4.3c). Die Unterseite blieb für den optischen Zugang offen.

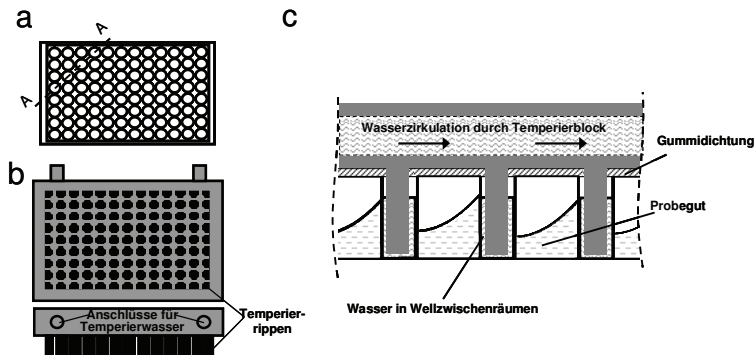


Abbildung 4.3: Draufsicht auf eine MTP (a), Unteransicht und Seitenansicht des Temperierblocks mit Temperierrippen, welche mit MTP'n Formschluss bilden (b), Schnittansicht AA der MTP mit aufgesetztem Temperierblock (c).

Die relevanten Wärmeübergangskoeffizienten α und Wärmeleitkoeffizienten λ sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Beim Wärmeübergang zwischen Festkörper und Fluid wird zwischen der erzwungenen und der nicht erzwungenen Konvektion unterschieden. Erzwungene Konvektion ist durch eine Strömung des Fluids relativ zum Festkörper gekennzeichnet. Unter gleichen Bedingungen ist der Wärmeübergang bei erzwungener Konvektion höher als bei nicht erzwungener Konvektion. Der Vergleich der Koeffizienten von Wasser und Luft zeigt, dass Wasser wesentlich bessere Wärmeleit- und Wärmeübertragungseigenschaften besitzt. Mit einem Wärmeleitkoeffizienten, welcher mehr als Faktor 400 über denen anderer aufgeführten Stoffe liegt, besitzt Aluminium des Weiteren die für den Temperierblock notwendigen guten Wärmeleiteigenschaften.

Tabelle 4.1: Wärmeübertragungskoeffizienten relevanter Stoffe.

Stoff	α [W/(m ² K)]		λ [W/(mK)]
	erzwungen	nicht erzwungen	
Luft	10-100	3-20	0,02
Wasser	500-1000	100-600	0,6
Aluminium	-	-	237
Polystyrol	-	-	0,08
Gummi	-	-	0,04

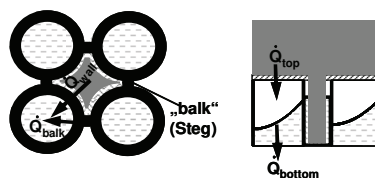
Im Folgenden wird die abgeschätzte Energiebilanz für ein einzelnes MTP-Well präsentiert. Anhand dieser Wärmebilanz soll die intuitiv entworfene Temperierung bewertet werden. Bei der Abschätzung werden folgende Annahmen getroffen:

- Homogene Temperaturverteilung liegt im ideal durchmischten Well vor.
- Da eine abgedichtete MTP-Abdeckung eingesetzt wird, ist der konvektive Wärmeverlust durch die Verdunstung vernachlässigbar klein.
- Für den Wellinhalt (Probegut) werden die wärmeleitenden Eigenschaften des Wassers angenommen.

Der Wärmefluss vom Temperierblock in das Well durch einen Querschnitt A kann als eine Reihenfolge von Wärmeübergangsschritten (i) und Wärmeleitungsschritten (j) durch Wärmeleitstrecken δ_j mit Hilfe der Angaben aus Tabelle 4.1 gemäß Gl. 4.1 abgeschätzt werden:

$$\dot{Q} = \frac{A}{\sum_i \frac{1}{\alpha_i} + \sum_j \frac{\delta_j}{\lambda_j}} \Delta T \quad (4.1)$$

In Abbildung 4.4 sind die Wärmeflüsse zwischen dem Temperierblock, dem Well und der Umgebung in Schnittansichten der Draufsicht und der Seitenansicht für den Fall der Erhitzung eingezeichnet. Im Fall der Kühlung kehren sich die Richtungen der Wärmeflüsse um. Wärme wird durch die Temperierrippen, den mit Wasser gefüllten Wellzwischenraum und die Wellwand in das Well übertragen ($\dot{Q}_{wall}$). Außerdem wird Wärme durch Wells verbindende Stege („Balk“ in Abbildung 4.4, $\dot{Q}_{balk}$) und die Wellwand in das Well geleitet. Wärme $\dot{Q}_{top}$ wird vom Temperierblock durch die Gummidichtung in den Luftraum des Wells übertragen. Die Wärmeabfuhr in die kältere Umgebung erfolgt über den Wellboden ($\dot{Q}_{bottom}$).



Draufsicht (Schnitt) Seitenansicht (Schnitt)

Abbildung 4.4: Visualisierung der Wärmeströme in die / aus der MTP.

Basierend auf Tabelle 4.1 und der MTP-Geometrie sind die Wärmeströme in Tabelle 4.2 mit Gl. 4.1 abgeschätzt. So durchläuft z. B. der Wärmefluss $\dot{Q}_{wall}$ folgende Wärmeübertragungsbarrieren:

1. Wärmeübergang von der Temperierrippe in den Wasser gefüllten Wellzwischenraum.
2. Wärmeleitung durch die Wasserschicht zur Wellwand.
3. Wärmeübergang aus dem Wellzwischenraum in die Wellwand.
4. Wärmeleitung durch die Wellwand.
5. Wärmeübergang von der Wellwand in das Well (Teil der Wellinnenwand grenzt an die Flüssigkeit, Teil der Wand grenzt an den Luftraum).

Der Wärmefluss durch die Temperierrippe $\dot{Q}_{rad}$ ist um Faktor 20 höher als der Wärmefluss aus der Temperierrippe in den Wellzwischenraum $\dot{Q}_{wall}$ (vgl. Tabelle 4.2). Somit ist die Wärmeversorgung der MTP durch den Temperierblock ausreichend schnell. Des Weiteren zeigt Tabelle 4.2, dass die Wärmeversorgung hauptsächlich über den Wärmefluss $\dot{Q}_{wall}$ erfolgt. Limitiert durch den Wärmetranspotwiderstand der Wellwand, kann dieser unter Benutzung von Standard-MTP'n nicht gesteigert werden. Bei Verzicht auf Wasser in Wellzwischenräumen würde der Wärmewiderstand des Wärmeflusses $\dot{Q}_{wall}$ von der Temperierrippe in den Wellzwischenraum deutlich von 200 auf 5000 m²K/W steigen. Somit wäre dieser Wärmetransportwiderstand limitierend für die gesamte Wärmeversorgung der MTP.

Tabelle 4.2: Abschätzung der relevanten Wärmeströme.

	A x 10 ⁻⁵ [m ²]	Wärmetransportwiderstand x 10 ⁻⁵ [m ² K/W]					Q̇/ΔT [W/K]
Q̇ _{rad}	Rippenquerschnitt	Leitung durch die Temperierrippe					0,45
	1,05	2,32					
Q̇ _{wall}	Wellwandfläche	Übergang Rippe-Zwischenraum	Leitung Zwischenraum	Übergang Zwischenraum-Wellwand	Leitung Wellwand	Übergang Wellwand-Well	0,019
	24,18	200	16,67	200	625	250	
Q̇ _{top}	horizontaler Wellquerschnitt	Leitung durch die Gummidichtung			Übergang Gummidichtung- Luftraum		0,00055
	3,85	5000			2000		
Q̇ _{balk}	Wellstegquerschnitt	Leitung durch Wellsteg und Wellwand			Übergang Wellwand- Well		0,00033
	0,5	1250			250		
Q̇ _{bottom}	horizontaler Wellquerschnitt	Übergang Well - Wellboden	Leitung durch Wellboden		Übergang Wellboden-Umgebung		0,0017
	3,85	200	125		2000		

Auf Grund der teils hohen Temperaturdifferenz von bis zu 60°C zwischen dem Well und der Umgebung kann ein beachtlicher Wärmefluss ($\dot{Q}_{bottom}$) durch den Wellboden an die Umgebung abgegeben werden. Die Wärmeisolation des MTP-Bodens würde jedoch den

optischen Zugang zum MTP-Boden unmöglich machen. In Experimenten wurde im relevanten Temperaturbereich die maximale Temperaturdifferenz von 4°C zwischen dem Temperierblock und den MTP-Wellen gemessen (Ergebnis nicht dargestellt). Diese Temperaturdifferenz wurde als moderat eingestuft, und der Wärmeverlust wurde akzeptiert.

Zur Bestimmung der Temperaturverteilung in der MTP wurde die optische Temperaturmessung (vgl. Kap. 5.3.3) eingesetzt. Ergänzend fand in drei Wells der MTP die invasive Temperaturmessung mit Mini-Pt100-Sensoren statt. In Abbildung 4.5 sind drei Entwicklungsstufen der Apparatur mit den jeweiligen Temperaturverteilungen in der MTP für $T_{\text{sol}} = 70^\circ\text{C}$ dargestellt. Rote und blaue Farben kennzeichnen jeweils warme und kalte Zonen. Trotz homogener Temperaturverteilung im Temperierblock führte die erste Version der Temperieranordnung zu einer nicht ausgeglichenen Temperaturverteilung zwischen der kalten Zone auf der linken Seite der MTP in Abbildung 4.5a. Eine maximale Temperaturdifferenz von 3,8°C zwischen dem wärmsten und dem kältesten Well wurde gemessen.

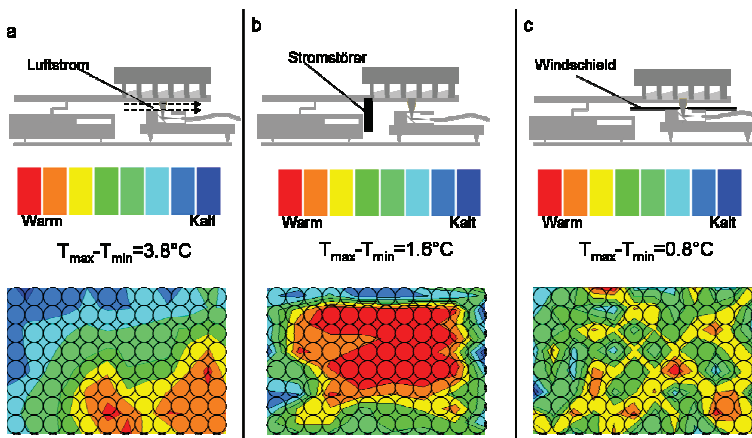


Abbildung 4.5: Experimentelle Anordnung, Temperaturverteilungen in der MTP und maximale Inhomogenitäten auf verschiedenen Entwicklungsstufen. $T_{\text{sol}} = 70^\circ\text{C}$, $n = 950$ rpm, $d_G = 3$ mm. Warme Seite / Kalte Seite-Temperaturverteilung verursacht durch Luftströmung (a), teilweise Homogenisierung durch die Verwendung des 5×20 cm² Stromerhitzers (b), optimierte Homogenität durch ein 20×30 cm² Windschild in 0,3 cm vom MTP-Boden (c).

Die Luftströmung wurde mittels Trockeneisverdampfung unter der MTP sichtbar gemacht. Dabei zeigte sich im geschüttelten Zustand die Ausbildung einer Strömung unter der MTP (in Abbildung 4.5a mit Pfeil gekennzeichnet) auf. Kalte Luft aus der Umgebung wurde auf der linken Seite der MTP in Abbildung 4.5a angesaugt. Beim Durchströmen unter dem warmen

MTP-Boden wurde die Luft erhitzt, sodass der Temperaturgradient zum MTP-Boden und somit das Kühlpotential der Luft reduziert wurde. Dadurch war die rechte Seite der MTP wärmer als die linke. Unter Verwendung eines Stromstörers ($5 \times 20 \text{ cm}^2$) auf der linken Seite der MTP in Abbildung 4.5b konnte diese Luftströmung vermieden und die Temperaturverteilung bis auf $1,6^\circ\text{C}$ zwischen dem wärmsten und dem kältesten Well homogenisiert werden. Die resultierende Temperaturverteilung (vgl. Abbildung 4.5b) wies kältere Wells im äußeren Bereich im Vergleich zum zentralen Bereich der MTP auf. Weitere Trockeneis-Experimente deckten das Aufstauen warmer Luft unter der MTP, insbesondere unter ihrer Mitte auf. Durch die Verwendung des sog. „Windschields“ (einer rechteckigen Platte von $20 \times 30 \text{ cm}^2$, welche gemeinsam mit dem Lichtwellenleiter unter der Mikrotiterplatte verfährt) in 0,3 cm Entfernung vom MTP-Boden konnte die Temperaturverteilung weiter bis auf $0,8^\circ\text{C}$ Differenz zwischen dem wärmsten und dem kältesten Well homogenisiert werden (vgl. Abbildung 4.5c). Der eingesetzte „Windschild“ wurde zusammen mit der Optik unter der MTP verfahren. Der erreichte Temperaturgradient entsprach der angestrebten Homogenität von $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Damit konnte die Temperaturregelung in der gesamten MTP über die Messung der Temperatur in einem einzelnen Well mit einem Mini-Pt100-Sensor erfolgen.

4.2.3 Modifizierung der Temperierung für begaste Stoffsysteme

Bei der Ausgangsversion der Temperierung ist die MTP mit einer Gummidichtung abgedeckt, sodass kein Gasaustausch mit der Umgebung stattfindet. Um die Begasung bestimmter Stoffsysteme zu ermöglichen (z. B. das Oxidasesystem, vgl. Kap. 3.2.2), wurde ein neuer Temperierblock entworfen, dessen Temperierrippen um 10 mm höher sind (vgl. Abbildung 4.6a und Abbildung 4.6b).

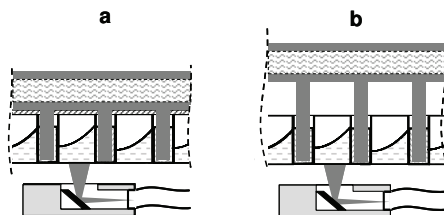


Abbildung 4.6: Diagonaler Schnitt (AA in Abbildung 4.3a) durch eine MTP mit aufgesetzter Temperiereinheit und optischer Vorrichtung zur Fluoreszenzmessung. Ursprüngliche, abgedichtete Version des Temperierblocks (a), modifizierter Temperierblock für begaste Stoffsysteme (b).

Der Wärmefluss durch die Temperierrippen ($\dot{Q}_{rad} \sim 0,45 \text{ W/K}$) ist um ca. Faktor 20 größer als der Wärmefluss aus den Rippen ($\dot{Q}_{wall} \sim 0,019 \text{ W/K}$). Durch die Verdoppelung der

Rippenlänge steigt der Wärmetransportwiderstand lediglich um Faktor 2. Folglich wurde beim Einsatz des neuen Temperierblocks keine Verschlechterung der Temperierergebnisse erwartet. Tatsächlich konnte bei Verwendung beider Temperiereinheiten kein Temperaturunterschied im Rahmen der Messgenauigkeit ($0,5^{\circ}\text{C}$) festgestellt werden (Ergebnis nicht dargestellt).

4.2.4 Ausblick Temperierung

Modifizierung des Temperierblocks

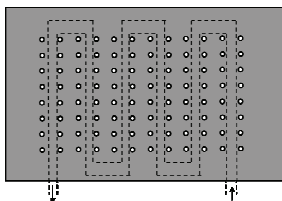


Abbildung 4.7: Draufsicht auf den vorgeschlagenen Temperierblock mit der Option der Probenahme ohne Unterbrechung des Temperiervorganges. Die Führung des Temperierkreislaufs ist mit gestrichelten Linien eingezeichnet.

Um invasive Probenahme bzw. Zupipettieren während des Temperiervorganges zu ermöglichen, ist ein Temperierblock mit Löchern über den Wellöffnungen denkbar (vgl. Abbildung 4.7). Durch die Abdeckung der MTP mit einem Septum kann das Zupipettieren ermöglicht und die Verdunstung vermieden werden. Auch eine auf Magnetventilen basierte Öffnungs- und Schließvorrichtung ist vorstellbar. Bei ausreichend kleinen Löchern und deren geschickter Anordnung ist der Platz ausreichend, um das Heiz- / Kühlwasser durch den Temperierblock zu leiten. Durch die Verwendung der Löcher als optische Fenster kann außerdem potentiell die optische Messung im Durchlicht realisiert werden.

Temperierung mit Luftstrom

Die folgende Überslagsrechnung demonstriert die prinzipielle Machbarkeit einer konvektiven Temperierung, welche ausschließlich auf Belüftung der MTP mit vortemperierter Luft basiert und somit den beidseitigen optischen und physikalischen Zugang zur MTP ermöglicht. Die Schwierigkeiten beim Erreichen einer homogenen Temperatur- und Geschwindigkeitsverteilung des Luftstroms werden an dieser Stelle nicht diskutiert. Die Überslagsrechnung soll lediglich die Frage beantworten, wie hoch der Volumenstrom und die Temperaturdifferenz zwischen Luft und der MTP sein müssen, um:

- den ausreichenden Wärmeübergang zu erreichen,
- die ausreichende Wärmekapazität zu liefern.

Annahmen:

- Temperierung durch den Boden der MTP: pro $V_L = 2 \times 10^{-7} \text{ m}^3$ Probegut steht $A_{\text{Wellboden}} = 0,0000385 \text{ m}^2$ Fläche zur Verfügung;
- Wärmeübergang: $\alpha \sim 50 \text{ W/m}^2\text{K}$ (vgl. Tabelle 4.1);
- Stoffeigenschaften Probegut: $c = 4200 \text{ J/kgK}$, $\rho = 1000 \text{ kg/m}^3$ (wässriges System);
- Stoffeigenschaften Luft: $c_{\text{Luft}} = 1005 \text{ J/kgK}$, $\rho_{\text{Luft}} = 1,292 \text{ kg/m}^3$;
- Heizgeschwindigkeit: 1 K/min .

Wärme / Wärmeleistung pro Well:

$$\frac{Q}{T} = c \cdot \rho \cdot V_L = 0,84 \frac{\text{J}}{^\circ\text{C}}$$

$$\dot{Q} = 0,014 \text{ W, mit } 1^\circ\text{C/min}$$

Das benötigte treibende Temperaturgefälle ΔT :

$$\dot{Q} = 0,014 \text{ W} = \alpha \cdot A_{\text{Wellboden}} \cdot \Delta T = 50 \text{ W/m}^2\text{K} \cdot 0,0000385 \text{ m}^2 \cdot \Delta T$$

$$\Delta T \approx 7 \text{ K}$$

Die zur Temperierung verwendete Luft muss ca. 7 K wärmer sein als der Wellinhalt, um den ausreichenden Wärmeübergang zu erreichen. Bei der Abgabe der Wärmeleistung von 0,014 W wird der Luftstrom abgekühlt und das treibende Temperaturgefälle reduziert. Um die komplexe, vollständige Wärmebilanzierung des Luftstroms im Rahmen dieser Übersichtsrechnung zu vermeiden, wird angenommen, dass mit einem Luftstrom geheizt wird, welcher 8 K wärmer ist, als der Wellinhalt. Analog zur oben aufgeführten Berechnung des Temperaturgefälles lässt sich für 8 K ein Wärmestrom von 0,016 W berechnen. Nun kann der Luftvolumenstrom berechnet werden, welcher um nicht mehr als $\Delta T_{\text{Luft}} = 1 \text{ K}$ abgekühlt wird und somit ein ausreichendes Heizpotential bietet.

$$\dot{Q} = \dot{V} \cdot \rho_{\text{Luft}} \cdot c_{\text{Luft}} \cdot \Delta T_{\text{Luft}}$$

$$0,016 \text{ W} = \dot{V} \cdot 1,292 \text{ kg/m}^3 \cdot 1005 \text{ J/kgK} \cdot 1 \text{ K}$$

$$\dot{V} \approx 0,045 \frac{\text{m}^3}{\text{h}}$$

Für den benötigten Wärmestrom ergibt sich der notwendige Luftstrom von ca. $0,05 \text{ m}^3/\text{Well/h} = 5 \text{ m}^3/\text{MTP/h}$. Dieser Wert liegt Größenordnungen unter der Leistung von kommerziell erhältlichen Gebläsen in der relevanten Größe. Durch die Verwendung von MTP'n mit unten offenen Wellzwischenräumen (z. B. Hersteller Nunc, Wiesbaden) kann

ferner die Kontaktfläche zwischen dem Luftstrom und dem Wellboden erhöht und die notwendige Temperaturdifferenz herabgesetzt werden.

4.3 Verfahrenstechnisch definierte Versuchsführung

In diesem Kapitel werden Maßnahmen zusammengefasst, welche der verfahrenstechnisch definierten Versuchsführung dienen und somit essentiell für die Interpretation der Messergebnisse und ihre Übertragbarkeit aus der MTP in größere Maßstäbe sind. Neben der Temperierung, welche im Kap. 4.2.2 separat diskutiert wurde, zählen die Durchmischung und, bei sauerstoffverbrauchenden Reaktionen, der definierte Sauerstoffeintrag sowie die Vermeidung der Verdunstung zu verfahrenstechnischen Aspekten der Versuchsführung.

4.3.1 Durchmischung

Die Durchmischung stellt eine wichtige Voraussetzung für die definierte Reaktionsführung und den Stoffaustausch im Reaktionssystem dar. Auch die Sauerstoffversorgung des Stoffsystems bei sauerstoffverbrauchenden Reaktionen hängt mit der Durchmischung zusammen. Bei mehrphasigen Stoffsystemen (z. B. Emulsionen) ist die Durchmischung notwendig, um eine ausreichende, definierte Kontaktfläche zwischen verschiedenen Phasen zu gewährleisten. Auch messtechnisch kann die Durchmischung von Bedeutung sein. Bei Verwendung immobilisierter Optoden (vgl. Kap. 5.2.1) kann das Signal vom Wellboden nur dann als repräsentativ für das gesamte Well angesehen werden, wenn keine Konzentrationsgradienten vorliegen.

Durchmischung in MTP'n wird durch den Schüttelvorgang erreicht (Pos. 3 in Abbildung 4.1a). Für einen definierten Reaktor (MTP), ein definiertes Füllvolumen (200 μL) und definierte rheologische Eigenschaften des Probeguts (wasserähnliche Viskosität) hängt die Durchmischung vom Schütteldurchmesser d_0 sowie der Schütteldrehzahl n ab. Der Schütteldurchmesser wird auf $d_0 = 3$ mm eingestellt, um die optische Messung ohne Unterbrechung der Schüttelbewegung zu verwirklichen (vgl. Samorski et al., 2005). Kameraaufnahmen zeigten, dass für diesen Schütteldurchmesser eine Schütteldrehzahl von mindestens $n = 600$ rpm gewählt werden muss, um eine Bewegung der Flüssigkeit im Well und somit Durchmischung zu ermöglichen. Dieses Ergebnis entspricht Hermann (2001).

Eine Voraussetzung für die verfahrenstechnisch definierte Versuchsführung ist die definierte Schüttelbewegung. Das dazu notwendige Auswuchten der Schüttelmaschine stellt eine Standardprozedur dar, die hier nicht erläutert werden soll. Diese Standardprozedur sieht

ausschließlich das Ausbalancieren von Zentrifugalkräften vor, die bei der Schüttelbewegung entstehen. Andere Unwuchtfaktoren, wie beispielsweise Kippmomente, werden auf Grund der flachen Bauweise von Schüttelmaschinen vernachlässigt. Beim Aufbau des Enzymprüfstandes führte der ca. 2 kg schwere, über die Lagerungspunkte der Schüttelmaschine hinausragende Temperierblock zu Tablarschwingungen in z-Richtung (vgl. Abbildung 4.8). Die am stärksten ausgeprägte Schwingung wurde bei der Resonanzfrequenz von 600 rpm beobachtet. Bei intensiven Gesprächen mit dem Hersteller der Schüttelmaschine (Cesana, 2004) und dem Lehrstuhl für Technische Mechanik der RWTH Aachen wurden folgende Massnahmen definiert, um die Schüttelmaschine auszubalancieren:

- Gewichtsreduktion des Temperierblocks (problematisch, da der aus Aluminium gefertigte Temperierblock bereits ein Kompromiss aus leichter Bauweise und guten Wärmeleiteigenschaften darstellt).
- Versteifung des Tablars und der Verbindung Schüttelmaschine / Tablar.

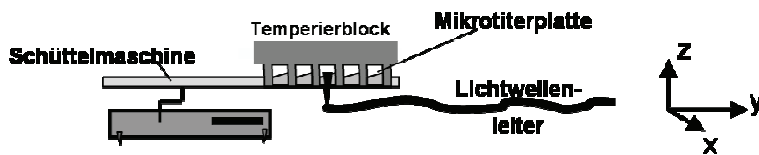


Abbildung 4.8: Positionierung der MTP und des Temperierblocks auf dem Tablar der Schüttelmaschine.

Das Flächenträgheitsmoment des Tablars wurde abgeschätzt. Die Resonanzfrequenz lässt sich durch folgende Gleichung ausdrücken:

$$f \sim \sqrt{\frac{E \cdot I}{\rho}} \quad (4.2)$$

f	Resonanzfrequenz	[Hz]
E	Elastizitätsmodul	[kN/mm ²]
I	Flächenträgheitsmoment	[kN/mm ²]
ρ	Dichte	[kg/m ³]

Gl. 4.2 macht deutlich, dass die Resonanzfrequenz durch die Wahl zwischen beiden für das Tablar in Frage kommenden Materialien Aluminium und Stahl nicht entscheidend verändert werden kann. So besitzt Stahl ein Elastizitätsmodul $E_{Stahl} = 210 \text{ kN/mm}^2$, welches um Faktor 3 höher ist als das von Aluminium: $E_{Aluminium} = 70 \text{ kN/mm}^2$. Gleichzeitig ist die Dichte von Stahl ($\rho_{Stahl} = 7800 \text{ kg/m}^3$) um Faktor 3 höher als die von Aluminium ($\rho_{Aluminium} = 2700 \text{ kg/m}^3$). Das Flächenträgheitsmoment I dagegen, kann z. B. durch das Anbringen von L-Profilen auf dem Tablar erhöht werden.

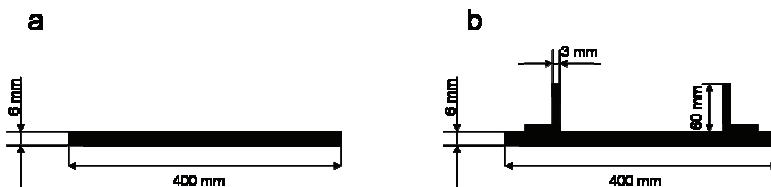


Abbildung 4.9: Tablar ursprünglich (a). Tablar mit L-Profilen versteift (b).

So wurde numerisch für die mit L-Profilen aus Aluminium (60 mm x 3 mm) versteifte Ausführung des Tablars (vgl. Abbildung 4.9a und Abbildung 4.9b) eine 10-fache Erhöhung des Flächenträgheitsmoments gegenüber der ursprünglichen Tablarversion (Berechnung mit Java-Skrip, Conewa, Neubert, 2001) ohne nennenswerte Erhöhung der Masse berechnet. Mit der versteiften Tablarversion stieg die Resonanzdrehzahl ca. um den Faktor 3 (vgl. Gl. 4.2). Mit diesen Maßnahmen konnte beim gewählten Schütteldurchmesser von 3 mm eine definierte Schüttelbewegung bis zur maximal einstellbaren Schütteldrehzahl von 1000 rpm sichergestellt werden.

4.3.2 Sauerstoffversorgung

Für sauerstoffverbrauchende Reaktionen, z. B. im Oxidasesystem, vgl. Kap. 3.2.2, muss auf Grund der geringen Löslichkeit des Sauerstoffs (ca. 0,27 mM im reinen Wasser bei Zimmertemperatur) eine definierte, kontinuierliche Sauerstoffversorgung der MTP gewährleistet sein. Die Sauerstoffversorgung von Mikroorganismen in MTP'n ist weitgehend charakterisiert (vgl. Kap. 2.3.1). Allerdings unterscheiden sich die Anforderungen an die Sauerstoffversorgung bei der Enzymcharakterisierung nach dem SMAS-Prinzip von denen bei einer mikrobiellen Kultivierung. So gilt es bei der Kultivierung mesophiler Mikroorganismen, in einem beschränkten Temperaturbereich von ca. 30 - 40°C einen möglichst hohen Sauerstoffeintrag zu erreichen. Damit wird die Sauerstofflimitierung bei hohen Biomassen vermieden. Bei der Enzymcharakterisierung dagegen ist die Enzymkonzentration und somit der Sauerstoffverbrauch ein Freiheitsgrad, welcher vom Experimentierenden eingestellt wird. Um eine Substratlimitierung im Laufe des Experiments zu vermeiden, werden niedrige Reaktionsraten und somit ein niedriger Sauerstoffverbrauch bevorzugt.

Die Reaktionsgeschwindigkeit sauerstoffverbrauchender Reaktionen wird über Gl. 5.10 aus der gemessenen Sauerstoffkonzentration im Reaktionssystem ermittelt, welche sich in Abhängigkeit vom Sauerstoffeintrag *OTR* und vom Sauerstoffverbrauch *OCR* einstellt. Die Genauigkeit der verwendeten Messmethode (vgl. Abbildung 5.14) nimmt mit steigender

Sauerstoffkonzentration ab. Um im sensitiven Bereich der Messtechnik bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen zu arbeiten, wird also ein nicht zu hoher Sauerstoffeintrag angestrebt. Der Sauerstoffeintrag in die MTP steigt mit steigender Schüttlerdrehzahl an (Hermann, 2003). Daher wird bei Sauerstoff verbrauchenden Reaktionen die kleinste Schüttlerdrehzahl gewählt, bei der die Durchmischung gewährleistet ist. Diese Schüttlerdrehzahl liegt für die gewählten Bedingungen bei 600 rpm (s. S. 59).

Um den Sauerstoffeintrag in die MTP zu ermöglichen, wurde der modifizierte Temperierblock verwendet (vgl. Abbildung 4.6b). Ein Plexiglas-Rahmen wurde (Abbildung 4.10a) gefertigt, welcher mit Gummidichtungen zwischen dem Temperierblock und der MTP eingespannt wird (Abbildung 4.10b). Die 1 mm starken Gummidichtungen sind mit dem Rahmen in der Draufsicht deckungsgleich. Durch den Stutzen im Plexiglas-Rahmen wird der Gasraum zwischen der MTP und dem Temperierblock begast (Abbildung 4.10b). Dabei kann über Umschaltung eines Ventils zwischen Luft- und Stickstoffbegasung gewählt werden. Die Stickstoffbegasung ist für die Kalibrierung der Messmethode zur pO_2 -Bestimmung in der MTP notwendig (vgl. Kap. 5.2.2). Außerdem wird durch die Stickstoffbegasung eine gezielte Unterdrückung der sauerstoffverbrauchenden Reaktion bis zum Start der Messung erreicht.

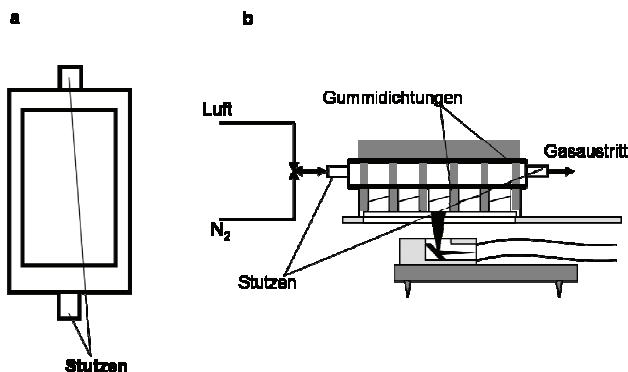


Abbildung 4.10: Plexiglasrahmen mit Stutzen zur Begasung der MTP in der Draufsicht (a). MTP mit aufgesetztem Temperierblock und eingespanntem Plexiglas-Rahmen. Variable Begasung mit Luft oder Stickstoff (b).

Vermeidung der Verdunstung

Um die Verdunstung aus der MTP bei hohen Temperaturen einzuschränken, wurden zwei alternative Ansätze verfolgt. Die erste Möglichkeit besteht in der Begasung von MTP'n mit feuchter, mit Wasserdampf gesättigter Luft. Da jedoch die Sättigungsgrenze von

Wasserdampf im hohen Maße temperaturabhängig ist (ca. Faktor 15 zwischen 20°C und 80°C), muss die Luftbefeuchtung bei der Ist-Temperatur der MTP erfolgen. Zu diesem Zweck fand die Luftbefeuchtung in einer doppelmanteligen Wassersäule statt, welche in den Temperierkreislauf des Temperierblocks integriert wurde. (vgl. Abbildung 4.11). Der Temperiermantel der Wassersäule wurde vom Wasser durchflossen, welches auch den Temperierblock versorgte.

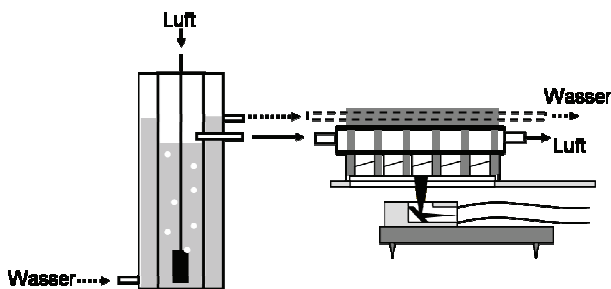


Abbildung 4.11: Luftbefeuchtung in einer doppelmanteligen Wassersäule. Die Wassersäule wird in den Temperierkreislauf der MTP integriert.

Alternativ zum Ansatz aus Abbildung 4.11 wurde versucht Materialien zu finden, welche eine gute Sauerstoffdurchlässigkeit bei geringer Wasserdampfdurchlässigkeit aufwiesen. Ein solches Material bietet in Form von Folien unterschiedlicher Dicke und Steifigkeit die Fa. Mitsui & Co. Deutschland GmbH (Düsseldorf) unter der Bezeichnung TPX (*Transparent Polymer X*) an. Bei 25°C weist dieser Stoff nach Herstellerangaben bei gleicher Wasserdampfdurchlässigkeit wie Nylon die 1000-fach höhere Sauerstoffdurchlässigkeit auf. Proben unterschiedlicher Folien aus TPX wurden zu Testzwecken vom Hersteller zur Verfügung gestellt. Während die Folie die MTP-Wells abdeckte, mussten die Wellzwischenräume für die Temperierrippen offen bleiben. Entsprechende Muster wurden in die Folie geschnitten. Zwei in Frage kommende Fertigungsverfahren für eine solche Aufgabe waren Laser- und Wasserstrahlschneiden. Wasserstrahlschneiden wurde gewählt, um die Beeinflussung der Folie durch Erhitzung beim Laserschneiden zu vermeiden.

In Abbildung 4.12 ist das Restfüllvolumen nach 2 h bei $T = 80^{\circ}\text{C}$, $n = 600 \text{ rpm}$, $d_0 = 3 \text{ mm}$, Startfüllvolumen $V_L = 200 \mu\text{L}$ präsentiert. Ohne Schutzmaßnahmen verdunsteten $40 \mu\text{L}$, was in einem Experiment nicht akzeptabel wäre. Während die Luftbefeuchtung bei Raumtemperatur keine Verbesserung brachte, konnte die Verdunstung bei Luftbefeuchtung im temperierten Wasser um die Hälfte reduziert werden. Offensichtlich war die Verweilzeit der Luft in der Wassersäule nicht ausreichend, um die vollständige Wasserdampfsättigung zu

erreichen. Durch die Verwendung einer höheren Säule oder schikaneartigen Einbauten in der Säule könnten die Verweilzeit und somit der Sättigungsgrad erhöht werden. Alternativ könnte das Ergebnis mit der Vergrößerung der Grenzfläche zwischen Luft und Wasser (kleinere Luftbläschen) durch die Zugabe von Koaleszenz hemmenden Stoffen in die Wassersäule verbessert werden. Das beste Ergebnis wurde mit Folie erreicht. Hier wird lediglich eine geringe Verdunstung von ca. 5-10 μL beobachtet. In weiteren Experimenten wurde die Folie verwendet. Sie wurde zwischen der unteren Gummidichtung und der MTP (vgl. Abbildung 4.10b) eingespannt.

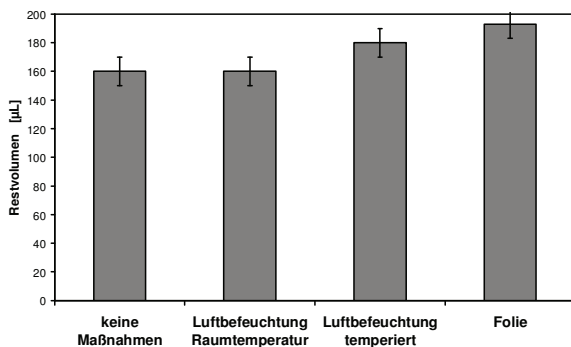


Abbildung 4.12: Restvolumen nach 2 h bei $T=80^\circ\text{C}$, $n=600\text{rpm}$, $d_o=3\text{mm}$, Startfüllvolumen $V_L=200\mu\text{L}$ bei verschiedenen Maßnahmen gegen die Verdunstung.

Quantifizierung des Sauerstoffeintrages

Für eine durchmischte MTP kann der *OTR* nach der Filmtheorie (Hermann, 2003) über den Sauerstoffübergangskoeffizient k_{La} und das treibende Konzentrationsgefälle zwischen dem Gasraum und dem Well ausgedrückt werden. Für den Fall des gesättigten Gasraums gilt:

$$OTR = k_{La} \cdot L_{O_2} \cdot (100\% - pO_2) / 100 \quad (4.3)$$

OTR	Sauerstoffeintrag	[mol / L / h]
k_{La}	Sauerstoffübergangskoeffizient	[1 / h]
pO_2	Sauerstoffpartialdruck	[%]
L_{O_2}	Sauerstofflöslichkeit	[mol / L]

Dabei lässt sich L_{O_2} als Funktion der Temperatur und weiterer, neben Sauerstoff gelöster Stoffe berechnen (vgl. Kap. 6.1.5). Der Sauerstoffübergangskoeffizient k_{La} wird bei Temperaturen von 30 - 40°C mit Hilfe des sog. Sulfitystems bestimmt (Kap. 3.2.3, Gl. 3.3). Allerdings ist das Verhalten des Sulfitystems im starken Maße temperaturabhängig, sodass

es nicht im gesamten für den Enzymprüfstand relevanten Temperaturbereich eingesetzt werden kann.

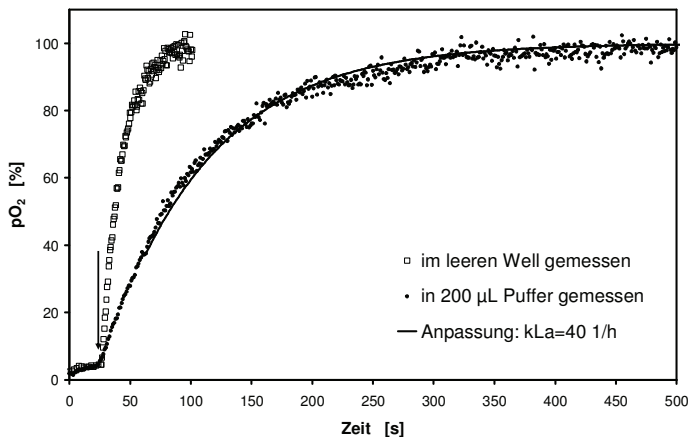


Abbildung 4.13: Experimentell gemessener (geschlossene Symbole) und angepasster (Linie) pO_2 -Verlauf eines Einschaltversuchs bei $n=600\text{rpm}$, $d_i=3\text{mm}$, $T=50^\circ\text{C}$ mit Folie. Experimentell gemessener pO_2 -Verlauf im leeren Well (offene Symbole). Zeitpunkt des Einschaltens der Belüftung ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Daher wird alternativ zum Sulfitsystem die Methode *Einschaltversuch* (Lopez et al. 2006) angewandt. Dieser gilt im Vergleich zum Sulfitsystem als ungenau, kann jedoch temperaturunabhängig eingesetzt werden. Beim Einschaltversuch (s. Abbildung 4.13) wird das Stoffsystem, in dem keine Reaktion abläuft, mit Stickstoff begast, bis die Sauerstoffkonzentration in der Flüssigkeit auf unter $pO_2 < 10\%$ abgesunken ist. Dann wird schlagartig auf Belüftung umgeschaltet (Pfeil in Abbildung 4.13) und dabei der Anstieg des pO_2 beobachtet (geschlossene Symbole in Abbildung 4.13). Anschließend wird der k_{La} in Gl. 4.3 an den experimentell bestimmten pO_2 -Verlauf angepasst (Linie in Abbildung 4.13). Einschaltexperimente erfolgten im 200 mM Acetatpuffer. pO_2 wurde mit der Messmethode aus Kap. 5.2 bestimmt. In leeren Wells wurde beim Einschaltversuch nach ca. 20 s ein Sauerstoffpartialdruck von $pO_2 > 95\%$ erreicht (offene Symbole in Abbildung 4.13). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Luftversorgung des Gasraumes als nicht limitierend für den Sauerstoffeintrag angesehen werden konnte.

Wiederholungsexperimente bei hohen Temperaturen $T > 50^\circ\text{C}$ zeigten eine starke Abweichung von dem in Einschaltversuchen zuvor bestimmten k_{La} . Dieses Ergebnis konnte auf eine Veränderung der Folieneigenschaften durch Erhitzung auf $T > 50^\circ\text{C}$ zurückgeführt

werden. Abbildung 4.14 illustriert diese Veränderung in der Sauerstoffdurchlässigkeit anhand der vor der Erhitzung (*Rauten*) und nach der Erhitzung (*Rechtecke*) bestimmten k_{La} -Werte.

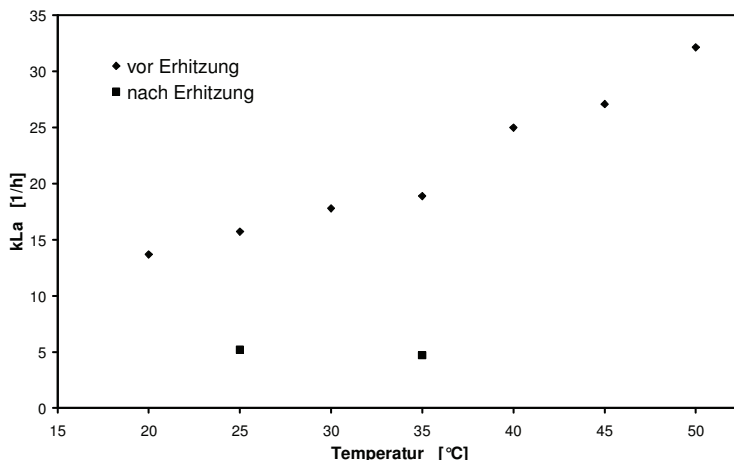


Abbildung 4.14: k_{La} -Werte gemessen vor (*Rauten*) und nach der Erhitzung (*Rechtecke*) des Systems auf 60°C. Durch die Verwendung einer Folienvariante mit erhöhter Steifigkeit (Herstellerbezeichnung: 25 μm , *High Rigidity*) konnte jedoch eine Folie gefunden werden, welche temperaturunabhängiges Verhalten zeigte. Die mit dieser Folie bestimmten k_{La} -Werte sind in Abbildung 4.15 präsentiert. Die Temperaturabhängigkeit des k_{La} wurde für alle in Abbildung 4.15 dargestellten Messpunkte linear angepasst:

$$k_{La}(600\text{rpm})[1/h] = 0,733 \cdot T[^\circ\text{C}] + 1 \quad (4.4)$$

Neben den regulären Einschaltversuchen mit Pufferlösung (*offene Kreise*) sind die Ergebnisse der Sulfitversuche im Temperaturbereich 30–40°C (*offene Rechtecke*). Die Sulfitversuche korrelieren im Rahmen der Messgenauigkeit und der Reproduzierbarkeit mit den Ergebnissen der regulären Einschaltversuche. Des Weiteren sind Einschaltversuche mit Substratlösung des Oxidasesystems (*geschlossene Dreiecke*) dargestellt. Diese Versuche entstanden nicht im Rahmen der Folienuntersuchung, sondern im Laufe der Experimente zur Charakterisierung des Oxidasesystems. Sie wurden in Wells ohne Enzym aufgenommen und resultierten in systematisch niedrigeren k_{La} -Werten als die Experimente zur k_{La} -Bestimmung ohne Substrat. Mögliche Erklärungen für diese abweichenden Ergebnisse ist die Alterung der sauerstoffdurchlässigen Folie oder der Einfluss des Substrates bereits in niedrigen eingesetzten Konzentrationen von < 50 mM auf den Sauerstoffübergang. Um das beobachtete

Phänomen zu verstehen, sind an dieser Stelle weitere Untersuchungen notwendig. Wenn Alterung der Folie für einen nicht reproduzierbaren Sauerstoffeintrag verantwortlich ist, sollte in Zukunft die Lösung aus Abbildung 4.11 zur Vermeidung der Verdunstung gewählt werden. Die Messgenauigkeit könnte durch die Anwendung der Druckerhöhungsmethode nach Linek et al. (1989) verbessert werden.

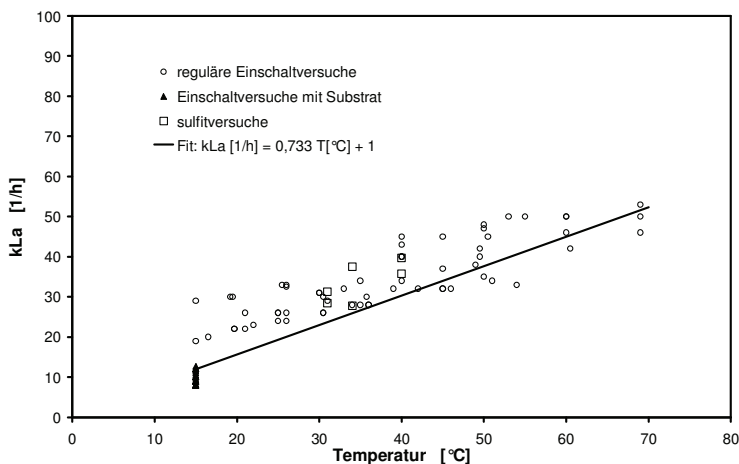


Abbildung 4.15: $k_L a$: Messwerte (Symbole) und lineare Anpassung (Gerade) bei verschiedenen Temperaturen, $d_0=3$ mm, $n=600$ rpm, $V_L=200$ μL .

Grenzen der Gültigkeit

Die Filmtheorie besitzt Gültigkeitsgrenzen, welche entscheidend für die Anwendbarkeit des Sauerstoffeintragsmodells (Gl. 4.3) sein können. Im allgemeinen Fall einer durch Sauerstoff nicht limitierten Enzymreaktion sind die Stofftransporteigenschaften nach Reith and Beek (1973) nicht nur von der Hydrodynamik und Stoffeigenschaften ($k_L a$), sondern auch von der Reaktionsgeschwindigkeit abhängig:

$$OTR = \sqrt{2 \cdot [\text{Enzym}] \cdot \text{Aktivität} / L_{O_2} \cdot D_{O_2} + k_L^2 \cdot L_{O_2} \cdot (100\% - pO_2)} \quad (4.5)$$

mit:

$[\text{Enzym}]$	Enzymkonz.	[mol/L]
Aktivität	Enzymaktivität	[1/h]
L_{O_2}	Sauerstofflöslichkeit	[mol/L]
D_{O_2}	Diffusionskoeff. von O_2 in H_2O	[m ² /h]
k_L	Stoffübergangskoeff.	[m/h]

Vereinfachend kann davon ausgegangen werden, dass Gl. 4.3 gültig ist, solange ein vernachlässigbarer Anteil des eingetragenen Sauerstoffes in der Gas-Flüssig-Grenzfläche reagiert (vgl. Hermann, 2003). Diese Bedingung kann durch die dimensionslose Hatta-Zahl Ha ausgedrückt werden (Linek and Vacek, 1981; Marquez et al., 1994):

$$Ha = \frac{\text{Reaktionsgeschwindigkeit}}{\text{Stofftransport}} < 0,3 \quad (4.6)$$

Für den Fall einer durch Sauerstoff nicht limitierten Enzymreaktion (0. Reaktionsordnung bezüglich Sauerstoff) lässt sich die Hatta-Zahl formulieren als:

$$Ha = \frac{\sqrt{2 \cdot [\text{Enzym}] \cdot \text{Aktivität} / L_{O_2} \cdot D_{O_2}}}{k_L} \quad (4.7)$$

mit den Werten für 25°C:

L_{O_2}	0,270	[mol/L]
D_{O_2}	$7,56 \times 10^{-6}$	[m ² /h]
$k_L = k_L a/a$	-0,116	[m/h]

Dabei gilt für a in einem Well:

$$a = \frac{\text{Diffusionsfläche}}{\text{Reaktionsvolumen}} \sim 167 \frac{1}{m} \quad (4.8)$$

Mit der in Vorversuchen bestimmten Enzymaktivität des Oxidasensystems bei Standardbedingungen (vgl. Kap. 3.2.2) und 25°C:

$$\text{Aktivität} \sim 8 \times 10^3 [\text{mol}_{\text{Substrat}} / \text{mol}_{\text{Enzym}} / \text{h}]$$

lässt sich die kritische Enzymkonzentration berechnen:

$$[\text{Enzym}] \sim 2,7 \mu\text{M}.$$

In diesem Konzentrationsbereich verlässt das Sauerstoffübergangsmodell die Grenzen seiner Gültigkeit, sodass auch Gl. 4.3 ihre Gültigkeit verliert.

4.3.3 Ausblick zur definierten Sauerstoffversorgung

Auf dem jetzigen Stand der Apparaturentwicklung erfolgt die Umschaltung der Begasung zwischen Luft und Stickstoff manuell. Durch die Verwendung einer Stickstoff / Luft oder Stickstoff / Sauerstoff Gasmischbatterie und ihre automatisierte Ansteuerung könnte die Begasung in Zukunft mit einem definierten Stickstoff-Sauerstoff-Gemisch erfolgen. Auf diese Weise könnten praktisch beliebig kleine Sauerstoffeinträge ermöglicht und somit Messung geringster Oxidasenaktivitäten verwirklicht werden. Außerdem könnte der Sauerstoffeintrag im Laufe des Versuchs gezielt an die sich ändernde Oxidasenaktivität angepasst werden, sodass die Messung immer im sensitivsten Bereich erfolgt. Eine weitere Möglichkeit zur

Steuerung des Sauerstoffeintrages ist die gezielte Beeinflussung des k_{la} über die Variation der Schüttlerdrehzahl. Dazu muss der k_{la} allerdings im gesamten relevanten Temperaturbereich als Funktion der Schütteldrehzahl bekannt sein.

4.4 Ansteuerung der entwickelten Apparatur

Eine ausführliche Beschreibung der entwickelten Automatisierungssoftware würde den Rahmen eines Unterkapitels sprengen. Aus diesem Grund werden hier lediglich die Struktur und die wichtigsten Programmeigenschaften vorgestellt. Die genaue Softwarebeschreibung ist dem Anhang D, *Software zur Ansteuerung des Enzymprüfstandes*, zu entnehmen. Die Bedienungsanleitung zur Apparatur findet sich im Anhang A.

Das Benutzermenü ermöglicht das Einstellen aller für die Versuchsdurchführung notwendigen Parameter. Das Experiment verläuft automatisch. Die Kommunikation mit den einzelnen Geräten erfolgt über die RS-232 Schnittstellen. Am Ende des Versuches steht eine Datei mit aufgenommenen Messdaten für die Auswertung zur Verfügung. Für die Pipettieraufgaben werden die bereits existierenden, vorprogrammierten Möglichkeiten von *WinPREP* genutzt, die sich zwischen den Skripten der Bediensoftware eingliedern lassen. Der Aufbau der Programmierung verläuft in weiten Teilen sequentiell, so dass die Integration weiterer Geräte möglich ist.

Die generelle Struktur der gesamten Applikation ist in Abbildung 4.16 dargestellt. Die beiden primären Programmblöcke: Die Ansteuerung der Geräte und die optische Messung sowie die Visualisierung des Benutzermenüs für die Wahl der Versuchsparameter wurden in *MSL* innerhalb der Software *WinPREP* realisiert. Diese beiden Skripte stellen den Kern der gesamten Applikation dar. Die Makros zur Festlegung von Wellmap und Pipettiermengen (*Wellmap.xls*) wurden unter *Microsoft Excel VBA* implementiert. Ebenfalls unter *Microsoft Excel VBA* wird die Auswertung und Darstellung der Messergebnisse (*Auswertung.xls*) durchgeführt. Die Datenübergabe zwischen den einzelnen Programmblöcken erfolgt unter Zuhilfenahme von Textdateien (*wellmap+ul.csv*, *config.ini*, *Messdatei.txt*).

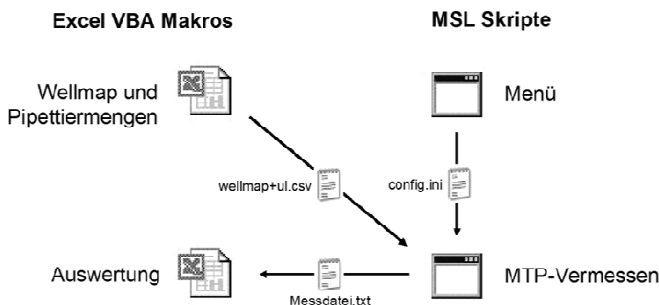


Abbildung 4.16: Struktur der entwickelten Software.

Zu Beginn eines Versuchs wird *WinPREP* gestartet, und das Skript „Menü“, die Pipettieraufgaben und die anschließende Online-Messung über das Skript „MTP-Vermessen“ automatisch abgearbeitet. Über die Eingabemaske im Menü werden folgende Versuchsparameter eingetragen und anschließend in Form von zwei Textdateien an das Hauptprogramm *MTP-Vermessen* übergeben:

- Die zu vermessenden Wells einer Platte und die jeweiligen Pipettiermengen;
- Spektrometer-Einstellungen: COM-Port, die zu vermessenden Wellenlängenpaare (Anregung und Emission), Bandbreiten, Sensitivität, Messzeit pro Well etc.;
- Schüttler-Einstellungen: COM-Port, Schütteldrehzahl;
- Thermostat-Einstellungen: COM-Port, externe oder interne Temperaturregelung, Temperatur-Zeit-Verlauf als Abfolge von Rampen;
- allgemeine Einstellungen: Versuchsdauer, Messhäufigkeit;
- sonstiges: Speichern / Laden der gewählten Einstellungen.

Anschließend wird das Experiment vom Hauptprogramm, Skript „MTP-Vermessen“, durchgeführt. Das Skript umfasst die Ansteuerung des Pipettierroboters, des Fluoreszenzspektrometers, des Thermostates und der Schüttelmaschine, das Positionieren der Optik, sowie die Aufnahme, das Verarbeiten und die Ausgabe der optischen Messwerte.

4.4.1 Ausblick Ansteuerung

Eine allgemeine Schwachstelle des Anlagenaufbaus besteht in der Ansteuerung aller Geräte über die Schnittstelle RS-232. Damit ist die Zahl der an den PC anschließbaren Geräten innerhalb einer Anlage begrenzt. Da der Trend in Richtung immer komplexerer Apparaturen weist, sollte in Zukunft die Ansteuerung über eine flexiblere Schnittstelle in Erwägung

gezogen werden, vor allem wenn die entwickelte Forschungsanlage zu kommerziellen kompakten Messanlagen weiterentwickelt wird. Hier würde sich beispielsweise eine Schnittstelle wie das Profibusnetzwerk zur Ansteuerung zahlreicher Geräte anbieten.

5 Entwicklung und Etablierung optischer Methoden

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit den am Enzymprüfstand etablierten Messmethoden zur Erfassung von biochemischen Reaktionen. Die am häufigsten eingesetzten Methoden im gewählten UV- und VIS-Bereich sind die Absorptions-, Streulicht- und Fluoreszenzmessung (vgl. Kap. 2.4). Das Streulicht eignet sich zur Erfassung nicht homogener Systeme und kommt somit nur für wenige Enzym-katalysierte-Stoffsysteme in Frage. Die Absorptionsmessung erfolgt im Durchlicht². Eine solche Messung ist nicht mit dem bestehenden Temperierkonzept am Enzymprüfstand vereinbar (vgl. Kap. 4.2.2). Somit fällt das Hauptaugenmerk auf fluoreszenzbasierte Methoden. Messtechnisch ist jeder enzymatische Assay, welcher auf der Messung der Fluoreszenzintensität basiert, auf dem Enzymprüfstand anwendbar. Um einen Assay zur Enzymcharakterisierung im Sinne des SMAS-Prinzips zu nutzen, müssen jedoch zwei weitere Bedingungen erfüllt sein:

- Anwendbarkeit des Assays im relevanten Temperaturbereich (10 - 85°C) und
- Anwendbarkeit des Assays für die relevante Experimentendauer (bis ca. 6 h).

Die erste Bedingung impliziert zunächst die Funktionalität des Assays im gesamten Temperaturbereich. In einer Reihe von Assays (vgl. Schmidt and Bornscheuer, 2005) muss das Reaktionsprodukt der eigentlichen Zielreaktion eine enzymatische Folgereaktion eingehen, damit optisch aktive Substanzen freigesetzt und erfasst werden können. In diesem Fall muss gewährleistet sein, dass die Folgereaktion im gesamten Temperaturbereich nicht limitierend ist. Darüber hinaus setzt die erste Bedingung voraus, dass der im Allgemeinen nicht vernachlässigbare Einfluss der Temperatur auf die Fluoreszenz (vgl. Lackowitz, 1999) bei der Auswertung der optischen Signale berücksichtigt wird.

Die zweite Anforderung an den Assay beinhaltet ebenfalls Aspekte der Funktionalität und der Auswertbarkeit. Die Reaktion muss unlimitiert und nicht inhibiert während des gesamten Experiments im Stundenbereich ablaufen. Somit sind Assays, welche zur Messung der Enzymanfangsaktivität im Minutenbereich ausgelegt sind, kritisch zu prüfen. Des Weiteren sind optische Zeiteffekte, wie z. B. die Abschwächung der Fluoreszenz durch das Licht im Laufe der Zeit („Photobleaching“, Lackowitz, 1999), bei der Auswertung zu berücksichtigen.

² Durch die Verwendung spiegelnder Partikel im Well oder eines Fluoreszenzfarbstoffes, welcher mit der absorbierten Wellenlänge angeregt wird, ist eine „indirekte“ Absorbanzmessung vorstellbar. Entsprechende Methoden sind noch nicht etabliert.

Neben der Anwendbarkeit spielt die Universalität eines Assays eine entscheidende Rolle im Screening. Tatsächlich sind Assays von besonderem Interesse, welche ganze Klassen von Reaktionen erfassen können. Ein ideales Beispiel würden in diesem Zusammenhang Methoden darstellen, welche die Entwicklung der Reaktionswärme exothermer Reaktionen in einzelnen Wells der MTP messen (z. B. über eine Infrarotkamera). Solche Methoden sind im Rahmen des Enzymprüfstandes nicht anwendbar, da hier die Temperatur in der MTP von außen aufgeprägt wird. Im Primärscreening sind solche Methoden jedoch durchaus vorstellbar.

Den Gegensatz zu universellen Assays stellen Reaktionssysteme dar, welche auf einem optisch aktiven Modellsubstrat oder -produkt basieren (vgl. Schmidt and Bornscheuer, 2005). Dabei wird angenommen, dass die gewonnenen Erkenntnisse auf die tatsächliche Zielreaktion übertragen werden können. Auf Grund der Substratspezifität vieler Enzyme ist diese Annahme nicht immer gültig. Im Gegensatz zu universellen Assays ist bei den substratspezifischen Assays kein Screening nach Substraten, sondern ausschließlich nach Enzymen möglich. Außerdem wird die stabilisierende bzw. destabilisierende Wirkung des Substrats auf das Enzym (vgl. Zecchinon et al., 2005; Hey and Clark, 1993) von substratspezifischen Assays nicht berücksichtigt.

Da der Fokus des Enzymprüfstandes gerade in der Bestimmung der Enzymstabilität liegt, kommen ausschließlich universelle Assays zum Einsatz. In diesem Zusammenhang wird die Etablierung zweier Methoden am Enzymprüfstand beschrieben, welche zur Enzymcharakterisierung eingesetzt wurden. Ein Assay basiert auf der Messung der pH-Änderung im Laufe der Reaktion und ist somit prinzipiell für jede pH-aktive Reaktion anwendbar (Kap. 5.1). Der zweite Assay basiert auf der Messung des Sauerstoffpartialdruckes pO_2 und ist für jede Reaktion geeignet, bei der Sauerstoff verbraucht wird (Kap. 5.2). Zum Abschluss des Kapitels wird ein Ausblick über weitere optische Methoden präsentiert, die in Zukunft die Möglichkeiten des Enzymprüfstandes erweitern könnten (Kap. 5.3.).

5.1 pH-aktive Reaktionen

Bei pH-aktiven Reaktionen werden H_3O^+ -Ionen freigesetzt bzw. verbraucht. Zu solchen Reaktionen zählen z. B. die Esterhydrolyse und ihre Umkehrreaktion, die Veresterung. Für die Entwicklung des pH-basierten Assays wurde die Hydrolyse im Esterasesystem (vgl. Kap. 3.2.1) gewählt. Das Assayprinzip ist in Abbildung 5.1 illustriert. Als Reaktionsprodukt wird eine Säure gebildet. Die Säuredissoziation führt zum pH-Abfall im System. Die optische

Messung des pH-Wertes (s. Kap. 5.1.1) liefert somit eine Aussage über den Reaktionsfortschritt. Die Produktkonzentration wird aus der gemessenen pH-Änderung berechnet (s. Kap. 5.1.2). Auf die gleiche Art wird die Produktkonzentration in Wells mit Substrat, jedoch ohne Enzym bestimmt, um so die Autohydrolyse zu erfassen und zwischen enzymatischer und chemischer Produktbildung unterscheiden zu können. Schließlich kann die Reaktionsrate und somit die Enzymaktivität als Zeitableitung der Produktkonzentration berechnet werden.

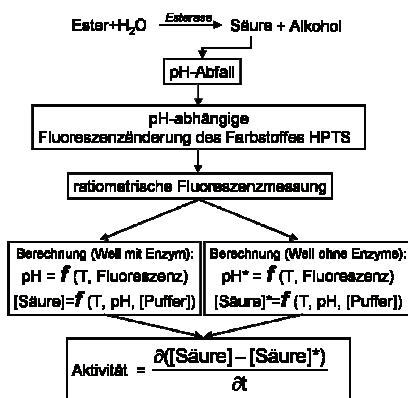


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des Assay- und Auswertepinzips für pH-aktive Reaktionen.

5.1.1 Optische pH-Messung

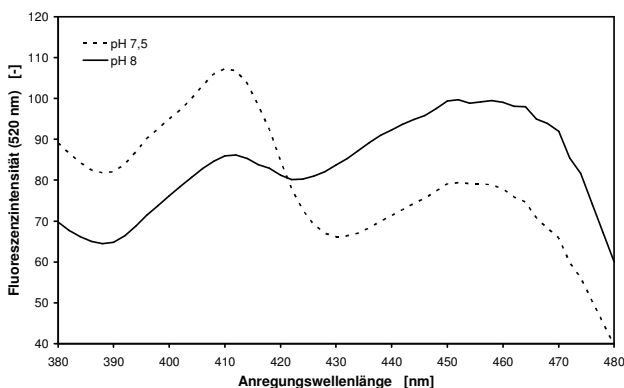


Abbildung 5.2: gemessene Anregungsspektren von HPTS bei $\lambda_{em}=520\text{nm}$ bei verschiedenen pH-Werten, 25°C.

Der Fluoreszenzfarbstoff HPTS besitzt ein pH- und temperaturabhängiges Anregungsspektrum mit Maxima bei $\lambda_{ex}=405$ nm und $\lambda_{ex}=450$ nm (Abbildung 5.2, Lackowitz, 1999). Mit steigendem pH fällt die Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{ex}=405$ nm und nimmt bei $\lambda_{ex}=450$ nm zu. Durch die Division der Fluoreszenzintensitäten bei beiden Wellenlängen (in diesem Kapitel vereinfachend als *Fluoreszenzverhältnis* bezeichnet) wird eine ratiometrische pH-Messung ermöglicht. Dabei wird der Einfluss intensitätsbasierter Fehlerquellen, wie z. B. Schwankungen in der Lichtquellenintensität, in der Empfindlichkeit des Photodetektors oder durch Pipettierfehler verursachte Unterschiede in HPTS-Mengen von Well zu Well im Vergleich zur Intensitätsmessung stark reduziert. Die Intensität der HPTS-Fluoreszenz im pH-Bereich von 2-14 setzt sich bei einer Anregungswellenlänge λ_{ex} aus der Fluoreszenz der deprotonierten (D^-) und der protonierten (DH) Formen zusammen und kann durch folgende Gleichung beschrieben werden (vgl. Mills and Chang, 1993):

$$I(\lambda_{ex}) = K \cdot \left(\frac{\varepsilon(D^-) \cdot K_a + \varepsilon(DH) \cdot [H_3O^+]}{K_a + [H_3O^+]} \right) \quad (5.1)$$

I	Fluoreszenzintensität	[-]
K_a	Dissoziationskonstante	[mol/L]
$\varepsilon(D^-)/\varepsilon(DH)$	Absorbanz der deprotonierten / protonierten HPTS-Form	[-]
K	temperaturabhängiger Koeffizient	[-]

Da die protonierte Form bei $\lambda_{ex}=450$ nm nicht absorbiert ($\varepsilon_{450nm}(DH)=0$), kann das Fluoreszenzverhältnis zwischen $\lambda_{ex}=405$ nm und $\lambda_{ex}=450$ nm ausgedrückt werden als:

$$\frac{I(405nm)}{I(450nm)} = \frac{K_{405nm} \cdot (\varepsilon_{405nm}(D^-) \cdot K_a + \varepsilon_{405nm}(DH) \cdot [H_3O^+])}{K_{450nm} \cdot \varepsilon_{450nm}(D^-) \cdot K_a} \quad (5.2)$$

Das Fluoreszenzverhältnis ist also proportional zu $[H_3O^+]$. In Abbildung 5.3 ist das Fluoreszenzverhältnis für einen weiten Temperaturbereich gegen $[H_3O^+]$ und den pH-Wert aufgetragen. Der hergeleitete lineare Zusammenhang aus Gl. 5.2 bei konstanter Temperatur wird bestätigt. Somit kann bei homogener Temperaturverteilung in der MTP der unbekannte pH-Wert in einem Well bestimmt werden. Zu diesem Zweck wird das Fluoreszenzverhältnis im Well zwischen den Fluoreszenzverhältnissen in zwei Referenzwells interpoliert, welche mit Puffern bekannter pH-Werte gefüllt sind. 15 Referenzwells (5 verschiedene pH-Werte, gemessen in jeweils 3 Well) haben sich im relevanten pH-Bereich (7,4-8,3, vgl. Kap. 3.2.1) zur Erstellung der Kalibriergeraden als praktikabel erwiesen. Die Messgenauigkeit der Methode ist durch den pH-Elektrodrift bei der Herstellung der Referenzpufferlösungen

limitiert. Für die eingesetzte pH-Elektrode (vgl. Kap. 3.3.1) beträgt die Messgenauigkeit der Methode 0,05 pH-Stufen.

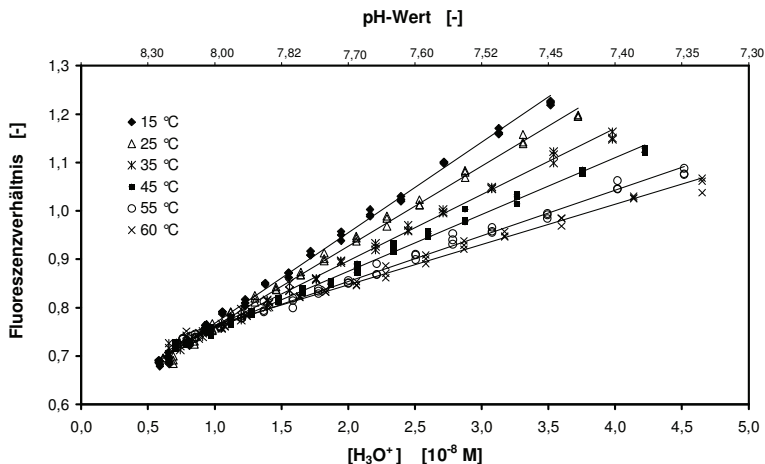


Abbildung 5.3: Linearer Zusammenhang zwischen dem Fluoreszenzverhältnis und $[H_3O^+]$ im relevanten pH-Bereich bei verschiedenen Temperaturen.

5.1.2 Berechnung der Produktkonzentration aus dem pH-Wert

Im Folgenden wird das mathematische Modell vorgestellt, welches die temperaturabhängige Berechnung der Produktkonzentration aus dem pH-Wert ermöglicht. Der eingesetzte Phosphatpuffer zeigt bei 25°C eine pH-abhängige Dissoziation zu unterschiedlichen Ionen mit Dissoziationskonstanten K_{1-3} :

$$\begin{aligned}
 K_1 &= \frac{[H_2PO_4^-] \cdot [H_3O^+]}{[H_3PO_4]} = 10^{-2,16} \\
 K_2 &= \frac{[HPO_4^{2-}] \cdot [H_3O^+]}{[H_2PO_4^-]} = 10^{-6,86} \\
 K_3 &= \frac{[PO_4^{3-}] \cdot [H_3O^+]}{[HPO_4^{2-}]} = 10^{-12,32}
 \end{aligned} \tag{5.3}$$

Im relevanten pH-Bereich spielt ausschließlich die Dissoziation mit $K_2(25^\circ\text{C})=10^{-6,86}$ eine Rolle (H_3PO_4 (K_1) liegt vollständig dissoziiert, HPO_4^{2-} (K_3) vollständig undissoziiert vor, Gl. 5.6) Gl. 5.4 beschreibt die temperaturabhängige Dissoziation der sauren Pufferkomponente NaH_2PO_4 und der basischen Pufferkomponente Na_2HPO_4 nach Beynon and Easterby (2003):

$$K_{NaH_2PO_4} = \frac{[HPO_4^{2-}] \cdot [H_3O^+]}{[H_2PO_4^-]} = 10^{(-6,86 + (T - 298,15) \cdot 0,0028)}$$

$$K_{Na_2HPO_4} = \frac{[H_2PO_4^-] \cdot [OH^-]}{[HPO_4^{2-}]} = \frac{K_W}{K_{NaH_2PO_4}} \quad (5.4)$$

mit der Dissoziationskonstante von Wasser nach Harned and Owen, (1958):

$$K_W = [H_3O^+] \cdot [OH^-] = 8,754 \cdot 10^{-10} \cdot \exp\left(-\frac{1,1 \cdot 10^6}{T^2}\right) \quad (5.5)$$

Ausgehend von der Produktdissoziationskonstante der Phenyllessigsäure $pK_p = 4,31$ bei 25°C wird angenommen, dass das Produkt im relevanten Temperatur- und pH-Bereich vollständig dissoziiert vorliegt. Das pH-Modell wird durch die Massenbilanz des Phosphatpuffers:

$$[NaH_2PO_4] + [Na_2HPO_4] = [HPO_4^{2-}] + [H_2PO_4^-]$$

$$[H_3PO_4] = [PO_4^{3-}] = 0 \quad (5.6)$$

sowie das Ladungsgleichgewicht komplettiert:

$$[H_3O^+] = [OH^-] + [P^-] + 2[HPO_4^{2-}] + [H_2PO_4^-] \quad (5.7)$$

Das vorliegende pH-Modell kann numerisch gelöst und die Produktkonzentration als Funktion des pH-Wertes, der Pufferkonzentration sowie der Temperatur berechnet werden.

Pufferwahl

Das vorgestellte pH-Modell zeigt, wie die Produktbildung anhand der im Laufe des Experiments optisch gemessenen pH-Änderung bestimmt werden kann. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass der pH-Wert in einem Enzym-katalysierten-System die Enzymaktivität beeinflusst. Dieser Einfluss lässt sich mit dem modifizierten Ansatz nach Ohara et al. (1992) als Gaußkurve mit dem Maximum bei $pH = pH_{opt}$ und der Standardabweichung $\sigma = \Delta pH$ beschreiben, sodass die Enzymaktivität mit dem steigenden Betrag der Differenz ($pH_{opt} - pH$) abnimmt:

$$\text{Aktivität} = \text{Aktivität}(pH_{opt}) \cdot e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{pH_{opt} - pH}{\Delta pH} \right)^2} \quad (5.8)$$

Somit widersprechen sich die Assay-Anforderungen bezüglich des pH-Wertes. Einerseits führt eine zu große pH-Wert-Änderung zum Aktivitätsverlust des Enzyms. Gleichzeitig bedeutet eine zu geringe pH-Wert-Änderung den Sensitivitätsverlust der Messmethode. Als Kompromiss zwischen diesen beiden Anforderungen muss die Pufferstärke so optimiert werden, dass:

- der pH-Wert nicht den Bereich der optimalen Enzymaktivität verlässt,
- die pH-Änderung für eine auswertbare Messung ausreicht.

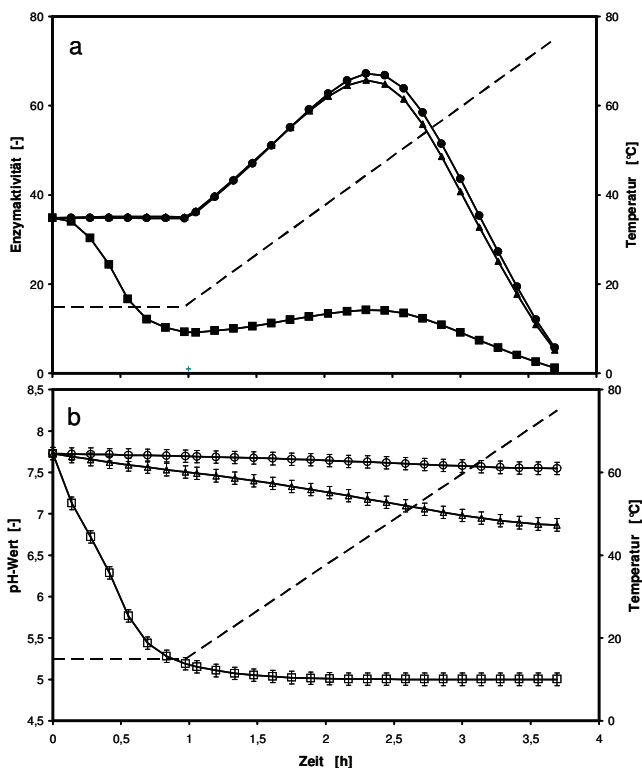


Abbildung 5.4: gPROMS Simulationen der Enzymaktivität (a, *geschlossene Symbole*) und des pH-Wertes (b, *offene Symbole und Fehlerbalken*) für ein aufgeprägtes Temperaturprofil (*gestrichelte Linie*) bei unterschiedlichen Pufferkonzentrationen von 2 M (*Kreise*), 0,25 M (*Dreiecke*), 0,01 M (*Rechtecke*). Die pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität ist gemäß Gl. 1.10 mit $pH_{opt}=7.5$ und $\Delta pH=0.5$ modelliert. Die pH-Messgenauigkeit von 0,075 pH-Stufe (*Fehlerbalken*) ist angenommen. Das Temperaturoptimum der Enzymaktivität ist bei 40°C modelliert.

Diese Zusammenhänge können durch Simulationen der Enzymaktivität und des pH-Wertes bei unterschiedlichen Pufferstärken verdeutlicht werden. In Abbildung 5.4 ist eine gPROMS Simulation der Enzymaktivität (a) und des pH-Verlaufs (b) eines *in silico* Experiments mit einem aufgeprägten Temperaturprofil (*gestrichelte Linie*) präsentiert. Die pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität ist entsprechend Gl. 5.8 mit $pH_{opt}=7.5$ und $\Delta pH=0.5$ modelliert. Die Messgenauigkeit von $\pm 0,075$ pH-Stufen ist angenommen. Das Modell (vgl. Kap. 6.1.2) sieht ein Maximum der Enzymaktivität bei 40°C vor. Bei der höchsten simulierten Pufferkonzentration von 2 M ist die Pufferwirkung so stark, dass nur ein geringer pH-Abfall

beobachtet wird (*offene Kreise, Fehlerbalken*). Dementsprechend verhält sich die Enzymaktivität (*geschlossene Kreise*) fast unabhängig vom pH-Wert als Funktion der Temperatur. Die Produktbildung (und somit die Enzymaktivität) kann jedoch nicht im Rahmen des Messfehlers anhand des pH-Verlaufs berechnet werden. Bei der kleinsten simulierten Pufferstärke von 0,01 M, dagegen, ist die pH-Änderung (*offene Rechtecke, Fehlerbalken*) deutlich sichtbar und eignet sich zur Erfassung der Produktbildung und damit der Enzymaktivität. Allerdings verlässt nach der ersten Stunde des Experiments der pH-Wert den Bereich der Enzymaktivität (*geschlossene Rechtecke*). Von diesem Zeitpunkt an ist das Enzym deaktiviert, sodass der weitere Versuchsverlauf keine Information über die Enzymeigenschaften enthält. Die beiden Simulationen unterstreichen also die Bedeutung der Pufferkonzentration zur Aufrechterhaltung der Enzymaktivität bei gleichzeitiger Auflösbarkeit des Messsignals. Bei der Pufferkonzentration von 0,25 M (*Dreiecke*) ist der Einfluss des pH-Wertes (*offene Dreiecke, Fehlerbalken*) auf die Enzymaktivität (*geschlossene Dreiecke*) vernachlässigbar. Gleichzeitig ist die pH-Änderung für die Erfassung der Produktbildung ausreichend.

Zusammenfassend lässt sich die Vorgehensweise bei der Wahl der Pufferkonzentration wie folgt definieren:

1. Basierend auf dem Einfluss des Substrats bzw. des Produkts auf die Enzymaktivität (Michaelis-Menten Kinetik, mögliche Produkt- und Substratüberschussinhibition) werden Grenzen definiert, in denen sich die Substrat- und Produktkonzentration im Laufe des Experiments verändern dürfen.
2. Ausgehend von diesen Grenzen und der geplanten Versuchszeit wird die Enzymkonzentration gewählt. Die niedrigste Enzymkonzentration ist durch die unkatalysierte Autohydrolysereaktion definiert. So darf der Enzym katalysierte Reaktionsanteil nicht vernachlässigbar klein im Vergleich zur Autohydrolyse sein.
3. Schließlich wird die Pufferkonzentration so eingestellt, dass für die gewählte Enzymkonzentration die pH-Änderung auswertbar ist, jedoch im Bereich der Enzymaktivität bleibt.

Wie bei jedem enzymatischen Assay erfolgt die Wahl des Puffers unter Beachtung des für die Enzymaktivität optimalen pH-Bereiches. Eine effiziente Pufferung liegt vor, wenn der im Experiment durchlaufene pH-Bereich innerhalb der Grenzen $[pK_{\text{Puffer}} - 1 ; pK_{\text{Puffer}} + 1]$ liegt. Zusätzlich muss am Enzymprüfstand die Temperaturabhängigkeit $pK_{\text{Puffer}}(T)$ berücksichtigt werden. Für den gewählten Phosphatpuffer ($pK_{\text{Puffer}} \sim 0.0028 \text{ 1/K}$) zeigt sich in Simulationen

in Abbildung 5.4 eine geringe durch Temperatur verursachte pH-Änderung (*Kreise*). Beim stark temperaturabhängigen TRIS-Puffer dagegen ($pK_{\text{Puffer}} \sim 0.028 \text{ 1/K}$) würde die Temperaturänderung von 25°C auf 75°C eine pH-Änderung von 8,06 auf 6,66 und damit den Verlust der Enzymaktivität verursachen. Im Gegensatz zur optischen Temperaturmessung (vgl. Kap. 5.3.3) werden dementsprechend beim Enzymassay Puffer mit schwach ausgeprägter Temperaturabhängigkeit eingesetzt.

5.1.3 Etablierung der Methode

In diesem Kapitel wird der Assay zur Erfassung pH-aktiver Reaktionen basierend auf den Ergebnissen aus Kap. 5.1.1 und 5.1.2 im Esterasesystem eingesetzt und somit etabliert. In Abbildung 5.5 ist das gemessene Fluoreszenzsignal und die anschließende Auswertung gemäß dem Schema in Abbildung 5.1 gezeigt. Die Form des aufgeprägten Temperaturprofils (konstante Temperatur in den ersten 20 min des Versuchs, anschließend Temperaturrampe, *gestrichelte Linie*) sowie anderer in diesem Kapitel gezeigten Temperaturprofile sind Gegenstand der Versuchsplanung und werden in Kap. 6.4 ausführlich behandelt.

Die Fluoreszenzverhältnisse in den Referenzwells, welche mit Puffern unterschiedlicher pH-Werte gefüllt sind, sind in Abbildung 5.5a durch *punkt-gestrichelte Linien* gekennzeichnet. Dabei stellt jeder Datenpunkt den Mittelwert der Fluoreszenzverhältnisse aus drei Referenzwells gleichen pH-Wertes dar. Die im Laufe des Experiments auftretenden Fluoreszenzänderungen in diesen Wells sind auf die temperaturbedingte pH-Änderung zurückzuführen (vgl. Gl. 5.4, 5.5). Die Fluoreszenzverhältnisse aus diesen Wells werden zu jedem Zeitpunkt des Experiments zur Erstellung der temperaturabhängigen Kalibriergeraden gemäß Abbildung 5.3 verwendet. Diese dienen der Berechnung des pH-Wertes in den Wells, in denen die Reaktion stattfindet.

Der Fluoreszenzverhältnisverlauf in zwei Wells mit Substrat, aber ohne Enzym (*offene Symbole*) repräsentiert die chemische Autohydrolysereaktion. Drei Wells mit Substrat und Enzym sind durch *geschlossene Symbole* gekennzeichnet. Der Verlauf des Fluoreszenzverhältnisses in diesen Wells beginnt bei Werten, welche $pH(25^\circ\text{C}) = 8,15$ entsprechen, um im Laufe des Versuchs sich den niedrigeren pH-Werten zu nähern. Dieses Verhalten weist auf den durch die Produktbildung bedingten pH-Abfall hin. In Abbildung 5.5b sind die mit Hilfe der Kalibriergeraden berechneten pH-Wertverläufe in Wells dargestellt, in welchen die Produktbildung (chemisch oder enzymatisch) stattfindet.

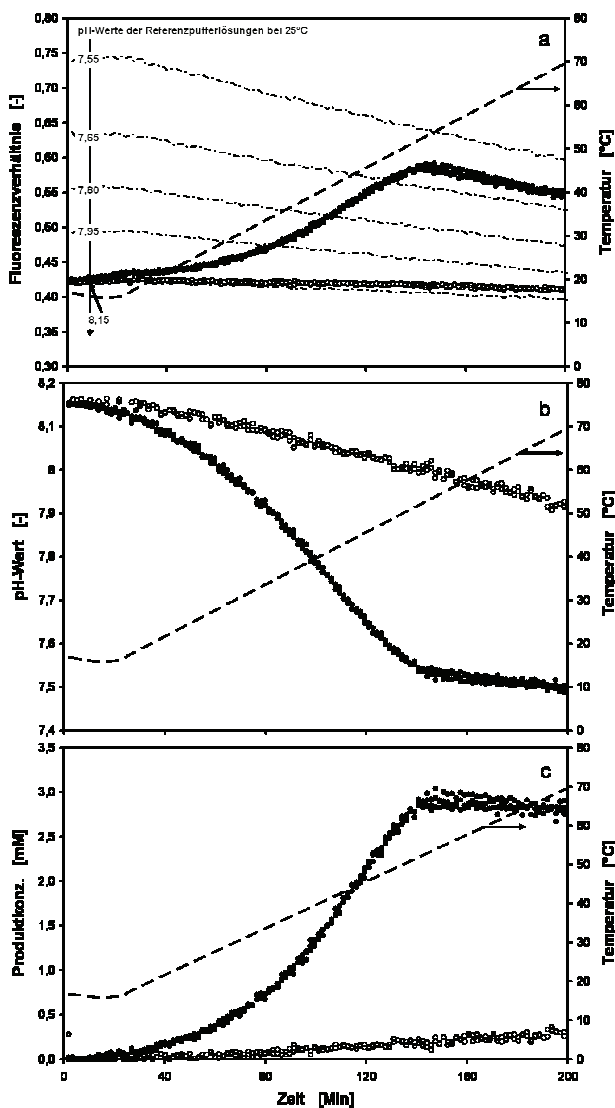


Abbildung 5.5: Auswertung der Fluoreszenzdaten für das aufgeprägte Temperaturprofil einer Rampe (gestrichelte Linie) gemessen in Referenzwells verschiedener pH-Werte (punkt-gestrichelte Linien), in Wells ohne Enzym mit Autohydrolysereaktion (offene Symbole) und Wells mit Enzym katalysierter Reaktion (geschlossene Symbole). Fluoreszenzverhältnisse (a), berechnete pH-Werte (b), berechnete Produktbildung (c). Assay: 30 mM Na-Phosphatpuffer, 10% EtOH, 30 mM Substrat, 0,02 g/L Enzym, 20 μ M HPTS.

Die aus den pH-Werten berechneten Produktkonzentrationen sind in Abbildung 5.5c dargestellt. Während sich die Produktverläufe in Wells mit rein chemischer Produktbildung durch einen langsamen Anstieg auszeichnen, zeigt die enzymkatalysierte Produktbildung einen deutlich schnelleren exponentiellen Anstieg bis ca. 40°C, welcher auf eine Arrhenius-Aktivierung des Enzyms hinweist. Zwischen 40°C und 50°C verlangsamt sich der Anstieg der Produktkonzentration, was auf einen zur Enzymaktivierung gegenläufigen Deaktivierungseffekt deutet. Bei 50°C nach ca. 140 min stoppt die Produktbildung abrupt. Dieses Verhalten entspricht dem spontanen Enzymschmelzen.

Die in Abbildung 5.5b,c dargestellten Verläufe deuten auf eine erfolgreiche Pufferwahl hin. Der Bereich der optimalen Enzymaktivität von $7,3 < \text{pH} < 8,2$ wird nicht verlassen, und die pH-Änderung ist gleichzeitig groß genug, um die Produktbildung zu verfolgen. Der enzymkatalysierte Reaktionsanteil ist deutlich, ca. um Faktor 9 größer als der chemische. Allerdings beinhalten die Kurvenverläufe keine Information darüber, wie stark die Enzymaktivität im Laufe des Experiments durch die sich ändernden Substrat- und Produktkonzentrationen beeinflusst wurde. Auch der optimale pH-Bereich, der im vorliegenden Fall einer Assa yetablierung in Vorversuchen bestimmt wurde, wäre unter Bedingungen des industriellen Screeningverfahrens zunächst nicht bekannt. In diesem Zusammenhang wird die Stärke der MTP im Sinne der parallelisierbaren Experimente deutlich. So können die 96 Wells einer MTP nicht nur zum Testen unterschiedlicher Enzymkandidaten eingesetzt werden. Vielmehr können Reproduzierbarkeitsversuche durchgeführt, aber auch der Einfluss solcher Parameter, wie der Substrat- und der Produktkonzentration gezielt untersucht werden.

In Abbildung 5.6 ist der berechnete pH-Wertverlauf bei Standardbedingungen (vgl. Kap. 3.2.1) für einen aufgeprägten Temperaturverlauf (*gestrichelte Linie*) dargestellt. Darüber hinaus sind die Verläufe aus demselben Experiment bei verkleinerter Substratkonzentration (20 mM statt 30 mM) und vor dem Reaktionsstart vorgelegtem Produkt (10 mM) dargestellt. Jede Bedingung wurde in drei Wells eingestellt. Im Rahmen der Messgenauigkeit ist kein Unterschied im Kurvenverlauf erkennbar. Somit ist gezeigt, dass für die gewählten Konzentrationen und Versuchsdauer der Einfluss der Substrat- sowie Produktkonzentration auf die Enzymaktivität vernachlässigbar ist. Außerdem ist in Abbildung 5.6 das Ergebnis eines Wiederholungsexperiments (*Experiment 2* in der Legende) gezeigt. Sowohl die Temperaturregelung als auch der pH-Wertverlauf reproduzieren im Rahmen der Messgenauigkeit *Experiment 1*. Somit ist neben der Reproduzierbarkeit der Messergebnisse

von Well zu Well auch die Reproduzierbarkeit von Experimenten, welche zu unterschiedlichen Zeiten bei gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, gezeigt.

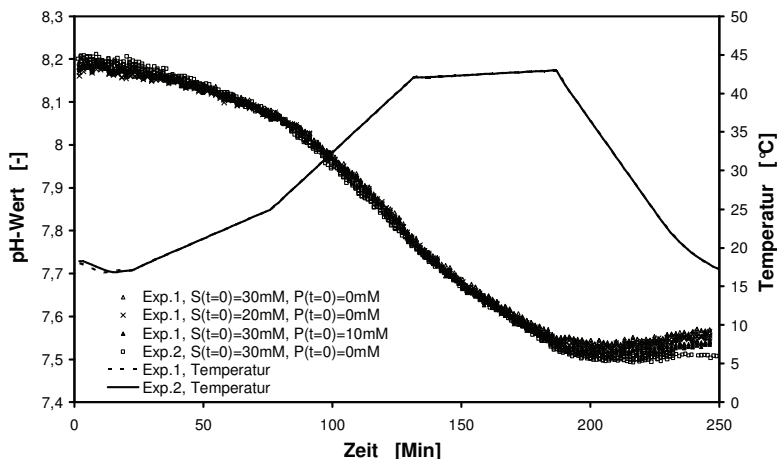


Abbildung 5.6: pH-Verläufe in zwei Experimenten mit demselben aufgeprägten Temperaturprofil (*gestrichelte Linie, durchgezogene Linie*) für unterschiedliche vorgelegte Substrat- und Produktkonzentrationen. Assay: 30 mM Na-Phosphatpuffer, 10% EtOH, 0,02 g/L Enzym, 20 μ M HPTS.

Des Weiteren wird der Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymaktivität im relevanten Bereich untersucht. In Abbildung 5.7a ist der pH-Wertverlauf (*Symbole*) bei unterschiedlichen Start-pH-Werten für ein aufgeprägtes Temperaturprofil (*gestrichelte Linie*) dargestellt. Jeder Start-pH-Wert wurde in zwei Wells gemessen. Die unterschiedlichen Steigungen der pH-Verläufe bei verschiedenen Start-pH-Werten sind durch die pH-abhängige Puffereffizienz zu erklären. Die berechnete Produktbildung (Abbildung 5.7b) ist weitgehend pH-unabhängig. Sie bestätigt somit die Annahme der pH-unabhängigen Enzymaktivität im gewählten Bereich.

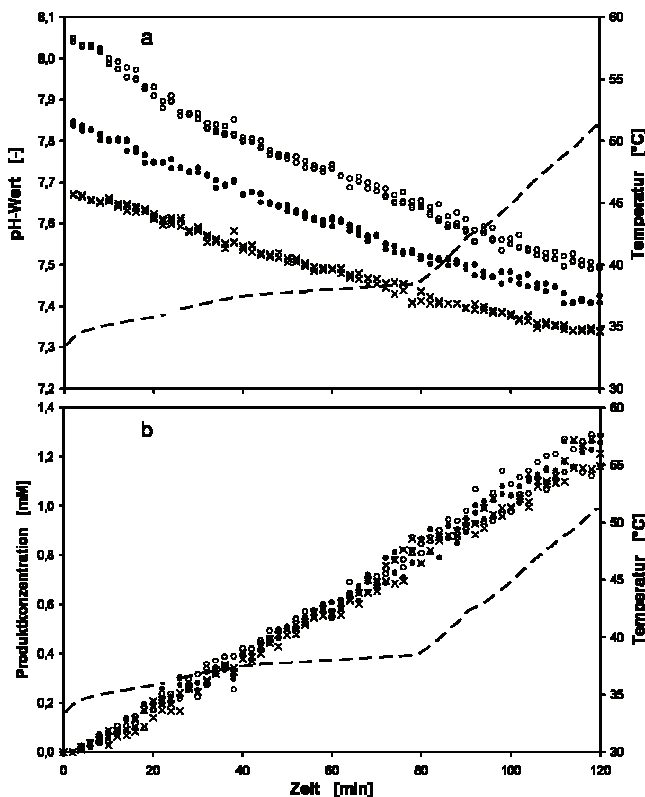


Abbildung 5.7: pH-Werte (a) und berechnete Produktkonzentrationen (b) für ein aufgeprägtes Temperaturprofil (gestrichelte Linie) bei verschiedenen Start-pH-Werten; Assay: 30 mM Na-Phosphatpuffer, 10% EtOH, 30mM Substrat, 0,02 g/L Enzym, 20 μ M HPTS.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich der etablierte Assay zur online-Erfassung von pH-aktiven Reaktionen mit einer Dauer von mehreren Stunden im weiten Temperaturbereich eignet und somit für die Enzymcharakterisierung am Enzymprüfstand einsetzbar ist. Unter der Annahme, dass jede Bedingung in drei Wells gemessen, 15 Wells mit Referenzpufferlösungen belegt und ein Well für die Temperaturregelung verwendet werden, ist die gleichzeitige Untersuchung von bis zu 26 Enzymkandidaten, Substraten oder Lösungsmitteln möglich. Die Grenzen des Assays sind für das jeweils untersuchte Stoffsystem durch die Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen in Substrat- und Produktkonzentration sowie pH-Wert definiert. Die MTP stellt jedenfalls mit ihrem hohen

Parallelisierungsgrad die geeignete Plattform dar, um die Bestimmung dieser Grenzen in den Enzymcharakterisierungsprozess zu integrieren. Dabei können zusätzliche, prozessrelevante Informationen über die Enzymkinetik (Limitierungen, Inhibierungen, pH-Empfindlichkeit) gewonnen werden.

5.2 Sauerstoffverbrauchende Reaktionen

Der optische Assay zur Erfassung sauerstoffverbrauchender Reaktionen wurde am Beispiel des Oxidasesystems (Kap. 3.2.2) entwickelt und etabliert. Um die Assayentwicklung zu erklären, ist zunächst die Betrachtung der vereinfachten Reaktionsgleichung gemäß Gl. 5.9 ausreichend, die den Sauerstoffverbrauch beschreibt.



Über die Messung der Sauerstoffkonzentration $[O_2]$ in der Reaktionslösung und die Bilanzierung des eingetragenen Sauerstoffes (*OTR*) kann der Sauerstoffverbrauch (*OCR*) als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt werden:

$$\frac{d[O_2]}{dt} = OTR - OCR \quad (5.10)$$

<i>OTR</i>	volumetrischer Sauerstoffeintrag	[mol/L/h]
<i>OCR</i>	volumetrischer Sauerstoffverbrauch	[mol/L/h]

5.2.1 Messprinzip zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration

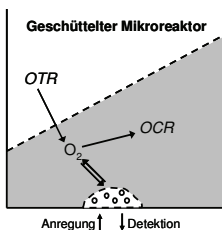


Abbildung 5.8: Schematische Darstellung des eingesetzten Messprinzips zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration in einem MTP-Well.

Das Messprinzip zur Messung der Sauerstoffkonzentration in MTP'n des Herstellers PreSens (vgl. Tabelle 3.1) ist in Abbildung 5.8 skizziert. Nach Gl. 5.10 ergibt sich die Sauerstoffkonzentration im ideal durchmischten Well aus dem Sauerstoffeintrag *OTR* und Sauerstoffverbrauch *OCR*. Über Diffusion wird der Sauerstoff zwischen der Reaktionslösung mit der am Wellboden Gel-immobilisierten Optode ausgetauscht, sodass sich ein schnelles

Gel-Flüssig-Gleichgewicht (Response-Zeit des Sensors von 30 s laut Hersteller) zwischen dem Sensor und dem Well einstellt. Dabei ist zu beachten, dass nicht die Sauerstoffkonzentration, sondern der Sauerstoffpartialdruck pO_2 im Well (Gl. 5.11) die Sauerstoffkonzentration im Sensor bestimmt. So ist zwar die Sauerstofflöslichkeit im Salzwasser gegenüber der im Reinwasser herabgesetzt, für die Sauerstoffkonzentration im Sensor spielt dies jedoch keine Rolle, da sich der Henrykoeffizient für das Gel-Flüssig-Gleichgewicht entsprechend verschiebt.

$$pO_2 = \frac{[O_2]}{L_{O_2}} \cdot 100\% \quad (5.11)$$

L_{O_2} Sauerstofflöslichkeit [mol/L]

pO_2 Sauerstoffpartialdruck [%]

Der Sauerstoff dient im Sensor als dynamischer Quencher des eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffes (Anregung: $\lambda_{ex} = 540$ nm, Emission: $\lambda_{em} = 650$ nm). Die Stern-Volmer-Gleichung beschreibt die Abschwächung der Fluoreszenzintensität F in Abhängigkeit von der Quencherkonzentration im Vergleich zur Fluoreszenz F_0 in Abwesenheit des Quenchers über den temperaturabhängigen Koeffizienten K :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K \cdot pO_2 \quad (5.12)$$

Bei konstanter Temperatur werden zur Bestimmung von F_0 und K (und somit zur Kalibrierung der Apparatur) Messungen bei zwei definierten Sauerstoffpartialdrücken benötigt. Diese erfolgen bei $pO_2 = 100\%$ (F_{100} , O_2 -Sättigung, Messung im reinen Wasser) und $pO_2 = 0\%$ (schnelle, Sauerstoff verbrauchende Reaktion, z. B. Sulfitsystem). Im Messprotokoll des Herstellers wird vorgeschlagen in einigen Wells der MTP die entsprechenden Lösungen vorzulegen, um sie dann als Referenzwerte für andere Wells zu nutzen. Da die gemessenen Fluoreszenzen von Well zu Well schwanken, wird eine ratiometrische Methode vorgeschlagen. Dazu liegt im Sensor neben dem sauerstoffsensitiven Fluoreszenzfarbstoff ein weiterer vor, welcher bei einer anderen Lichtwellenlänge ($\lambda_{em} = 590$ nm) sauerstoffunabhängig emittiert. Durch die Division der Fluoreszenzintensitäten bei beiden Emissionswellenlängen wird der Einfluss der intensitätsbasierten Fehlerquellen auf das Messergebnis verringert.

5.2.2 Übertragung des Messprinzips auf den Enzymprüfstand

Bei der Übertragung des Messprinzips auf den Enzymprüfstand musste eine Reihe von Unterschieden zu der vom Hersteller vorgesehenen Messmethode beachtet werden. Die

Messung am Enzymprüfstand erfolgt ohne Unterbrechung des Schüttelvorganges. Nur so kann ein definierter Sauerstoffeintrag erreicht und der Sauerstoffverbrauch mit Gl. 5.10 bestimmt werden. Außerdem erfolgt die Messung unter dynamischer Temperaturveränderung. Die Temperatur beeinflusst die Fluoreszenzintensität und den Koeffizienten K in Gl. 5.12.

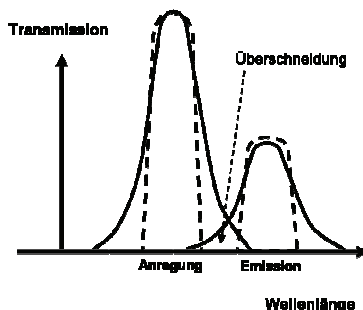


Abbildung 5.9: Schematische Darstellung der Transmissionsbanden für das Anregungs- und das Emissionslicht von Glasfiltern (*gestrichelte Linie*) und Monochromatoren (*durchgezogene Linie*).

Des Weiteren empfiehlt der Hersteller PreSens den Einsatz von Filterglasgeräten. Bei dem am Enzymprüfstand eingesetzten Fluoreszenzspektrometer handelt es sich dagegen um ein Monochromatorgerät. Hier werden die Anregungs- und Emissionswellenlängen durch die Verstellung von Monochromatorgittern erreicht. Dies bietet eine Reihe von Vorteilen in der Flexibilität und Schnelligkeit der Messung sowie Messbarkeit von Spektren. Allerdings besitzen Monochromatoren (Abbildung 5.9, *durchgezogene Linien*) im Vergleich zu Glasfiltern (Abbildung 5.9, *gestrichelte Linien*) sehr unscharfe Transmissionsbanden, sodass es zur Überschneidung der Spektren für das Anregungslicht und das Emissionslicht kommen kann (gekennzeichnet durch *Pfeil* in der Abbildung). Dies hätte zur Folge, dass nicht die Fluoreszenz (F), sondern ein Mischsignal aus der Fluoreszenz und dem vom Wellboden reflektierten Anregungslicht ($F+R$) gemessen wird. Auf Grund der nicht linearen Kalibrierung des Messsignals mit der Stern-Volmer-Gleichung (Gl. 5.12) würde dies zur fehlerhaften Auswertung der Signale führen.

Um den Einfluss des reflektierten Lichts auszuschließen, wurde emissionsseitig ein Glasfilter mit Hilfe eines am Fluoreszenzspektrometer speziell vorgesehenen Filterrahmens eingesetzt, welches für Lichtwellenlängen $\lambda < 570$ nm absorbiert. Der Lichtwellenleiter der Detektiereinheit wurde so ausgerichtet, dass der am Wellboden immobilisierte Sensor immer im Lichtspot liegt (vgl. Abbildung 5.10). Trotzdem haben die Experimente gezeigt, dass die

Messgenauigkeit mit der Messzeit pro Well steigt. Die Bezeichnung *Messzeit* bezieht sich dabei auf die Dauer, über welche die am Photomultiplier erfasste Intensität aufintegriert und gemittelt wird.

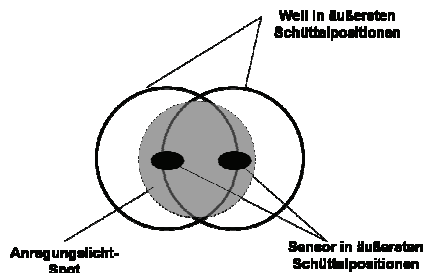


Abbildung 5.10: Ausrichtung der Optik für die Messung ohne Unterbrechung des Schüttelvorganges.

So ist bei einer Schüttlerdrehzahl von 600 rpm die Standardabweichung der Messung bei 0,5 s/Well Messzeit um Faktor 2 niedriger als bei 0,1 s/Well. Die Ergebnisse einer zweistündigen Messung bei $pO_2 = 0\%$ (Dreiecke, Fluoreszenz nicht gequencht, hohes Signal) und $pO_2 = 100\%$ (Rechtecke, Fluoreszenz gequencht, schwächeres Signal) bei 30°C für die optimierte Messzeit von 0,5 s/Well sind in Abbildung 5.11 dargestellt.

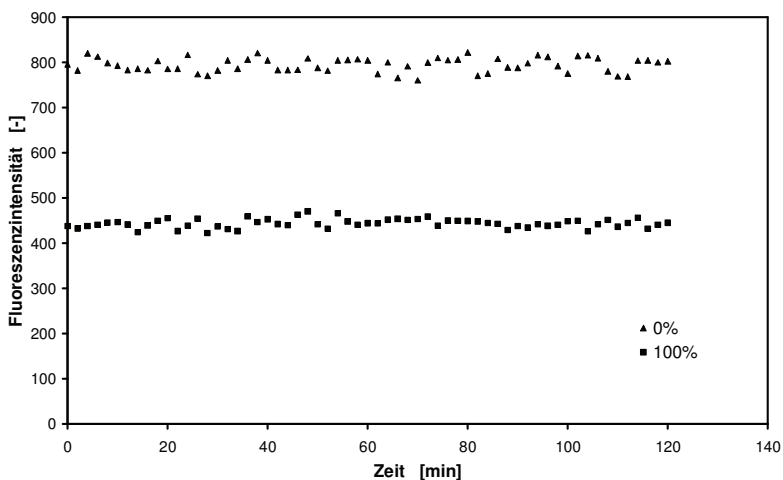


Abbildung 5.11: Fluoreszenzsignale bei $pO_2=0\%$ (Dreiecke) und $pO_2=100\%$ (Rechtecke) einer Messung bei $n = 600$ rpm, $d_0 = 3$ mm, $T = 30^\circ\text{C}$.

Aus dem Diagramm in Abbildung 5.11 lassen sich zwei Aussagen ableiten. Erstens findet während des zweistündigen Experiments keine Abschwächung der Fluoreszenz statt (z. B. durch Photobleaching). Zweitens lässt sich aus den Kurvenverläufen die Messgenauigkeit bestimmen. Die relative Standardabweichung beträgt unabhängig vom pO_2 ca. 3%.

In Abbildung 5.12 ist die Fluoreszenz für $pO_2 = 0\%$ und $pO_2 = 100\%$ gegen die Temperatur aufgetragen. Die Temperaturabhängigkeit ist linear. Somit lassen sich die temperaturabhängigen Variablen F_0 und F_{100} aus den Messungen bei $pO_2 = 0\%$ und $pO_2 = 100\%$ bei jeweils zwei definierten Temperaturen bestimmen. Damit kann aus Gl. 5.12 $K(T)$ abgeleitet werden.

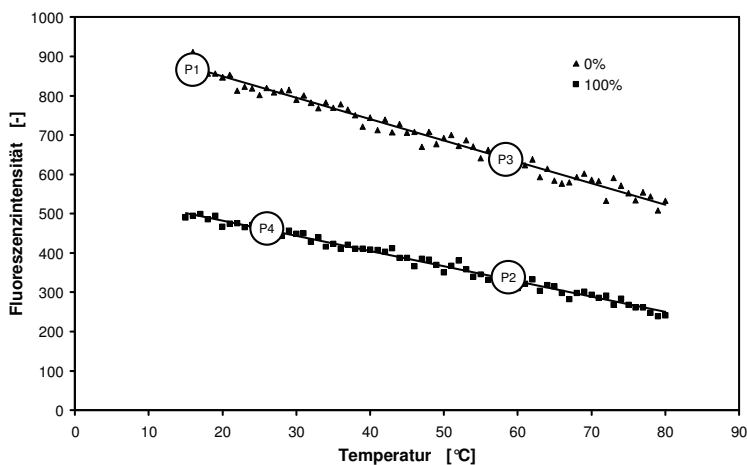


Abbildung 5.12: Temperaturabhängige Fluoreszenz bei $pO_2=0\%$ (Dreiecke) und $pO_2=100\%$ (Rechtecke) einer Messung bei $n=600$ rpm, $d_0=3$ mm.

Das heißt, dass sich durch die Messung von vier definierten Systemzuständen (in Abbildung 5.12 als Punkte **P1-P4** bezeichnet) sich die Apparatur kalibrieren und der Sauerstoffpartialdruck zu jedem Zeitpunkt des Experiments bei jeder Temperatur bestimmen lässt. Aus dieser Erkenntnis ergibt sich die eingesetzte, nicht ratiometrische Messmethode, die auf die Referenzmessung bei $\lambda_{em} = 590$ nm verzichtet und somit die Messzeit pro Well reduziert. Im Folgenden wird das Vorgehen anhand eines beispielhaften Versuchs beschrieben, bei dem die Kalibrierung der Apparatur in das Experiment integriert wird.

In Abbildung 5.13 ist die aufgeprägte Temperatur (*durchgezogene Linie*) sowie die gemessene Fluoreszenz (*Symbole*) gegen die Zeit aufgetragen. Die Zeiträume der Vermessung

von **P1-P4** sind voneinander durch *graue gepunktete Linien* getrennt. Da jedes Experiment mit Stickstoffbegasung bei 15°C beginnt (vgl. Kap. 4.3.2), liefert die Messung zum Versuchsbeginn den ersten Punkt bei $pO_2=0\%$ (**P1**, die ersten 15 min des Versuchs). Anschließend erfolgt entsprechend dem geplanten Temperaturprofil das Experiment (ca. 15 min – 230 min). Am Ende des Versuchs wird die Temperatur auf min. 60°C eingestellt, bis das Enzym deaktiviert und $pO_2=100\%$ erreicht ist. Dann wird **P2** bei der Temperatur von 60°C vermessen (230 min – 250 min). Anschließend wird das System bei bleibender Temperatur von 60°C mit Stickstoff begast, bis $pO_2=0\%$ erreicht wird (250 min – 270 min, **P3**). Zum Schluss wird wieder die Belüftung eingeschaltet, und die Temperatur auf ca. 25°C abgesenkt, um den Messpunkt bei $pO_2=100\%$ und einer niedrigen Temperatur zu erhalten (360 min – 375 min, **P4**). Die verwendete Auswertemethode basiert auf der Annahme, dass keine Fluoreszenzabschwächung durch „Photobleaching“ im Laufe des Experiments erfolgt. Diese Annahme wurde durch das in Abbildung 5.11 dargestellte Experiment bestätigt. Durch die beschriebene Messmethode lassen sich die Sauerstoffpartialdrücke während des Experiments aufzeichnen.

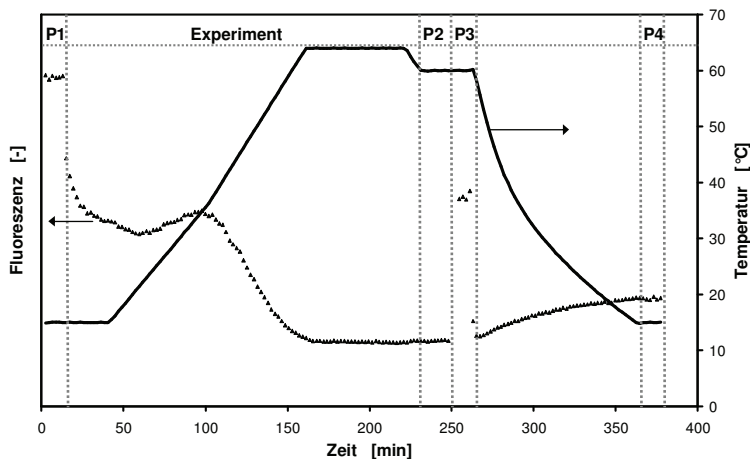


Abbildung 5.13: Fluoreszenzverlauf eines beispielhaften Experiments (*Symbole*) mit einem aufgeprägten Temperaturprofil (*durchgezogene Linie*). Die Phasen der Vermessung der Punkte **P1-P4** sind durch *graue gestrichelte Linien* gekennzeichnet.

Die erreichte Messgenauigkeit besitzt auf Grund des nicht linearen Charakters der Stern-Volmer-Gleichung eine ebenfalls nicht lineare Struktur. Die Messfehler kommen nicht nur durch die Fluoreszenzmessung (F) bei aktuellem pO_2 zustande, sondern auch durch die Messgrößen F_0 und F_{100} , welche in die pO_2 -Berechnung mit einfließen. In Abbildung 5.14

sind die Standardabweichungen in Abhängigkeit von pO_2 aufgetragen. Sie steigen von ca. 4% bei $pO_2 = 0$ auf 13% bei $pO_2 = 100\%$. Die Messgenauigkeit bei niedrigen Partialdrücken ist also wesentlich höher als bei hohen Partialdrücken.

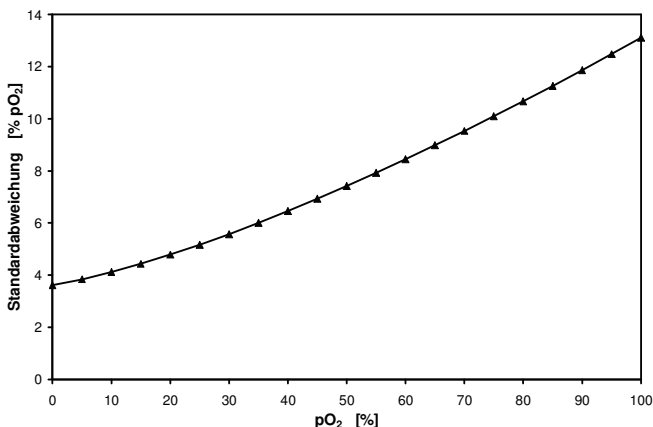


Abbildung 5.14: Standardabweichung der pO_2 -Messung als Funktion des pO_2 basierend auf statistischer Experimentenauswertung.

Das *VisualBasic*-Programm zur automatischen offline Berechnung des pO_2 aus den während des Experiments aufgezeichneten Fluoreszenz- und Temperaturverläufen ist Anhang D-*Auswertesoftware* zu entnehmen. Eine präzise online Berechnung des pO_2 ist mit der eingesetzten Messmethode nicht möglich, da die zur Berechnung notwendigen Punkte **P2-P4** (vgl. Abbildung 5.14) erst am Ende des Experiments zur Verfügung stehen.

Abschließend ist in Abbildung 5.15 die Auswertung des Fluoreszenzverlaufs aus Abbildung 5.13 beispielhaft präsentiert. Hier ist neben den bereits gezeigten Verläufen des Temperaturprofils (*durchgezogene Linie*) sowie der gemessenen Fluoreszenzintensitäten (*geschlossene Dreiecke*) der berechnete Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks dargestellt (*offene Rechtecke mit durchgezogener Linie*). Da Sauerstoff beim eingesetzten Messprinzip als Fluoreszenzquencher auftritt, entsprechen die höchsten Fluoreszenzsignale $pO_2 = 0\%$, während die niedrigsten Fluoreszenzsignale für $pO_2 = 100\%$ stehen.

Das System wird zu Beginn des Versuchs mit Stickstoff begast. Der pO_2 beträgt 0%. Nach 15 min wird auf die Luftbegasung umgeschaltet, und der Sauerstoff wird in das System eingetragen, sodass der pO_2 steigt, bis sich ein Fließgleichgewicht gemäß Gl. 5.10 bei $pO_2 \sim 40\%$ einstellt.

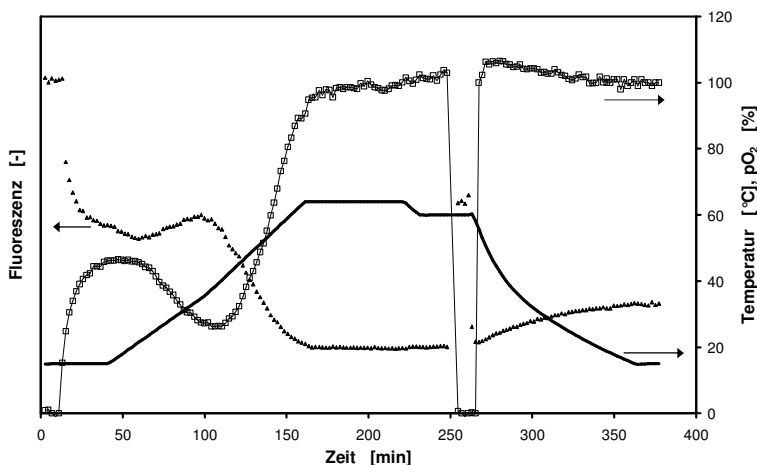


Abbildung 5.15: pO_2 (offene Rechtecke, durchgezogene Linie) berechnet aus der in einem beispielhaften Experiment gemessenen Fluoreszenz (geschlossene Dreiecke) mit dem aufgeprägten Temperaturprofil (durchgezogene Linie). $n=600$ rpm, $d_0=3$ mm, $0,18 \mu\text{M}$ Enzym, 48 mM Substrat.

Beim anschließenden Temperaturanstieg im Bereich zwischen 45 min – 100 min auf ca. 40°C fällt der Sauerstoffpartialdruck. Dieser Abfall entspricht einem erhöhten Sauerstoffverbrauch durch die Enzymaktivierung. Beim weiteren Anstieg der Temperatur auf über 60°C und dem anschließenden Temperaturplateau steigt der Sauerstoffpartialdruck auf 100% , was auf die Enzymdeaktivierung hinweist. Anschließende Temperaturänderung und Umschalten zwischen Luft- und Stickstoffbegasung dienen der Kalibrierung der Apparatur und sind bereits in Abbildung 5.13 diskutiert. Der quantitative Verlauf der Enzymaktivität lässt sich aus dem pO_2 -Verlauf mit Gl. 5.10 als Funktion der temperaturabhängigen Sauerstoffeintrages und Sauerstofflöslichkeit kalkulieren. Entsprechende Gleichungen werden in Kap. 6.1.5 vorgestellt.

5.3 Weitere Messmethoden

Die beiden oben beschriebenen Assays wurden am Enzymprüfstand etabliert und zur Enzymcharakterisierung eingesetzt (vgl. Kap. 7.1, 7.2). Ferner wurde eine Reihe weiterer Methoden konzipiert bzw. getestet. In diesem Kapitel werden solche Methoden kurz vorgestellt und hinsichtlich ihrer Einsatzmöglichkeiten am Enzymprüfstand kritisch diskutiert.

5.3.1 Ergänzende Messungen der Enzymkonformationsänderungen über Tryptophanfluoreszenz

Tryptophan (Trp) ist eine im UV-Bereich fluoreszierende Aminosäure. Die Intensität sowie spektrale Eigenschaften der Trp-Fluoreszenz sind im hohen Maße von der Umgebung, z. B. von ihrer Polarität abhängig (Lackowitz, 1999). Trp ist die am seltensten vorkommende Aminosäure; trotzdem ist sie in den meisten Proteinen enthalten (Lackowitz, 1999). Häufig führen die mit der Deaktivierung des Enzyms einhergehenden Konformationsänderungen zu Änderungen in der Trp-Umgebung. Diese Änderungen können über die Trp-Fluoreszenz erfasst werden. Aus mehreren Gründen (vgl. Kap 2.1) ist die Trp-Fluoreszenz nicht direkt mit den Aktivitätsmessungen korrelierbar. Vielmehr ist sie als komplementär zu Aktivitätsmessungen anzusehen.

Die Trp-Fluoreszenzmessung erfolgte bei $\lambda_{ex} = 285 \text{ nm}$ und $\lambda_{em} = 345 \text{ nm}$ an der mesophilen und der thermophilen Esterase aus dem Esterasesystem. Eine hohe Enzymkonzentration von 0,5 g/L wurde benötigt, um eine ausreichende Sensitivität zu erreichen. Diese Enzymkonzentration würde im Rahmen des pH-basierten Assays (vgl. Kap. 5.1) zu hohen Reaktionsraten und somit zur Substratlimitierung führen. Aus diesem Grund wurden Trp-Messungen getrennt von Aktivitätsmessungen in Abwesenheit von Substrat im 100 mM Phosphatpuffer bei $pH(25^\circ\text{C}) = 8$ durchgeführt. In anderen Stoffsystemen (weniger aktives Enzym oder höhere Substratverträglichkeit) ist jedoch eine parallele Messung der Aktivität und der Trp-Fluoreszenz vorstellbar. Um die Verfälschung der Ergebnisse durch den Einfluss der Temperatur auf die Trp-Fluoreszenz auszuschließen, wurde nicht die absolute Intensität, sondern das Verhältnis der Intensität der untersuchten Probe zur Intensität einer Probe betrachtet, welche bei gleicher Enzymkonzentration irreversibel deaktiviert vorliegt (im Folgenden: *Fluoreszenzverhältnis*). Irreversibel deaktiviertes Enzym wurde hergestellt, indem natives Enzym für 60 min der Temperatur von 80°C ausgesetzt wurde.

In Abbildung 5.16 sind die Ergebnisse der Trp-Messungen mit den Ergebnissen der Aktivitätsmessungen für die mesophile Esterase verglichen. In Abbildung 5.16a ist das Fluoreszenzverhältnis für ein aufgeprägtes Temperaturprofil (*gestrichelte Linie*) bei unterschiedlichen Zusammensetzungen aus anfänglich aktiver und denaturierter mesophiler Esterase (*verschiedene Symbole*) dargestellt.

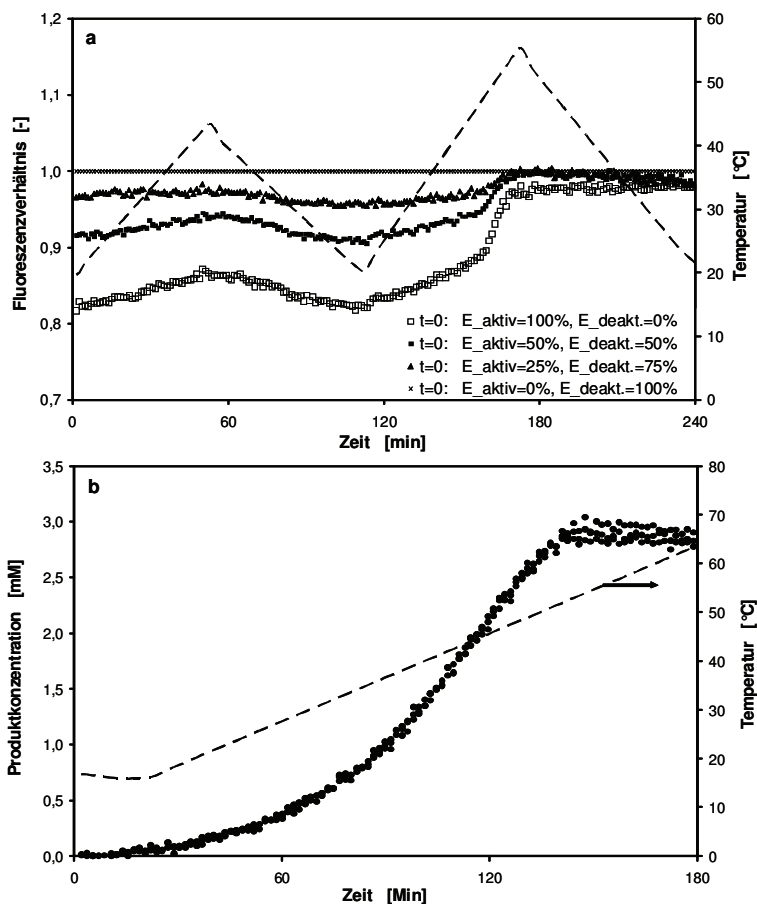


Abbildung 5.16: Tryptophanfluoreszenzmessungen, 0,5 g/L Enzym (a) und Produktbildungsmessungen, 0,02 g/L Enzym (b) der mesophilen Esterase für die aufgeprägten Temperaturprofile (gestrichelte Linie). 10% EtOH, 20 μ M HPTS.

Für das betrachtete Enzym ist die Fluoreszenz der denaturierten Fraktion höher als die der aktiven. Beim Temperaturanstieg auf ca. 40 °C wird ein leichter Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses beobachtet, welcher auf die Enzymdenaturierung hinweist. Bei der anschließenden Temperaturabsenkung auf 20 °C erreicht das Fluoreszenzverhältnis den ursprünglichen Wert, was auf den reversiblen Charakter der beobachteten Denaturierung deutet. Der nächste Temperaturanstieg auf 50 °C führt zur schnellen Annäherung der Fluoreszenzverhältnisse an den Wert „1“, welcher der komplett denaturierten Fraktion

entspricht. Die wiederholte Temperaturabsenkung auf 20°C führt nicht zur Regeneration des Fluoreszenzverhältnisses. Die beobachtete Denaturierung ist also irreversibler Natur. Die Trp-Fluoreszenzmessung weist in diesem Fall auf eine schnelle irreversible Deaktivierung des Enzyms bei 50°C hin. Dieses Ergebnis wird durch die Messung der Produktbildung für das aufgeprägte Temperaturprofil einer Rampe (Abbildung 5.16b) bestätigt. Bei der Temperatur von ca. 50°C wird ein plötzliches Ende der Produktbildung beobachtet. Auch bei der thermophilen Esterase geht eine schnelle Trp-Fluoreszenzänderung von 60°C mit der schlagartigen Einstellung der Produktbildung einher (Ergebnis nicht dargestellt). Somit entsprechen für beide betrachteten Esterasen die durch Aktivitätsmessungen bestimmten Schmelztemperaturen von 50°C und 60°C den Ergebnissen der Trp-Fluoreszenzmessungen.

Diese Ergebnisse illustrieren, dass Trp-Fluoreszenzmessungen das Potential besitzen, eine sinnvolle Ergänzung zu den Aktivitätsmessungen zu bilden. Vor allem in mehrstufigen Reaktionssystemen (vgl. Kap. 7.3.2), kann eine zusätzliche Messgröße zum besseren Verständnis der biochemischen Vorgänge beitragen.

5.3.2 Beeinflussung von Fluorophoren durch ihre Umgebung

Eine Reihe von Substanzen besitzt eine gegenüber ihrer Umgebung sensitive Fluoreszenz. HPTS (pH-abhängig, vgl. Kap. 5.1.1) und Tryptophan (Polaritätsabhängig, vgl. Kap. 5.3.1) sind in diesem Kapitel bereits vorgestellt worden. Die Fluoreszenz anderer Substanzen wie 2-Acetylanthracen oder 2-Anilinonaphtalen (vgl. Lackowitz, 1999) wird von kurzkettigen Alkoholen beeinflusst. Dies könnte bei der Erfassung von Umesterungsreaktionen (aus Kap. 3.2.3) ausgenutzt werden, welche nach dem Schema der Reaktionsgleichung 3.4 ablaufen und einen kurzkettigen Alkohol als Reaktionsprodukt bilden.

Der kurzkettige Alkohol beeinflusst die Fluoreszenz des sich in der Lösung befindenden Farbstoffes, welche somit als Maß für den Reaktionsfortschritt dienen kann. Der in der Literatur beschriebene Einfluss des reinen Ethanol auf die Fluoreszenz von 2-Acetylanthracen oder 2-Anilinonaphtalen konnte in verschiedenen Lösungsmitteln bestätigt werden (Ergebnis nicht dargestellt). Der Einfluss anderer Reaktionsedukte und -produkte auf die Fluoreszenz (vgl. Umesterungssystem in Kap. 3.2.3) ist jedoch so komplex, dass sich das Fluoreszenzsignal in ihrer Anwesenheit nicht interpretieren lässt (Ergebnis nicht dargestellt). Einige Erklärungsansätze für dieses komplexe Fluoreszenverhalten im Umesterungssystem finden sich in Cherkasov, 1960.

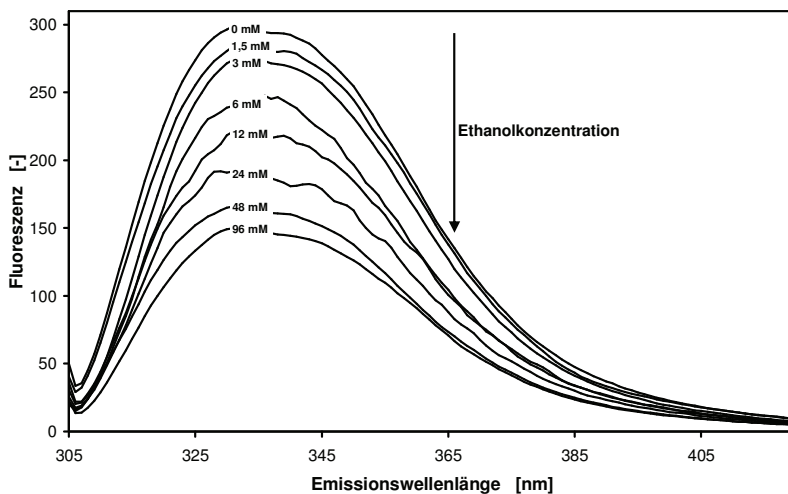


Abbildung 5.17: Emissionsspektren von Tryptophan in Abhängigkeit von Ethanolkonzentration gemessen bei $\lambda_{\text{ex}}=285$ nm in 100 mM Na-Phosphatpuffer bei pH 8. $[\text{Trp}]=0,5$ mM.

In Abbildung 5.17 ist der Einfluss von Ethanol auf das Anregungsspektrum von Tryptophan präsentiert. Im Gegensatz zum Beispiel aus Kap. 5.3.1 wird in diesem Fall nicht das enzymeigene, sondern das als extrinsischer Fluorophor der Lösung zugesetzte Tryptophan vermessen. Mit steigender Ethanolkonzentration fällt die Fluoreszenzintensität. Der Effekt muss für die Etablierung eines enzymatischen Assays im vollständigen Umesterungssystem bestätigt werden.

5.3.3 Optische Temperaturmessung

Zur Bestimmung der Temperaturverteilung in der MTP wurde eine fluoreszenzbasierte Methode in Anlehnung an Schilling et al. (1993) eingesetzt. Diese Messmethode (Stoffsystem aus Kap. 3.2.3) basiert auf der optischen pH-Messung (vgl. Kap. 5.1) und der stark temperaturabhängigen Dissoziationskonstante des TRIS-Puffers ($pK_{\text{Puffer}} \sim 0,028$ 1/K). Die Temperaturänderungen führen also beim TRIS-Puffer zu pH-Änderungen, welche über die HPTS-Fluoreszenz erfasst werden können. Das Fluoreszenzverhältnis ist in Abbildung 5.18 für einen weiten Temperaturbereich präsentiert. Es lässt sich mit einem Polynom an die Temperatur anpassen. Über diese Anpassung lassen sich die Temperaturen in MTP'n optisch bestimmen. Die Voraussetzung für die Einsetzbarkeit der Methode bei gleichzeitiger Reaktionsführung sind nicht pH-aktive Systeme. In pH-aktiven Systemen dagegen wäre es

nicht möglich zwischen der temperaturbedingten und der reaktionbedingten pH-Änderung zu unterscheiden.

In Zukunft könnte TRIS gegen Temperatur empfindlichere Puffer wie TAMRA ersetzt und somit die Messgenauigkeit erhöht werden.

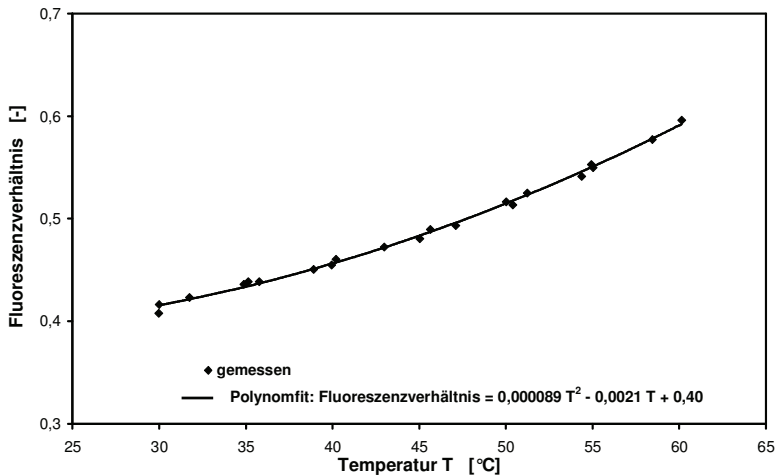


Abbildung 5.18: Temperaturabhängiges Fluoreszenzverhältnis (Symbole) und seine Anpassung über ein Polynomfit (Linie) im Stoffsystem zur optischen Temperaturbestimmung: 100 mM TRIS-Puffer (pH 8,6 bei 25°C), 20 μ M HPTS.

5.3.4 Ausblick Infrarotmessungen

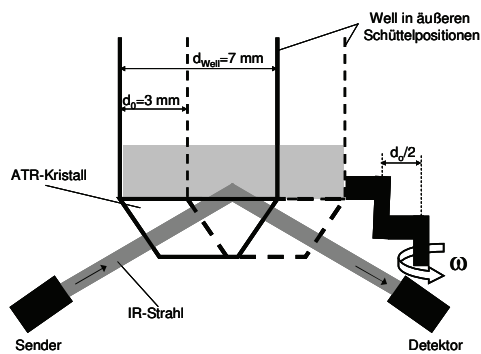


Abbildung 5.19: Schematische Darstellung des Aufbaus zur ATR-Infrarotmessung in MTP'n.

Wie in Kap. 2.4 beschrieben, stellt die Infrarotmessung ein sehr universelles Messverfahren dar, da sehr viele Reaktionsedukte und -produkte anhand der Infrarotmessungen mit Hilfe der Fouriertransformation erfasst und quantifiziert werden können. Die wichtigste Einschränkung bei der Untersuchung biochemischer Proben, welche meist in wässrigen Stoffsystemen vorliegen, ist die sehr starke Absorption des Infrarotsignals durch Wasser. In diesem Zusammenhang wird die sog. ATR-Methode (Attenuated Total Reflection) vorgeschlagen, welche zur Untersuchung fester, lichtundurchlässiger Proben eingesetzt wird. Das physikalische Prinzip des ATR, die Ausbildung von evaneszenten Wellen hinter einer reflektierenden Oberfläche, ist in Abbildung 5.19 für ein Well einer geschüttelten MTP illustriert. Um das ATR-Prinzip in der MTP zu verwirklichen, muss der Boden aus einem bestimmten Material (Zink-Selenid, Germanium, Diamant) gefertigt sein und eine bestimmte Form besitzen (Prisma eines bestimmten, materialabhängigen Winkels), welche zur Totalreflexion des Infrarotstrahls führen. Bei der Totalreflexion an der Grenzfläche zwischen dem ATR-Kristall und dem wässrigen Probegut dringt das Infrarotlicht in eine von den Brechungsindizes n_1 und n_2 , vom Einfallswinkel Θ und von der Lichtwellenlänge λ abhängige Tiefe d ein (Pedrotti, 2005):

$$d = \frac{\lambda}{2 \cdot \pi \cdot \sqrt{n_1^2 \cdot \sin^2(\Theta) - n_2^2}} \quad (5.13)$$

Durch das Eindringen wird ein Teil des total reflektierten Lichts absorbiert. Das Licht wird anschließend zum Detektor reflektiert und dort über Fourier-Transformation ausgewertet. Auf Grund der geringen Eindringtiefe von $d \sim 0,5 - 5 \mu\text{m}$ stehen auch bei stark absorbierenden Proben die Chancen gut, dass Signale auswertbar sind. Über die Wahl des ATR-Kristalls besteht ferner die Möglichkeit den Brechungsindex und somit die Eindringtiefe in gewissen Grenzen zu variieren. Die häufig eingesetzte sog. „mehrfache Totalreflexion“, bei der das Licht mehrfach in die Probe eindringt und somit mehrfach die Absorption stattfindet, lässt sich in einem Well wahrscheinlich nicht (oder nur über ausgeklügelte Spiegelsysteme, vgl. Abbildung 5.20a) verwirklichen. Alternativ kann die mehrfache Reflexion über eine Messung in mehreren Wells erfolgen, wenn diese mit dem gleichen Probegut befüllt sind (vgl. Abbildung 5.20b). In diesem Fall wird die Messgenauigkeit auf Kosten der frei verfügbaren Wellzahl erreicht.

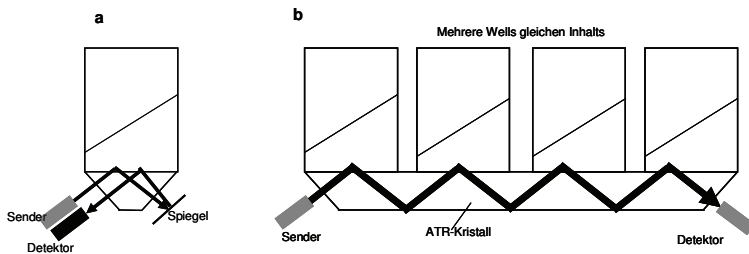


Abbildung 5.20: Ansätze zur Verwirklichung von Mehrfachreflexionen in MTP'n über einen Spiegel (a), über die Messung in mehreren Wells gleichen Inhalts (b) (Zeichnung nicht maßstabsgetreu).

Die Verwirklichung der ATR-Messung in MTP'n ist ein komplexes Vorhaben. Allein die Fragen der Fertigung der prismaförmigen MTP-Böden aus ATR-Kristallen erfordern die Mitarbeit von kompetenten Partnern aus dem Bereich der Materialwissenschaften und der Fertigungstechnik. Bei Erfolg verspricht jedoch das ATR-basierte Messprinzip einen sehr hohen Universalitätsgrad. Der Einfluss der durch IR eingetragenen Energie auf die Temperatur im Well sollte bei der Etablierung der Methode untersucht werden.

6 Modellbasierte Enzymcharakterisierung

In diesem Kapitel wird der Prozess der modellbasierten Enzymcharakterisierung am Enzymprüfstand beschrieben. Als Beispiel für das Standardvorgehen wird dabei das Esterasesystem (Kap. 3.2.1) gewählt. An einigen Stellen werden mögliche Alternativen zur Standardvorgehensweise anhand des biochemisch komplexeren Oxidasesystems (Kap. 3.2.2) demonstriert. Abbildung 6.1 illustriert das Schema der Enzymcharakterisierung am Enzymprüfstand.

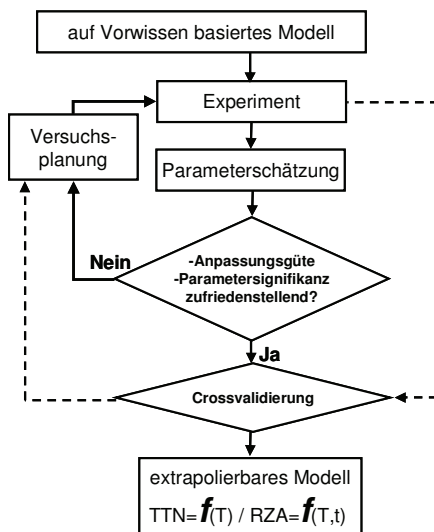


Abbildung 6.1: Schema der Enzymcharakterisierung am Enzymprüfstand.

Basierend auf Vorwissen (Literatur, Erfahrungen mit vergleichbaren Enzymen, in Voruntersuchungen bereits durchgeführten Experimenten) wird ein mathematisches Modell erstellt, welches die Enzymaktivierung und -deaktivierung als Funktion der Temperatur beschreibt. Ferner beschreibt das Modell auch weitere Phänomene, welche die im Experiment gemessene Größe (η) beeinflussen. Die erstellten Modelle werden in Kap. 6.1 vorgestellt. Basierend auf dem Modell werden Experimente entworfen und durchgeführt. Auf diese nicht numerisch entworfenen, *intuitiven Experimente* wird in Kap. 6.2 eingegangen. Die anschließende Parameterschätzung wird in Kap. 6.3 diskutiert. Ausgehend von den Ergebnissen der Parameterschätzung erfolgt eine numerische Versuchsplanung (Kap. 6.4).

Die entworfenen Experimente werden durchgeführt und Parameter unter Berücksichtigung aller erfolgten Experimente erneut geschätzt. Dieses Vorgehen wird solange iterativ wiederholt, bis die in Kap. 2.2.3 erläuterten Kriterien der Anpassungsgüte und der Parametersignifikanz erfüllt sind. Anschließend erfolgt eine Crossvalidierung (*gestrichelte Pfeile* in Abbildung 6.1): das Modell wird auf seine Voraussagekraft geprüft. Zu diesem Zweck werden eine erneute Versuchsplanung und entsprechende Experimente durchgeführt, und die Modellvoraussage ohne eine weitere Parameterschätzung mit den experimentellen Ergebnissen verglichen. Wenn die Crossvalidierung erfolgreich ist, wird von einem parametrisierten Modell ausgegangen, welches das Enzymverhalten als Funktion der Temperatur und der Zeit abbilden kann. Somit lassen sich Prozessgrößen wie TON oder RZA ebenfalls als Funktionen der Temperatur und der Prozesszeit berechnen. Falls das iterative Vorgehen nicht zum Erfolg führt, können weitere Maßnahmen getroffen werden, welche auf dem jetzigen Stand der Entwicklung nicht fest etabliert sind. Zu diesen Maßnahmen zählen die Modelldiskriminierung und die Modellreduktion. In Kap. 6.5 wird ein Überblick über diese Maßnahmen und ein Ausblick über ihre Etablierbarkeit am Enzymprüfstand gegeben.

6.1 Auf Vorwissen basierte Modelle

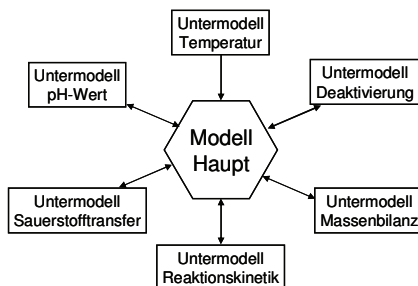


Abbildung 6.2: Unter gPROMS implementierte Modellstruktur.

Mathematisch sind die bei der BioVT und bei der BASF SE implementierten Modelle identisch. Sie unterscheiden sich lediglich in ihrem Aufbau. Hier wird die bei BioVT implementierte modulare Struktur (Abbildung 6.2) beschrieben. Die verschiedenen Module (Untermodelle) beschreiben einzelne mechanistische Effekte oder Gruppen von mechanistischen Effekten. Sie tauschen über das Hauptmodell *Haupt* Variablen mit anderen Untermodellen aus. Im Folgenden werden einzelne Untermodelle anhand von behandelten mechanistischen Effekten und entsprechenden Gleichungen beschrieben. Der vollständige gPROMS-Quellcode ist dem Anhang D, *Implementiertes Modell*, zu entnehmen. Auf dem

jetzigen Stand ist der Zusammenhang zwischen den Stoffsystemen und der Messgröße Fluoreszenz nicht in die Modelle integriert. Als Messgrößen η dienen im Modell die aus der Fluoreszenz berechneten pH (Esterasesystem) bzw. pO_2 (Oxidasesystem).

6.1.1 Untermodell *Temperatur*

Das Untermodell *Temperatur* enthält Verläufe der Steuergröße Temperatur, welche nicht berechnet werden, sondern:

- als Ergebnis der intuitiven oder numerischen Versuchsplanung in Form von Funktionen $T(t)$ oder
- als Messreihen aus Zeitpunkten (t) und Temperaturen (T) aus einem Experiment vorliegen. Daher wird „*Temperatur*“ als einziges Untermodell nicht von anderen Untermodellen mit berechneten Variablen-Werten versorgt, es liefert ausschließlich die Temperaturwerte an andere Untermodelle (vgl. Abbildung 6.2).

6.1.2 Untermodell *Deaktivierung*

Das Untermodell *Deaktivierung* hat am Enzymprüfstand eine zentrale Bedeutung. Hier werden vielfältige Deaktivierungseffekte modelliert, welche durch gezielte Versuchsführung beschleunigt und erfasst werden. Die Enzymdeaktivierungsvorgänge werden nach dem Stand der Technik als chemische Reaktionen modelliert, bei denen verschiedene (aktive oder nicht aktive) Enzymfraktionen ineinander übergehen.

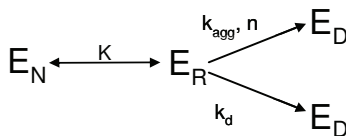


Abbildung 6.3: Schema des am Enzymprüfstand implementierten Modells der Enzymdeaktivierung.

In Abbildung 6.3 ist das Standardmodell der Enzymdeaktivierung schematisch dargestellt. Dabei handelt es sich um ein Modell, welches die in der Literatur am häufigsten beschriebenen Effekte aufgreift. Drei unterschiedliche Enzymfraktionen sind definiert: aktives Enzym (E_N), reversibel deaktiviertes Enzym (E_R) und irreversibel deaktiviertes Enzym (E_D). Bei der irreversiblen Deaktivierung wird zwischen der Reaktion erster Ordnung mit der Reaktionsrate k_d und der Agglomeration der Ordnung n mit der Reaktionsrate k_{agg} unterschieden. Das Gleichgewicht zwischen der aktiven Fraktion und der reversibel deaktivierten Fraktion wird als algebraische Gleichung modelliert.

$$K(T) = \frac{[E_R]}{[E_N]} \quad (6.1)$$

$$\frac{d([E_D])}{dt} = k_d(T) \cdot [E_R] + k_{agg}(T) \cdot [E_R]^n$$

Falls weitere Phänomene aus Vorwissen oder Experimenten bekannt sind, muss das Deaktivierungsmodell angepasst werden. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 6.4 gezeigt. Da für das zu untersuchende Oxidasesystem keine Hinweise auf Agglomerationseffekte vorlagen, dagegen jedoch eine Enzymdeaktivierung durch die oxidierende Wirkung des Zwischenproduktes TEMPO^+ (vgl. Kap. 7.2.1) bekannt war, wurde das Enzymdeaktivierungsmodell gemäß dem Schema in Abbildung 6.4 geändert. Dabei wurde angenommen, dass die Deaktivierungsrate k_{md} für beide Fraktionen E_N und E_R durch TEMPO^+ gleich ist.

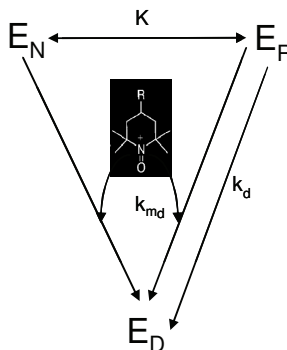


Abbildung 6.4: Zu Abbildung 6.3 alternatives Enzymdeaktivierungsmodell basierend auf Vorwissen.

Im Oxidasesystem gilt somit für die irreversible Enzymdeaktivierung:

$$\frac{d[E_D]}{dt} = k_d \cdot [E_R] + k_{md} \cdot [\text{TEMPO}^+] \cdot ([E_N] + [E_R]) \quad (6.2)$$

Als Anfangsbedingung wird die Lagerungsstabilität angenommen; es wird davon ausgegangen, dass das Enzym zum Versuchsbeginn vollständig potentiell aktiv vorliegt:

$$[E_D](t=0) = 0 \quad (6.3)$$

6.1.3 Untermodell *Reaktionskinetiken*

In *Reaktionskinetiken* werden die Reaktionsgeschwindigkeiten berechnet, mit denen die Deaktivierungsreaktionen (vgl. Kap. 6.1.2) und die chemischen bzw. die biochemischen

(enzymatisch katalysierten) Reaktionen (vgl. Kap. 6.1.4) erfolgen. Die Temperaturabhängigkeit der Reaktionen wird nach dem Arrheniusgesetz gemäß Gl. 2.2 und 2.3 modelliert, welche numerisch günstig gemäß 2.13 formuliert werden.

Neben der Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit wird bei enzymatisch katalysierten Reaktionen der Einfluss der Substratkonzentration nach dem Stand der Technik über die Michaelis-Menten Kinetik implementiert:

$$r = r_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (6.4)$$

r	tatsächliche Reaktionsgeschwindigkeit	[g/L/h]
$r_{\max}$	Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung	[g/L/h]
$[S]$	Substratkonzentration	[g/L]
K_m	Michaelis-Menten-Konstante	[g/L]

Die Formulierung der Michaelis-Menten-Kinetik nach Gl. 6.4 berücksichtigt nicht die Temperaturabhängigkeit der Michaelis-Menten Konstante K_m . Für Substratüberschuss- oder Produkt- (kompetitiv oder nicht kompetitiv) inhibierte Systeme müssen zusätzlich die entsprechenden Mechanismen im Modell berücksichtigt werden. Wenn die Erfassung dieser Effekte nicht explizit zum Ziel der Enzymcharakterisierung gesetzt ist, wird in Experimenten eine nicht limitierte und nicht inhibierte Reaktionsführung angestrebt. Auf diese Weise werden Modelle einfach und somit identifizierbar gehalten.

In Systemen mit veränderlichem pH-Wert kann die pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität z. B. nach Gl. 5.8 modelliert werden. Allerdings gilt auch in diesem Fall, dass die Modellerweiterung zu einer erhöhten Parameterzahl führt und somit die Modellidentifizierung erschwert.

6.1.4 Untermodell *Massenbilanz*

Im Untermodell *Massenbilanz* werden die im Stoffsystem stattfindenden chemischen und enzymatisch katalysierten Reaktionen mit den im Untermodell *Reaktionskinetiken* berechneten Reaktionsgeschwindigkeiten beschrieben. Dabei gilt im Esterasesystem:



Der chemische Anteil wird als eine Reaktion 1. Ordnung bezogen auf das Substrat S mit der Geschwindigkeitskonstante k_{chem} beschrieben. Der enzymatische Reaktionsanteil wird mit $r_{\text{enzymatisch}}$ ausgedrückt. Hier ist der Einfluss der Substratkonzentration $[S]$ auf die Reaktionsgeschwindigkeit im Untermodell *Reaktionskinetiken* berücksichtigt. Bei

komplexeren Systemen wie dem Oxidasesystem werden die Reaktionszahl und die Reaktionsordnung entsprechend angepasst.

Das Modell *Massenbilanz* wird durch die Massenerhaltung gemäß der jeweiligen Reaktionsstöchiometrie komplettiert.

6.1.5 Untermodell *Sauerstofftransfer*

Das Untermodell *Sauerstofftransfer* spielt ausschließlich in sauerstoffverbrauchenden Stoffsystemen wie dem Oxidasesystem eine Rolle. Damit stellt es ein Beispiel für die Vorteile des modularen Modellaufbaus dar. Das Untermodell *Sauerstofftransfer* kann bei sauerstoffunabhängigen Stoffsystemen schnell aus dem Gesamtmodell herausgenommen werden.

Das Untermodell enthält die Gleichungen zur Bilanzierung der Sauerstoffkonzentration im durchmischten System als Funktion des Sauerstoffeintrages *OTR* und des in *Reaktionskinetik* berechneten Sauerstoffverbrauchs *OCR* gemäß Gl. 5.10, Gl. 4.3 und der Anpassung Gl. 4.4:

$$\frac{d[O_2]}{dt} = OTR - OCR$$

mit

$$OTR = k_L a \cdot L_{O_2} \cdot (100\% - pO_2) / 100$$

$$k_L a (600rpm) [1/h] = 0,733 \cdot T[^\circ C] + 1$$

Die apparativen Möglichkeiten bei der Begasung werden im Modell durch Anfangsbedingung beschrieben. So gilt für die Begasung mit Stickstoff und schlagartige Umstellung auf Luftbegasung zum Versuchsbeginn (Kap. 4.3.2):

$$pO_2(t=0) = 0 \quad (6.6)$$

Bei komplexerer Begasung mit mehrfacher Umschaltung zwischen Luft und Stickstoff wird die Interval-Funktion unter gPROMS verwendet (Anderson et al., 2003). Die Berechnung der Sauerstofflöslichkeit L_{O_2} erfolgt nach Wilhelm et al. (1977, Temperaturabhängigkeit) und Weisenberger and Schumpe (1996, Einfluss von gelösten Salzen). Der Einfluss des im Oxidasesystem eingesetzten Acetatpuffers $[HA]$ auf den Henry-Koeffizient wurde als erweiterte Antoine-Gleichung modelliert. Die Koeffizienten stammen aus der BASF-Datenbank:

$$H_T = e^{163,8 - \frac{8039,2}{T} - 22,1385 \ln(T)} \quad (6.7)$$

$$H = H_T \cdot e^{-\frac{[HA]}{[H_2O]} (4,995 + \frac{1,188}{30} (T-60))}$$

H_T	temperaturabhängiger Henry-Koeffizient	[-]
H	konzentrationsabhängiger Henry-Koeffizient	[-]

6.1.6 Untermodell *pH-Wert*

Wie in Kap. 6.1.4 erwähnt, sollten pH-Änderungen im Laufe der Experimente vermieden werden. Dies kann z. B. über eine ausreichend starke Pufferung erfolgen. In manchen Fällen sind jedoch pH-Änderungen (z. B. aus messtechnischen Gründen, vgl. Kap. 5.1) nicht vermeidbar und gar gewollt. Dann ist die Berechnung von *pH* als Funktion der temperaturabhängigen Dissoziation des Puffers und der Reaktanden (Substrate, Produkte) unabdingbar. Das für das Esterasesystem implementierte pH-Modell ist in Kap. 5.1, Gl. 5.3 - 5.7 präsentiert. An dieser Stelle wird lediglich die grundsätzliche Struktur der pH-Modelle vorgestellt. Ein pH-Modell besteht aus (vgl. Bliefert, 1978):

- den temperaturabhängigen Dissoziationsgleichungen für Puffer und Reaktanden,
- der Massenbilanz für einzelne dissoziiert und undissoziiert vorliegenden Substanzen z. B.:
$$[\text{gebildetes Produkt}] = [\text{dissoziiertes Produkt}] + [\text{nicht dissoziiertes Produkt}],$$
- dem Ladungsgleichgewicht.

6.2 Intuitive Experimente

Die modellgestützte Versuchsplanung (Kap. 6.4) basiert nicht nur auf der implementierten Modellstruktur, sondern auch auf Parameterwerten, die aus Vorwissen bzw. bereits erfolgten Parameterschätzungen mit einer bestimmten Sicherheit bekannt sind. Die entsprechenden Algorithmen entwerfen also Experimente, welche umso sensitizer gegenüber den Modellparametern sind, je genauer diese Parameter bereits bekannt sind. Die Vor- und Nachteile solcher Algorithmen werden in Kap. 6.4 diskutiert. An dieser Stelle wird lediglich festgehalten, dass das Werkzeug zur Versuchsplanung nicht angewandt werden kann, wenn keine Information über die Parameterwerte vorliegt. Daher werden die ersten Experimente bei der Enzymcharakterisierung nicht numerisch, sondern intuitiv gestaltet. *Intuitiv* bedeutet jedoch keineswegs willkürlich. Vielmehr entstammen die Experimente modellgestützten Überlegungen. Die im Folgenden präsentierten Standardtemperaturprofile basieren auf dem Standarddeaktivierungsmodell aus Abbildung 6.3.

Als erstes Temperaturprofil wird eine Temperaturrampe gewählt. Dieses Vorgehen, bereits von Boy et al. (1999) vorgeschlagen, besitzt den Vorteil, dass falls ein ausreichend großer Temperaturbereich gewählt wird, z. B. $\sim 10 - 75^{\circ}\text{C}$ für mesophile Enzyme, unterschiedliche Effekte beobachtet und erfasst werden können. Dazu zählen die Enzymaktivierung bei niedrigen Temperaturen und das Enzymschmelzen bei hohen Temperaturen.

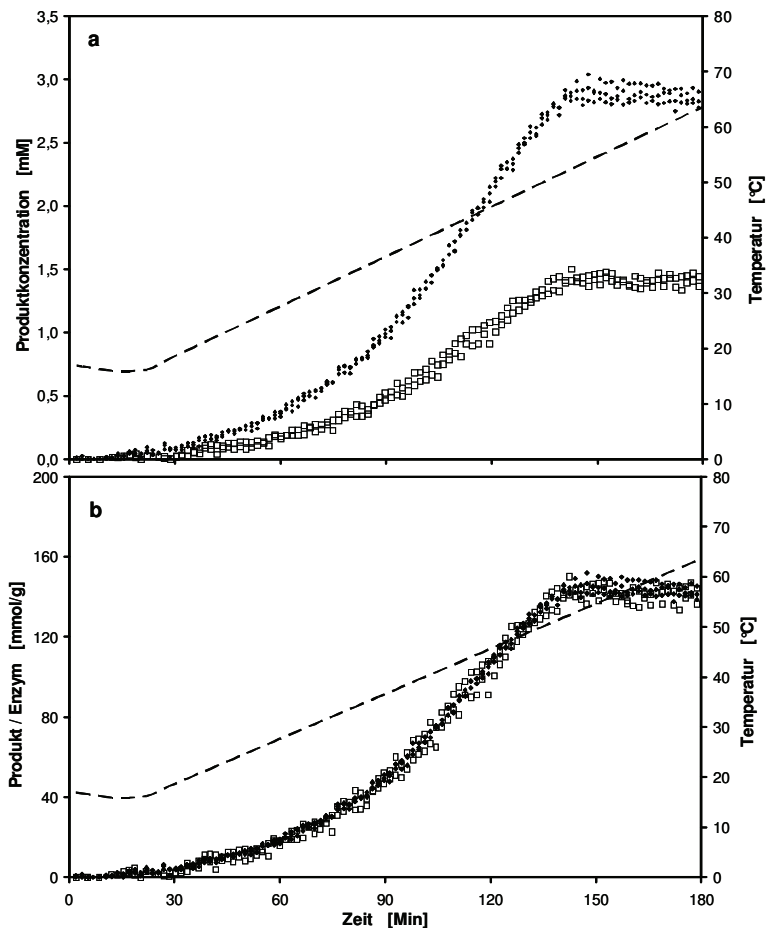


Abbildung 6.5: Esterasesystem. Produktkonzentration über experimentelle Zeit für das aufgeprägte Temperaturprofil einer Rampe (gestrichelte Linie) bei der Standardenzymkonzentration (geschlossene Symbole) und bei halber Enzymkonzentration (offene Symbole) (a), Produktkonzentrationen bezogen auf Enzymkonzentration (b).

Das Ergebnis eines solchen Rampen-Experiments im Esterasesystem ist in Abbildung 6.5 dargestellt. In Abbildung 6.5a ist die Produktbildung für zwei verschiedene Enzymkonzentrationen (Standardenzymkonzentration: *geschlossene Symbole*, halbe Enzymkonzentration: *offene Symbole*) für die gewählte Temperaturrampe (gestrichelte Linie) gezeigt. Jede der beiden Enzymkonzentrationen wurde in drei Wells gemessen. Bis zur

Temperatur von ca. 40°C wird ein exponentieller Produktanstieg beobachtet, welcher der exponentiellen Arrhenius- Aktivierung des Enzyms entspricht. Zwischen 40°C und 50°C wird eine Verlangsamung der Produktbildung beobachtet. Diese weist zunächst auf das Einsetzen der Enzymdeaktivierung hin; die Frage nach Reversibilität dieser Deaktivierung ist zunächst offen. Bei ca. 50°C stoppt die Produktbildung abrupt, was auf ein spontanes „Enzymschmelzen“ deutet.

Das erste intuitive Experiment liefert also wichtige Information über den Temperaturbereich der Arrheniusaktivierung aber auch über die Schmelztemperatur des Enzyms. Darüber hinaus wird die Parallelisierbarkeit der Experimente in der MTP dazu genutzt, die Produktbildung bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen zu vergleichen, indem die Produktkonzentration auf die eingesetzte Enzymkonzentration bezogen wird (vgl. Abbildung 6.5b). Unterschiedliche Verläufe bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen würden an dieser Stelle auf enzymkonzentrationsabhängige Deaktivierungsmechanismen mit der Reaktionsordnung > 1 wie Agglomeration hinweisen. Agglomerationseffekte würden also zu schnellerer Deaktivierung und somit niedrigerer Enzym-bezogener Produktbildung bei höheren Enzymkonzentrationen führen (Polakovic and Bryjak, 2002). In Abbildung 6.5b ist die Produktbildung pro Enzym jedoch enzymkonzentrationsunabhängig. Agglomerationseffekte werden also bei den untersuchten Enzymkonzentrationen nicht beobachtet. Dieses erste Experiment ist also bereits ausreichend, um das Modellschema aus Abbildung 6.3 um die temperaturabhängigen Agglomerationseffekte zu reduzieren. Die Voraussetzung für den Test bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen ist eine Substrat- und Produkt-unabhängige Reaktion. Andernfalls könnten eventuelle Unterschiede in der Produktbildung durch Limitierungs- oder Inhibierungseffekte erklärt werden. Für das Esterasesystem wurde diese Voraussetzung durch die Variation der vorgelegten Substrat- und Produktkonzentrationen in verschiedenen MTP-Wells (Abbildung 5.7) geprüft.

Beim zweiten intuitiven Experiment handelt es sich um eine Modifizierung des für konstante Temperaturen entwickelten Selwyn Tests (Selwyn, 1965). Eine Temperaturrampe wird bei halber Enzymkonzentration aufgeprägt, welche sich, verglichen mit Abbildung 6.5, durch die halbe Steigung bei doppelter Dauer auszeichnet. Es wird also das gleiche Temperaturprofil, jedoch in „Zeitlupe“ durchlaufen. Die Produktbildung aus Abbildung 6.5 bei Standardenzymkonzentration (*geschlossene Symbole*) ist mit der Produktbildung im „Zeitlupe“-Experiment bei halber Enzymkonzentration (*offene Symbole*) in Abbildung 6.6a verglichen.

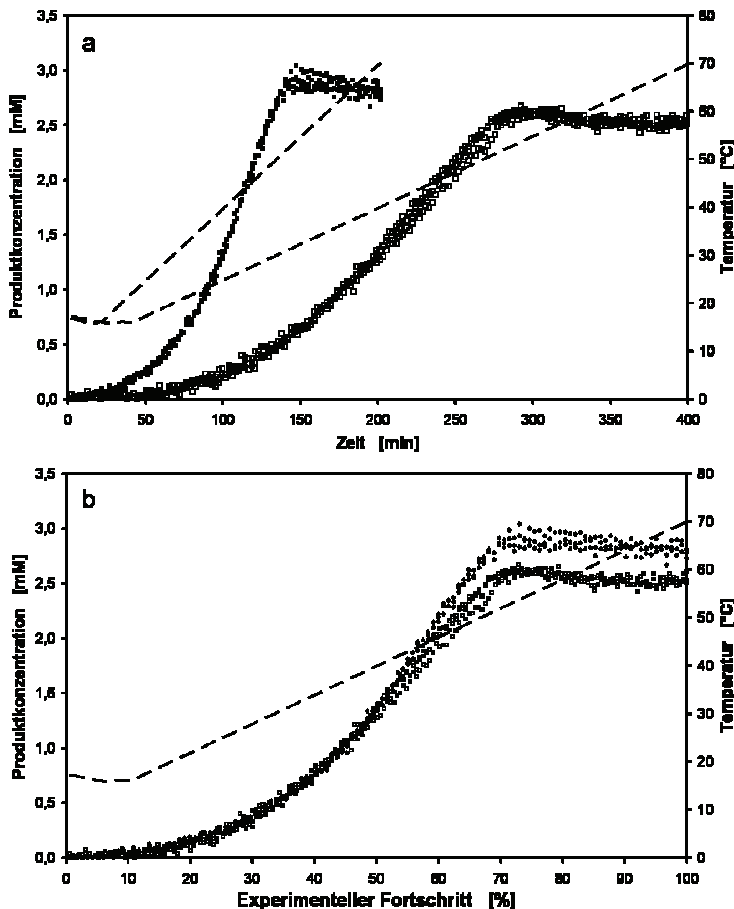


Abbildung 6.6: Vergleich der Produktbildung aus dem Experiment der Temperaturrampe bei Standardenzymkonzentration (*geschlossene Symbole*) mit dem "Zeitlupe"-Experiment (*offene Symbole*) bei doppelter Experimentendauer, halber Steigung der Temperaturrampe und halber Enzymkonzentration. Temperaturprofile sind mit *gestrichelten Linien* gekennzeichnet. Auftragung gegen die Zeit (a), Auftragung gegen den experimentellen Fortschritt (b).

In Abbildung 6.6b sind die Kurven gegen den experimentellen Fortschritt in % aufgetragen. Durch diese Art Normierung liegen die Temperaturprofile übereinander. In Abwesenheit dynamischer Deaktivierungseffekte würden beide Experimente in gleichen Produktkurven resultieren. Tatsächlich erfolgt das "Zeitlupe"-Experiment zwar bei halber Enzymkonzentration, die Zeit für die Produktbildung ist aber doppelt so groß. Bis ca. 50% des

Experiments und 40°C überdecken sich die Produktkurven. Von dieser Temperatur an, zeigt das „Zeitlupe“-Experiment eine geringere Produktbildung. Dies wird durch den dynamischen Deaktivierungsprozess erklärt, welcher bei Temperaturen unter 40°C zu langsam ist, um im gegebenen Zeitraum beobachtet zu werden. Bei höheren Temperaturen wird die dynamische Deaktivierung jedoch so beschleunigt, dass sie zur unterschiedlichen Produktbildung in der Standardrampe und im Zeitlupenexperiment führt. Das Zeitlupenexperiment liefert die wichtige Information, in welchem Temperaturbereich dynamische Deaktivierungseffekte beobachtbar sind.

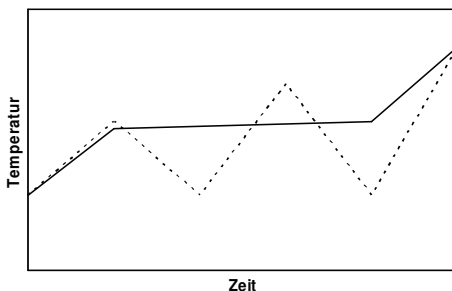


Abbildung 6.7: Qualitativer Verlauf der für den 3. intuitiven Versuch in Frage kommender Temperaturprofile.

Das dritte intuitive Experiment wird basierend auf der Analyse der ersten beiden entworfen. Dabei werden die Erkenntnisse über die Schmelztemperatur, Temperatur der beobachtbaren irreversiblen Deaktivierung und das Agglomerationsverhalten berücksichtigt. Der qualitative Verlauf zweier sinnvoller Temperaturprofile ist in Abbildung 6.7 dargestellt. Der mit *durchgezogener Linie* gekennzeichnete Verlauf („Plateau“), bei dem die Temperatur im Bereich der beobachtbaren dynamischen Deaktivierung fast konstant bleibt, liefert die Information über die Deaktivierungskinetik bei dieser Temperatur. Das mit *gestrichelter Linie* dargestellte Profil („Zick-Zack“) ermöglicht über das gezielte Anheben und Absenken der Temperatur die Unterscheidung zwischen reversiblen und irreversiblen Effekten.

Die vorgestellten Temperaturprofile bilden eine Reihe von Standardexperimenten, mit denen die Charakterisierung einstufiger Reaktionssysteme, wie des Esterasesystems, beginnt. Die Auswertung dieser Experimente bildet eine Grundlage für die weitere erfolgreiche Versuchsplanung. Bei ungewöhnlich komplexen oder biochemisch nicht verstandenen Stoffsystemen stellen die ersten intuitiven Experimente keineswegs eine Routineprozedur dar. Sie werden speziell auf das entsprechende Reaktionsschema zugeschnitten (vgl. Kap. 7.2.2).

6.3 Parameterschätzung

Im Rahmen der Enzymcharakterisierung erfolgt die Parameterschätzung nach jedem Satz durchgeführter Experimente. Dabei werden jedoch nicht nur die Experimente dieses Satzes, sondern alle bis dahin durchgeführten Experimente angepasst.

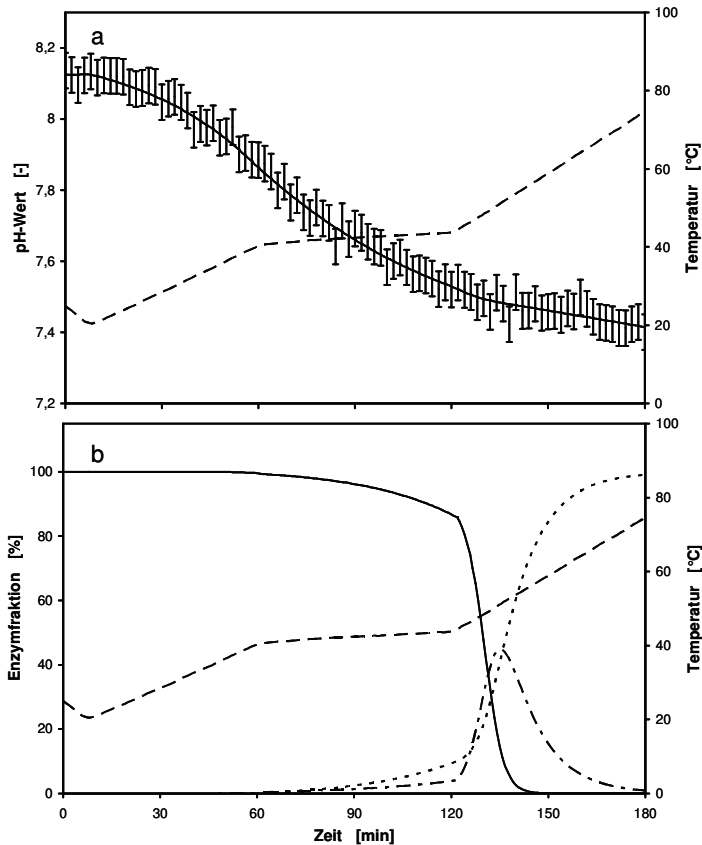


Abbildung 6.8: Gemessener (Fehlerbalken) und durch eine Parameterschätzung angepasster Verlauf (durchgezogene Linie) der Messgröße pH-Wert im Esterasesystem für ein aufgeprägtes Temperaturprofil (gestrichelte Linie) (a). Modellvoraussage des entsprechenden Verlaufs der Enzymfraktionen (aktives Enzym: durchgezogene Linie, reversibel deaktivierte Enzym: punkt-gestrichelte Linie, irreversibel deaktivierte Enzym: kurz gestrichelte Linie) (b).

In Abbildung 6.8a ist das Ergebnis eines Experiments im Esterasesystem für ein aufgeprägtes Temperaturprofil (gestrichelte Linie) und der entsprechenden Parameterschätzung gezeigt. Hier ist die Messgröße pH-Wert gemäß dem Fehlermodell (Kap. 5.1) mit Fehlerbalken

dargestellt. Das Modell ist in der Lage den gemessenen Verlauf mit einer Anpassung (*durchgezogene Linie*) zu beschreiben. Die Simulation der Enzymfraktionen in Abbildung 6.8b liefert einen Einblick in das modellierte Enzymverhalten. In der ersten Stunde des Experiments bei Temperaturen unter 40°C liegt das Enzym vollständig aktiv vor (*durchgezogene Linie*). In der zweiten Stunde des Experiments wird bei einer Temperatur um 40°C eine langsame dynamische Deaktivierung beobachtet (*Anstieg der kurz gestrichelten Linie*). In der dritten Stunde des Experiments bei weiterem Temperaturanstieg findet eine schnelle irreversible Deaktivierung statt. Abbildung 6.8 ist ein gutes Beispiel für eine Parameteranpassung, welche dem ersten Kriterium (Kap. 2.2.3, S. 17) entspricht. Selbstverständlich gilt diese Aussage nur, wenn andere Experimente ähnlich gut angepasst werden können. Alle experimentellen Verläufe und deren Anpassungen sind Anhang B zu entnehmen.

6.4 Versuchsplanung und Crossvalidierung

Das Ziel der Versuchsplanung ist es Experimente zu entwerfen, welche eine möglichst hohe Sensitivität hinsichtlich der zu schätzenden Modellparameter besitzen (vgl. Kap. 2.2.3, S. 17). Bei der Versuchsplanung für den Enzymprüfstand wurde der folgende Versuchsraum definiert:

1. Die experimentelle Dauer betrug 3-8 Stunden:

Diese experimentelle Dauer wurde aus Praktikabilitätsgründen gewählt, sodass 1-2 Experimente pro Arbeitstag oder ein Experiment über Nacht durchgeführt werden konnten.

2. Drei Experimente pro Versuchsplanung wurden entworfen:

Die Wahl der Experimentenzahl basierte auf Erfahrungswerten des Kooperationspartners BASF aus anderen Projekten. Die entworfenen Experimente sind komplementär. Das heißt, sie besitzen nur dann den vom Algorithmus als maximal angesehenen Informationsgehalt, wenn sie alle durchgeführt werden.

3. Definierte Anfangsbedingungen wurden in Abhängigkeit vom Stoffsystem geschaffen:

In Experimenten wurden Anfangsbedingungen angestrebt, bei denen die Reaktion bis zum Versuchsbeginn unterdrückt wird. Technisch wurde dies im Esterasesystem durch niedrige Starttemperaturen erreicht. Im Oxidasesystem wurde der Reaktionsteilnehmer Sauerstoff erst zu Versuchsbeginn dem System zugeführt.

4. Wahl der Steuergrößen und Steuerfunktionen:

Die wichtigste Steuergröße am Enzymprüfstand ist die Temperatur. Als Temperaturprofil wurden drei bzw. vier Temperaturrampen gleicher Dauer gewählt, welche vom Algorithmus nach einem Plateau bei niedriger Temperatur zu Beginn des Experiments im

Rahmen der Apparurmöglichkeiten (Temperaturgrenzen, maximale Temperiergeschwindigkeit, vgl. Kap. 4.2.2) frei geplant werden durften. Neben der Temperatur wurden teilweise auch die Konzentrationen vorgelegter Reaktionsteilnehmer als weitere Steuergrößen durch die Versuchsplanung bestimmt (vgl. Kap. 7.2). Dabei wurde wie folgt vorgegangen: Für ein bereits entworfenes Temperaturprofil wurde ein Versuchsplanungsproblem aufgestellt, bei dem nur die Stoffkonzentrationen im System variiert werden durften. Die so geplanten Experimente mit demselben Temperaturprofil, jedoch unterschiedlichen Konzentrationen konnten in einer MTP simultan durchgeführt werden.

In Abbildung 6.9 ist das aus einer Versuchsplanung resultierende Temperaturprofil (*gestrichelte Linie*) gezeigt. Die Versuchsplanung erfolgte, nachdem bereits eine Reihe von Experimenten durchgeführt und erfolgreich, mit ausreichender Parametersignifikanz (vgl. Ergebnisse in Kap. 7.1) angepasst wurden. Beim Experiment handelt es sich also um eine Crossvalidierung: Der vor dem Versuch von dem Modell vorausgesagte Verlauf der Messgröße pH-Wert (*durchgezogene Linie*) wurde mit dem Ergebnis des Experiments (*Fehlerbalken*) verglichen. Die Voraussage kann das Experiment im Rahmen des Messfehlers abbilden. Die systematische Überschätzung der Observablen ab 100 Minuten lässt sich durch das Messfehlermodell (Drift der pH-Elektrode bei der Messung des Anfangs-pH) erklären.

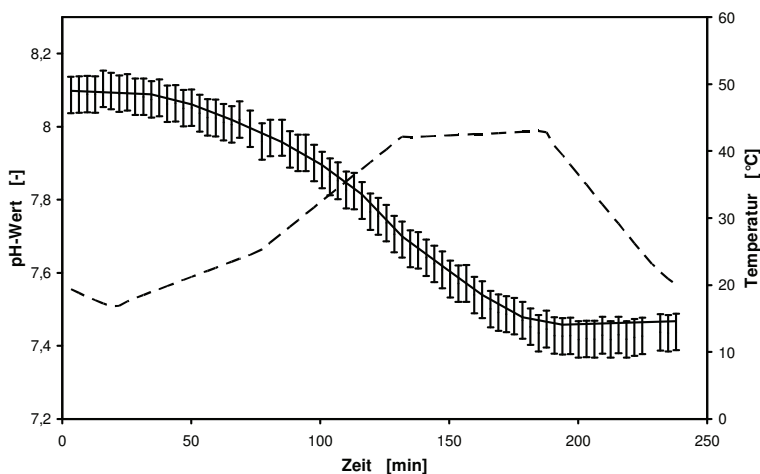


Abbildung 6.9: Vorausgesagter (*durchgezogene Linie*) und gemessener (*Fehlerbalken*) Verlauf der Messgröße pH-Wert im Esterasesystem für ein aufgeprägtes Temperaturprofil (*gestrichelte Linie*).

Das Vorgehen bei der Enzymcharakterisierung wurde gezeigt und an Beispielen eines Standardsystems, des Esterasesystems, illustriert. Des Weiteren wurden einige Beispiele für das Vorgehen bei der Behandlung ungewöhnlicher komplexer Systeme, wie des Oxidasesystems gezeigt. Die Ergebnisse der Enzymcharakterisierung werden in Kap. 7 präsentiert und mit den Ergebnissen der Langzeitexperimente verglichen. Zunächst wird jedoch in Kap. 6.5 ein Ausblick zum modellbasierten Vorgehen bei der Enzymcharakterisierung gegeben.

6.5 Ausblick zur modellbasierten Enzymcharakterisierung

In diesem Kapitel werden weitere Modellierungsaspekte diskutiert, welche auf dem jetzigen Stand der Entwicklung noch nicht am Enzymprüfstand etabliert sind, in Zukunft jedoch die Enzymcharakterisierung effektiver gestalten könnten. Die meisten Aspekte zielen darauf ab die intuitiven Anteile der Enzymcharakterisierung gezielt durch numerische Abläufe zu ersetzen. Dieses Vorgehen bietet zwei potentielle Vorteile.

Zum einen resultieren bei gut verstandenen Stoffsystemen (gleich zu setzen mit guten Modellen) die numerischen Algorithmen tendenziell in schnelleren bzw. besseren Lösungen. Dies wird an der Prozedur der Parameterschätzung deutlich, die analytisch nur für sehr eingeschränkte und numerisch für praktisch beliebige experimentelle Bedingungen funktioniert (vgl. Kap. 2.2.2 und 2.2.3).

Außerdem sind numerisch formulierte Lösungen zur weiteren numerischen bzw. automatisierten Verarbeitung geeignet. Der Output eines numerisch durchgeführten Schritts nach dem Schema aus Abbildung 6.1 kann also direkt als Input für den nächsten Schritt verwendet werden. Auf menschlichen Entscheidungen basierte Lösungen sind hingegen mit teurer Arbeitskraft verbunden, sie müssen zur automatisierten Weiterverarbeitung zunächst in Maschinensprache übersetzt werden. Daher wird die numerische Bearbeitung von Aufgaben nicht nur im Sinne der Verbesserung der Ergebnisse, sondern auch im Sinne der Automatisierbarkeit und der Durchsatzsteigerung angestrebt.

6.5.1 Modellreduktion

Bei der Modellreduktion werden im Gegensatz zur Modelldiskriminierung (vgl. Kap. 6.5.2) nicht die unterschiedlichen in Frage kommenden Modelle verglichen; vielmehr wird basierend auf der analytischen oder statistischen Modellanalyse auf verzichtbare Modellteile geschlossen. Ein Beispiel für die Modellreduktion ist das Entfernen des Agglomerationsmechanismus aus dem Modell des Esterasesystems. Ferner stellt die

Modellierung schneller dynamischer Effekte, wie reversible Enzymdeaktivierung, als Gleichgewichte einen Schritt der Modellreduktion dar. Weitere Beispiele finden sich in Kap. 7. Bei der Charakterisierung aller bisher behandelten Enzyme (zwei im Esterasesystem, eines im Oxidasesystem) mussten Schritte zur Modellreduktion unternommen werden. Insgesamt ist die Formulierung von Kriterien, welche eine automatische Erkennung von verzichtbaren Modellteilen erlauben und somit Modellreduktion ermöglichen, nicht trivial und das Vorgehen daher schwer automatisierbar. Ein mathematisch wesentlich umfassenderes, jedoch auch numerisch besser formulierbares Problem stellt die Modelldiskriminierung dar.

6.5.2 Modelldiskriminierung

Unter der Modelldiskriminierung wird die Planung und Auswertung von Experimenten verstanden, welche eine besondere Sensitivität gegenüber unterschiedlichen, in Frage kommenden Modellen besitzen. Die allgemeine Formulierung für das Problem der Modelldiskriminierung nach Hunter and Reiner lautet:

„Choose the experimental points which will most strain the incorrect model to jointly explain the data.“

Für zwei Modelle resultiert das Problem der Modelldiskriminierung in der Wahl der Steuergrößen q und $u(t)$, die zu möglichst großen Unterschieden in den Modellantworten h^1 und h^2 führen:

$$\max_{u(t), q} \left(\frac{h_i^1(t_i, y(t_i), z(t_i), p, q) - h_i^2(t_i, y(t_i), z(t_i), p, q)}{\sigma_i} \right)^2 \quad (6.8)$$

Das Problem wird auf die Standardabweichung der Messung normiert. Sind die Modellantworten unterschiedlich, kann entschieden werden, welches Modell besser in der Lage ist das experimentelle Ergebnis abzubilden. Im Rahmen einer am IWR (Institut für Wissenschaftliches Rechnen, Heidelberg) angefertigten Diplomarbeit (Hoffmann, 2007) wurde eine Modelldiskriminierung aus mehreren Enzymdeaktivierungsmodellen anhand von *in silico* Experimenten erfolgreich durchgeführt und somit die Eignung bestehender Algorithmen zur Diskriminierung Enzymprüfstand-relevanter Modelle gezeigt. In Zukunft könnte die Modelldiskriminierung einen Teil der Enzymcharakterisierung darstellen, wenn am Anfang routinemäßig das geeignetste Modell aus einem Pool gewählt wird. Wenn das Pool Modelle unterschiedlicher Komplexität beinhaltet, kann die Modelldiskriminierung die Schritte zur Modellreduktion ersetzen.

Abschließend soll eine weitere Frage an die Modelldiskriminierung adressiert werden. Die Temperaturabhängigkeit aller Reaktionskinetiken wurde nach dem Stand der Technik über das Arrheniusgesetz (Gl. 2.2 und Gl. 2.3) modelliert. Alternativ zu diesem Ansatz wurde der Versuch unternommen das kooperative Enzymverhalten bei den Faltungs- und Entfaltungsvorgängen phänomenologisch mit der Tangens Hyperbolicus Funktion zu beschreiben, die in der Physik z. B. für den spontanen Phasenübergang angewandt wird:

$$r = r_0 \cdot \frac{\tanh(a \cdot (T - T_0)) + 1}{2} \quad (6.9)$$

r	Reaktionsgeschwindigkeit der Entfaltung	[1/s]
r_0	maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Entfaltung	[1/s]
T_0	Temperatur bei der $r_0/2$ erreicht wird	[1/s]
a	Ableitung der Reaktionsgeschwindigkeit nach T an der Stelle T_0	[1/K]

Der qualitative Verlauf der mit Tangens Hyperbolicus beschriebenen temperaturabhängigen Reaktionsgeschwindigkeit ist in Abbildung 6.10 dargestellt. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist bis zum Erreichen eines bestimmten Temperaturbereichs vernachlässigbar klein. Beim Erreichen dieses „kritischen“ Temperaturbereichs steigt die Reaktionsgeschwindigkeit auf einen bestimmten maximalen Wert r_0 , welcher sich beim weiteren Temperaturanstieg nur unwesentlich ändert. Über die Variation des Parameters a in Gl. 6.9 lässt sich die Breite des kritischen Temperaturbereichs unterschiedlich modellieren. Phänomenologisch kann der Tangens Hyperbolicus sehr gut die spontanen Enzymfaltungsvorgänge beim Erreichen bestimmter Temperaturen beschreiben. Daher sollte dieser Ansatz als eine Alternative zum Arrhenius-Ansatz bei der Modelldiskriminierung berücksichtigt werden.

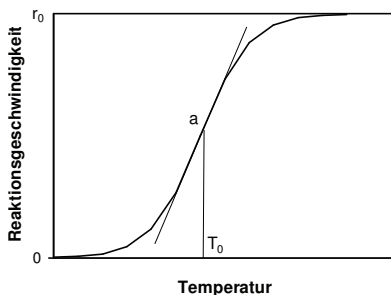


Abbildung 6.10: Qualitatives Verhalten der Tangens Hyperbolicus Funktion.

6.5.3 Robuste Versuchsplanung

Im Allgemeinen hängen die Ergebnisse der Versuchsplanung von den Werten der Modellparameter ab. In der Regel sind diese nicht oder nur ungenau bekannt und sollen erst durch die Methoden der Parameterschätzung und Versuchsplanung genau bestimmt werden (Körkel, 2002). Die Ergebnisse der Versuchsplanung sind also für den aktuellen Parameterwert optimiert. Folgendes Gedankenexperiment verdeutlicht die Schwäche dieser Eigenschaft der Versuchsplanung für den Enzymprüfstand.

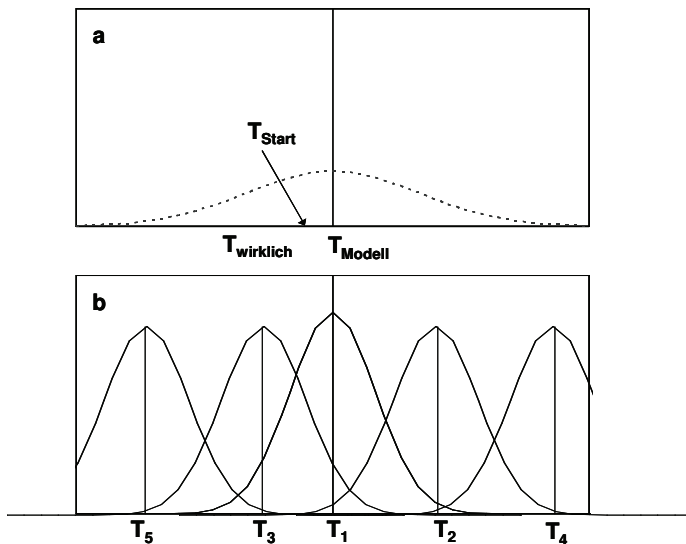


Abbildung 6.11: Gründe für die Berücksichtigung der Parameterunsicherheit in der Versuchsplanung bei ungenau bekannten Parametern (a), bei Versuchsplanung für mehrere Enzyme mit unterschiedlichen Eigenschaften (b).

Vereinfacht wird angenommen, dass das zu parametrisierende Modell als einzigen Parameter die Schmelztemperatur T besitzt. Bei dieser Temperatur deaktiviert das Enzym spontan und irreversibel. Die Schmelztemperatur wird durch ein Experiment erkannt, bei dem die Produktbildung unter Bedingungen einer Temperaturrampe gemessen wird. Beim Durchschreiten der Schmelztemperatur stoppt die Produktbildung, und der Parameter kann bestimmt werden. Zu Beginn der Enzymcharakterisierung ist das Enzymverhalten praktisch unbekannt, sodass der Modellwert für den Parameter Schmelztemperatur mit großer Unsicherheit versehen ist (T_{Modell} in Abbildung 2.4a). Wenn der wahre Wert $T_{wirklich}$ unterhalb T_{Modell} liegt, kann der Algorithmus eine Rampe entwerfen, welche oberhalb von $T_{wirklich}$ bei

T_{Start} beginnt und somit auf Grund der sofortigen Deaktivierung die Identifizierung des Parameters unmöglich macht.

Ein ähnliches Problem kann auftreten, wenn beim Screening mehrere Kandidaten mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen $T_{l,5}$ in Abbildung 2.4b getestet werden. In diesem Fall würde eine Rampe, welche knapp unter T_l beginnt und somit optimal für diesen Kandidaten ist, nicht optimal für den Kandidaten mit T_5 sein.

Entsprechende Probleme sind im Laufe der Enzymcharakterisierung aufgetreten und wurden bisher durch manuelle Einführung von Einschränkungen in der Versuchsplanung gelöst. Mit der sog. *Robusten Versuchsplanung* (Körkel., 2002) existiert ein Ansatz, welcher den *Worst-Case*, also die unglücklichste Parameterlage innerhalb des definierten Konfidenzintervalls berücksichtigt. Während bei der herkömmlichen Versuchsplanung die Funktion $\Psi(C)$ minimiert wird (vgl. Abschnitt Versuchsplanung in Kap. 2.2.3, S. 19), werden bei der robusten Versuchsplanung die maximalen Abweichungen vom erwarteten Verhalten durch die Parameterstreuung ausgehend von einer bestimmten Unsicherheit (z. B. mit $1\cdot\sigma$) berücksichtigt:

$$\min \left(\max_{\|p-p_0\|_{2,\Sigma^{-1}\sigma}} (\Psi(C)) \right) \quad (6.10)$$

Ein weiterer Aspekt der robusten Versuchsplanung kann die Unsicherheit bei den Steuergrößen sein. So sollen die entworfenen Temperaturprofile die Unsicherheit bei der Temperaturmessung und -regelung berücksichtigen.

Die Algorithmen zur robusten Versuchsplanung (Körkel et al., 2004) gehören zwar noch nicht zum Stand der Technik, sie sind jedoch in Entwicklung und könnten in Zukunft zu wichtigen Fortschritten am Enzymprüfstand führen.

6.5.4 „Geregelte“ Versuchsplanung

Eine weitere vielversprechende Möglichkeit der robusten Versuchsplanung liegt in der Einstellung der Steuergröße anhand des Messgrößenverlaufs. Auf diese Weise kann eine (unerwartete) Systemantwort mit der Modellvoraussage verglichen und durch die Einstellung der Steuergröße angepasst werden. So kann z. B. der „zu früh“ einsetzenden Enzymdeaktivierung durch das Absenken der Temperatur entgegengewirkt werden oder die Messgröße im Bereich maximaler Messgenauigkeit gehalten werden.

Unterschiedliche Ziele können für die Regelung definiert werden, wie:

- „stelle die Steuergröße so ein, dass sich der als optimal angesehene Verlauf der Systemantwort ergibt“, oder
- „folge so nah wie möglich dem als optimal angesehenen Verlauf der Steuergröße unter der Bedingung, dass die Systemantwort bestimmte Grenzen nicht verlässt.

Mathematische Grundlagen für die rationale Wahl der Regelungsziele im Hinblick auf die signifikante Parameterschätzung müssen geschaffen werden. Ferner müssen Regelungsstrategien gefunden werden, welche eine effiziente Regelung unter Berücksichtigung des komplexen Zusammenhanges zwischen der Steuergröße und der Systemantwort erlauben. Dabei muss z. B. berücksichtigt werden, dass verschiedene in Frage kommende Messgrößen (Enzymaktivität, Produktkonzentration, pH etc.) unterschiedlich schnell / träge auf die Einwirkung der Steuergröße reagieren.

7 Enzymcharakterisierung am Enzymprüfstand

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Enzymcharakterisierung für die beiden untersuchten Stoffsysteme Esterasesystem (Kap. 7.1) und Oxidasesystem (Kap. 7.2) vorgestellt. Diese Ergebnisse werden anhand der Langzeitexperimente validiert. Des Weiteren werden in Kap. 7.3 weitere Ergebnisse präsentiert, welche außerhalb der beiden Beispielstoffsysteme entstanden sind. Diese qualitativen Ergebnisse stellen keine vollständige Enzymcharakterisierung im Sinne des Enzymprüfstandes dar, sie demonstrieren jedoch das Potential des Enzymprüfstandes beim Screening nach Lösungsmitteln (Kap. 7.3.1), sowie die Problematik bei der Untersuchung mehrstufiger Reaktionen (Kap. 7.3.2). Abschließend wird in Kap. 7.4 anhand einer Fallstudie die Zeitersparnis beim Einsatz des Enzymprüfstandes im Vergleich zur Erlangung vergleichbarer Information nach dem Stand der Technik abgeschätzt.

7.1 Esterasesystem

Die Charakterisierung des Esterasesystems erfolgte anhand von drei Iterationsschleifen gemäß Abbildung 6.1 bestehend aus jeweils drei Temperaturprofilen. Die Experimente der ersten Iterationsschleife erfolgten für beide Enzyme simultan. Sie erlaubten es, das Deaktivierungsmodell beider Enzyme um das Agglomerationsmechanismus zu reduzieren. Die Versuchsplanung beider weiteren Iterationsschleifen erfolgte für beide Enzyme getrennt, da sie bereits in intuitiven Experimenten unterschiedliches Verhalten (resultierend in unterschiedlich geschätzten Parametern nach der ersten Iterationsschleife) zeigten.

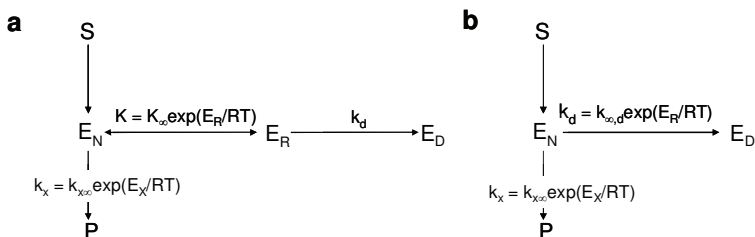


Abbildung 7.1: Endgültige Modelle zur Beschreibung des Esterasesystems für das mesophile (a) und das thermophile (b) Enzym.

Bei der mesophilen Esterase wurde auf Grund nicht ausreichender Parametersignifikanz (Korrelation zwischen Parametern E_d und k_d von 0,9988) das Modell um den Parameter E_D

(grau hinterlegt in Tabelle 7.1) reduziert. Dadurch konnte eine maximale relative Parameterstandardabweichung von 4,5% erreicht werden. Das endgültige Modellschema ist in Abbildung 7.1a dargestellt. Die Produktbildung erfolgt temperaturabhängig unter katalytischer Wirkung der nativen Enzymform E_N . Ferner steht E_N mit dem reversibel deaktivierten Enzym E_R im temperaturabhängigen Gleichgewicht. Die irreversible Deaktivierung aus E_R erfolgt temperaturunabhängig.

Bei der thermophilen Esterase betragen die Standardabweichungen bei den Parametern der reversiblen Deaktivierung über 100%. Daher wurde das Modell um diese Parameter reduziert, sodass sich ein Enzymdeaktivierungsschema mit direkter irreversibler Enzymdeaktivierung aus dem aktiven Zustand ergab. Dieses Modell entspricht dem aus der Literatur bekannten Schema (vgl. Gl. 2.8) und ist somit mechanistisch vertretbar. Als Ergebnis wurde eine hohe Parametersignifikanz (maximale Standardabweichung von 2,6%) bei gleichbleibender Fitgüte erreicht. Das endgültige Modellschema ist der Abbildung 7.1b zu entnehmen.

Die Ergebnisse der Parameterschätzungen für beide Enzyme sind in Tabelle 7.1 präsentiert. Einzelne Anpassungen sind dem Anhang B zu entnehmen.

Tabelle 7.1: Modellparameter für beide charakterisierten Enzyme. Parameterwerte und Standardabweichungen.

Parameter	Parameterwert	Standard- abweichung [%]	Parameterwert	Standard- abweichung [%]
	mesophile Esterase		thermophile Esterase	
$k_{x,\infty}$ [molProdukt/(gEnzymS)]	$2,572 \times 10^9$	2,6	0,99	0,7
E_X [J/mol]	83430	1,5	32908	1,7
$K_{R,\infty}$ [-]	$4,811 \times 10^{17}$	2,9	-	-
E_R [J/mol]	94,931	4,5	-	-
k_d [1/s]	1,067	0,5	$1,182 \times 10^{49}$	1,3
E_d [J/mol]	-	-	272733	2,6

Mit den Ergebnissen aus Tabelle 7.1 kann das dynamische Verhalten des Stoffsystems als Funktion der Temperatur und der vorgelegten Konzentrationen der Reaktanden vorausgesagt werden. In Abbildung 7.2 wird die Modellvoraussage hinsichtlich des TON als Funktion der Temperatur eines sechs Tage laufenden Prozesses mit den Ergebnissen der Langzeiterperimente im 1L-Reaktor im Fed-Batch-Modus verglichen. Das temperaturabhängige TON besitzt Maxima bei 35°C für die mesophile und bei 40°C für die thermophile Esterase. Die Modellvoraussagen sind in einer guten qualitativen Übereinstimmung mit den Langzeitergebnissen. Sowohl die Wahl der optimalen Prozesstemperatur als auch die Enzymwahl kann anhand der Modellvoraussage erfolgen. Die Ergebnisse demonstrieren also die Eignung des Enzymprüfstandes für das Screening: Anhand

der Voraussagen wird die richtige Parameterwahl (Enzymkandidat und Prozesstemperatur) getroffen. Ferner ist das höhere TON der mesophilen Esterase im Vergleich zur thermophilen bei moderaten Temperaturen anzumerken. Dieses Ergebnis offenbart die Schwäche der häufig angewandten Abschätzung der Langzeitstabilität anhand der Anfangsaktivität bei hohen Temperaturen (vgl. Kap. 2.1, S. 5). Tatsächlich würde ein Experiment bei 50°C zu dem Ergebnis führen, dass die thermophile Esterase Aktivität zeigt, während die mesophile deaktiviert ist. Die Ergebnisse aus Abbildung 7.2 zeigen jedoch, dass bei Temperaturen unter 42°C die mesophile Esterase zu einem höheren TON führt.

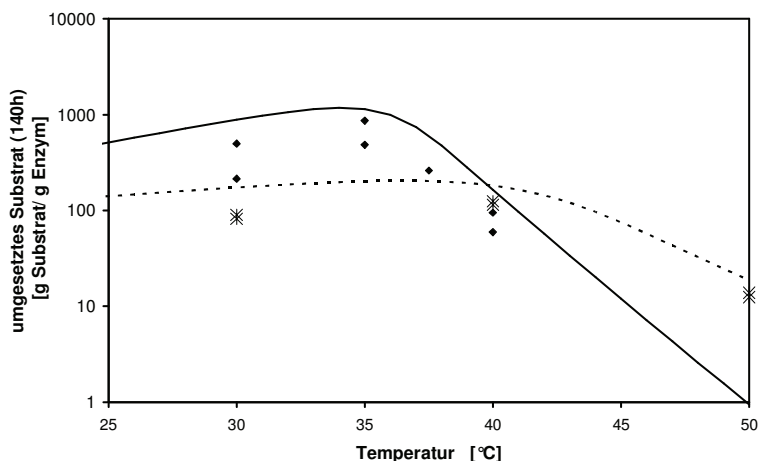


Abbildung 7.2: Vorausgesagter (Linien) und in 1L-Langzeitversuchen gemessener Verlauf (Symbole) von TON eines 6-Tage-Prozesses für die mesophile Esterase (durchgezogene Linie, Rauten) und die thermophile Esterase (kurz gestrichelte Linie, Sterne).

Quantitativ wird das TON von der Modellvoraussage systematisch überschätzt. Dies kann durch temperaturunabhängige Quellen der Deaktivierung erklärt werden, welche sich über die Steuergröße Temperatur nicht beschleunigen lassen. Zu diesen Deaktivierungsmechanismen zählt die Enzymzerstörung durch die Adsorption an der hydrophilen Reaktorwand, durch die mechanische Belastung (Shiragami and Unno, 1994; Colombie et al., 2000), durch den Scherstress (verfahrenstechnisch beschreibbar durch maximalen Leistungseintrag, Thomas and Dunnill, 1979; Thomas et al., 1979). Diese Deaktivierungsmechanismen sind reaktorspezifisch. Der durchschnittliche Leistungseintrag und der maximale Leistungseintrag in MTP'n stellen den Gegenstand aktueller Forschung dar. Es gibt Hinweise (Peter et al., 2006), dass die geschüttelten Reaktoren generell einen gleichmäßigeren Leistungseintrag und niedrigeren maximalen Leistungseintrag aufweisen als die Rührreaktoren. Eine weitere

Deaktivierungsquelle in begasten Stoffsystemen ist die Enzymzerstörung an der gas-flüssig Grenze (Wang et al., 1994; Caussette et al., 1999). Als oberflächenbegaste Reaktoren besitzen die MTP'n eine im Vergleich zu blasenbegasten Reaktoren kleinere gas-flüssig Grenzfläche. Insgesamt lässt sich also festhalten, dass die MTP'n eine insgesamt schonendere Betriebsweise als Rührreaktoren bieten, sodass die nicht modellierten, temperaturunabhängigen Deaktivierungseffekte weniger stark ausgeprägt sind. Somit wird der Einfluss dieser Effekte auf den Charakterisierungsprozess minimiert.

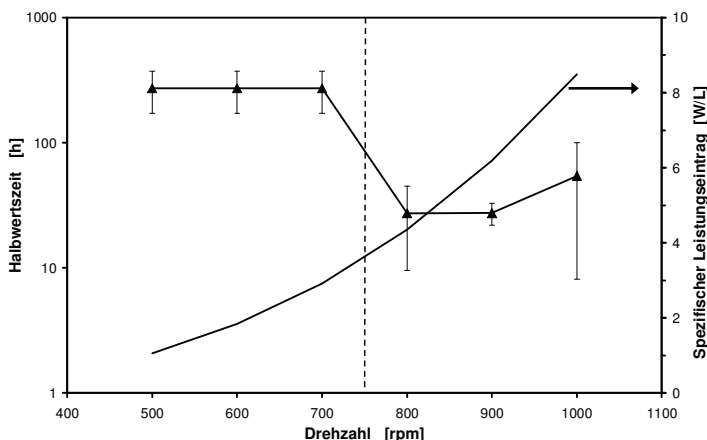


Abbildung 7.3: Halbwertszeit (Symbole mit Fehlerbalken und Linie) sowie Leistungseintrag (Linie) als Funktion der Rührerdrehzahl. Die kritische Drehzahl des Luftansaugens von der Oberfläche ist durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet.

In Abbildung 7.3 ist die Halbwertszeit (Symbole mit Fehlerbalken und Linie) der mesophilen Esterase sowie der berechnete spezifische Leistungseintrag (Linie) im unbegasten Reaktor als Funktion der Drehzahl bei 25°C aufgetragen. Während der Leistungseintrag einen stetigen Verlauf aufweist, fällt die Halbwertszeit zwischen 700 und 800 rpm sprunghaft ab (Faktor 10). Da bei der gewählten Reaktorkonfiguration bei der kritischen Drehzahl von 750 rpm das Luftansaugen aus dem Gasraum des Reaktors eintritt und somit ein qualitativer Unterschied zwischen den Drehzahlen <750 rpm und >750 rpm besteht, liegt die Vermutung nahe, dass das Enzym tatsächlich an der gas-flüssig Grenzfläche deaktiviert. Dieser am Rande der Untersuchungen entstandene Versuch demonstriert, wie auch die temperaturunabhängigen Deaktivierungseffekte durch die geeignete Wahl der Steuergröße beschleunigt werden können. Die gas-flüssig Grenzfläche könnte z. B. als Funktion der Begasungsrate untersucht werden. In Zukunft sollte es also ein Ziel sein, Modelle zu entwickeln, welche

unterschiedliche Deaktivierungseffekte über verfahrenstechnische Parameter wie z. B. die gas-flüssig Grenzfläche reaktorübergreifend beschreiben. In diesem Fall könnten die Ergebnisse des Enzymprüfstandes im Rahmen der Prozessentwicklung für einige wenige, ausgesuchte Enzymkandidaten in größeren und komplexeren als die MTP Reaktoren gezielt präzisiert werden.

Das Potential des Enzymprüfstandes lässt sich anhand der TON-Voraussage der mesophilen Esterase bei unterschiedlichen Prozesszeiten als Funktion der Temperatur in Abbildung 7.4 demonstrieren. Für steigende Prozesszeit verschiebt sich das optimale TON zu niedrigeren Prozesstemperaturen, da der Einfluss der Langzeitstabilität steigt. Bei Temperaturen über 37°C ist das TON für alle drei Prozessdauer gleich, da das Enzym bereits innerhalb des kürzesten Prozesses vollständig deaktiviert.

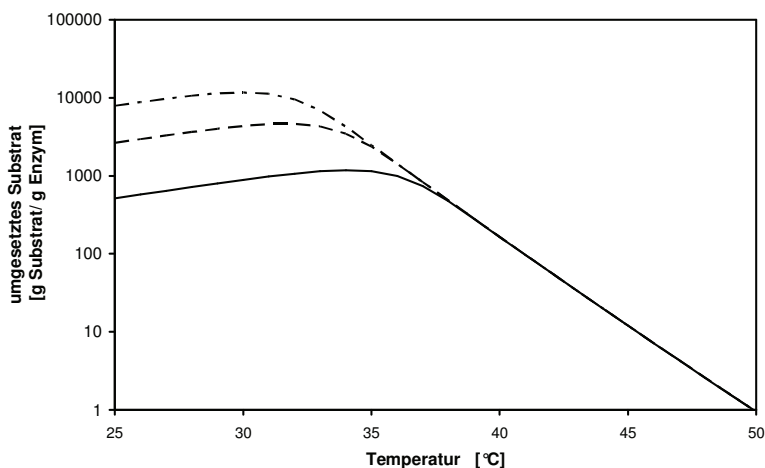


Abbildung 7.4: TON-Voraussage eines 6-Tage Prozesses (durchgezogene Linie), eines 30-Tage Prozesses (gestrichelte Linie) und eines 90-Tage Prozesses (punkt-gestrichelte Linie) für das mesophile Enzym.

Für kostengünstige Enzyme und hohe Betriebskosten ist nicht die TON, sondern die RZA für die Bewertung der Prozesseffizienz entscheidend. In Abbildung 7.5 ist die vorausgesagte RZA beider Esterasen für verschiedene Prozessdauer gegen die Temperatur aufgetragen. Das Temperaturoptimum und die erreichte RZA fallen dabei mit steigender Prozessdauer. In der Praxis ist die wirtschaftliche Prozesseffizienz eine komplizierte Funktion der RZA, der Enzym- und Substratkosten, des Produktpreises und der Betriebskosten. Die Ergebnisse der Enzymcharakterisierung können jedenfalls bei der Berechnung dieser Funktion eingesetzt werden.

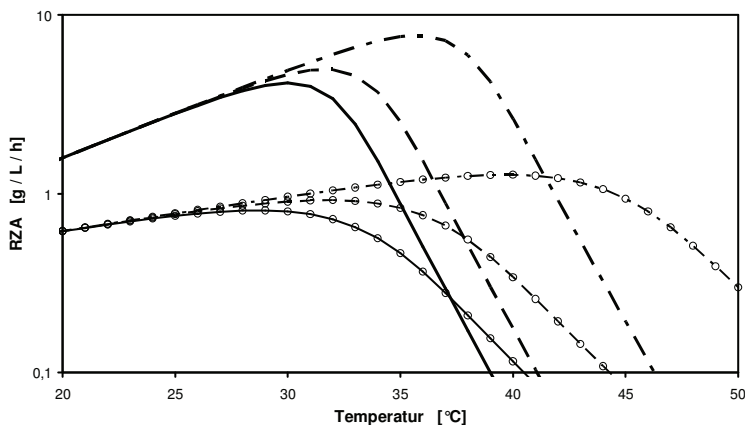


Abbildung 7.5: Voraussage der RZA eines 6-Tage Prozesses (punkt-gestrichelte Linie), eines 30-Tage Prozesses (gestrichelte Linie) und eines 90-Tage Prozesses (durchgezogene Linie) für das mesophile Enzym (Linien) und das thermophile Enzym (Linien und Symbole).

7.2 Oxidasesystem

Die Charakterisierung des Oxidasesystems stellt ein Beispiel für die Untersuchung eines komplexen, biochemisch nicht restlos verstandenen Stoffsystems am Enzymprüfstand dar. Für das Schema in Abbildung 6.1 bedeutet das, dass eine starke Rückkopplung zwischen der Auswertung der Experimente und dem Modell bestand. Nicht nur die Modellparameter, sondern auch das Reaktionsschema stellten den Gegenstand der Untersuchungen dar. Aus diesem Grund erfolgt die Beschreibung des Reaktionsschemas zusammen mit der Auswertung.

7.2.1 Erstellung des Modells

Der angenommene Reaktionsmechanismus im Oxidasesystem ist in Abbildung 7.6 schematisch dargestellt. Der Mediator (TEMPO) wird durch das Enzym (Laccase) unter Verbrauch von Sauerstoff und Wasserstoff zum Mediator⁺ (TEMPO⁺) oxidiert. Der Mediator⁺ reagiert mit dem Substrat (ein Alkohol) zu Mediator-OH (TEMPO-OH) und zum Produkt (Aldehyd). Dabei ist bisher ungeklärt, inwiefern diese Reaktion als einstufig angesehen werden kann. Ebenso ist ungeklärt, ob und wie schnell das Produkt weiter zum Produkt 2 (eine Säure) reagieren kann. Marjasvaara et al. (2004) fanden für das von ihnen eingesetzte Modellsubstrat HMPtMA, dass die Reaktion des Aldehyds zur Säure erst dann einsetzt, wenn

das Substrat verbraucht ist. Das Mediator-OH kann auf zwei Wegen zum Mediator regeneriert werden. Entweder (Weg 1) reagieren ein Mediator⁺ und ein Mediator-OH unter Abgabe eines Protons zu zwei Mediator-Molekülen (Burton, 2003; Arends et al., 2006) oder (Weg 2) ein Mediator-OH reagiert unter katalytischer Wirkung des Enzyms und Sauerstoffverbrauch zum Mediator (Burton, 2003; Arends et al., 2006; d'Acunzo et al., 2002). Während der Weg 1 als Stand des Wissens akzeptiert wird, bestehen Zweifel, inwieweit der Weg 2 stattfindet (Hoffmann, 2007). Mit der Mediatorregeneration wird der katalytische Kreis geschlossen.

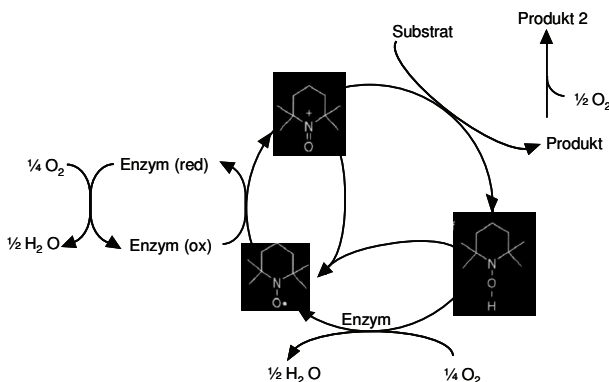


Abbildung 7.6: angenommener Reaktionsmechanismus im gewählten LMS (Fabrini et al., 2001; Arends et al., 2006).

Durch eine Literaturrecherche (Burton, 2003; Arends et al., 2006; d'Acunzo et al., 2002; Hager, 2003; Potthast, 1998; Dragutan & Mehlhorn, 2007) sowie Beratungsgespräche mit BASF-Mitarbeitern wurde ein Vorwissen über das Stoffsystem erlangt, welches für die Modellierung sowie experimentelle Arbeit von Bedeutung war:

1. Die Reaktion des Substrats läuft (zumindest bei Zimmertemperatur) ausschließlich bei gleichzeitiger Anwesenheit von Sauerstoff, Laccase und Mediator ab.
2. Durch die Oxidation kann Mediator⁺ das Enzym irreversibel deaktivieren.
3. Mediator und Mediator⁺ besitzen im sauren Milieu (unter anderem im Acetattpuffer) eine eingeschränkte Stabilität. Sie gehen Reaktionen (z. B. Reduktion zu Hydroxylamin) ein, welche je nach Temperatur und Reaktionspartnern in der Zeitskala von Monaten bis Stunden beobachtbar sind.
4. Die Michaelis-Menten-Konstante der eingesetzten Laccase bezüglich des Mediators bei Raumtemperatur beträgt $K_{\text{TEMPO}} \sim 6,3 \text{ mM}$.

5. Die Michaelis-Menten-Konstante der eingesetzten Laccase bezüglich des Sauerstoffs bei Raumtemperatur beträgt $K_{O_2} \sim 20 \mu\text{M}$.
6. Die Löslichkeit des Mediators in wässrigen Medien bei Raumtemperatur beträgt $\sim 60 \text{ mM}$. Die Verwendung von Lösungsmitteln sollte ausführlich geprüft werden, da eine Gefahr der Reaktion mit Mediator⁺ besteht (z. B. bei Methanol).

Die Schwierigkeit bei der Charakterisierung des vorliegenden Stoffsystems ist die Tatsache, dass für mehrere Reaktionen aus Abbildung 7.6:

- Mediatoroxidation,
- Substratoxidation,
- Produktoxidation,
- Mediatorrückgewinnung (Weg 1),
- Mediatorrückgewinnung (Weg 2),
- Enzymoxidation bzw. -inhibierung durch Mediator⁺

nur eine Meßgröße nach Kap. 5.2, nämlich der pO_2 , vorliegt. Um den Bestimmtheitsgrad des Problems zu erhöhen, wurden folgende Annahmen getroffen:

1. Produktoxidation findet nicht statt (diese Annahme basiert auf Marjvasara et al., 2004; Hoffmann, 2007).
2. Nur ein Weg der Mediatorrückgewinnung findet statt. Sollte das System nicht durch eine Art der Mediatorrückgewinnung zu beschreiben sein, würden beide Mechanismen gleichzeitig angepasst.
3. Mediator⁺ kann das Enzym deaktivieren. Enzyminhibierung durch der Mediator wird vernachlässigt. Diese Annahme stützt sich auf die Literatur, welche über die deaktivierende Wirkung des Mediators⁺ über Oxidation und nicht über eine inhibierende Wirkung spricht.
4. Die Michaelis-Menten-Konstanten für die Mediatoroxidation für den Mediator und den Sauerstoff wurden als nicht temperaturabhängig angenommen und aus der Literatur übernommen.

Somit entstanden zwei Modellvarianten, welche sich durch den Mechanismus der Mediatorrückgewinnung unterschieden. Die Enzymdeaktivierung wurde gemäß Abbildung 6.4 modelliert. Dabei wurde angenommen, dass die irreversible Deaktivierung des Enzyms über die Oxidation durch TEMPO⁺ für alle Fraktionen (aktiv und reversibel deaktiviert) mit gleichen Reaktionsraten erfolgt. Die Massenbilanzen wurden gemäß Abbildung 7.6 (außer Produkt $\rightarrow$ Produkt 2) formuliert.

7.2.2 Intuitive Experimente und ihre analytische Auswertung

Wie in Kap. 6.2 erklärt, ließ sich das Oxidasesystem als mehrstufiges Reaktionssystem nicht mit Standardexperimenten charakterisieren, wie sie im Esterasesystem eingesetzt wurden. Der Versuch wurde unternommen die Konzentrationen in verschiedenen Wells der MTP zu variieren, um bestimmte Reaktionen gezielt hervorzuheben oder zu unterdrücken:

- Über die Vorlage / nicht Vorlage von Substrat sollte das TEMPO^+ gezielt zum Weiterreagieren zu TEMPO-OH / Akkumulierung in der Lösung gebracht werden.
- Über die Vorlage von TEMPO^+ ohne Substrat sollte gezielt seine deaktivierende Wirkung untersucht werden.
- Über die Vorlage von TEMPO-OH ohne TEMPO sollte Weg 2 der Mediatorrückgewinnung untersucht werden.

Während TEMPO kommerziell erhältlich ist, mussten TEMPO^+ und TEMPO-OH synthetisiert werden (beim Bleichen von TEMPO mit Natriumhypochlorit entsteht TEMPO^+ , bei der Reaktion von TEMPO mit Vitamin C entsteht TEMPO-OH , vgl. Kap. 3.2.2, Gl. 3.2). Alternativ lag TEMPO^+ als Salz vor ($\text{TEMPO}^+\text{BF}_4^-$). Bei der Verwendung in dieser Form vorliegender TEMPO -Derivate ist der Einfluss von Fremdstoffen: BF_4^- -Ionen und Dehydroascorbinsäure auf das System unvermeidbar. Vor allem aber das Natriumhypochlorit, das in sehr stark schwankenden Konzentrationen vorliegt (Herstellerangabe 10-13 % in der Lösung, vgl. Tabelle 3.4), eignet sich nur eingeschränkt für eine definierte Synthese.

In Abbildung 7.7 ist für ein aufgeprägtes Temperaturprofil (*gestrichelte Linie*) der Einfluss unterschiedlicher TEMPO^+ -Vorlagen auf das Systemverhalten untersucht. Der $p\text{O}_2$ steigt zunächst nach dem Einschalten der Luftbegasung, um auf einem bestimmten Niveau ins Fließgleichgewicht zu kommen. Der anschließende Verlauf ist durch die Änderungen in der Reaktionsgeschwindigkeit (und auch die temperaturabhängigen Änderungen im Sauerstoffeintrag, vgl. Gl. 4.4) definiert. Dabei entspricht ein niedriger $p\text{O}_2$ einem hohen Sauerstoffverbrauch und somit einer schnellen Reaktion, während ein $p\text{O}_2 = 100\%$ einer Sauerstoffsättigung, also einem vernachlässigbaren Sauerstoffverbrauch entspricht. Qualitativ zeigen alle Kurven einen ähnlichen Verlauf mit steigender Reaktionsgeschwindigkeit bei steigender Temperatur bis ca. 40°C , einem $p\text{O}_2$ -Minimum bei dieser Temperatur nach ca. 100 min und anschließendem Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit bis zur Sauerstoffsättigung bei 60°C nach 150 min. Die Reaktionsgeschwindigkeit ohne TEMPO^+ -Vorlage (*durchgezogene Linie*) ist höher als mit TEMPO^+ , was auf seine deaktivierende Wirkung zurückzuführen ist. Trotz gleicher Konzentrationen ist ein deutlicher Unterschied zwischen dem durch Bleichen

hergestellten (*kurz gestrichelte Linie*) und in Form von Salz zugegebenen (*punkt gestrichelte Linie*) TEMPO⁺ zu beobachten. Wie vermutet, führten das Vorhandensein von Fremdstoffen und die undefinierte Synthese von TEMPO⁺ zu Unsicherheiten in der Auswertung von Ergebnissen. Während die qualitative Enzymdeaktivierung durch TEMPO⁺ bestätigt wird, muss die Verwendbarkeit der Ergebnisse mit TEMPO⁺-Vorlagen für die Parameterschätzung kritisch geprüft werden.

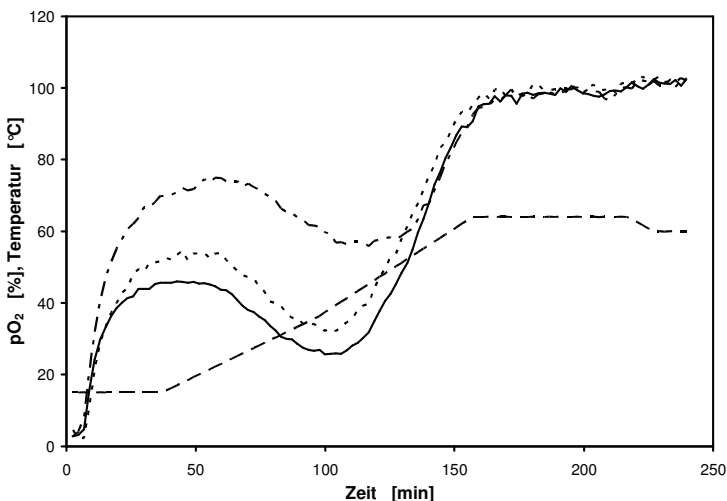


Abbildung 7.7: Einfluss von TEMPO⁺-Vorlagen auf das Reaktionssystem in Abwesenheit von Substrat. pO₂-Verlauf für ein aufgeprägtes Temperaturprofil (*lang gestrichelte Linie*) ohne TEMPO⁺ (*durchgezogene Linie*), 6 mM durch Bleichen hergestelltes TEMPO⁺ (*kurz gestrichelte Linie*), 6 mM TEMPO⁺-BF₄⁻-Salz (*punkt-gestrichelte Linie*).

In Abbildung 7.8 ist das in Abbildung 7.7 vorgestellte Ergebnis ohne TEMPO⁺-Vorlage (*durchgezogene Linie*) mit den Ergebnissen in Wells verglichen, in denen 72 mM Substrat ebenfalls ohne TEMPO⁺ (*kurz gestrichelte Linie*) bzw. 72 mM Substrat und 6 mM TEMPO⁺ (*punkt-gestrichelte Linie*) vorgelegt wurden. Die Wells mit Substratvorlage unterscheiden sich von dem Well ohne Substrat durch die spätere Deaktivierung (Sauerstoffsättigung wurde erst nach 230 Min erreicht, nachdem das System für ca. 80 min der Temperatur von 60°C ausgesetzt war). Während TEMPO⁺ ohne Substrat über die Versuchsdauer akkumuliert und deaktivierend wirken kann, reagiert es in Anwesenheit von Substrat zu TEMPO-OH. Dadurch kann die Deaktivierung durch TEMPO⁺ wesentlich abgeschwächt werden. Dieses Ergebnis liefert einen qualitativen Nachweis, dass die Deaktivierung durch TEMPO⁺ und die

thermodynamische Deaktivierung unterschiedliches Temperaturverhalten aufweisen und über die Wahl der Substratkonzentration voneinander trennbar sind.

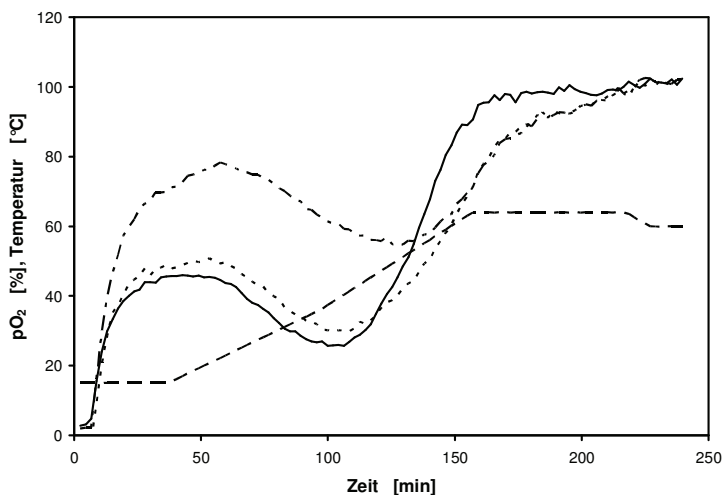


Abbildung 7.8: Einfluss des Substrates auf das Reaktionssystem. pO_2 -Verlauf für ein aufgeprägtes Temperaturprofil (lang gestrichelte Linie). Ohne $TEMPO^+$ und ohne Substrat (durchgezogene Linie), 72 mM Modells substrat (kurz gestrichelte Linie), 72 mM Modells substrat und 6 mM $TEMPO^+$ (punkt-gestrichelte Linie).

Ferner liefert der Vergleich der Verläufe mit und ohne $TEMPO^+$ -Vorlage in Anwesenheit von Substrat den Hinweis, dass nicht nur das akkumulierte, sondern auch das vorgelegte $TEMPO^+$ abgebaut werden kann. Die $TEMPO^+$ -Vorlage führte nicht zu einer Enzymdeaktivierung bei niedriger Temperatur von 40°C, wie es in Abwesenheit von Substrat der Fall war. Schließlich wird der irreversible Charakter der Deaktivierung durch $TEMPO^+$ deutlich. Obwohl das vorgelegte $TEMPO^+$ nach einiger Zeit abgebaut wird, bleibt die Reaktionsgeschwindigkeit im entsprechenden Well unter der ohne $TEMPO^+$ -Vorlage. Die Verläufe mit und ohne Substrat in den ersten 100 min des Versuchs sind sich ähnlich und liefern somit einen qualitativen Hinweis dafür, dass der Sauerstoff verbrauchende Weg 2 der enzymatischen Mediatorrückgewinnung (vgl. Abbildung 7.6) schwach im Vergleich zur Mediatoroxidation ausgeprägt ist.

Experimente mit vorgelegtem $TEMPO-OH$ (Ergebnis nicht dargestellt) zeigten einen ungewöhnlich hohen Sauerstoffverbrauch, welcher sich durch das Reaktionsschema nicht erklären ließ. Dieses Verhalten ist offensichtlich auf die Wirkung der Ascorbinsäure oder der Dehydroascorbinsäure zurückzuführen, die bei der Synthese von $TEMPO-OH$ im Stoffsystem

vorliegen. Daher wurde auf die weitere Synthese von TEMPO-OH verzichtet. Aus der qualitativen Auswertung des Experiments wurden folgende Schlüsse gezogen, welche in die Modellierung und Versuchsplanung einfließen:

- Die obigen Modellannahmen 1-3 aus Kap. 7.2.1 wurden qualitativ bestätigt.
- Über die Variation der Substratkonzentration konnte die thermische Deaktivierung von der Deaktivierung durch TEMPO⁺ im Experiment unterschieden werden.
- Die Vorlage von TEMPO⁺ und TEMPO-OH ist nur unter Vorbehalten sinnvoll, da auf dem jetzigen Stand der Untersuchungen diese Stoffe nicht rein vorliegen und ihre Wirkung im System daher nicht quantifizierbar ist. In Zukunft sollten Bemühungen unternommen werden, diese Stoffe in reiner Form zu erhalten.

7.2.3 Ergebnisse der Enzymcharakterisierung

Parallel zu der auf dem Softwarepaket des IWR (PARFIT + VPLAN) basierten Modellierarbeit bei der BASF erfolgte die Charakterisierung des Oxidasesystems bei BioVT unter *gPROMS*. Die knappe Projektzeit und die Arbeit mit verschiedenen Modellvarianten ließen keine vollständig getrennte Charakterisierung nach dem Schema aus Abbildung 6.1 zu. Vielmehr wurden die Ergebnisse beider Versuchspläne beiden Softwarepaketen zur Verfügung gestellt, sodass beispielsweise *gPROMS* von Versuchsplänen des *VPLAN* „profitieren“ konnte.

Die folgenden Ergebnisse der Parameterschätzungen wurden mit *gPROMS* erzeugt. Insgesamt wurden zwei Iterationsschleifen gemäß Abbildung 6.1 durchlaufen. Dabei wurden drei intuitive Temperaturprofile mit jeweils sechs Konzentrationsprofilen in der ersten Iterationsschleife implementiert. Fünf von sechs Konzentrationsprofilen für eines der Temperaturprofile sind z. B. in den Abbildung 7.7 und Abbildung 7.8 verglichen. In der anschließenden Versuchsplanung in der zweiten Iterationsschleife wurden drei Temperaturprofile (zwei für die Modellvariante Weg 1, eines für die Modellvariante Weg 2) von *gPROMS* und zwei Temperaturprofile von *VPLAN* mit jeweils drei Konzentrationsprofilen entworfen. Diese fünf Temperaturprofile können nicht als komplementär angesehen werden (vgl. Kap. 6.4), da sie von verschiedenen Softwarepaketen und für unterschiedliche Modellvarianten entworfen wurden. Alle Versuchspläne, Messdatenverläufe sowie Anpassungen mit beiden Modellvarianten sind in Anhang B dokumentiert.

Grenzen der Modellgültigkeit**Tabelle 7.2:** Grenzen der Modellgültigkeit.

	Untere Grenze	Obere Grenze
TEMPO-Konzentration [mM]	10	-
Enzymkonzentration [μ M]	-	1
TEMPO ⁺ [mM]	-	0

Experimente mit vorgelegtem TEMPO⁺ lieferten wertvolle qualitative Informationen über das Stoffsystem. Sie wurden jedoch aus der Parameterschätzung ausgeschlossen, da die Synthese von TEMPO⁺ auf eine undefinierte Art erfolgte und nicht vom Modell abgebildet werden konnte. In diesem Zusammenhang wurden auch weitere, mechanistisch begründete Grenzen der Modellgültigkeit definiert und in die Versuchsplanung übernommen. Diese Grenzen sind in Tabelle 7.2 zusammengefasst. Sie lassen sich mechanistisch erklären:

- Bei TEMPO-Konzentrationen von $K_{TEMPO}(25^\circ\text{C}) = 6,3 \text{ mM}$ im Michaelis-Menten Bereich und tiefer ist das Modellverhalten stark von K_{TEMPO} -Wert abhängig. Bereits geringe temperaturabhängige Änderungen in der Substrataffinität können zu einem unerwarteten Verhalten führen. Da $K_{TEMPO}(T)$ nicht der Gegenstand der Anpassung ist (vgl. Kap. 7.2.1), liegen die Substratkonzentrationen in diesem Bereich außerhalb der Modellgültigkeit. Aus diesem Grund wurde die minimale TEMPO-Konzentration auf 10 mM festgesetzt.
- Bei hohen Enzymkonzentrationen ist die Reaktionsgeschwindigkeit so hoch, dass der eingetragene Sauerstoff bereits an der Gas-Flüssig-Grenzphase verbraucht wird. In diesem Fall gilt das Modell für den Sauerstoffeintrag nicht (vgl. Kap. 4.3.2, Gl. 4.6). Basierend auf Messungen der Enzymaktivität bei 25°C und Abschätzungen der *Hatta*-Zahl (s. S. 68, kritische Enzymkonzentration von 2,7 μM bei 25°C) wurde 1 μM als Obergrenze für die Enzymkonzentration innerhalb der Modellgültigkeit definiert.
- Wie oben beschrieben, bestehen Unsicherheiten bei der Verwendung von TEMPO⁺-Vorlagen, da sie chemisch nicht dem im Laufe des Versuches akkumulierten TEMPO⁺ entsprechen. Daher werden die entsprechenden Versuche nicht bei der Parameterschätzung berücksichtigt.

Die zu schätzenden Modellparameter gemäß dem Reaktionsmechanismus aus Abbildung 7.6 mit Annahmen von S. 127 sind in Tabelle 7.3 aufgelistet. Dabei werden zwei alternative Modelle mit chemischer Enzymdeaktivierung (Weg 1 in Abbildung 7.6, Parameter E_{TRX} und S_{TRX} sind ausgeschaltet) und mit enzymatischer Enzymdeaktivierung (Weg 2 in Abbildung 7.6, Parameter E_{TRC} und S_{TRC} sind ausgeschaltet) betrachtet.

Tabelle 7.3: Zu bestimmende Parameter.

	<i>Reaktion</i>	<i>k</i>	<i>E</i>
Enzymatische Mediatoroxidation	$TEMPO \rightarrow TEMPO^+$	k_X	E_X
Reversible Deaktivierung	$E_N \leftrightarrow E_R$	K_R	E_R
Irreversible Deaktivierung	$E_R \rightarrow E_D$	k_D	E_D
Irreversible Deaktivierung durch TEMPO+	$(E_N + E_R) \rightarrow E_D$	k_T	E_T
Substratoxidation	$Substart \rightarrow Produkt$	k_{ox}	E_{ox}
Enzymatische Mediatorrückgewinnung	$TEMPO-OH \rightarrow TEMPO$	k_{TRX}	E_{TRX}
Chemische Mediatorrückgewinnung	$TEMPO-OH + TEMPO^+ \rightarrow 2 TEMPO$	k_{TRC}	E_{TRC}

Nach der ersten Reihe der intuitiven Experimente und zwei anschließenden Versuchsplänen lagen 24 Messdatenverläufe innerhalb der Modellgültigkeit (8 Temperaturprofile á 3 experimentelle Bedingungen) vor.

Wahl des Modells der Mediatorrückgewinnung

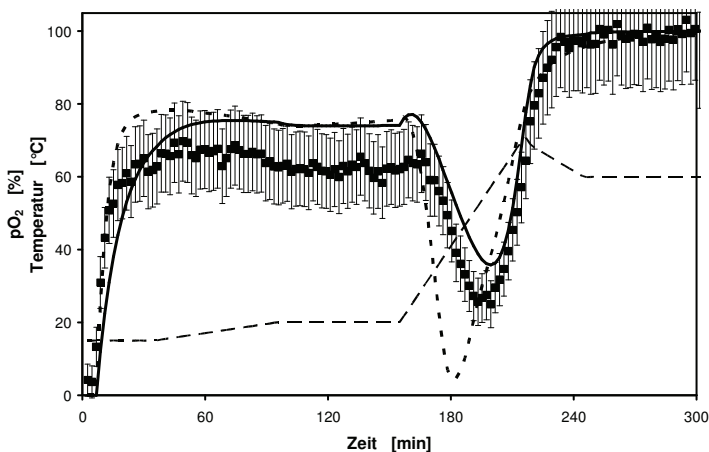


Abbildung 7.9: Messdatenverlauf (Symbole mit Fehlerbalken), Anpassung mit chemischer Mediatorrückgewinnung (durchgezogene Linie), Anpassung mit enzymatischer Mediatorrückgewinnung (kurz gestrichelte Linie) für das aufgeprägte Temperaturprofil (lang gestrichelte Linie). [Enzym]=0,1 μ M, [TEMPO]=12 mM, [Substrat]=120 mM.

In Abbildung 7.9 ist ein Messdatenverlauf (Fehlerbalken) sowie Anpassungen mit beiden Modellvarianten für das aufgeprägte Temperaturprofil (lang gestrichelte Linie) beispielhaft präsentiert. Die Anpassung mit der chemischen Mediatorrückgewinnung (durchgezogene Linie) ist besser in der Lage den Verlauf der Messdaten zu beschreiben. Dieser Trend ist typisch für die Anpassungen (s. Anhang B).

Dieses Ergebnis wurde als Hinweis für die Wirksamkeit der chemischen Mediatorrückgewinnung gedeutet. Parallele unabhängige Untersuchungen beim

Kooperationspartner BASF ergaben ebenfalls, dass die chemische Mediatorrückgewinnung der wahrscheinlichere Weg ist (Hoffmann, 2007). Daher wurde nur diese Modellvariante weiterverfolgt. Allerdings konnte nicht ausgeschlossen werden, dass beide Mechanismen überlagert auftreten. Überhaupt erweist sich die Aufklärung der wirksamen biochemischen Mechanismen mit der eingesetzten Hochdurchsatztechnik als schwierig. Die starke Rückkopplung zwischen den auftretenden Effekten und die hohe Parameterzahl ermöglichen es unterschiedlichen Modellen die experimentelle Wirklichkeit abzubilden. An dieser Stelle wäre eine gezielte Versuchsplanung zur Modelldiskriminierung sinnvoll (vgl. Kap. 6.5.2).

Modellreduktion

Trotz 24 Experimenten und mehreren Iterationsschleifen gemäß Abbildung 6.1 wurde keine akzeptable Parametersignifikanz erreicht. Mehrere Parameter besaßen eine Standardabweichung $\sigma > 100\%$. Die Analyse der Korrelationsmatrix in der Tabelle 7.4 zeigt eine hohe Korrelation der Parameter für die Aktivierung k_x , E_x , die reversible k_R , E_R , und die irreversible Enzymdeaktivierung k_D , E_D . Da die Enzymaktivierung sowie die irreversible Enzymdeaktivierung mechanistisch unverzichtbar sind, wurde der Versuch unternommen, das Modell um die reversible Enzymdeaktivierung zu reduzieren.

Tabelle 7.4: Korrelationsmatrix für 24 angepasste Versuche im Oxidasesystem.

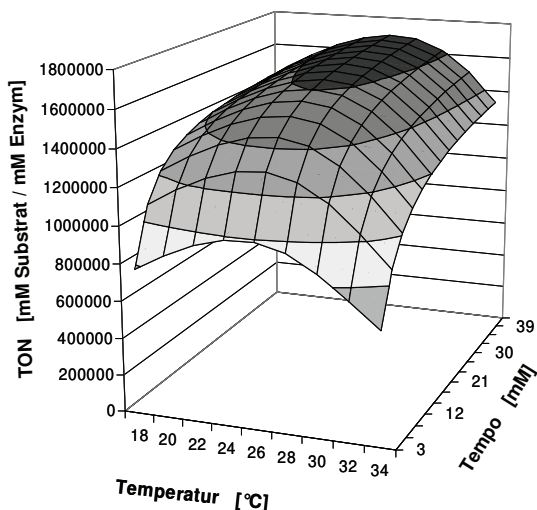
Parameter		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
k_x	1	1											
E_x	2	1	1										
K_R	3	1	1	1									
E_R	4	1	1	1	1								
k_D	5	1	1	1	1	1							
E_D	6	1	1	1	1	1	1						
k_T	7	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	1					
E_T	8	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	0,96	1				
k_{ox}	9	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	1			
E_{ox}	10	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	0,92	1		
k_{TRC}	11	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	1	
E_{TRC}	12	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	0,92	1

Durch die Modellreduktion und die anschließende Parameterschätzung konnte eine ausreichende Parametersignifikanz (maximale Standardabweichung von 3,01%, vgl. Tabelle 7.5) bei gleichbleibender Fitgüte erreicht werden.

Tabelle 7.5: Parametersatz für das Modell ohne reversible Enzymdeaktivierung.

	Parameter	Relative Standardabweichung [%]
k_D [-]	$1,19329 \times 10^{-24}$	0,46
E_D [J/mol]	$1,43 \times 10^5$	0,77
k_X [-]	$1,82793 \times 10^{10}$	0,05
E_X [J/mol]	$3,98 \times 10^4$	0,56
k_{ox} [-]	$3,50297 \times 10^{15}$	0,32
E_{ox} [J/mol]	$1,11 \times 10^5$	1,30
k_T [-]	$2,16392 \times 10^{10}$	1,17
E_T [J/mol]	$7,22 \times 10^4$	3,01

Somit entstand ein parametrisiertes Modell, welches für Voraussagen des Oxidasesystemverhaltens als Funktion von Temperatur, Substrat-, TEMPO- und Enzymkonzentration geeignet war. Die Crossvalidierung erfolgte aus Zeitgründen ohne zusätzliche Experimente. Stattdessen wurde eine erneute Parameterschätzung mit einem unvollständigen Experimentensatz aus 20 Versuchen durchgeführt. Die Ergebnisse der Parameterschätzung lagen innerhalb der Standardabweichung in Tabelle 7.5, sodass sie auch die vier aus der Parameterschätzung ausgeschlossenen Experimente beschreiben konnte.

**Abbildung 7.10:** Modellvorhersage von TON nach 168 h als Funktion von TEMPO-Vorlage und Temperatur für die Enzymkonz. von 0,1 μ M und Substratkonzentration von 200 mM.

Eine beispielhafte Modellvorhersage des TON nach einer Woche in Abhängigkeit von Temperatur und TEMPO-Konzentration für definierte Substrat- und Enzymkonzentrationen

ist in Abbildung 7.10 präsentiert. Die Voraussage besitzt ein nur schwach von TEMPO-Konzentration abhängiges Temperaturoptimum zwischen 24 und 26°C. Im folgenden Kapitel wird die Voraussage mit den Ergebnissen von Langzeitexperimenten verglichen.

Die Charakterisierung des Oxidasesystems zeigte, dass das Softwarepaket *gPROMS* in der Lage ist Parameterschätzungen für Enzymprüfstand-relevante Systeme durchzuführen. Die Ergebnisse der Versuchsplanung unterschieden sich qualitativ nur unwesentlich von *VPLAN*-Versuchsplänen. Allerdings können diese Versuchspläne nicht als optimal angesehen werden, da sie noch vor der Modellreduktion entworfen und somit, streng genommen, für den falschen Parametersatz optimiert wurden. Um eine zuverlässige Aussage über die Vergleichbarkeit der Softwarepakete *VPLAN* / *PARFIT* und *gPROMS* bei der Charakterisierung von Stoffsystemen gemäß dem Schema in Abbildung 6.1 zu treffen, sollten ein oder mehrere Enzymdeaktivierungsmodelle implementiert werden. Diese sollten von beiden Softwarepaketen getrennt, ausgehend von gleichen Parameterstartwerten mit *in silico* Experimenten und anschließenden Parameterschätzungen charakterisiert werden. Nur dann ist eine tatsächliche Vergleichbarkeit gegeben. Die Charakterisierung eines *in silico* Systems hat dabei den Vorteil, dass der experimentelle Aufwand (gleich zu setzen mit Simulationen und anschließendem Verrauschen der Daten mit einem definierten Fehlermodell) minimal ist. Viel wichtiger ist jedoch, dass bei einem *in silico* System die Gewissheit besteht, dass die Enzymcharakterisierung mechanistisch von absolut korrekten Modellen ausgeht und der „richtige“ Parametersatz als Gütekriterium bekannt ist.

7.2.4 Validierung der Ergebnisse anhand der Langzeitversuche

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Langzeitexperimente (*Symbole* in Abbildung 7.11) mit den Modellvoraussagen (*Linien* in Abbildung 7.11) verglichen. Die Modellvoraussagen basieren auf Simulationen bei festgelegten Modellsubstratkonzentration $[Substrat] = 200 \text{ mM}$ und Enzymkonzentration $[E] = 0,125 \text{ }\mu\text{M}$. Der Vergleich erfolgt anhand der Prozesszeit von einer Woche. Als Vergleichsgröße dient der Gesamtsauerstoffverbrauch, welcher über die Stöchiometrie (vgl. Reaktionsschema aus Abbildung 7.6) mit Substratumsatz korreliert ist:

$$\begin{aligned} [Substratumsatz] + [Tempo^+] &= 4 \cdot [O_2] \\ [Substratumsatz] &\approx 4 \cdot [O_2] \end{aligned} \quad (7.1)$$

In Abbildung 7.11a ist der Sauerstoffverbrauch nach einer Woche für $[Tempo^+] = 24 \text{ mM}$, aus Langzeitexperimenten und als Modellvorhersage gegen die Temperatur aufgetragen. Bei diesen Bedingungen ist das Modell in der Lage das Temperaturoptimum sowie qualitative Temperaturabhängigkeit wiederzugeben.

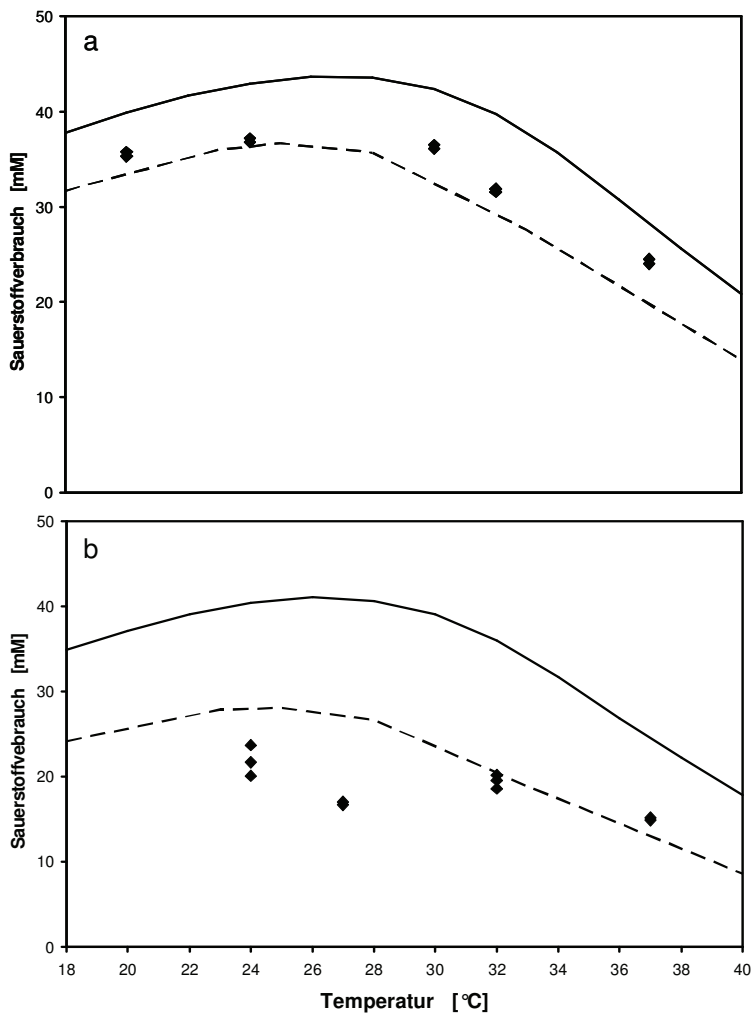


Abbildung 7.11: Sauerstoffverbrauch bei $[Modellsubstrat]=200 \text{ mM}$, $[Enzym]=0,125 \text{ }\mu\text{M}$, Modellvoraussage (durchgezogene Linie), Modellvoraussage für $K_{TEMPO}^*=25 \text{ mM}$ (gestrichelte Linie), Langzeitexperiment (Symbole) als Funktion der Temperatur. $[TEMPO]=24 \text{ mM}$ (a), $[TEMPO]=12 \text{ mM}$ (b).

Die quantitative Voraussage überschätzt den Sauerstoffverbrauch um ca. 15%. Abbildung 7.11b zeigt den Verlauf des temperaturabhängigen Sauerstoffverbrauchs für eine geringere Tempo-Konzentration $[Tempo] = 12 \text{ mM} \sim 2 \times K_{TEMPO}$ (vgl. Kap. 7.2.1). Der im Experiment gemessene Sauerstoffverbrauch ist in diesem Fall stark (ca. Faktor 2) gegenüber dem in

Abbildung 7.11a herabgesetzt. Die Modellvoraussage hingegen liegt nur ca. 10% unter der in Abbildung 7.11a. Offensichtlich ist das Modell nicht in der Lage das Systemverhalten bei niedrigen TEMPO-Konzentrationen zu beschreiben. Dieses Ergebnis korreliert mit den Schwierigkeiten bei der Anpassung von Experimenten bei niedriger TEMPO-Konzentration (vgl. Grenzen der Modellgültigkeit auf S. 132). Eine mögliche Erklärung ist die Unterschätzung des K_{TEMPO} -Wertes, der aus der Literatur übernommen und nicht als Modellparameter bestimmt wurde. Ein höherer K_{TEMPO} -Wert würde den stark herabgesetzten Sauerstoffverbrauch erklären. Dies wird in Abbildung 7.11a,b durch Simulationen mit einem stark erhöhten $K_{TEMPO}^* = 25$ mM bestätigt. Beide experimentellen Ergebnisse werden von der Voraussage wesentlich besser abgebildet³. An dieser Stelle sind weitere gezielte Untersuchungen des K_{TEMPO} -Wertes, eventuell als Funktion der Temperatur notwendig, falls niedrige TEMPO-Konzentrationen im Prozess von Interesse sind.

Bemerkung: In einer Reihe von Langzeitexperimenten (Ergebnis nicht dargestellt), bei erhöhten Enzymkonzentrationen ($>0,2 \mu\text{M}$) und / oder niedrigen Substratkonzentrationen ($<120 \text{ mM}$) wurde ein Sauerstoffverbrauch beobachtet, welcher den nach der Modellvorstellung möglichen überstieg:

$$[\text{Substrat}](t=0) + [\text{Tempo}](t=0) \leq 4 \cdot [\text{O}_2] \quad (7.2)$$

Dies kann ausschließlich dadurch erklärt werden, dass eine weitere Sauerstoff verbrauchende Reaktion stattfindet, welche nicht im Modell berücksichtigt ist. Nach dem Stoffsystem aus Abbildung 7.6 kann es sich dabei um die Oxidation des Produktes handeln. Diese Vorstellung entspricht der Beobachtung (vgl. Marjasvaara et al., 2004), dass die Produktoxidation erst nach vollständiger Substratoxidation stattfindet, welche bei niedrigen Substratkonzentrationen und hohen Enzymkonzentrationen schneller erreicht wird. Alternativ könnte der hohe Sauerstoffverbrauch als ein Hinweis auf die enzymatische Mediator-Regeneration gedeutet werden (Weg 2 in Abbildung 7.6), welche entgegen der Vorstellung in einem bestimmten (wahrscheinlich geringen) Maße parallel zur chemischen Mediatorrückgewinnung stattfindet.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Charakterisierung des Oxidasesystems zu einer Vorhersage des komplexen Systemverhaltens innerhalb der Modellgültigkeit führte. Dies ist

³ Die Simulationen mit erhöhtem $K_{TEMPO}^* = 25$ mM demonstrieren lediglich, dass die Annahme des falschen K_{TEMPO} -Wertes die schlechten Voraussagen bei niedrigen TEMPO-Konzentrationen erklären kann. Um den wahren K_{TEMPO} zu bestimmen, bedarf es einer erneuten modellbasierten Untersuchung gemäß Abbildung 6.1, welche K_{TEMPO} als Modellparameter berücksichtigt. Der Versuch K_{TEMPO} aus bestehenden Experimenten zu schätzen resultierte in fehlender Parametersignifikanz (Ergebnis nicht dargestellt).

bemerkenswert, da es sich beim Enzymprüfstand um eine Screeningtechnik handelt, welche sich einfacher Messmethoden bedient und sich somit nur bedingt für die Charakterisierung unverstandener biochemischer Systeme eignet. Offensichtlich ist aber auch bei solchen Fragestellungen die hochparallelisierbare Arbeit in MTP'n vom Vorteil, bei der viele experimentelle Bedingungen mit hoher Redundanz (Reproduzierbarkeitsmessungen in mehreren Wells) simultan getestet werden können. Beim vorliegenden System könnten die Grenzen der Modellgültigkeit durch die gezielte modellbasierte Untersuchung der temperaturabhängigen Michaelis-Menten-Kinetik erweitert werden. Die Vorlage von TEMPO^+ und TEMPO-OH in reiner Form könnte zum besseren Verständnis des Stoffsystems führen. Ebenso sinnvoll wäre die Erweiterung der Messmethode um die pH-Messung. Da der pH-Wert bei der Reaktion von $\text{TEMPO} \rightarrow \text{TEMPO}^+$ steigt und bei der Reaktion $\text{TEMPO}^+ \rightarrow \text{TEMPO-OH}$ regeneriert wird, würde der pH-Wert eine wichtige Information über die aktuelle Konzentration von TEMPO^+ liefern. Bisherige Versuche die pH-Messung gemäß Kap. 5.1.1 im Oxidasesystem zu etablieren blieben erfolglos, da das hochreaktive TEMPO^+ mit dem zurzeit eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff HPTS reagiert und innerhalb von Minuten die Fluoreszenz um Größenordnungen abschwächt (Ergebnis nicht dargestellt). Ferner versprechen die Ansätze der Modelldiskriminierung generell eine Verbesserung bei Unsicherheiten in der Modellierung.

7.3 Weitere Ergebnisse

7.3.1 Lösungsmittelscreening

Der Enzymprüfstand eignet sich nicht nur zum Enzym-, sondern auch zum Lösungsmittelscreening. Dies wird am Beispiel eines Pilotversuchs im Esterasesystem demonstriert. In Abbildung 7.12 ist für die mesophile Esterase die Produktbildung für das aufgeprägte Temperaturprofil einer Rampe (*Linie*) unter Verwendung verschiedener Lösungsmittel gezeigt. Die Lösungsmittel wurden in einer Konzentration von 10% vol. vorgelegt. Man beachte, dass auch in übrigen Experimenten des Esterasesystems 10% Ethanol vorgelegt wurden (vgl. Kap. 3.2.1). Die Verläufe der Produktbildung mit exponentiellem Anstieg bis ca. 40°C und Schmelzpunkt bei 50°C zeigen ein ähnliches Verhalten wie im Standard-Esterasesystem (Lösungsmittel Ethanol) in Kap. 6.2. Die Verläufe sind beinahe deckungsgleich und lassen keine Aussage über die Vor- bzw. Nachteile einzelner Lösungsmittel zu.

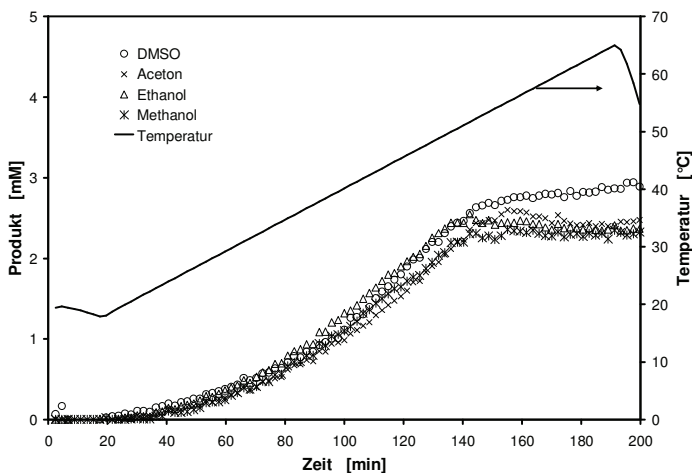


Abbildung 7.12: Produktbildung eines Pilotversuchs unter Verwendung versch. Lösungsmittel (10% vol., Symbole) im Esterasesystem für das aufgeprägte Temperaturprofil einer Rampe (Linie).

In Abbildung 7.13 sind die Verläufe zweier ausgewählten Lösungsmittel (Ethanol und DMSO) aus Abbildung 7.12 mit dem Versuch bei doppelter Experimentendauer, halbem Temperaturgradienten und halber Enzymkonzentration gegen den experimentellen Fortschritt aufgetragen und verglichen.

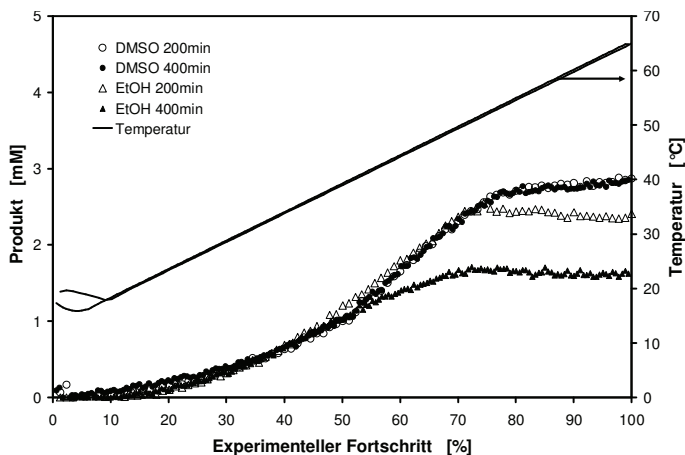


Abbildung 7.13: Produktbildung eines 200min-Versuchs (offene Symbole) und eines 400min-Zeitlupe-Versuchs (geschlossene Symbole) unter Verwendung der Lösungsmittel Ethanol (Dreiecke) und DMSO (Kreise) im Esterasesystem für das aufgeprägte Temperaturprofil einer Rampe (Linie).

Dieses *Zeitlupe*-Experiment wurde als wichtiger Teil der ersten intuitiven Experimente am Enzymprüfstand in Kap. 6.2 ausführlich erklärt. Die Verläufe mit Ethanol weisen ab ca. 40°C ein unterschiedliches Verhalten auf, welches auf die in der gewählten Zeitskala beobachtbare dynamische Deaktivierung hinweist. Die Verläufe mit DMSO sind dagegen im Rahmen der Messgenauigkeit deckungsgleich. Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass die mesophile Esterase in DMSO bei 40°C eine wesentlich längere Halbwertszeit als in Ethanol besitzt.

Die Messungen nach dem Vorbild der Langzeitexperimente aus Kap. 3.3.2 lieferten tatsächlich eine Halbwertszeit von ca. 39 h für DMSO und 7 h für Ethanol. Selbstverständlich muss die mesophile Esterase in DMSO einer kompletten Charakterisierung unterworfen werden, um zu bestätigen, dass DMSO für das gewählte Enzym auch im Temperaturoptimum (vgl. Kap. 7.1, Abbildung 7.2) zu höheren Umsätzen führt. Das präsentierte Ergebnis zeigt jedoch das Potential des Enzymprüfstandes hinsichtlich des Lösungsmittelscreenings und seine Voraussagekraft bereits anhand qualitativer Verläufe aus intuitiven Experimenten.

7.3.2 Mehrstufige Reaktionen

Häufig sind Stoffsysteme vom Interesse, welche in mehreren Stufen erfolgen (z. B. das Oxidasesystem) oder von mehreren Enzymen katalysiert werden. Darüber hinaus funktionieren einige optische Assays (z. B. aus Schmidt and Bornscheuer, 2005), indem das Produkt einer Reaktion in einer nachgeschalteten ebenfalls enzymatisch katalysierten Reaktion zum erfassbaren optischen Effekt führt. Die Untersuchung solcher Stoffsysteme am Enzymprüfstand ist schwierig, da die Deaktivierung eines Enzyms dazu führt, dass das andere Enzym nicht untersucht werden kann. Dies soll am Beispiel des Oxidase-Katalase-Stoffsystems verdeutlicht werden, das in Kap. 3.2.3, S. 40 beschrieben ist. Das Oxidase-Katalase-Stoffsystem (Abbildung 7.14) verbraucht in der ersten Stufe ein Sauerstoffmolekül. Dabei entsteht Wasserstoffperoxid, welches deaktivierend auf das Enzym wirkt. In der zweiten von Katalase katalysierten Reaktionsstufe wird das Wasserstoffperoxid unter Bildung eines halben Sauerstoffmoleküls entfernt.

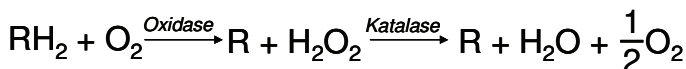


Abbildung 7.14: Reaktionsschema des Oxidase-Katalase-Systems.

In Abbildung 7.15 ist der $p\text{O}_2$ -Verlauf in einem Versuch bei Raumtemperatur bei unterschiedlichen Oxidase- und Substratkonzentrationen präsentiert. In einem der Wells (*kurz*

gestrichelte Linie) wurde Katalase im 20-fachen Überschuss bezogen auf Oxidase vorgelegt, um die potentiell deaktivierende Wirkung des Wasserstoffperoxids aufzuheben. In den restlichen Wells fand nur die erste Stufe der Reaktion statt. Bei hohen Oxidasekonzentrationen von 12 U/mL (*lang gestrichelte und punkt-gestrichelte Linien*) lag das Fließgleichgewicht bei $pO_2 \sim 5\text{--}10\%$. Der schnelle Anstieg des pO_2 auf 100% nach ca. 60 min weist drauf hin, dass das Substrat bei der Vorlage von 50 mM verbraucht ist (*punkt-gestrichelte Linie*). Bei der Substratkonzentration von 250 mM hingegen wird über die gesamte Experimentendauer von ca. 100 min ein pO_2 von ca. 5% beobachtet, in dieser Zeit findet also keine erkennbare Enzymdeaktivierung durch das sich bildende Wasserstoffperoxid statt.

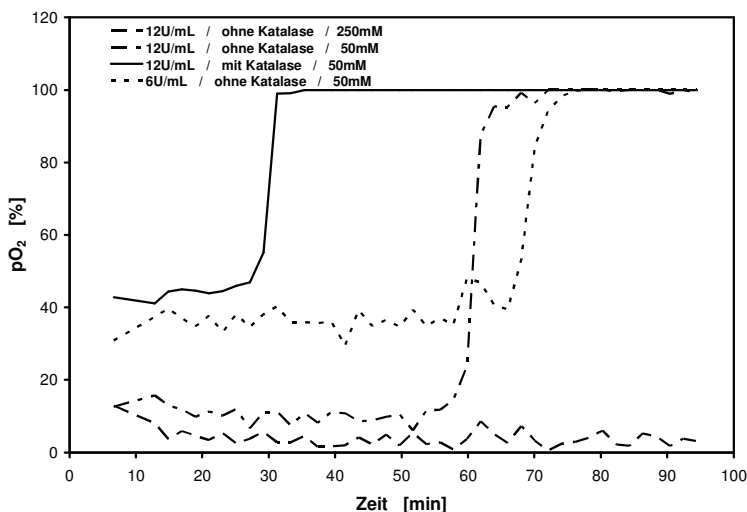


Abbildung 7.15: pO_2 einer HOX-katalysierten Reaktion bei unterschiedlichen Substrat- und Enzymkonzentrationen, $pH=7$, $n=800$ rpm, Raumtemperatur. Katalase im 20-fachen Überschuss, falls vorhanden.

Die hohe Stabilität der eingesetzten Oxidase gegen die deaktivierende Wirkung des Wasserstoffperoxids ist aus der Literatur bekannt (Groen et al., 1997). Bei der halben Enzymkonzentration von 6 U/mL (*kurz gestrichelte Linie*) liegt der pO_2 bis zum Substratverbrauch nach 70 min bei ca. 40%. Alle HOX-Reaktionen laufen grundsätzlich sauerstofflimitiert, da HOX einen K_{O_2} -Wert von 0,3 mM besitzt und die Sauerstofflöslichkeit bei Raumtemperatur lediglich $L_{O_2} \sim 0,27$ mM beträgt. Somit ist die Reaktionsgeschwindigkeit im hohen Maße pO_2 -abhängig. Infolgedessen wurde die Substratkonzentration von 50 mM

nur in unwesentlich längerer Zeit bei 6 U/mL (*kurz gestrichelte Linie*) als bei 12 U/mL (*punkt-gestrichelte Linie*) abgebaut. Der pO_2 der Reaktion mit 12 U/mL HOX und Katalase (*durchgezogene Linie*) zeigt bis zum Substratverbrauch nach ca. 30 min $pO_2 = 40\%$, welcher dem ohne Katalase bei 6 U/mL gleicht. Dieses Verhalten entspricht dem Reaktionsschema in Abbildung 7.14, da pro zwei durch Oxidase umgesetzte Sauerstoffmoleküle eins durch die Katalase produziert wird.

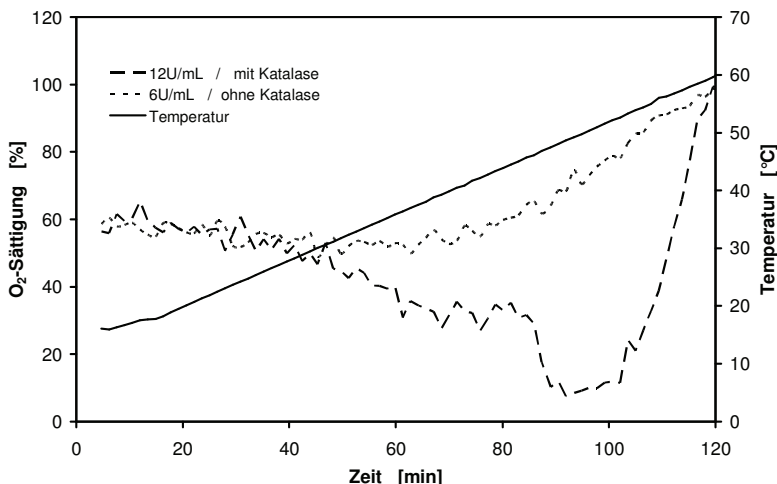


Abbildung 7.16: pO_2 einer HOX-katalysierten Reaktion für das aufgeprägte Temperaturprofil einer Rampe, $n = 800$ rpm, [Substrat] = 200 mM, pH7. Katalase im 20-fachen Überschuss, falls vorhanden.

In Abbildung 7.16 sind die pO_2 -Verläufe bei einer Enzymkonzentration von 12 U/mL mit Katalase (*lang gestrichelte Linie*) und 6 U/mL ohne Katalase (*kurz gestrichelte Linie*) für das aufgeprägte Temperaturprofil einer Rampe (*durchgezogene Linie*) präsentiert. In den ersten 40 min sind die Verläufe unter beiden Bedingungen erwartungsgemäß deckungsgleich. Der Verlauf der Kurve mit Katalase weist anschließend auf eine Enzymaktivierung mit steigender Temperatur zwischen 30°C und 50°C (40 – 100 min) hin, welche durch den pO_2 -Abfall gekennzeichnet ist. Der Verlauf der Kurve ohne Katalase zeigt hingegen keine Aktivierung. Eine Deaktivierung des Enzyms in Abwesenheit von Katalase durch Wasserstoffperoxid würde dieses Verhalten erklären. Es widerspricht jedoch der in Abbildung 7.15 beobachteten ausgeprägten Stabilität von HOX gegenüber Wasserstoffperoxid. Wahrscheinlicher ist, dass der pO_2 -Abfall in Gegenwart von Katalase nicht auf die vermeintliche Enzymaktivierung, sondern auf die Deaktivierung der Katalase zurückzuführen ist. Diese Deaktivierung führt dazu, dass die Katalase keine sauerstoffbildende Reaktion nach Abbildung 7.14 katalysiert

und der pO_2 bei gleich bleibender oder gar abnehmender Oxidaseaktivität fällt. Dieses Beispiel demonstriert die Schwierigkeit bei der Charakterisierung von Systemen, welche mehrere Enzyme enthalten. Gleichzeitig wird deutlich, dass die vermeintliche Unterbestimmtheit des Systems (zwei Reaktionen, eine Messgröße) durch die unterschiedliche Konzentrationsverteilung in verschiedenen Wells umgangen werden kann.

7.4 Fallstudie

Abschließend soll anhand einer Fallstudie die Zeitersparnis beim Screening am Enzymprüfstand im Vergleich zum Erlangen gleichwertiger Information in Langzeitexperimenten abgeschätzt werden. Die Fallstudie greift dabei auf Erfahrungswerte aus verschiedenen Teilen dieser Arbeit zurück und kann somit als Beispiel für ihre jeweilige Bedeutung bei der Enzymcharakterisierung dienen.

Als Aufgabe wird die Selektion eines Kandidaten aus einer Bibliothek und die Wahl der Prozesstemperatur definiert, welche zum maximalen TON führen. Das Ablaufschema der Enzymcharakterisierung am Enzymprüfstand ist in Abbildung 7.17a dargestellt.

Unter der Annahme, dass jeder Kandidat in drei Wells vermessen wird, um die Redundanz der Messergebnisse zu erhöhen, können 30 Kandidaten pro MTP getestet werden. Nach der ersten Iterationsschleife aus drei Experimenten mit einer Gesamtdauer von 10 h und anschließender Parameterschätzung (vgl. Kap. 6) wird erwartet, dass die meisten Kandidaten aussortiert werden können und nur drei Kandidaten zur weiteren Charakterisierung ausgewählt werden. Da die ausgewählten Kandidaten jeweils ein unterschiedliches Verhalten aufweisen, ist für jeden Kandidaten ein eigener Versuchsplan und somit ein eigenes Temperaturprofil erforderlich. Jeder Kandidat wird also separat charakterisiert. In Zukunft könnte durch die robuste Versuchsplanung die simultane Charakterisierung mehrerer Kandidaten ermöglicht werden, vgl. Kap. 6.5.3. Auf dem jetzigen Stand der Entwicklung wird die Wellenzahl der MTP dazu genutzt, redundante Messungen durchzuführen, welche die Messgenauigkeit erhöhen. Des Weiteren wird der Einfluss verschiedener Lösungsmittel (vgl. Kap. 7.3.1), der Additive, des pH-Wertes (vgl. Kap. 5.2.2, Abbildung 5.7) sowie Substrats und Produktes (vgl. Kap. 5.2.2, Abbildung 5.6) auf das Enzymverhalten untersucht. Nach drei Iterationsschleifen aus Versuchsplanung, Experiment und Parameterschätzung für jeden der drei Kandidaten nach dem Schema aus Abbildung 6.1 steht TON als Funktion der Prozesszeit und der Temperatur zur Verfügung. Der experimentelle Aufwand wird dabei zu $3 \text{ Enzyme} \times 3 \text{ Iterationsschleifen} \times 5 \text{ h} = 45 \text{ h}$ auf der Grundlage der Erfahrungswerte aus bisherigen Projekten abgeschätzt.

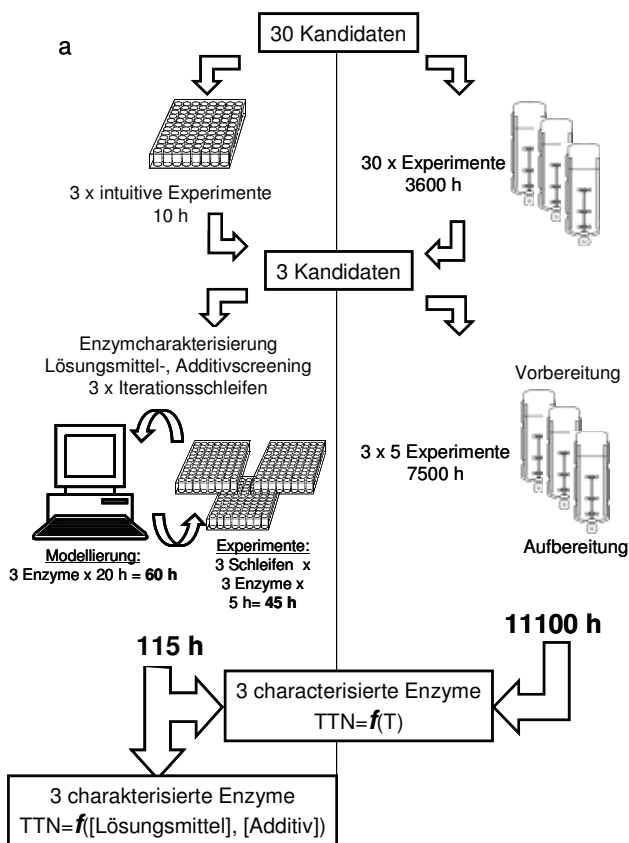


Abbildung 7.17: Ablaufschema und geschätzter Zeitaufwand beim Enzymscreening am Enzymprüfstand (a) im Vergleich zum Erlangen vergleichbarer Information im 1L-Maßstab in Langzeitexperimenten (b).

Zu dem experimentellen Aufwand kommt dabei der modellier-technische Aufwand (Versuchsplanung, Parameterschätzung, Ergebnisanalyse) mit einem Erfahrungswert von ca. 20 h pro Enzym hinzu. Da die Arbeit mit MTP'n weitgehend automatisiert ist und die Platten selbst Einwegartikel sind, kann der Aufwand der Vor- und Aufbereitung von Experimenten vernachlässigt werden. Der Gesamtzeitaufwand beläuft sich somit auf 10 h + 45 h + 60 h = 115 h. Des Weiteren lassen sich die automatisierten Experimente nachts, außerhalb der üblichen Arbeitszeiten verwirklichen, sodass die analytische Arbeit tagsüber und experimentelle Arbeit nachts zu einer schnellen Prozedur verschachtelbar sind. Mit einer solchen Verschachtelung lässt sich die Bruttozeit des Screenings optimieren.

Vergleichend wird abgeschätzt, mit welchem Aufwand ein vergleichbarer Informationsgehalt im gerührten 1L-Reaktor erlangt werden kann (Abbildung 7.17b). Unter Berücksichtigung teils deutlicher Unterschiede in Reproduzierbarkeitsexperimenten im 1L-Reaktor (vgl. Abbildung 7.2) werden auch hier drei Reproduzierbarkeitsexperimente pro Kandidat angenommen. Ferner sei angenommen, dass dem Labor drei Reaktoren zur simultanen Nutzung zur Verfügung stehen, sodass Reproduzierbarkeitsmessungen gleichzeitig durchgeführt werden können. Experimente werden zunächst bei einer moderaten Temperatur durchgeführt (z. B. $< 35^{\circ}\text{C}$ für mesophile Enzyme), um die Aussortierung vielversprechender Kandidaten auf Grund fehlender Thermostabilität zu vermeiden (vgl. TON der mesophilen Esterase in Abbildung 7.2). An diese Stelle ist das Fehlerpotential groß, da Enzyme häufig ein enges Temperaturoptimum aufweisen, sodass vielversprechende Kandidaten durch Tests bei unglücklich gewählter Temperatur mit hoher Wahrscheinlichkeit aussortiert werden. Vermutlich können nach den ersten 100 h bei den meisten Enzymen die ersten Hinweise auf die Deaktivierung festgestellt und drei Kandidaten für weitere Untersuchungen gewählt werden. Unter Berücksichtigung der Vor- und Aufbereitung (Vorlage von Edukten, Einstellung des Fließgleichgewichts, Säubern des Reaktors, Entsorgung von Produkten) wird ein Zeitaufwand von 120 h pro Enzym angenommen, was in $120\text{ h} \times 3\text{ Enzyme} \times 3\text{ Reproduzierbarkeitsmessungen} / 3\text{ Reaktoren} = 3600\text{ h}$ resultiert. Anschließend werden die drei ausgewählten Kandidaten bei jeweils fünf Temperaturen getestet, um einen Trend des TON als Funktion der Zeit zu erhalten und die Lage des Maximums nach Vorbild der Abbildung 7.2 abzuschätzen. Die Versuchsdauer dieser stabilen Kandidaten wird mit $\sim 500\text{ h}$ im Schnitt inkl. Vor- und Aufbereitung abgeschätzt. Dabei werden wesentlich längere Experimente bei niedrigen Temperaturen aber auch wesentlich kürzere Experimente bei hohen Temperaturen angenommen. Hier beläuft sich der Zeitaufwand auf $500\text{ h} \times 5\text{ Temperaturen} \times 3\text{ Enzyme} \times 3\text{ Wiederholungsexperimente} / 3\text{ Reaktoren}$, also 7500 h. Der Gesamtaufwand für beide Schritte des Screenings beträgt $3600\text{ h} + 7500\text{ h} = 11100\text{ h}$.

Zwischen den beiden Verfahren, der Charakterisierung am Enzymprüfstand (115 h) und den Langzeitexperimenten (11100 h) liegt ein Faktor 95, welcher die Zeitersparnis am Enzymprüfstand beeindruckend illustriert. Noch wichtiger als diese Zahl ist die Tatsache, dass 115 h, welche teils auf Nachtversuche verschoben werden, innerhalb von ca. zwei Wochen von einem Analytiker und einer Laborkraft abgearbeitet werden können, was durchaus vertretbar ist. 11100 h, hingegen, würden bei 24 h am Tag laufenden Reaktoren über ein Jahr dauern und sehr hohe Personal- und Materialkosten verursachen. Dieses Vorgehen ist

also völlig unpraktikabel und kann nicht als Alternative zum Enzymprüfstand angesehen werden.

Aus der vorgelegten Fallstudie lassen sich weitere Schlussfolgerungen ableiten. Zunächst ist es wichtig hervorzuheben, dass die Zeitersparnis auf beiden Stufen des Screenings erfolgt. Sowohl im Vorscreening (Selektion von drei Enzymen aus 30 Kandidaten in Abbildung 7.17) als auch in der darauf folgenden Enzymcharakterisierung (TON-Voraussage für drei gewählte Kandidaten) liegt der Zeitaufwand am Enzymprüfstand mindestens um den Faktor 50 unter dem der Langzeitversuche. Des Weiteren liefern die Experimente zum Einfluss der Lösungsmittel, Additive, pH-Wertes, Produkte und Edukte bei der Enzymcharakterisierung einen Mehrwert für die Prozessentwicklung, welcher sich nicht in Zahlen ausdrücken lässt, jedoch ganz entscheidend sein kann. Schließlich sind die Ergebnisse des Enzymprüfstandes innerhalb der Modellgültigkeit extrapolierbar: Das parametrisierte Modell erlaubt die Berechnung unterschiedlichster Prozessgrößen. Wenn sich also bei der Prozessentwicklung herausstellt, dass der Prozess bei wechselnden Temperaturen gefahren werden sollte, lässt sich die entsprechende Prozessführung anhand der Modellparameter simulieren und optimieren. Ergebnisse der Langzeitversuche hingegen sind nicht extrapolierbar.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine neuartige Apparatur „Enzymprüfstand“ entwickelt, welche die modellbasierte Charakterisierung von enzymatisch katalysierten Reaktionssystemen mit hohem Durchsatz ermöglicht. Somit lassen sich erstmals neben der bisher etablierten Enzymanfangsaktivität auch komplexere Prozesseigenschaften wie die Langzeitstabilität als Kriterium für die Enzymwahl in das Screening mit einbeziehen.

Die Technik basiert auf der mathematischen Modellierung des Enzymverhaltens. Unterschiedliche Vorgänge, wie der Wechsel zwischen Faltungszuständen, die Enzymaktivierung und -deaktivierung werden als temperaturabhängige Reaktionen abgebildet. Dabei wird die unterschiedliche Geschwindigkeit der einzelnen Vorgänge berücksichtigt. So ist z.B. der Wechsel zwischen den Faltungszuständen so schnell, dass er im Rahmen des Messintervalls als temperaturabhängiges Gleichgewicht angesehen und als algebraische Gleichung modelliert wird. Die irreversiblen Deaktivierungseffekte können hingegen so langsam sein, dass sie erst auf der Zeitskala von Wochen oder Monaten sichtbar werden. Solche Effekte gilt es durch gezielte Temperaturführung in kurzen Experimenten zu beschleunigen und zu erfassen.

Die modellbasierte Enzymcharakterisierung sieht die Temperatur als wichtigste Steuergröße in den Experimenten vor. Über die Systemantwort auf unterschiedliche Temperaturprofile wird das Modell des Enzymverhaltens identifiziert. Als Systemantwort dienen optische Signale, welche im direkten Zusammenhang mit der Produktbildung der enzymkatalysierten Reaktion stehen. In einem iterativen Vorgang werden Temperaturprofile entworfen, Experimente durchgeführt und Modellparameter geschätzt. Wird ein Modell identifiziert, welches in der Lage ist, das experimentelle Verhalten durch signifikante Parameter zu beschreiben und vorauszusagen, gilt das Stoffsystem als charakterisiert. Im Rahmen der Modellgültigkeit werden die Zielgrößen der Prozessentwicklung, wie z.B. die zeit- und temperaturabhängige Raum-Zeit-Ausbeute simuliert und optimiert. Somit besteht erstmals eine Methode, welche solche prozessrelevanten Größen als Screeningkriterien berücksichtigt.

Apparativ ist der Enzymprüfstand in der Lage auf der Plattform einer 96-Well-Mikrotiterplatte die Steuergröße Temperatur zwischen 5 und 85°C mit einer Geschwindigkeit von $\pm 1^\circ\text{C}/\text{min}$ mit einer Homogenität von $\pm 0,5^\circ\text{C}$ zu regeln. Durch den Schüttelvorgang wird eine definierte Durchmischung erreicht. Bei sauerstoffverbrauchenden Reaktionen

besteht die Möglichkeit einer definierten Begasung. Die Reaktionsüberwachung erfolgt online, nicht invasiv und ohne Unterbrechung des Schüttel- und des Temperiertvorganges. Die fluoreszenzbasierte Messtechnik ermöglicht eine flexible Verstellung der Anregungs- und Emissionswellenlängen im Bereich zwischen 200 und 750 nm während der Messung, sodass Intensitätswerte bei unterschiedlichen Wellenlängen oder auch Fluoreszenzspektren aufgenommen werden können. Die Versuchsführung erfolgt automatisiert. Die Charakterisierung des temperaturabhängigen Sauerstoffeintrages ist noch zu präzisieren.

Im Rahmen der Arbeit wurden zwei Assays etabliert, welche bei sich ändernden Temperaturen für die Reaktionsdauer von bis zu ca. 10 h funktionieren. Ein Assay ist für jede pH-aktive Reaktion anwendbar. Er wurde am Beispiel einer Esterhydrolysereaktion etabliert. Der zweite Assay eignet sich für die Überwachung einer jeden sauerstoffverbrauchenden Reaktion. Er wurde an einem Laccase-Mediator-System und an einer Glucose-Oxidationsreaktion etabliert. Eine weitere vielversprechende optische Methode, die unterstützende Messung der Trp-Eigenfluoreszenz von Enzymen, wurde erfolgreich getestet und mit den Messungen der Reaktionsgeschwindigkeit korreliert. Ansätze für die Entwicklung weiterer universeller Assays wurden diskutiert.

Das pH-aktive System und das sauerstoffverbrauchende System wurden beispielhaft am Enzymprüfstand charakterisiert. Für die Charakterisierung wurden jeweils drei Versuchspläne mit drei Temperaturprofilen entworfen und ausgeführt. Die mittlere Dauer eines Experiments betrug ca. 4 h. Das Arbeitsvolumen pro MTP-Well betrug 200 μ L. Die zeitliche und räumliche Extrapolierbarkeit der Modellvoraussage wurde für beide Systeme anhand von Langzeitmessungen des gebildeten Produktes (TON) nach einer Woche im 1000 mL bzw. 100 mL Arbeitsvolumen geprüft.

Für das biochemisch gut verstandene pH-aktive System konnte das Temperaturverhalten beider untersuchter Enzyme vorausgesagt werden. Überraschenderweise besaß der als thermophil geltende Kandidat in seinem Temperaturoptimum eine geringere Stabilität und eine kleinere TON als der mesophile Kandidat. Damit wurde deutlich gezeigt, dass das komplexe temperaturabhängige Langzeitverhalten nur über das mechanistische Verständnis des Systems und keineswegs allein anhand kurzer Messungen unter extremen Bedingungen vorausgesagt werden kann.

Für das biochemisch nicht vollständig verstandene, mehrstufige, sauerstoffverbrauchende Reaktionssystem konnte das Enzymverhalten als Funktion der Temperatur und der Konzentration der Reaktanden im Rahmen der Modellgültigkeit vorausgesagt werden. Für die

vollständige Charakterisierung muss das Modell jedoch erweitert und weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Die hohe Parallelisierbarkeit der Experimente unter Variation von Konzentrationen verschiedener Reaktanden erwies sich als leistungsstarkes Werkzeug bei der Aufklärung biochemischer Mechanismen in einer MTP. Durch die Synthese der Reaktionszwischenprodukte in Reinform und die Untersuchung ihres Einflusses auf das System könnte die Charakterisierung ergänzt werden.

Die Vorteile des Enzymprüfstandes im Vergleich zur Erlangung der gleichwertigen Information aus Langzeitexperimenten wurden in einer Fallstudie illustriert. Anhand der bisherigen Erfahrung wurde die Zeit zur Wahl und Charakterisierung von 3 Kandidaten aus 30 auf 115 h inkl. analytischer Zeit abgeschätzt. Berücksichtigt man, dass analytische Schritte und automatisierte Experimente im Tag / Nacht Rhythmus verschachtelt werden können, ergibt sich eine im Rahmen der Prozessentwicklung vertretbare Zeit von 1-2 Wochen. Die Wahl der 30 Kandidaten aus Tausenden von Kandidaten enthaltenden Proteinbibliotheken für den Enzymprüfstand sollte allerdings im Primärscreening erfolgen, bei welchem in schnellen Tests geprüft wird, ob die Kandidaten überhaupt eine Aktivität zeigen. Des Weiteren sollten die am Enzymprüfstand untersuchten und ausgewählten Kandidaten im Rahmen der Prozessentwicklung noch ausgiebiger charakterisiert werden, als es am Enzymprüfstand möglich ist. So sind einige Deaktivierungsmechanismen bekannt, welche sich durch Temperatur nicht beschleunigen lassen, wie z. B. die mechanische Belastung oder die Deaktivierung an der Gas-Flüssig-Grenzfläche. Deren Einfluss könnte für ausgesuchte Enzyme während der Prozessentwicklung untersucht werden. Eventuell könnten auch diese Effekte in Laborreaktoren gezielt durch die Variation des Leistungseintrages oder der Begasungsrate beschleunigt und untersucht werden. In diesem Zusammenhang müssten die Enzymdeaktivierungsmodelle entsprechend erweitert werden. Dann würde die gesamte Prozessentwicklung aus folgenden Arbeitsabschnitten bestehen:

- Vorauswahl der in Frage kommenden Kandidaten im Primärscreening (Hunderte).
- Auswahl und Charakterisierung einiger Kandidaten am Enzymprüfstand (Dutzende).
- Schnelle, modellbasierte Endcharakterisierung im Laborformat (1-3 Kandidaten).
- Abschließende Tests im Pilotformat (gewählter Kandidat).

Auf dem jetzigen Stand der Entwicklung sind bereits die technischen Voraussetzungen für den Nachbau des Enzymprüfstandes als kommerzielles Stand-Alone-Gerät gegeben. Allerdings besitzt die Prozedur der Enzymcharakterisierung bisher noch zu viele Anteile an „Expertenwissen“, um von einem nicht speziell ausgebildeten Benutzer effizient eingesetzt zu

werden. Vor allem bei der statistischen Analyse der Ergebnisse und der Aufstellung der experimentellen Einschränkungen wurden in bisherigen Projekten häufig Schritte, wie die Modellreduktion oder Modellanpassung eingesetzt, welche sich nicht algorithmisch beschreiben und somit auch nicht automatisieren lassen. In diesem Zusammenhang werden Ansätze der Modelldiskriminierung, der automatischen Modellreduktion sowie der robusten Versuchsplanung verfolgt. Diese Maßnahmen würden zur Universalität und Automatisierbarkeit beitragen und somit eine Voraussetzung für den breiten, industriellen Einsatz der Technik schaffen.

Literaturverzeichnis

- Altomare R.E., Greenfield P.F., Kittrell J.R., 1974. Inactivation of immobilized fungal catalase by hydrogen peroxide. *Biotech and Bioeng.* 16: 1675-1680.
- Anderlei T., 2002. Entwicklung einer Messanlage zur Online-Bestimmung der Atmungsaktivität von mikrobiellen Kulturen in geschüttelten Bioreaktoren. Dissertation an der RWTH Aachen.
- Anderlei T., Büchs J., 2001. Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochem Eng J.* 7: 157-162.
- Anderson E.Z., Bai C., Bischof S., Blackford J., Demmel J., Dongarra J., Du Croz A., Greenbaum S., Hammarling A., McKenney D., 2003. gPROMS Advanced User Guide. Process Systems Enterprise Ltd.
- Arends I., Li Y.X., Sheldon R.A., 2006. Stabilities and rates in the laccase/TEMPO-catalyzed oxidation of alcohols. *Biocatalysis and Biotransformation.* 24: 443-448.
- Aucamp J.P., Cosme A.M., Lye G.J., Dalby P.A., 2005. High-throughput measurement of protein stability in microtiter plates. *Biotechnol Bioeng.* 89:599-607.
- Azevedo A.M., Fonseca L.P., Prazeres DMF. 1999. Stability and stabilization of penicillin acylase. *J ChemTechn Biotechnol.* 74:1110-1116.
- Baldrian P., 2006. Fungal laccases - occurrence and properties. *Fems Microbiology Reviews* 30: 215-242.
- Baptista R.P., Chen L.Y., Paixão A., Cabral J.M.S. and Melo E.P., 2003. A novel pathway to enzyme deactivation: The cutinase model. *Biotechnol Bioeng.* 82:851-857.
- Bauer I., Bock H.G., Körkel S., Schlöder J.P., 1999 Numerical Methods for Initial Value Problems and Derivative Generation for DAE Models with Application to Optimum Experimental Design of Chemical Processes. In Keil F, Mackens W, Voss H, Werther J, Scientific Computing in Chemical Engineering II, Volume 2, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

- Bertrand T., Jolivald C., Briozzo P., Caminade E., Joly N., Madzak Z., Mougin C., 2002. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: Insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry*, 41: 7325-7333.
- Bethge M., 2002. Schnelle homogene Temperierung von Mikrotiterplatten zur photometrischen Messung von Analysengut. Dissertation an der TU Ilmenau.
- Betts J.I., Bagnanz F., 2006. Miniature bioreactors: current practices and future opportunities. *Microbial Cell Factories*, 5-21.
- Benyon R., Easterby J., 2003. Buffer Solutions. London: Taylor and Francis.
- Bliefert C., 1978. pH-Wert-Berechnungen. Weinheim: Verl. Chemie.
- Blobel V., Lohrmann E., 1998. Statistische und numerische Methoden der Datenanalyse. BG Teubner. Stuttgart: 137.
- Bobbitt J., 2005. Preparation of 4-Acetylamino-2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-1-oxoammonium Tetrafluoroborate, and the oxidation of geraniol to geranial. *Organic Synthesis*, 82: 80.
- Bock H.G., 1981. Numerical treatment of inverse problems in chemical reaction kinetics in Ebert KH, Deufhard P, Jäger W. Modelling of Chemical Reaction Systems, Springer Series in Chemical Physics vol. 18, 102- 125, Springer Verlag: Heidelberg.
- Bock H.G., 1987. Randwertproblemmethoden zur Parameteridentifizierung in Systemen nichtlinearer Differentialgleichungen. Bonner Mathematische Schriften, vol. 183, Bonn.
- Bock H.G., Körkel S., Kostina E., Schlöder J.P., 2004. Methods for Design of Optimal Experiments with Application to Parameter Estimation in Enzyme Catalytic Processes. In M. G. Hicks and C. Kettner, Experimental Standard Conditions of Enzyme Characterization, Logos Verlag Berlin, 45-70.
- Bornscheuer U.T., Pohl M., 2001. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr Opin Biotechnol*. 5:137-143.
- Burton S.G., 2003. Laccases and Phenol Oxidases in Organic Synthesis - a Review. *Curr Orga Chem*. 7: 1317-1331.
- Büttgenbach S., Michalzik M., Wilke R., 2006. New Approaches to Online Bioprocess Monitoring.
- Boy M., Bohm D., Voss H., 2001. A new method for rapid determination of biocatalyst process stability. *Biocat Biotrans* 19:413-425.

- Boy M., Dominik A., Voss H., 1999. Fast determination of biocatalyst process stability. *Process Biochem* 34:535-547.
- Call H.P., Mucke I., 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym(R)-process). *Journal of Biotechnology*. 53: 163-202.
- Cesana, 2004. Technischer Mitarbeiter der Fa. Kühner. Persönliche Mitteilung.
- Cherkasov A.S., 1960. Influence of The Solvent on The Fluorescence Spectra of Acetylanthracenes, *Akad. Nauk. SSSR Bull. Phys. Sci.* 24:597-601.
- Collins T., Meuvis M.A., Gerday C., Feller G., Activity, Stability and Flexibility in Glycosidases Adapted to Extreme Thermal Environments. *J. Molecul Biol.* 328: 419-428.
- Caussette M., Gaunand A., Planche H., Colombié S., Monsan P., Lindet B., 1999. Lysozyme inactivation by inert gas bubbling: kinetics in a bubble column reactor. *EnzMicrobial Technol* 24: 412-418.
- Colombie S., Gaunand A., Rinaudo M., Lindet B., 2000. Irreversible lysozyme inactivation and aggregation induced by stirring: kinetic study and aggregation characterisation. *Biotechnol Letters* 22: 277-283.
- Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems
- D'Acunzo F., Galli C., Masci B., 2002. Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems. Solubility and steric issues. *Eur. J. Biochem.* 269: 5330-5335.
- Dragutan I., Mehlhorn R.J., 2007. Modulation of oxidative damage by nitroxide free radicals. *Free Radical Research.* 41: 303-315.
- Duetz W.A., Rüedi L., Hermann R., Minas W., O'Connor K., Büchs J., Witholt B., 2000. Methods for Intense Aeration, Growth, Storage and Replication of Bacterial Strains in Microtiter Plates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:2641-2646.
- Fernandes P., Cabral J.M.S., 2006. Microlitre/millilitre shaken bioreactors in fermentative and biotransformation processes- a review. *Biocatalysis and Biotransformation*, 24: 237-252.
- Gibbs P.R., Uehara C.S., Neunert U., Bommarius A.S., 2005. Accelerated biocatalyst stability testing for process optimization. *Biotechnol Progress* 21:762-774.

- Griffith H., 1986. Fourier Transform Infrared Spectroscopy, New York: John Wiley & Sons.
- Grosser D., 1985. Pflanzliche und tierische Bau- und Werkholzschildlinge, DRW-Verlag.
- Groen B.W., De Vries S., Duine J.A., 1997. Characterization of Hexose oxidase from the red seaweed *Chondrus crispus*. Eur. J. Biochem. 244: 858-861.
- Hager A., 2003. Zum Effekt von Laccasen beim Altpapier-Deinking. Dissertation an der Universität Hamburg.
- Harned H.S., Owen G.B., 1958. The Physical Chemistry of Electrolytic Solutions. New York: Reinhold Publishing Cooperation.
- Hei D.J., Clark D.S., 1993. Estimation of melting curves from enzymic activity-temperature profiles. Biotechnol Bioeng. 42:1245-51.
- Henke E., Bornscheuer U.T., 2002. Esterases from *Bacillus subtilis* and *B. stearothermophilus* share high sequence homology but differ substantially in their properties. Appl Microbiol Biotec. 60:320-6.
- Henke E., Pleiss J., Bornscheuer U., 2002. Activity of lipases and esterases towards tertiary alcohols: insights into structure-function relationships. Ang Chem, International Edition. 41: 3211-3213.
- Hermann R., 2001. Entwicklung und Anwendung optischer Methoden zur Charakterisierung von Kleinkulturbioreaktoren. Dissertation an der RWTH Aachen.
- Hermann R., Walther N., Maier U., Büchs J. 2001., Optical Method for the Determination of the Oxygen-Transfer Capacity of Small Bioreactors based on Sulfite Oxidation Biotech. Bioeng. 74: 355-363.
- Hermann R., Lehmann M., Büchs J., 2003. Characterization of Gas-Liquid Mass Transfer Phenomena in Microtiter Plates Biotechnology and Bioengineering 81: 177-186.
- Hiroyuki K., 1995. Temperature Regulator for Microplate. JP 72 60 648.
- Hoffmann C., 2007. Persönliche Mitteilung. Arbeitsgespräche zum Oxidase-System. Ludwigshafen.
- Horn A., Schilling K., Müller-Hipper R., Sammler G., 1992: Temperierbare Multiküvette: DE 217868
- Hunter W.G., Reiner A.M., 1965. Methods for discrimination between two rival models. Technometrics. 7: 307-323.

- Jaeger K.E., 2004. Protein technologies and commercial enzymes. *Curr Opin Biotechnol.* 15:269-271.
- Jaeger K.E., Eggert T., 2004. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Curr Opin Biotechnol.* 15:305-313.
- Jeude M., 2007. Entwicklung und Anwendung einer Fed-batch-Betriebsweise mit Nährstofffreisetzungssystemen zur kontrollierten Kultivierung und zum Screening von Mikroorganismen in Schüttelreaktoren. Dissertation, RWTH Aachen.
- Jeude M., Dittrich B., Niederschulte H., Anderlei T., Knocke C., Klee D., Büchs J., 2006 Fed-batch mode in shake flasks by slow-release technique, *Biotechnol. Bioengng.* 95:433-445.
- John G.T., Klimant I., Wittmann C., 2003. Integrated optical sensing of dissolved oxygen in microtiter plates: A novel tool for microbial cultivation. *Biotechnol. Bioeng.* 81: 829-839.
- Kleppe K., 1966. Effect of hydrogen peroxide on clucose oxidase from *Aspergillus nige*. *Biochemistry.* 5:139-143.
- Krommenhoek E.E., Gardeniers J.G.E., Bomer J.G., Li X., Ottens M., Van Dedem G.W.K., Van Leeuwen M., Van Gulik W.M., Van der Wielen L.A.M., Heijnen J.J., Van den Berg A., 2007. Integrated Electrochemical Sensor Array for On-Line Monitoring of Yeast Fermentations. *Analytical Chemistry.* 79:5567-5573.
- Kensy F., Zimmermann H.F., Knabben I., Anderlei T., Trauthwein H., Dingerdissen U., Büchs J., 2005. Oxygen transfer phenomena in 48-well microtiter plates: Determination by optical monitoring of sulfite oxidation and verification by real-time measurement during microbial growth. *Biotech. Bioeng.* 89: 698-708
- Koerkel S., 2002. Numerische Methoden fuer Optimale Versuchsplanungsprobleme bei nichtlinearen DAE-Modellen. PhD thesis, University of Heidelberg.
- Körkel S., Kostina E., Bock H.G., Schlöder J.P., 2004. Numerical Methods for Optimal Control Problems in Design of Robust Optimal Experiments for Nonlinear Dynamic Processes. *Optimization Methods and Software (OMS) Journal*, 19: 327-338.
- Lackowitz J.R., 1999. Principles of Fluorescence Spectroskopy. New York: Kluwer Academic / Plenum Publisher.

- Lanio T., Jeltsch A., Pingoud A., 2000. Automated purification of His6-tagged proteins allows exhaustive screening of libraries generated by random mutagenesis. *Biotechniques*. 29:338-342.
- Lejeune A., Vanhove M., Lamotte-Brasseur J., Pain R.H., Frere J.M., Matagne A., 2001. Quantitative Analysis of the stabilization by substrate of *Staphylococcus aureus* PC1 β -lactamase. *Chemistry and Biology*. 8: 831 – 842.
- Lumry R., Eyring H., 1953. Conformaion changes of proteins. *J. Phys. Chem.* 58: 110-120
- Lye G.J., Ayazi-Shamlou P., Baganz F., Dalby P.A., Woodley J.M., 2003. Accelerated design of bioconversion processes using automated microscale processing techniques. *Trends in Biotechnology*. 21: 29-37.
- Linek V., Benes P., Vacek V., 1989. Dynamic pressure method for k_La measurement in Large-Scale Boreactors. *Biotech. Boeng.* 33: 1406-1412.
- Linek V., Vacek V., 1981. Chemical Engineering use of catalyzed sulfite oxidation kinetics for the determination of mass transfer characteristics of gas-liquid contactors. *Chem Eng Sci.* 36: 1747-1768.
- Lopez J.L.C., Rodriguez E.M., Alberola I.O., Ballesteros M.M., Sanchez Perez J.A., Fernandez J.M., Chisti Y., 2006. Simultaneous Determination of Oxygen Consumption Rate and Volumetric Oxygen Transfer Coefficient in Pneumatically Agitated Bioreactors. *Ind. Eng. Chem. Res.* 45: 1167-1171.
- Marquez L.A., Wild G., Midoux N., 1994. A review of recent chemical techniques for the determination of the volumetric mass-transfer coefficient k_La in gas-liquid reactors. *Chem. Eng. Proc.* 33: 247-260.
- Marjasvaara A., Torvinen M., Vainiotalo P., 2004. Laccase-catalyzed mediated oxidation of benzyl alcohol: the role of TEMPO and formation of products including benzonitrile studied by nanoelectrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 39: 1139-1146.
- Mills A., Chang Q., 1993. Fluorescence plastic thin-film sensors for carbon dioxide. *Analyst*. 118: 839-43.
- Mirabella F.M., 1998 *Modern Techniques in Applied Molecular Spectroscopy*. New-York: Wiley & Sons.

- Neubert A., 2001. Lehrhilfe und Anwendungsprogramme für die Festigkeitslehre. Internetadresse: <http://www.offroad-travel.de/conewa/Technik/index.html>.
- Nikolova P.V., Creagh A.L., Duff S.J.B., Haynes C.A., 1997. Thermostability and irreversible activity loss of exoglucanase/xylanase Cex from *Cellulomonas fimi*. *Biochem.* 36:1381-1388.
- Ohara H., Hiyama K., Yoshida T., 1992. Kinetic study on pH dependence of growth and death of *Streptococcus faecalis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 38:403-407.
- Pedrotti F.L., 2005. Optik für Ingenieure: Grundlagen. Springer. Berlin/Heidelberg/New York
- PerkinElmer. 2005. Internetauftritt der Fa. PerkinElmer: http://las.perkinelmer.com/content/TechnicalInfo/TCH_FTIRATR.pdf
- Peter C.P., Suzuki Y., Büchs J., 2006. Hydromechanical stress in shake flasks: Correlation for the maximum local energy dissipation rate, *Biotechnol. Bioeng.* 93: 1164-1176.
- Peterson M.E., Eisenthal R., Danson M.J., Spence A., Daniel R.M., 2004 A new intrinsic thermal parameter for enzymes reveals true temperature optima. *J Biol Chem.* 279: 20717-20722
- Petrounia I.P., Arnold F.H., 2000. Designed evolution of enzymatic properties. *Curr Opin Biotechnol.* 11:325-330.
- Piontek K., Antorini M., Choinowski T., 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-angstrom resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry* 277: 37663-37669.
- Polakovic M., Vrabel P., 1996. Analysis of the mechanism and kinetics of thermal inactivation of enzymes: critical assessment of isothermal inactivation experiments. *Proc. Biochem.* 31:787-800
- Polakovic M., Bryjak J., 2002. Modelling of the kinetics of thermal inactivation of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *J Mol Cat B Enz.* 19-20: 443-450.
- Polizzi K.M., Bommaris A.S., Broering J.M., Chaparro-Riggers J.F., 2007. Stability of biocatalysts. *Curr Opin Biotechnol.* 11:220-225.
- Potthast A., 1998. Untersuchungen zum Laccase-Mediator-System. Dissertation an der TU Dresden.
- Pukelsheim F., 1993. Optimal Design of Experiments. John Wiley & Sons, Inc., New York.

- Robertson DE, Steer BA. 2004. Recent progress in biocatalyst discovery and optimization. *Curr Opin Biotechnol.* 8:141-149.
- Reetz M.T., Jaeger KE. 2002. Directed evolution as a means to create enantioselective enzymes for use in organic chemistry. *Directed Molecular Evolution of Proteins.* Weinheim: Wiley VCH. 245-279.
- Reith T., Beek W.J., 1973. The oxidation of aqueous sodium sulphite solutions. *Chem. Eng. Sci.* 28: 1331-1339.
- Roccatano D., Di Nola A., Amadei A., 2004. A theoretical model for the folding/unfolding thermodynamics of single-domain proteins, based on the quasi-gaussian entropy theory *Journal of Physical Chemistry B*, 108: 5756-5762.
- Samorski M., Müller-Newen G., Büchs J., 2005. Quasi-continuous combined scattered light and fluorescence measurements: A novel measurement technique for shaken microtiter plates, *Biotechnol. Bioeng.* 92: 61-68.
- Schilling K., Horn A., Hoffmann-Blume E., 1992. Verfahren und Testkit zur Bestimmung der Temperatur in Multiküvetten mit thermochromen Indikatorsystemen. DE 41 30 584.
- Schilling K., Cumme G.A., Hoffmann-Blume E., Horn A., 1993. Multiwavelength Photometry of Thermochromic Indicator Solutions for Temperature Determination in Multicuvettes: *Journal of the Clinical Chemistry*, 39: 251-256.
- Schmidt M., Bornscheuer U.T., 2005. High-throughput assays for lipases and esterases. *Biomolecular engineering*, 22: 51-56.
- Schultze H., 2007, Persönliche Auskunft.
- Selwyn M.J., 1965. A simple test for inactivation of an enzyme during assay. *Biochim Biophys Acta.* 105: 193–195.
- Shiragami N., Unno H., 1994. Effect of shear stress on activity of cellular enzyme in animal cell. *Bioproc Eng* 10: 43–45.
- Solomon E.I., Machonkin T.E., Sundaram U.M., 1997. *Multi-Copper Oxidases.* 103-127. Singapore: World Scientific.
- Studer A., 2001. Factors Influencing the C-O Bond Homolysis of Alkoxyamines: Effects of H-Bonding and Polar Substituents. *J. Org. Chem.* 66: 1146-1156.
- Thomas C.R., Dunnill P., 1979. Action of shear on enzymes: studies with catalase and ureases. *Biotechnol Bioeng* 21: 2279–2302.

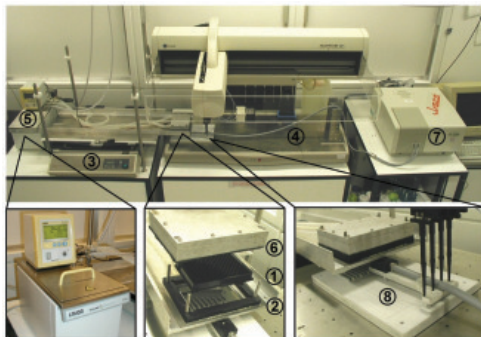
- Thomas C.R., Nienow A.W., Dunnill P., 1979. Action of shear on enzymes: studies with alcohol dehydrogenase. *Biotechnol Bioeng* 21: 2263–2278.
- Tijsskens L.M.M., Rodis P.S., Hertog M., Proxenia N., van Dijk C., 1999. Activity of pectin methyl esterase during blanching of peaches. *J Food Eng*, 39: 167-177.
- Vasudevan P.T., Weiland R.H., 1990. Deactivation of catalase by hydrogen peroxide. *Biotech and Bioeng.* 36:783-789.
- Vauck W.R.A., Müller H.A., 2000. *Grundoperationen Chemischer Verfahrenstechnik.* Stuttgart: Deutscher Verlag der Grundstoffindustrie. S. 19.
- Verbruggen H.W., 1989. Geheizte Mikrotiterplatte. *DE 39 41 168.*
- Wang, N.S., Yang J.D., Calabrese R.V., Chang K.C., 1994. Unified modeling framework of cell death due to bubble in agitated and sparged bioreactors. *J Biotec* 33: 107–122.
- Weisenberger S., Schumpe A., 1996. Estimation of gas solubilities in salt solutions at temperatures from 273 K to 363 K. *AIChE J.* 42: 298-300.
- Weuster-Botz D., 2005. Parallel Reactor Systems for Bioprocess Development. *Adv Biochem Engin/Biotechnol.* 92: 125–143
- Weuster-Botz D., Puskeiler R, Kusterer A, Kaufmann K, John GT, Arnold M. 2005. Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design. *Bioprocess Biosyst Eng.* 28: 109–119.
- Wilhelm E., Battino R., Wilcock R.J., 1977. Low-Pressure Solubility of Gases in Liquid Water. *Chem.Rev.* 77: 219.
- Wolfbeis O.S., Furlinger E., Kronein H., Marsoner H., 1983. Fluorimetric Analysis. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 314: 119-124.
- Xu F., 1996. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society.* 212: 55.
- Yamamoto T., 1998. Heating System for Microplate. *JP 11 80 435.*
- Yazbeck D.R., Tao J., Martinez C.A., Kline B.J., Hu S., 2003. Automated Enzyme Screening Methods for the Preparation of Enantiopure Pharmaceutical Intermediates. *Adv. Synth. Catal.* 345: 524-532.

- Zamost B.L., Nielsen N.K., Starnes R.L., 1991. Thermostable enzymes for industrial applications. *J. Indust Microbiol Bioechnol.* 8:71-81.
- Zecchinon L., Oriol A., Netzel U., Svennberg J., Gerardin-Otthiers N., Feller G., 2005. Stability Domains, Substrate-induced Conformational Changes, and Hinge-bending Motions in a Psychrophilic Phosphoglycerate Kinase: a microcalorimetric study. *J. Biol Chem.* 280: 41307-41314.

Anhang A

Bedienungsanleitung zum Enzymprüfstand

Bedienungsanleitung der Anlage zur Enzymstabilitätsbestimmung (ESB) und der Software MTPReader



(1) MTP; (2) Halterung für MTP und MTP-Heizung; (3) Schüttler mit Tablar; (4) Arbeitsfläche des Pipettierroboters; (5) Thermostat; (6) MTP-Heizung; (7) Spektrometer; (8) Schlitzen mit Optik und angeschlossenem Lichtleiter, auf der Bodenplatte

Seite 2

Grundsätzliches	2
Einrichten der Arbeitsfläche	3
Kalibrieren der Anlage	3
Versuch durchführen	7
Bekannte Probleme:	13
Fortgeschrittenen Optionen:	14

Grundsätzliches

Folgende Dateien müssen sich im Verzeichnis „C:\MTPReader\“ befinden:

- ☐ MTPReader.s: Enthält die Programmierung zur ESB
- ☐ Wellmap_waehlen.xls: Enthält Excel-Makros zur Festlegung von Wellmap und Pipettiermengen
- ☐ Config.ini: Enthält die Grundeinstellungen für das Programm MTPReader
- ☐ Wellmap+ul.csv: Enthält die Wellmap und Pipettiermengen

Begriffe:

workist: Datei für einen Versuch, wird in WinPREP verwendet

labware: Bezeichnung für alle auf der Arbeitsfläche des Roboters installierbaren Vorrichtungen

procedure: Eine Pipettieraufgabe in WinPREP

wellmap: Enthält Informationen zu jedem einzelnen Well der MTP, ob dieses im folgenden Versuch belegt oder leer ist

Einrichten der Arbeitsfläche

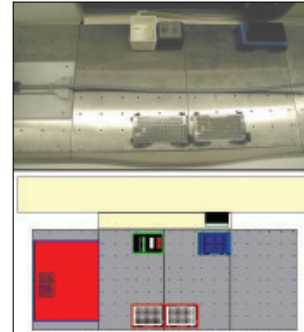
- ❑ **Bodenplatte:** Die Bodenplatte muss in den Löchern C1 und F6 arretiert werden; die Führungsschienen müssen nach links zeigen
- ❑ **Umlenkrolle:** Die Umlenkrolle wird in den Löchern D22 und F24 arretiert
- ❑ **Schlitten:** Der Schlitten wird auf die Bodenplatte gesetzt. Dabei müssen sich die beiden hinteren Füße in der Parkposition befinden (s. Bild oben). Der Lichtleiter wird über die Umlenkrolle geführt
- ❑ **Gewicht:** Damit der Lichtleiter gestrafft bleibt, muss das Gewicht zwischen Umlenkrolle und Spektrometer am frei hängenden Teil des Lichtleiters befestigt sein
- ❑ **Einweg-Pipettenspitzen:** Auf der Arbeitsfläche müssen 200µl-Einweg-Pipettenspitzen installiert sein. Diese werden zum Bewegen des Schlittens benötigt
- ❑ **Labware für Pipettieraufgaben (optional):** Sollen Pipettieraufgaben durchgeführt werden, müssen der Waschtrog und die Behälter / MTPn für die Flüssigkeiten zusätzlich installiert werden. (Achtung: der Abfluss-Schlauch des Waschtrogs muss in einem Auffangbehälter enden. Sonst kann es zu „interessanten“ Nebeneffekten an den Steckdosenleisten am Boden kommen)

Kalibrieren der Anlage

Wurde die Position von Schüttler oder Tablar verändert, müssen diese neu über der Bodenplatte ausgerichtet werden. Darüber hinaus wird mit dem Kalibrieren eine Vorauswahl für die Spektrometer-Einstellungen getroffen, wenn diese für die verwendete Fluoreszenzlösung noch nicht bekannt sind.

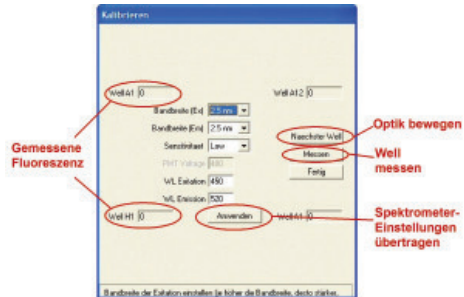
- ❑ **Starten von WinPREP:** Über das Windows-Startmenü oder manuell über „C:\Packard\MultiPROBE\bin\MPIApp.exe“
- ❑ **Laden der worklist zum Kalibrieren:** In der Menüleiste „File \ Open...“ auswählen und anschließend die worklist „C:\MTPReader\WinPREP-Versuche\Kalibrieren.MPT“ öffnen

- ❑ **Arbeitsfläche überprüfen:** Kurz überprüfen, ob die Labware sich in WinPREP an den gleichen Stellen wie auf der Arbeitsfläche befindet.



(Zur Kalibrierung werden nur die im Bild blauen Einweg-Spitzen und die Bodenplatte mit Schlitten benötigt). Gegebenfalls die Positionen auf der Arbeitsfläche oder in WinPREP verändern. Auf dem Schüttler-Tablar muss sich eine 96er MTP in der Halterung befinden, die MTP-Heizung ist nicht aufgesetzt.

- ❑ **Anschalten des Schüttlers:** Der Schüttler wird eingeschaltet, aber im Zustand „Stop“ (ohne Drehzahl). Der Schüttler fährt nun automatisch eine definierte Position an.
- ❑ **Spektrometer einschalten:** Warten, bis die LED am Gerät grün leuchtet
- ❑ **Starten der Kalibrierung:** „Execute Test“ anklicken. Die Pipettenspitzen werden automatisch in den Schlitten eingeführt.
- ❑ **COM-Port wählen:** Es öffnet sich das Fenster, in dem der COM-Port des Spektrometers angegeben werden muss
- ❑ **Kalibrieren (grob):**
Mit dem Button „Naechster Well“ wird nun die Optik der Reihe nach unter die

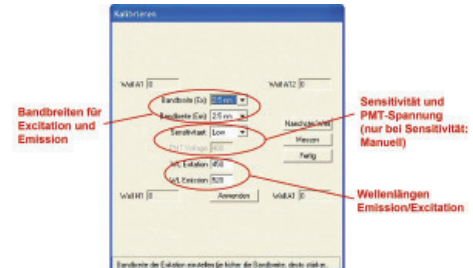


4 Eck-Wellen der MTP gefahren. An jedem Well wird per Augenmaß geschaut, ob sich die Optik genau unter dem jeweiligen Well befindet und gegebenenfalls dazu der Schüttler oder das Tablar verschoben. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis das Ergebnis an allen 4 Wells zufrieden stellend ist.

- Kalibrieren (fein):** Die 4 Eck-Wellen werden mit einer Fluoreszenz-Lösung gefüllt (z.B. HPTS). Es werden wieder der Reihe nach alle 4 Wells angefahren und an jedem Well per Button „Messen“ ein Messwert aufgenommen. Dabei sollte das Licht im Raum ausgeschaltet sein. Die 4 Messwerte sollten im Idealfall identisch sein. Durch weiteres (feinfühliges) Verschieben von Tablar und Schüttler können die Werte weiter angeglichen werden. Dieser Vorgang von Messen und Verschieben wird so lange wiederholt, bis die MTP zufrieden stellend ausgerichtet ist. Dafür ist es ausreichend, wenn der größte und kleinste Messwert ca. 5-10% voneinander abweichen.

□ Vorauswahl der Spektrometer-Einstellungen:

Die Intensitätswerte des Spektrometers können Werte zwischen 0 und 1000



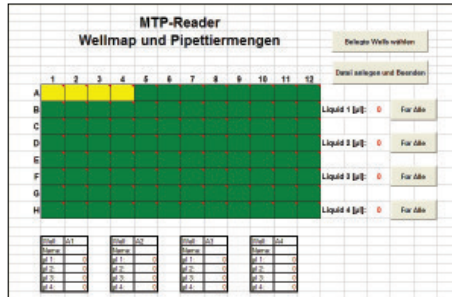
annehmen. Deshalb ist im Versuch darauf zu achten, dass durch die Wahl geeigneter Spektrometer-Einstellungen diese Werte einerseits nicht zu klein sind (geringe Auflösung), andererseits nicht die Obergrenze von 1000 erreichen. Deshalb kann im Rahmen der Kalibrierung eine Vorauswahl für die Spektrometer-Einstellungen getroffen werden. Hierzu wird ein Eck-Well mit der im späteren Versuch zu verwendenden Fluoreszenzlösung gefüllt und die Optik unter diesem positioniert. Die Spektrometer-Einstellungen im Menü-Fenster werden so verändert, dass der danach aufgenommene Messwert idealerweise im Bereich von 100-500 liegt. Die Wellenlängen für Excitation und Emission (jeweils zwischen 200 und 900 nm) werden wie im späteren Versuch gewählt. Größere Bandbreiten verstärken die Messwerte, mindern aber gleichzeitig die Messgenauigkeit im späteren Versuch. Durch eine höhere Sensitivität werden die Messwerte ebenfalls erhöht. Wird für die Sensitivität „manuell“ gewählt, lässt sich die Sensitivität über den Wert „PMT-Voltage“ (200 – 600 V) in sehr kleinen Schritten einstellen. (Tip: Höhere Sensitivitäten ermöglichen die Messung bei kleineren Bandbreiten)

Versuch durchführen

In diesem Kapitel werden alle zu einer Versuchsdurchführung benötigten Einstellungen beschrieben, die im Benutzer-Menü angegeben werden können.

❑ Festlegen der Wellmap und zu pipettierender Flüssigkeitsmengen:

Hierfür muss die Datei „C:\MTPReader\Wellmap_waehlen.xls“ geöffnet werden. Nach dem Start „Makros aktivieren“ auswählen.

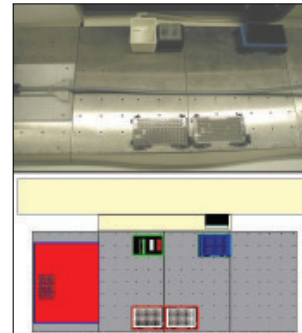


Als erstes über den Button „Belegte Wells wählen“ den Bereich der MTP (grüne Felder im Bild) markieren, der im Versuch verwendet werden soll. Für jedes markierte Well wird nun ein Kästchen (unten im Bild) erzeugt. Sollen Pipettiervorgänge durchgeführt werden, können dort die jeweils zu pipettierenden Mengen in µl eingetragen werden. (Dabei wird „µl 1“ für den ersten Pipettiervorgang verwendet, „µl 2“ für den zweiten, usw.) Über die Buttons „Für Alle“ kann eine Menge direkt in alle Kästchen eingetragen werden. Abschließend wird mit dem Button „Datei anlegen und Beenden“ Excel beendet.

- ❑ **Starten von WinPREP:** Über das Windows-Startmenü oder manuell über „C:\Packard\MultiPROBE\bin\MPIApp.exe“
- ❑ **Laden der worklist zur Versuchsdurchführung:** In der Menüleiste „File \ Open...“ auswählen und anschließend die Worklist „C:\MTPReader\WinPREP-Versuche\Grundeinstellungen-lite.MPT“ öffnen. Hiermit wird ein Versuch ohne

Pipettieraufgaben durchgeführt. Für einen Versuch mit Pipettieraufgaben muss die worklist „Grundeinstellungen.MTP“ gewählt werden. (Alternativ können auch selber modifizierte und gespeicherte Versionen dieser worklist geladen werden. Informationen zum Modifizieren einer worklist finden sich weiter unten)

- ❑ **Arbeitsfläche überprüfen:** Kurz überprüfen, ob die Labware sich in WinPREP an den gleichen Stellen wie auf der Arbeitsfläche befindet. Gegebenfalls die Positionen auf der Arbeitsfläche oder in WinPREP verändern. (Die Abbildung ist nur eine Beispiel-Einrichtung).



- ❑ **Anschalten des Schüttlers:** Der Schüttler wird angeschaltet, aber im Zustand „Stop“ (ohne Drehzahl). Der Schüttler fährt nun automatisch eine definierte Position an. Soll ein Versuch ohne Schüttelbewegung durchgeführt werden, kann der Schüttler jetzt wieder ausgeschaltet werden
- ❑ **Spektrometer einschalten:** Warten, bis die LED am Gerät grün leuchtet
- ❑ **Starten des Versuchs:** „Execute Test“ anklicken. Es wird nun das Benutzer-Menü zur Auswahl der Versuchs-Einstellungen angezeigt
- ❑ **Einstellungen laden:** Im ersten Menü-Fenster können bereits gespeicherte Einstellungen geladen werden. Ansonsten werden die Grundeinstellungen für

alle folgenden Menü-Fenster verwendet. Mit dem Button „Weiter >“ geht es zum nächsten Menü-Fenster

❑ Spektrometer-Einstellungen:

Einstellungen SP-6300 [Spektrometer]

COM-Port: COM1

Bandbreite (Ex): 2.5 nm

Bandbreite (Em): 5 nm

Sensitivität: Manual

PMT Voltage: 404

Anzahl zu messender WL: 5

WL [nm]	Excitation	Emission
Messung 1: 400	720	Messung 3: 400 770
Messung 2: 490	720	Messung 4: 490 770

< Zurück Weiter > Abbrechen

Anzahl der Wellenlängen-Kombinationen, die gemessen werden sollen, einstellen

Hier kann u. a. der COM-Port des Spektrometers eingestellt werden. (Falls man nicht sicher ist, welcher Port benutzt wird: Nach einem Klick auf „Weiter >“ wird überprüft ob die Wahl richtig war). Für die Einstellungen der Bandbreiten und der Sensitivität sollte im Rahmen der Kalibrierung bereits die Vorauswahl erfolgt sein. Diese Einstellungen werden auch hier gewählt (Die Beschreibung der betr. Parameter findet sich ebenfalls im Kapitel „Kalibrieren“). Die „Anzahl zu messender WL“ gibt an, wie viele Kombinationen von Excitation und Emission gemessen werden sollen (max. 4). Die Wellenlängen dürfen im Bereich 200 – 900 nm gewählt werden. Weiter geht es mit dem Button „Weiter >“

❑ Schüttler-Einstellungen:

Einstellungen Schüttler

☒ Schüttler verwenden?

COM-Port: COM2

Drehzahl (U/min): 50

< Zurück Weiter > Abbrechen

Soll das Schüttler vom PC angesteuert werden?

Soll der Schüttler im Versuch verwendet werden, hier das entsprechende Kästchen anklicken. Nun lassen sich der COM-Port und die Drehzahl festlegen. Der Schüttler wird unmittelbar vor der Vermessung automatisch gestartet. Die Drehzahl bleibt den gesamten Versuch über konstant, der Schüttler wird am Ende automatisch gestoppt.

❑ Thermostat-Einstellungen:

Einstellungen Thermostat

☒ Thermostat verwenden?

COM-Port: COM3

Segment 1

Temperatur: 20

Zeit: 1

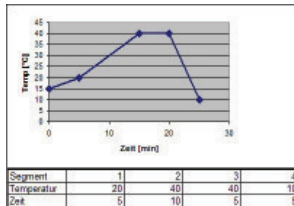
Gesamtzahl Segmente: 1

☐ Externe Regelung verwenden?

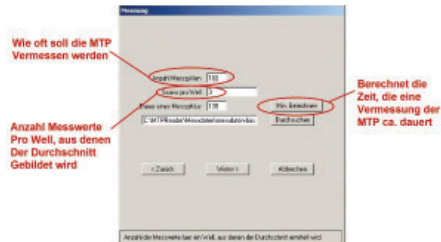
< Zurück Weiter > Abbrechen

Soll das Thermostat vom PC angesteuert werden?

Soll das Thermostat verwendet werden, das entsprechende Kästchen anklicken. Nun kann ein Temperatur-Zeit-Verlauf eingegeben werden. Zuerst sollte die gewünschte Gesamtanzahl von Temperatur-Zeit-Segmenten gewählt werden. Nun wird für jedes Segment Zeit und Temperatur angegeben (s. Bild, die 15°C links in der Kurve ist die aktuelle Temperatur im Thermostat bei Versuchsbeginn). Über die Buttons „Segment“ kann dabei zwischen den Segmenten gewechselt werden. Ist das Kästchen „Externe Regelung verwenden?“ aktiviert, wird die Temperatur über den an das Thermostat angeschlossenen externen PT100 Fühler geregelt. Die Temperatur-Werte, die in die Messdatei geschrieben werden, werden in diesem Fall auch vom externen Sensor ausgelesen (ansonsten vom internen PT100 im Bad)



□ Einstellungen zur Messung:



Die „Anzahl Messzyklen“ bestimmt die Dauer des Versuchs. Die Anzahl „Scans pro Well“ beeinflusst stark, wie lange eine Vermessung der MTP dauert (Dauer eines Messzyklus) und sollte so gering wie möglich gewählt werden (ohne Schüttelbewegung ca. 3 Scans, mit Schüttler 5-10 Scans). Mit dem Button „Min.Berechnen“ wird nach einer Änderung der „Scans pro Well“ die neue Messzyklus-Dauer berechnet. Die „Dauer eines Messzyklus“ kann auch kleiner als vorgeschlagen eingestellt werden, in dem Fall folgen die einzelnen Vermessungen unmittelbar hintereinander. Mit dem Button „Durchsuchen“ wird die Datei gewählt, in der die Versuchsergebnisse gespeichert werden (Datei vom Typ *.txt wählen). Weiter geht es mit „Weiters“

- **Einstellungen speichern:** Hier können alle gemachten Einstellungen in einer *.ini-Datei gespeichert werden. Mit „Start“ wird der Versuch begonnen.
- **Versuch:** Der Versuch bzw. die Pipettieraufgaben und die Vermessung der MTP werden automatisch durchgeführt. Lediglich nach den Pipettieraufgaben (wenn welche durchgeführt werden sollen) erscheint ein Fenster, wenn die MTP-Heizung nach dem Pipettieren aufgesetzt werden muss. Nach Bestätigen mit „Ok“ startet der Schüttler, das Temperatur-Zeit-Programm am Thermostat und die Vermessung der MTP beginnt. Während der Vermessung sollte das Licht im Raum ausgeschaltet bleiben.
- **Versuch beenden:** Der Versuch läuft, bis die eingestellte Anzahl von Vermessungen durchgeführt wurde. Alternativ kann ein Versuch auch manuell beendet werden. In dem Fall stehen alle Messwerte bis auf grade laufende Messung in der Messdaten-Datei zur Verfügung. Die verwendeten Einweg-Pipettierspitzen zum Verfahren des Schlittens sollten nach ca. 10-20 Betriebsstunden entsorgt werden.

Bekannte Probleme

❑ Kommunikationsfehler mit dem Roboter bei Versuchsstart:

Mögliche Lösungen:

- Kabelverbindung überprüfen, v.a. den Stecker am PC
- WinPREP ausschalten, Roboter ausschalten. Anschließend beides wieder anschalten.
- Neustart des PC

❑ Kommunikationsfehler mit Spektrometer FP6300:

Mögliche Lösungen:

- Falscher COM-Port gewählt
- Kabelverbindung überprüfen
- Sämtliche Programme des Spektrometers beenden, sofern welche geöffnet sind
- Neustart von WinPREP oder des PC

❑ Schlitten bleibt beim Verfahren hängen:

Mögliche Ursachen:

- Der Lichtleiter liegt nicht so, wie unter „Einrichten der Arbeitsfläche beschrieben“
- Die Bodenplatte wurde zu lange nicht mit Teflonspray behandelt
- Die Füße sind abgenutzt
- Eine oder mehrere Einweg-Pipettenspitzen sind gebrochen

Diese Liste darf gerne beim Auftreten neuer Fehler ergänzt werden...

Fortgeschrittenen Optionen

In diesem Abschnitt werden einige Hinweise gegeben, wenn der Versuchsablauf oder der Versuchsaufbau geändert werden müssen. Informationen zu den zahlreichen möglichen Einstellungen in WinPREP, die hier nicht aufgeführt werden, finden sich in der Bedienungsanleitung des Pipettierroboters *MultiPROBE IIEx* und in der sehr guten Online-Hilfe von WinPREP.

Einfügen von Pipettieraufgaben: Hier wird erklärt, wie die Wellmap und die Pipettiermengen, die in Excel angegeben werden, in eine Pipettieraufgabe eingebunden werden können (vgl. „Versuch durchführen“)

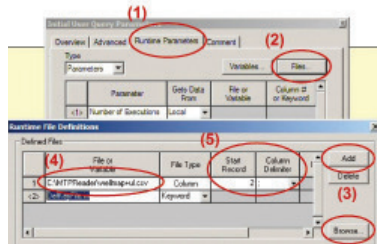
❑ Pipettierschritt einfügen:



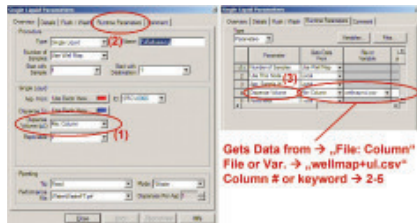
Für normales Pipettieren eignen sich die Prozeduren „Single liquid“ und „Reagent“. Diese beiden unterscheiden sich kaum und können durch Anpassung bestimmter Parameter sich auch gegenseitig ersetzen. Grundsätzlich verwendet man „Single liquid“, wenn aus einzelnen Positionen (z.B. Wells einer MTP) pipettiert wird. Wird dagegen aus einer Position, z.B. aus einem Trog (in eine MTP) pipettiert, verwendet man „Reagent“. Die folgenden Schritte werden anhand einer „Single Liquid“ Prozedur erklärt. Anschließend müssen noch die zugehörigen labwares per Click&Drop den einzelnen Pipettierschritten der Pipettieraufgabe (Prozedur) zugeordnet werden.

- ❑ **Excel-Datei einbinden:** Die Datei, die wellmap und die zu pipettierenden Flüssigkeitsmengen beinhaltet, wird wie folgt in WinPREP eingebunden:

- Doppelklick auf eine der Pipettieraufgaben (egal welche) oder „Initial User Query“ im Test-Verlauf links in WinPREP



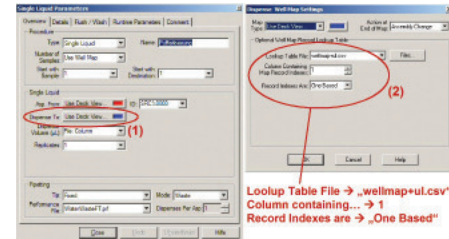
- Im nun geöffneten Fenster die Karteikarte „Runtime Parameter“ wählen (1), anschließend „Files“ anklicken (2). Im nächsten Fenster über „Add“ und „Browse“ (3) die Datei „C:\MTPReader\wellmap+ul.csv“ (4) auswählen. Jetzt noch die dazugehörigen Werte für „Start Record“ auf „2“ und als „Column Delimiter“ das Semikolon auswählen (5). Fertig.
- **Zuweisen der Pipettiermengen aus der Datei:** Doppelklick auf die betreffende Pipettieraufgabe im Test-Verlauf links in WinPREP.



Anschließend für „Dispense Volume“ „File.Column“ (1) wählen und „Runtime Parameter“ (2) anklicken. Im nächsten Fenster dann für den Parameter

„Dispense Volume“ die Einstellungen wie im Bild wählen. Für „Column or keyword“ kann die gewünschte Spalte aus der Datei „wellmap+ul.csv“ zwischen 2 und 5 gewählt werden (Spalte 1 enthält die Wellmap).

- **Zuweisen der Wellmap aus der Datei:** Doppelklick auf die betreffende Pipettieraufgabe im Test-Verlauf links in WinPREP. Anschließend „Dispense to: Use Deck View“ anklicken. Im folgenden Fenster die Einstellungen wie im unteren Bild zu sehen eingeben.



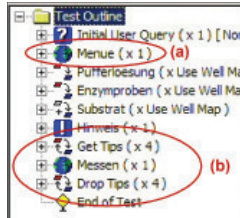
Wenn gewünscht, kann der Vorgang auch nach einem Klick auf „Asp. From: Use Deck View“ wiederholt werden. Die restlichen Einstellungen zu dem Pipettiervorgang werden wie bei normalen Pipettiervorgängen durchgeführt (s. Anleitung und Online-Hilfe von WinPREP)

Einbinden der Datei mit User-Skripten:

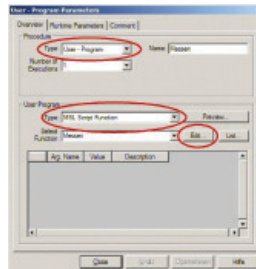
In der Menüleiste in WinPREP „Test/Register User Skript Files(s)...“ auswählen. Anschließend eine Textdatei mit MSL-Code auswählen. Die Datei muss die Endung *.s haben (z.Z. wird verwendet: „C:\MTPReader\MTPReader.s“)

Einbinden der User-Skripte in den Versuchs-Ablauf:

Über den Button „User Program“  wird solch ein Schritt in den Versuchs-Ablauf integriert (im Bild, (a))



Durch einen Doppelklick auf dieses User-Programm wird das folgende Fenster geöffnet:



Wie im Bild wird für „Procedure – Type“ „User-Program“ und für „User Program – Type“ „MSL Script Function“ gewählt. Mit dem Button „Edit“ wird ein Fenster aufgerufen, in dem der MSL Code geschrieben werden kann. An dieser Stelle müssen auch die Funktionen aus eingebundenen User-Skripten aufgerufen werden. Durch die aktuelle Programmierung der User-Skript-Datei „MTPReader.s“ wird hier nur einen der drei folgenden Einträge pro User-Programm benötigt:

```
MenuControl();    (inkl. Semikolon u. Klammern) Ruft das Benutzermenü auf
ReadMTP();        Führt eine Vermessung durch, zuvor sollte das Menü
                  aufgerufen worden sein
Calibrate();       Funktion zur gesamten Durchführung der Kalibrierung
```

Wichtig ist, das vor den Funktionen „ReadMTP“ und „Calibrate“ jeweils ein Pipettierschritt zur Aufnahme der Einweg-Pipettenspitzen durchgeführt wird, wie im oberen Bild auf der vorigen Seite unter (b) markiert („Get Tips (4x)“), und nach Durchführung des User-Skriptes wieder abgeworfen werden („Drop Tips (4x)“). Hilfe dazu gibt es in der Online-Hilfe (Tip: es müssen bereits auf der Arbeitsfläche des Roboters in WinPREP Einweg-Spitzen als labware eingerichtet sein, damit das Aufnehmen/Abwerfen ausgewählt werden kann)

Ändern der Position der Bodenplatte bzw. des Schlittens: Soll die Position der Bodenplatte / des Schlittens verändert werden, müssen einige Parameter geändert werden: Hierzu die Datei „C:\MTPReader\config.ini“ öffnen. Unten in der Datei befinden sich unter dem Sektionsnamen [Coordinates] die X-, Y- und Z-Koordinaten des Schlittens (in mm). Diese Koordinaten beziehen sich auf die vordere der vier Bohrungen am Schlitten und können in der Datei geändert werden. (Achtung: Es wird empfohlen, zunächst die Z-Koordinate (Höhe) größer zu wählen (ca. 50 mm größer), so das bei falschen X- und Y-Koordinaten die Pipettierspitzen nicht direkt in den Schlitten knallen)

Tip: zum Ermitteln der Koordinaten einfach eine beliebige „labware“ unter „Utilities\Labware library“ auswählen. Dann kann der Roboter manuell bewegt werden und gleichzeitig werden die Koordinaten der aktuellen Position angezeigt.

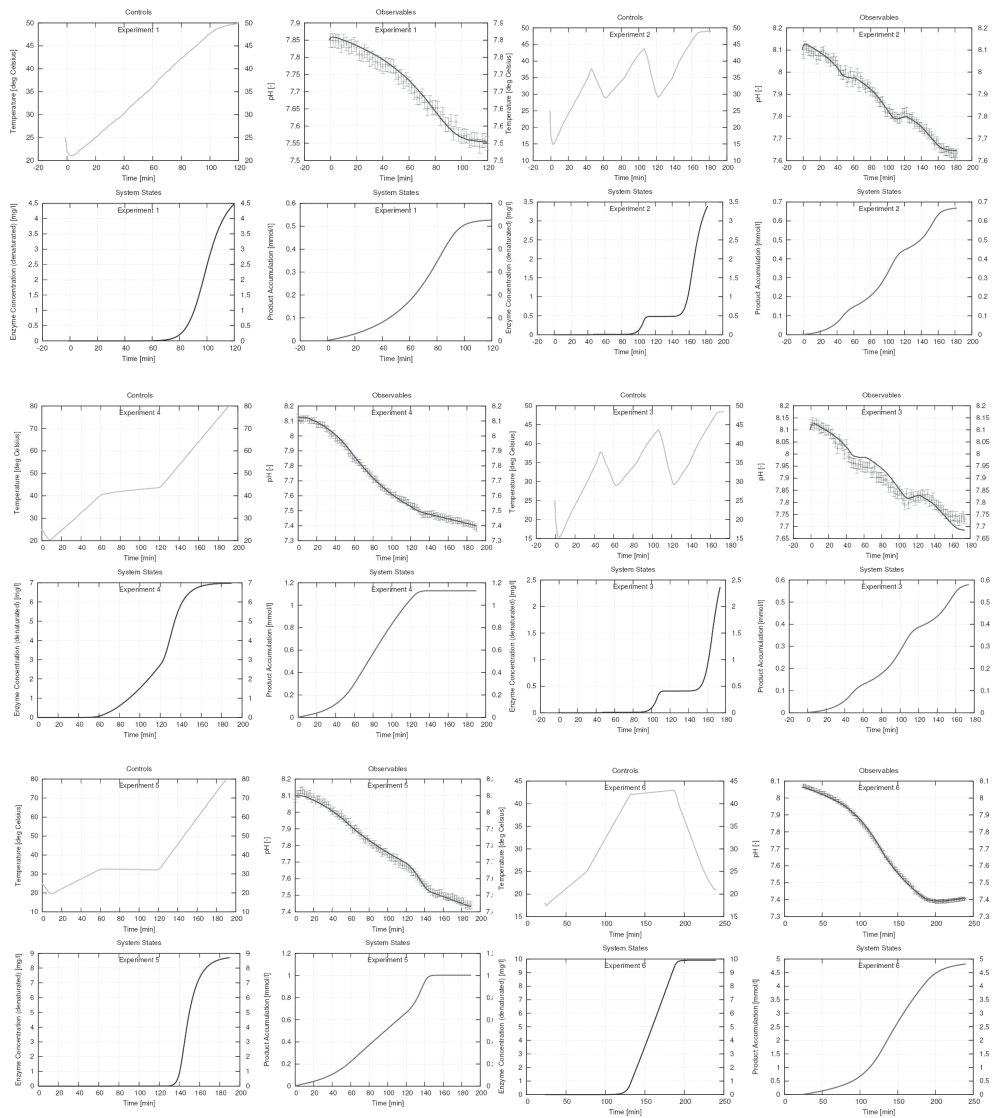
```
[Coordinates]
Xstart = -38.5
Ystart = 207.5
ZPosLow = 22.0

[End]
```

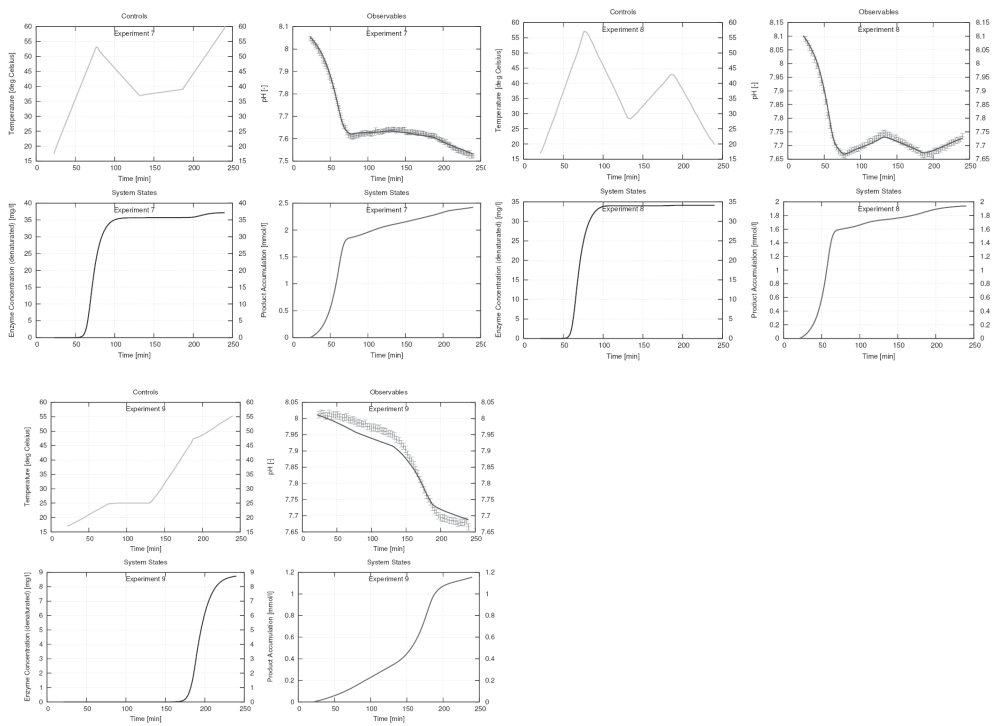
Anhang B

Ergebnisse einzelner Experimente und Anpassungen

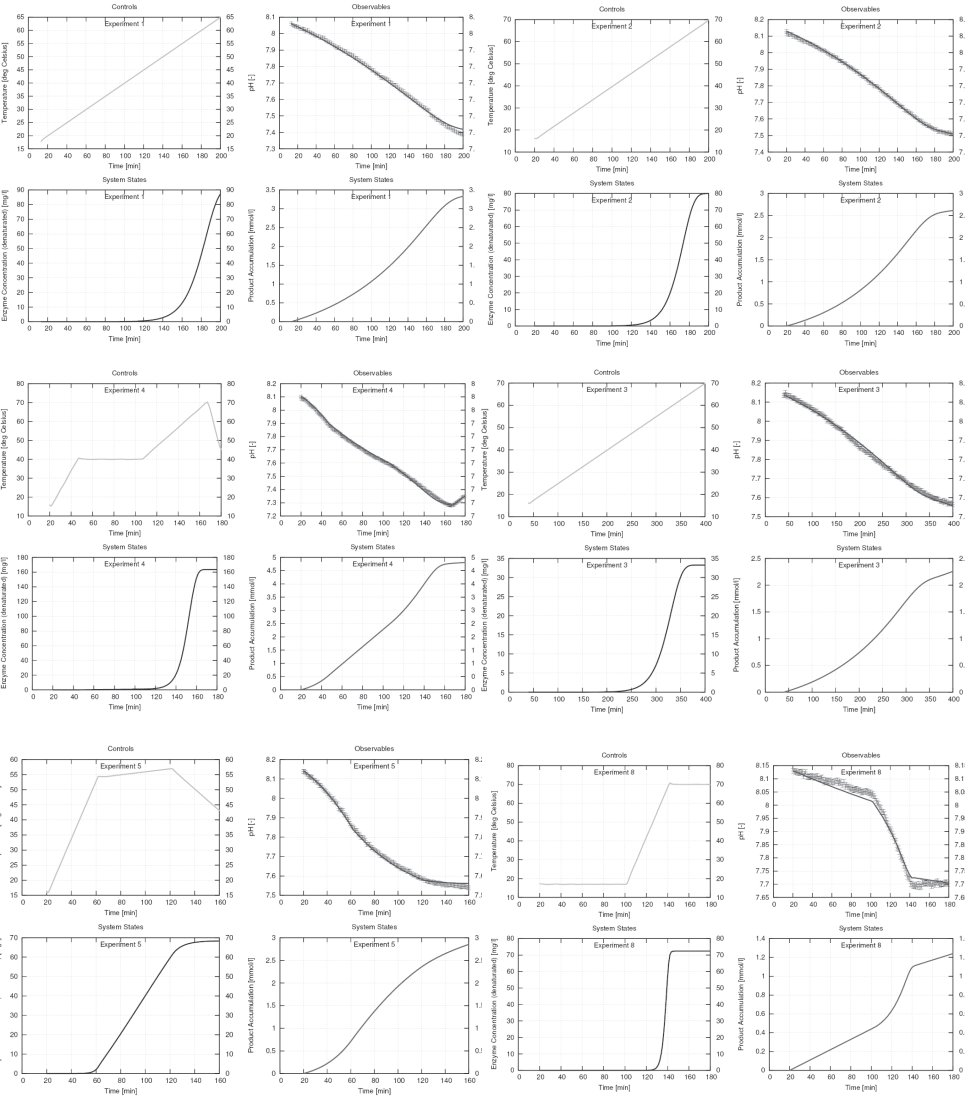
Mesophile Esterase



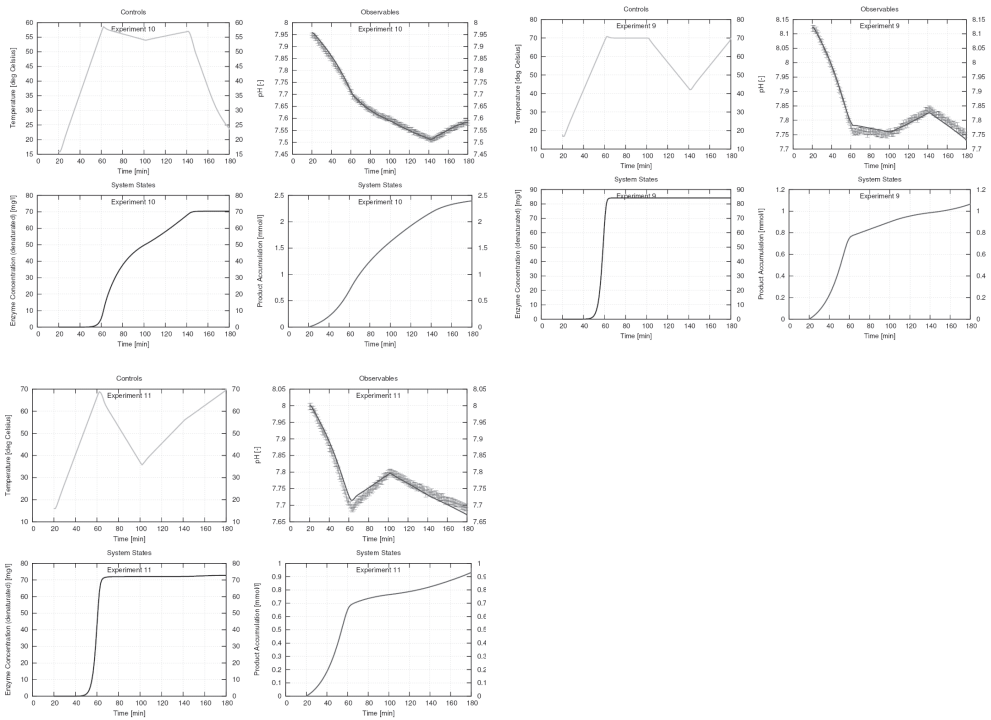
Mesophile Esterase



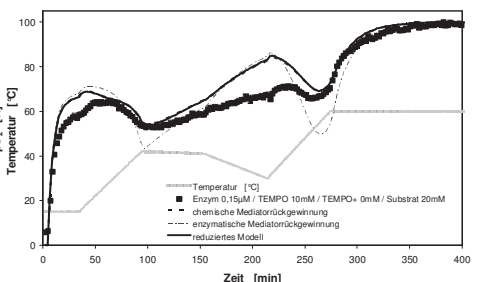
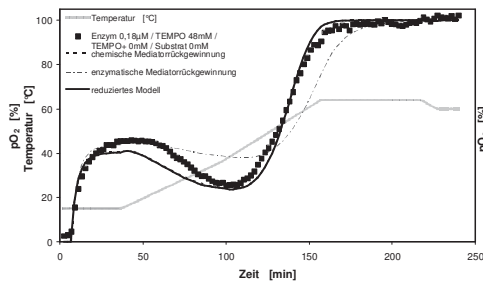
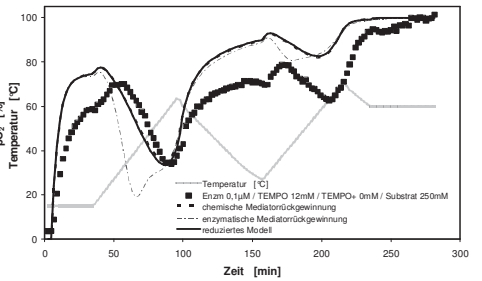
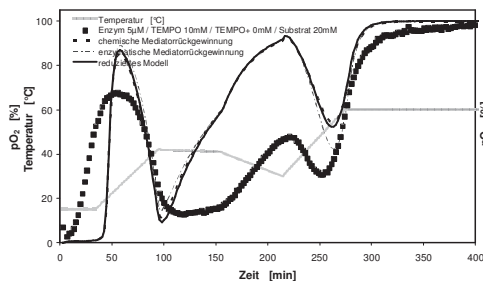
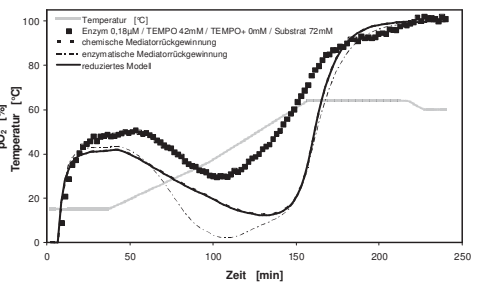
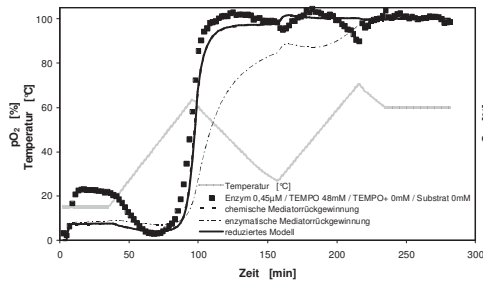
Thermophile Esterase



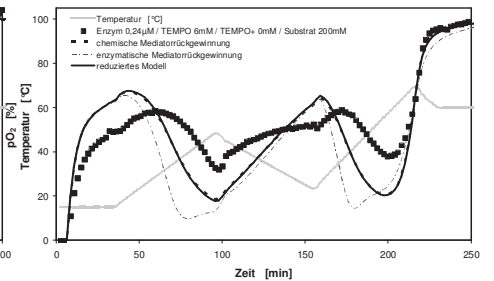
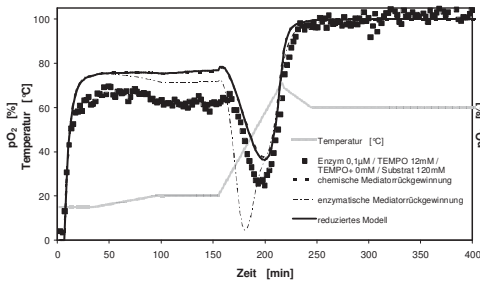
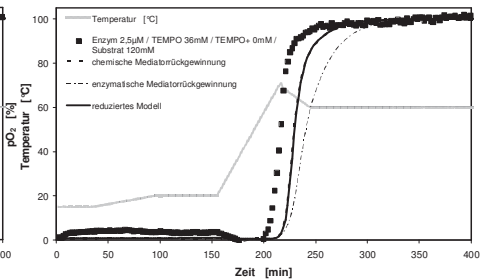
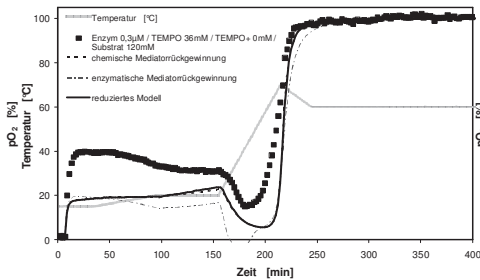
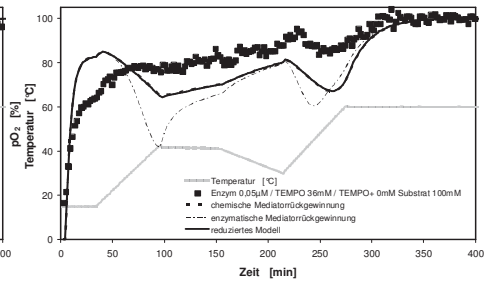
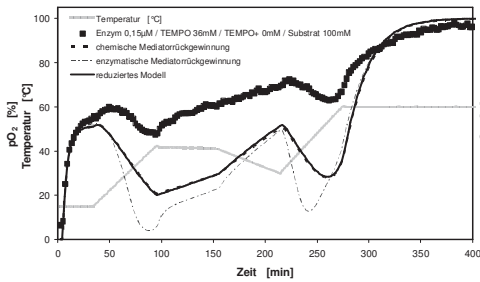
Thermophile Esterase



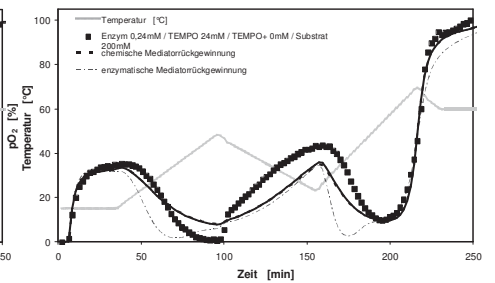
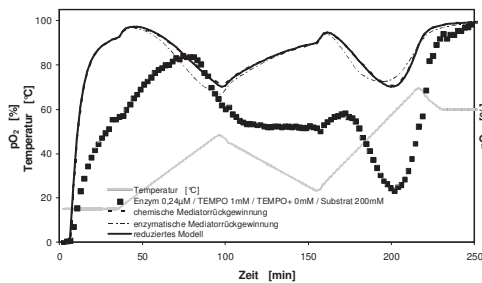
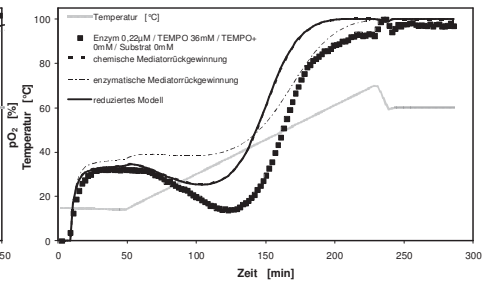
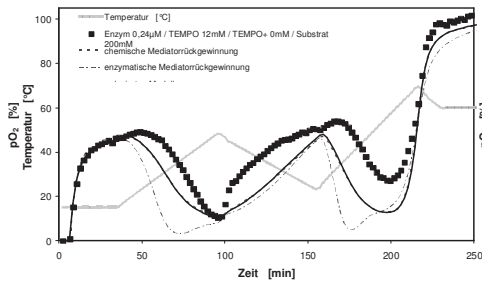
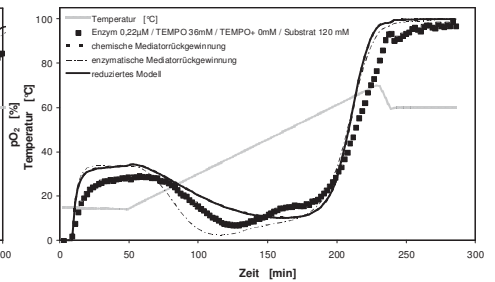
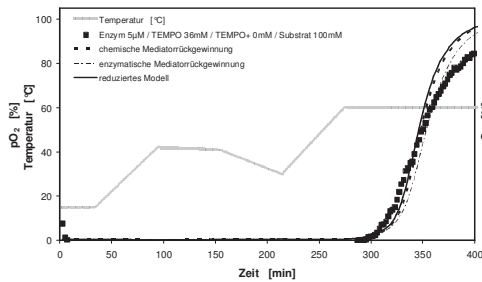
Oxidasesystem



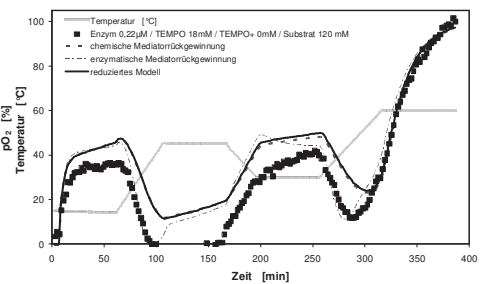
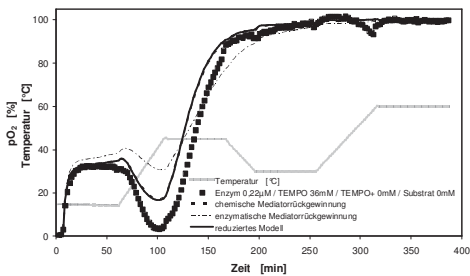
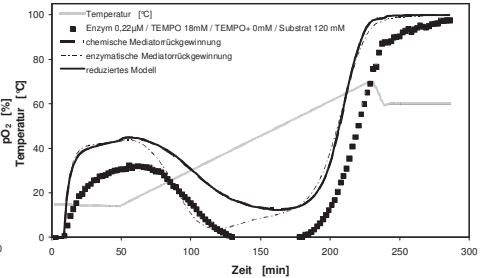
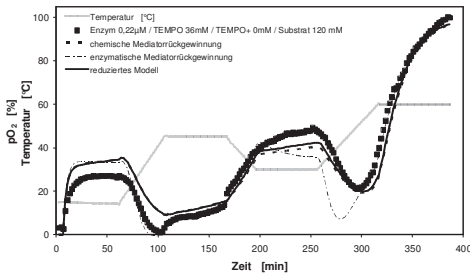
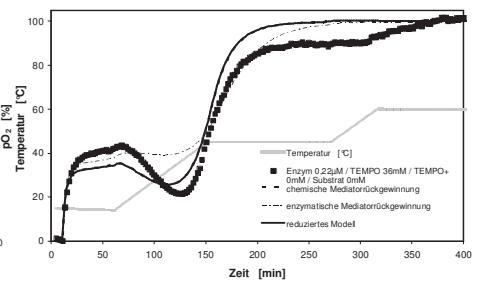
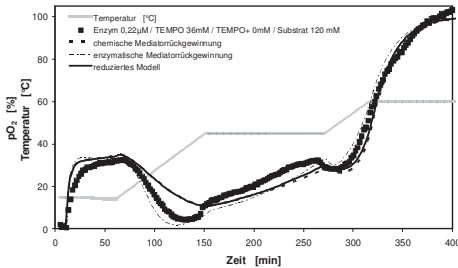
Oxidasesystem



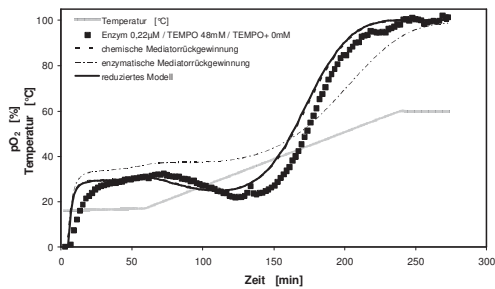
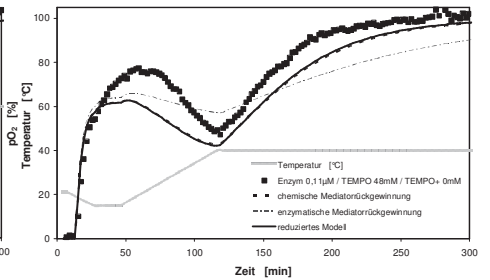
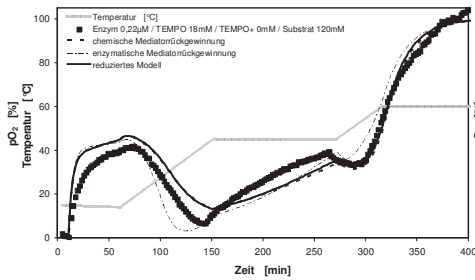
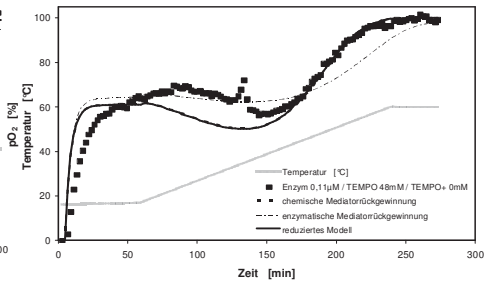
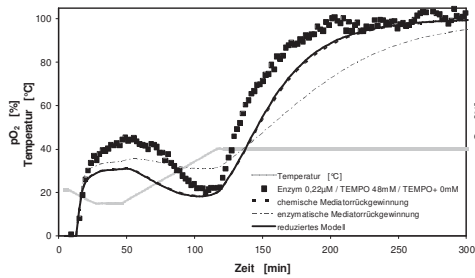
Oxidasesystem



Oxidasesystem



Oxidasesystem



Anhang C

Mechanische Komponenten des Enzymprüfstandes / Technische Zeichnungen

Entwicklung der Komponenten zum Verfahren der Optik

Da die Entwicklung der für die Anlage benötigten mechanischen und optischen Komponenten eine Herausforderung bei der vorliegenden Arbeit darstellte, werden im Folgenden die verschiedenen Lösungsansätze während der Entwicklung in diesem Kapitel beschrieben.

Generell ist der Pipettierroboter nicht dafür ausgelegt, Bauteile zu bewegen oder anzuheben. Zwar ist für solche Aufgaben die Erweiterung des Roboters mit einem Greifer möglich oder alternativ der Einsatz einer Verfahreinheit. Aufgrund der hohen Anschaffungskosten, aus Platzgründen im Labor und zur Minimierung des Programmieraufwands, sollte zunächst die Möglichkeit der Realisierung des Verfahrens der Optik mit dem bestehenden System untersucht werden.

In einem ersten Ansatz sollte die Optik vom Roboter angehoben werden und unter der MTP verfahren werden. Die einzige Möglichkeit, Bauteile mit den Pipettierspitzen anzuheben, ohne diese fest an den Spitzen zu montieren, besteht in der Aufnahme von Einweg-Pipettenspitzen. Der in Bild dargestellte Dummy aus Aluminium repräsentiert die Optik, wobei zwei Einwegspitzen über Schrauben an dem Körper fixiert sind. Erste Tests ergaben jedoch, dass sich die Einwegspitzen aufgrund der Gewichtsbelastung von den Pipettierspitzen lösen können, die Vorrichtung also für mehrstündige automatisierte Versuchsdurchführungen ungeeignet ist. Zudem beginnt der Dummy durch die Bewegungen zu schwingen.

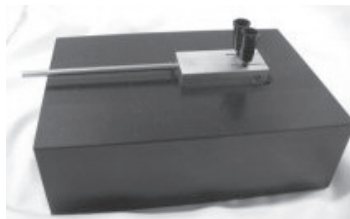


Bild: Testvorrichtung zum Anheben über Pipettenspitzen

Alternativ wurde die Methode untersucht, die Optik nicht anzuheben, sondern auf einer Bodenplatte lediglich zu verschieben. Hierzu wurde der Schlitten aus Aluminium mit aufgesetzter Optik entworfen. In den ersten Tests mit dieser Vorrichtung stellte sich das Verschieben der Optik als durchführbar heraus. Dabei ist jedoch eine Verdrehung des Schlittens bei Bewegungen quer zur Längsachse, wie in Bild dargestellt, zu beobachten. Diese Verdrehung resultiert aus mehreren Faktoren: der Verbiegung der Einweg-Pipettierspitzen aus Kunststoff bei Krafteinwirkung, der Reibung der Madenschrauben des Schlittens auf der Bodenplatte und einer Krafteinwirkung, die durch den angeschlossenen Lichtwellenleiter verursacht wird.

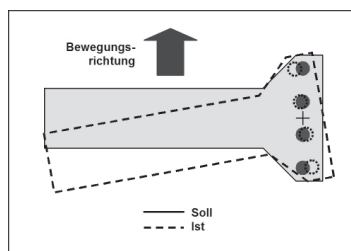


Bild: Abweichung des Schlittens von der Soll-Position bei einer Bewegung quer zur Längsachse des Schlittens

Als Gegenmaßnahme wurde in einem ersten Schritt die Bodenplatte mit Führungsschienen versehen. Durch das Verfahren der vorderen Madenschraube des Schlittens innerhalb der Führung wird die Verdrehung unterdrückt. Als weiterhin problematisch stellt sich jedoch das Einfahren in die einzelnen Führungen heraus, da häufig ein Abgleiten der Madenschraube in

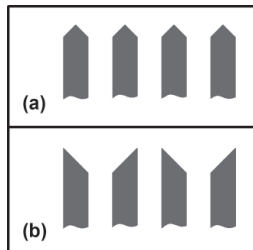
die Nachbar-Führung oder ein Hängenbleiben an der Spitze der Führung zu beobachten war. Beides kann zu Beschädigungen am Roboter führen und ist zudem für eine automatisierte Anwendung nicht akzeptabel. Dieses Problem konnte durch die drei im Folgenden beschriebenen, parallel durchgeführten Maßnahmen vollständig behoben werden.

- Das Design der Führungsschienen wurde modifiziert. Durch die breiteren Winkel beim Einfahren in die Schienen wird die Fehlerquote stark reduziert. Nachteil ist, dass jede Führung nun nur noch in einer Richtung angefahren werden kann.
- Der Lichtwellenleiter wurde über eine Umlenkrolle geführt und liegt nicht mehr auf der gesamten Länge auf der Arbeitsfläche des Roboters auf. Zuvor verstärkte das Schleifen des LWL und die daraus resultierende Krafteinwirkung auf den Schlitten die Verdrehung des Schlittens beim Bewegen. Ein zusätzliches Gewicht (ca. 200g) am LWL hinter der Umlenkrolle führt zur konstanten Straffung des Lichtleiters und zusätzlich durch die Zugkraft für eine stabile Lage des Schlittens in der Parkposition, wie sie für das Einführen der Pipettierspitzen notwendig ist.
- Um die Reibung des Schlittens auf der Bodenplatte zu minimieren, werden Füße aus Teflon verwendet. Nachteil bei der Verwendung von „Teflonfüßen“ ist jedoch, dass diese alle 75-100 Betriebsstunden ausgetauscht werden müssen.

Erst durch das Umsetzen dieser Maßnahmen ist ein fehlerfreies Verfahren des Schlittens möglich, so dass es während der Testphase von ca. 100 h zu keinem Zwischenfall gekommen ist. Die Positioniergenauigkeit unterhalb eines Wells liegt mit den hier beschriebenen Komponenten bei ausreichenden 0,5-1 mm.

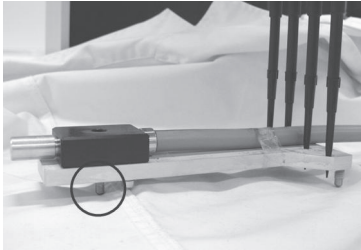


Bild: Umlenkrolle und Gewicht am Lichtwellenleiter

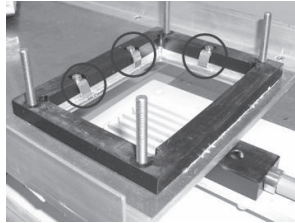


(a) ursprüngliche Winkel am Eingang der Führungsschienen

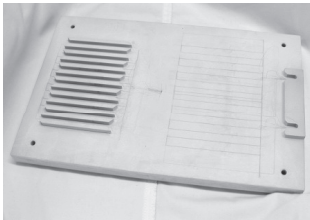
(b) modifizierte Winkel am Eingang der Führungsschienen



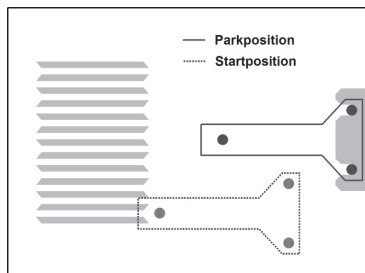
Schlitten mit eingeführten Pipettenspitzen (ohne Bodenplatte), die vordere Madenschraube mit aufgesetztem „Teflonfuß“ ist markiert.



MTP-Halterung mit markierten Federelementen, installiert auf dem Schüttler-Tablar

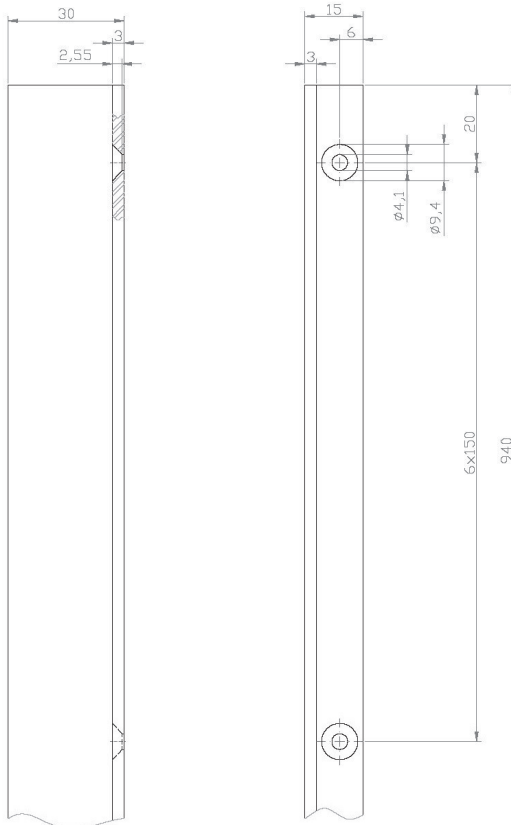


Bodenplatte mit Nuten zur Führung der vorderen Madenschraube des Schlittens



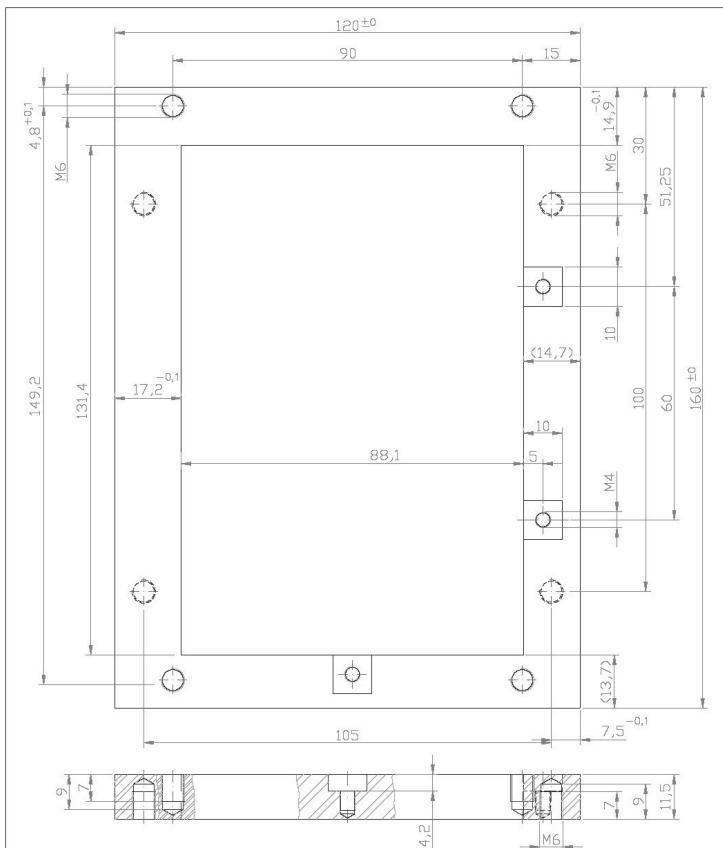


				Allgemein- toleranz ISO2768-fH		Maßstab 1 : 2		Alu		
						1x				
				Datum	Name	Schütteltablar				
				Bearb.						
				Gepr.						
				Norm						
						MTP Heizung				Blatt 2
										B
Zust.	Änderung	Datum	Name	Urspr.		Frs. für:		Frs. durch:		



Alle unbemaßten Kanten 0,5 gebrochen!

				Allgemein- toleranz ISO2768-fH		Maßstab	1 : 1	Alu
						2x		
				Datum	Name	Winkelstück		
				Bearb.				
				Gepr.				
				Norm				
						MTP Heizung		Blatt 3
Zust.	Änderung	Datum	Name	Urspr.	Ers. für:	Ers. durch:		

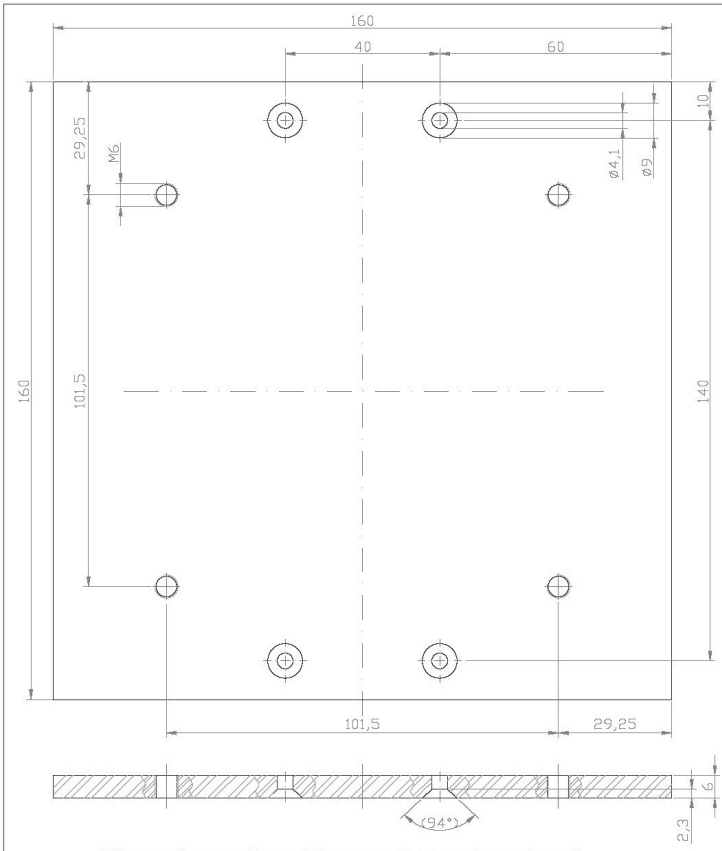


Alle unbemaßten Kanten 0,5 gebrochen!

				Allgemein- toleranz ISO2768-fH	Maßstab 1 : 1		POM	
					1x			
				Datum	Name	Halterung		
				Bearb.				
				Gepr.				
				Norm				
						MTP Heizung		Blatt 1
								B
Zust.	Änderung	Datum	Name	Urspr.	Ers. für:		Ers. durch:	

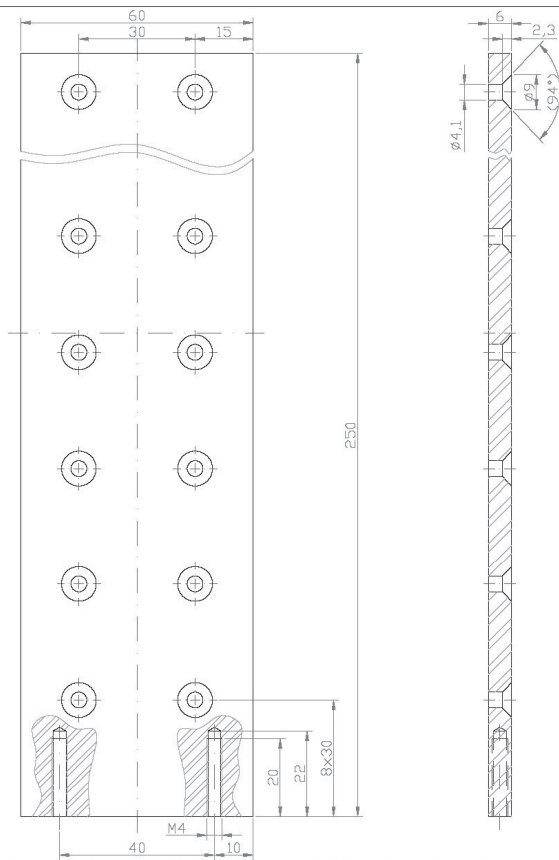


				Allgemein— toleranz ISO2768—fH		Maßstab 1 : 1		Federstahl	
						3x			
				Datum	Name	Feder			
				Beerb.					
				Gepr.					
				Norm		MTP Heizung			
Zust.	Änderung	Datum	Name	Urspr.	Ers. für:		Ers. durch:		Blatt 4
									Bl.



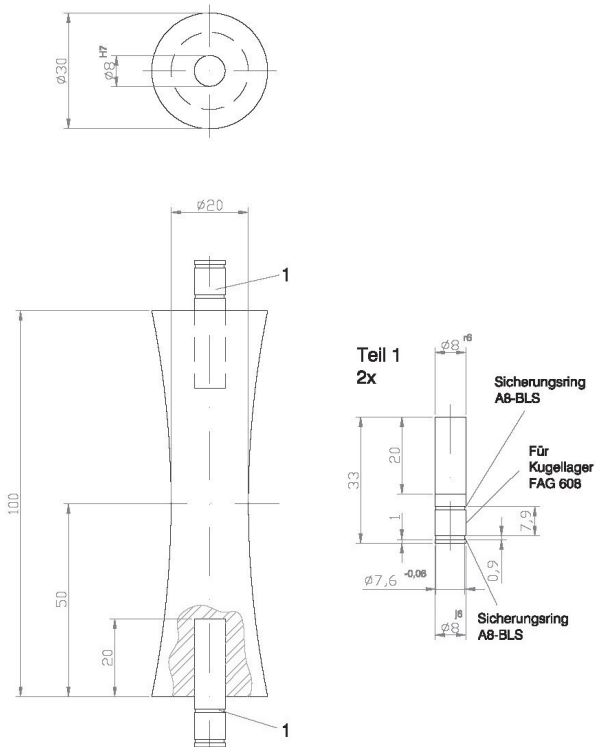
Alle unbemaßten Kanten 0,5 gebrochen!

				Allgemein- toleranz ISO2768—fH		Maßstab 1 : 1		Alu	
						1x			
					Datum	Name		Grundplatte	
					Bearb.				
					Gepr.				
					Norm				
							Umlenkrolleneinheit		Blatt 3
									Bl.
Zust.	Änderung	Datum	Name	Urspr.		Ers. für:		Ers. durch:	



Alle unbemaßten Kanten 0,5 gebrochen!

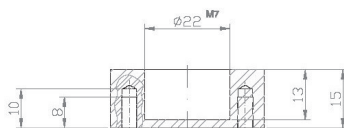
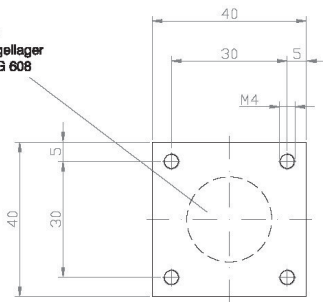
				Allgemein- toleranz ISO2768-fH		Maßstab	1 : 1	Alu
						2x		
				Datum	Name	Seitenteil		
				Bearb.				
				Gepr.				
				Norm				
							Umlenkrolleneinheit	
							Blatt	4
Zust.	Änderung	Datum	Name	Urspr.		Ers. für:	Ers. durch:	Bl.



Alle unbemaßten Kanten 0,5 gebrochen!

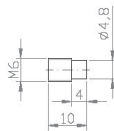
				Allgemein- toleranz ISO2768-fH	Maßstab 1 : 1	Alu
					1x	
				Datum	Name	Umlenkrolle
				Bearb.		
				Gepr.		
				Norm		
						Umlenkrolleneinheit
Zust.	Änderung	Datum	Name	Urspr.	Ers. für:	Ers. durch:
						Blatt 1
						Bl.

Für
Kugellager
FAG 608



Alle unbemaßten Kanten 0,5 gebrochen!

				Allgemein- toleranz ISO2768-fH	Maßstab 1 : 1		Alu
					2x		
				Datum	Name	Flansch	
				Bearb.			
				Gepr.			
				Norm			
							Umlenkrolleinheit
							Blatt 2
Zust.	Änderung	Datum	Name	Urspr.	Ers. für:	Ers. durch:	Bl.



Alle unbemaßten Kanten 0,5 gebrochen!

				Allgemein- toleranz ISO2768-fH		Maßstab 1 : 1		Madenschraube
						4x		
				Datum	Name	Zentrierschraube		
				Bearb.				
				Gepr.				
				Norm				
						Umlenkrolleneinheit		Blatt 5
Zust.	Änderung	Datum	Name	Urspr.		Ers. für:	Ers. durch:	Bl.

Anhang D

Elektronischer Anhang:

- Implementiertes Modell (*gPROMS* Quellcode)
- Auswertesoftware (*VBA* Quellcode)
- Software zur Ansteuerung des Enzymprüfstandes
 - Manuel zur Struktur und Programmierung
 - MSL-Quellcode
 - VBA-Quellcode
 - Textdateien
 - Liste der MSL-Funktionen

Lebenslauf

Name, Vorname: Rachinskiy, Kirill
Anschrift: Kastanienweg 13, 52074 Aachen
Geburtsdatum: 31.03.1978
Geburtsort: Charkow (Ukraine)
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulischer Werdegang:

1985 – 1992 Mittelschule, physikalisch-mathematische Schule, Charkow
1993 – 1998 Gymnasium „Siegesstraße“, Wuppertal

Studium:

1998 – 2004 RWTH Aachen, Studium des Maschinenbaus mit der
Vertiefungsrichtung Bioverfahrenstechnik

Wissenschaftlicher Werdegang:

2004 – 2008 RWTH Aachen, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik,
wissenschaftlicher Angestellter (Promotion)