

Einsatz funktioneller Magnetpartikel in der Biokatalyse: Enzymimmobilisierung, Charakterisierung und Optimierung

zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (Dr.-Ing.)

der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte
DISSERTATION

von
Dipl.-Ing. Christian Morhardt
aus Bietigheim-Bissingen

Referent: Prof. Dr. Matthias Franzreb

Korreferent: Prof. Dr. Hermann Nirschl

Tag der mündlichen Prüfung: 23.04.2015

„Le hasard ne favorise que les esprits préparés

(Der Zufall begünstigt den vorbereiteten Geist)“

Louis Pasteur (1822-1895)

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen, wenn ich nicht all die großartige Unterstützung erfahren hätte.

Ich danke meinem Betreuer Prof. Dr. Matthias Franzreb für die Aufgabestellung und die Unterstützung meiner Ideen.

Ich danke Prof. Dr. Hermann Nirschl für die Übernahme des Korreferats.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für die Finanzierung meiner Arbeit (FKZ: 0315815).

Ich danke den Projektpartnern für die produktive Zusammenarbeit: Dr. Christian Henze und Dr. Thomas Sommer von PerkinElmer chemagen, Dr. Michael Budde, Dr. Sebastian Rissom und Dr. Thomas Stillger von Sanofi sowie Dr. Berna Gerçe, Julia Stolarow und Prof. Dr. Rudolf Hausmann von der BLT II Technischen Biologie des KITs.

Ich danke besonders Benedikt Ketterer, Anna-Lena Walde, Patrick Naujoks, Christina Reichardt und Melanie Becker, die im Rahmen von Diplomarbeit, Bachelorarbeiten, Praktikum und als Teil der Ausbildung mit ihrem tatkräftigen Einsatz und vielen guten Ideen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe und des Instituts für Funktionelle Grenzflächen, die mich erst durch die Diplomarbeit und dann die Promotion begleitet und tatkräftig unterstützt haben. Allen danke ich für die hervorragende und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und dafür, dass sie mich immer an ihrem Wissen haben teilhaben lassen. Im Besonderen gilt mein Dank Dr. Ingo Fischer, Anja Paulus, Stefan Heißler und meinem langjährigen Zimmerkollegen Dr. Martín Silvestre.

Ich danke meiner Familie und ich danke Tamara für all die persönliche Unterstützung.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verwendung von Enzymen für industrielle Biotransformationen ist ein stark wachsendes Segment biotechnologischer Anwendungen. Auf Grund hoher Enzympreise kann eine Wiederverwendung durch die Immobilisierung der Enzyme auf partikuläre Trägersysteme wirtschaftlich interessant sein und findet bereits Einsatz in großtechnischen Prozessen der Lebensmittel-, chemischen und pharmazeutischen Industrie. Als interessantes Trägersystem bieten magnetische Partikel den Vorteil der einfachen Separation der immobilisierten Enzyme aus dem Reaktionsraum durch das Anlegen eines externen magnetischen Felds und erlauben so eine schonende Separation des Enzyms vom Zwischen- oder Endprodukt nach biokatalytischen Reaktionsschritten. Obwohl derartige Systeme und passende Immobilisierungsmethoden seit Jahrzehnten beschrieben werden, findet sich noch kein industrieller Prozess, in welchem Magnetpartikel als Biokatalyseträger zum Einsatz kommen. In der vorliegenden Arbeit sollte daher ein derartiger Einsatz in einem halbtechnischen Beispielprozess demonstriert werden.

Dafür wurden kommerziell verfügbare magnetische Polyvinylalkohol Partikel hinsichtlich Partikeldurchmesser, Partikelform, Partikelgrößenverteilung und Magnetisierbarkeit charakterisiert. Weiterhin wurden mit den Partikeln Extraktionsstudien durchgeführt, um zu untersuchen, ob sich die zur Partikelsynthese eingesetzten Substanzen unter Prozessbedingungen aus den Partikeln extrahieren lassen. Die Immobilisierung sollte kovalent durchgeführt werden, um ein Auswaschen des immobilisierten Modellenzym im Beispielprozess zu verhindern. Als Modellenzym diente α -Chymotrypsin, als zusätzliches Modellbiomolekül, im Hinblick auf eine technisch einsetzbare Plattform, wurde Tyrosin-Tripeptid immobilisiert. Die kovalente Immobilisierung wurde in zwei Schritten, erstens Aktivierung der Partikel mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und zweitens Kopplung des Biomoleküls an die aktivierten Partikel, durchgeführt und mittels statistischer Versuchsplanung optimiert. Es zeigte sich, dass der Aktivierungsschritt für beide Biomoleküle gleich durchgeführt werden kann. Durch den Einsatz der statistischen Versuchsplanung konnten stabile und robuste Immobilisierungsprotokolle erarbeitet werden. Das Protokoll für α -Chymotrypsin ermöglichte eine vollständige Immobilisierung bis zu einer eingesetzten Enzymkonzentration von 35 mg pro g Partikel mit einer Aktivitätsausbeute von 30 %. Für das, katalytisch nicht aktive, Tyrosin-Tripeptid konnten mittels des optimierten Protokolls im gesamten untersuchten Einsatzkonzentrationsbereich bis 107 mg/g Beladungsausbeuten größer 91 % erreicht werden.

Um eine verbesserte Prozessüberwachung der Immobilisate zu ermöglichen, wurde weiterhin eine Methode zur direkten Quantifizierung der Biomolekülbeladung auf den Partikeln entwickelt. Diese Methode basiert auf der Fourier Transformierten Infrarot Spektroskopie im Modus der Abgeschwächten Totalreflexion und einer darauf aufbauenden multivariaten Kalibration. Damit kann der zuvor nur aufwendig zu bestimmende Prozessparameter Enzymbeladung schnell und einfach mittels einer kleinen, direkt aus dem Biotransformationsprozess entnommenen, Partikelprobe analysiert werden.

Als Beispielprozess für Biotransformationen unter Einsatz magnetischer Partikel mit immobilisiertem Enzym sollte der rezyklierte Verdau des Proteins Hämoglobin durch immobilisiertes α -Chymotrypsin erfolgen. Dieser Beispielprozess wurde zunächst im Labormaßstab in fünf Rezyklierungen durchgeführt und ein Aktivitätsassay entwickelt, der auf der Entfärbung der, zu Beginn rötlich-braunen, Hämoglobin-Prozesslösung basiert. Weiterhin wurde der Labormaßstab zur Verifizierung der FTIR ATR Methode verwendet. Mit den Ergebnissen des Labormaßstabs wurde am Ende der Arbeit dieser Hämoglobin-Verdau mittels immobilisiertem α -Chymotrypsin auf einen halbtechnischen Maßstab hoch skaliert. Dafür wurden 52 g Partikel mit einer Enzymbeladung von 48 mg/g in einer 1 g/l Hämoglobin-Prozesslösung zwanzig Mal über jeweils 23 h rezykliert. Hierbei konnte mittels FTIR ATR gezeigt werden, dass die Immobilisate kein Enzym in die Prozesslösung desorbierten, die Enzymbeladung also konstant blieb. Die Hämoglobin-Verdauaktivität war über die zwanzig Zyklen zwar mit Schwankungen behaftet, nahm aber insgesamt nicht signifikant ab. Mit einer bei 4 °C gelagerten Rückstellprobe konnte ferner die Lagerstabilität der Immobilisate über 27 Tage gezeigt werden.

ABSTRACT

The usage of enzymes in industrial biotransformation processes is an emerging segment of biotechnological applications. Due to the high enzyme costs, recycling by the immobilization of the enzymes on particle-based carrier systems is economically interesting and already practiced on the industrial scale by food, chemical, and pharmaceutical industries. Magnetic particles are an interesting carrier system due to their easy separation from the reaction medium by the application of an external magnetic field. This allows for a gentle separation of the enzyme from the intermediate or final product resulting from the biocatalytic reaction. Although described for centuries now, those magnetic particle systems and suitable immobilization methods are not yet used on the industrial process scale. Therefore, it was the objective of this work to demonstrate such a usage in a semi-technical process.

Commercially available magnetic polyvinylalcohol particles were characterized for particle diameter, form, size distribution, and magnetic properties. Extraction studies were conducted to analyze whether substances used in the particle synthesis can be extracted from the particles under process conditions. For immobilization, a covalent immobilization method was used to circumvent desorption of the model enzymes in the exemplary process. α -Chymotrypsin and Tyrosine tripeptide were chosen as model biomolecules to demonstrate platform technology. The covalent immobilization was carried out in two distinctive steps: Firstly, activation of the particles by 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) and secondly, coupling of the biomolecule to the activated particles. This procedure was optimized by design of experiments approaches. One result obtained was that the activation step is the same for both biomolecules. With the help of the design of experiments approaches, stable and robust immobilization protocols were achieved. The protocol for α -Chymotrypsin led to complete immobilization of the applied enzyme up to a concentration of 35 mg per g particles and an activity yield of 30 %. For the non-catalytically active Tyrosine tripeptide, the optimized protocol yielded loadings bigger than 91 % in the whole concentration range of up to 107 mg/g.

For a better process control of the immobilizates, a direct quantification method for the immobilized biomolecule based on Fourier Transform Infrared Spectroscopy was developed. The method utilizes the Attenuated Total Reflection mode and a multivariate calibration model. With this method, it is possible to determine the formerly hard to analyze process parameter of enzyme loading in a fast and easy way, with a small particle sample being taken directly from the biotransformation process broth.

The exemplary process for a biotransformation reaction using magnetic particles with immobilized enzyme was the recycled digestion of the protein hemoglobin by immobilized α -Chymotrypsin. The process was initially accomplished on the laboratory scale in five cycles and an activity assay based on the decolorization of the ginger hemoglobin process solution was developed. Furthermore, the laboratory scale was used to verify the FTIR ATR method. With these results, hemoglobin digestion by immobilized α -Chymotrypsin was scaled up to a semi-technical scale at the end of this work. 52 g particles with an enzyme loading of 48 mg/g were used in a 1 g/l hemoglobin solution over 20 cycles with 23 h reaction time for each cycle. By the use of the FTIR ATR method, it was shown that the immobilizates did not release enzyme into the process solution and the loading therefore remained constant. The hemoglobin digestion activity did not decrease significantly over the 20 cycles. With a retained sample stored at 4 °C, storage stability of the immobilizates over 27 days was demonstrated.

INHALT

1	EINLEITUNG	13
2	STAND DER TECHNIK	15
2.1	Enzymimmobilisierung für die industrielle Biokatalyse	15
2.1.1	Industrieller Einsatz von Enzymen.....	15
2.1.2	Enzymimmobilisierung	16
2.1.3	Unporöse, magnetische Partikel zur Enzymimmobilisierung.....	18
2.1.4	Einsatz magnetischer Polyvinylalkohol Partikel.....	19
2.2	Statistische Versuchsplanung zur Optimierung	22
2.3	FTIR ATR zur quantitativen Proteinbestimmung	24
3	MATERIAL UND METHODEN.....	27
3.1	Verwendete Geräte	27
3.2	Verwendete Chemikalien	28
3.3	Verwendete Partikel	28
3.4	Partikelcharakterisierung	28
3.5	Verwendetes Enzym und Peptid	29
3.6	Verwendete Protein- und Enzymassays	29
3.6.1	Gesamtproteinbestimmung mittels BCA-Assay.....	29
3.6.2	Bestimmung der Tyrosin-Tripeptid-Konzentration mittels UV 280.....	30
3.6.3	Bestimmung der Enzymaktivität mittels Suc-AAPF-pNA	30
3.7	Immobilisierung auf magnetische Partikel	32
3.7.1	Immobilisierung mittels EDC.....	32
3.7.2	Vorbereitung und allgemeines Protokoll zur Partikelimmobilisierung.....	32
3.8	Extraktionsstudien	34
3.9	Protokolloptimierung mittels statistischer Versuchsplanung.....	36
3.9.1	Optimierung der kovalenten Immobilisierung	36
3.9.2	Screening der Aktivierungsbedingungen mit EDC.....	39
3.9.3	Optimierung der Aktivierungsbedingungen mit EDC	40
3.9.4	Erweiterung des Onion-Designs um höhere EDC-Konzentrationen.....	41
3.9.5	Optimierung der Kopplungsbedingungen von α -Chymotrypsin	41
3.9.6	Optimierung der Kopplungsbedingungen von Tyrosin-Tripeptid	42
3.10	Bestimmung der Enzym-/Peptidbeladung der Partikel mittels FTIR ATR.....	43
3.10.1	Calcium-Entfernung von den Immobilisaten.....	43
3.10.2	Vorbereitende Waschungen und Trocknung zur FTIR ATR Messung.....	43
3.10.3	Durchführung FTIR ATR Messungen	44
3.10.4	Erstellung multivariater Kalibrationsmodelle	44
3.11	Beladungskurven adsorptiver und kovalenter Immobilisierungen	46
3.11.1	Adsorptive Immobilisierung von α -Chymotrypsin	46
3.11.2	Kovalente Immobilisierung von α -Chymotrypsin	47
3.11.3	Kovalente Immobilisierung von Tyrosin-Tripeptid	48
3.12	Rezyklierung von α-Chymotrypsin-Immobilisaten im Labormaßstab.....	49
3.12.1	Rezyklierung adsorptiver α -Chymotrypsin-Immobilisate	49
3.12.2	Rezyklierung kovalenter α -Chymotrypsin-Immobilisate	50
3.13	Methodenentwicklung Aktivitätsassay Hämoglobin-Verdau	50

3.14	Scale-up der Rezyklierung kovalenter α-Chymotrypsin-Immobilisate	52
3.14.1	Durchfluss-Separator	53
3.14.2	Anlagenaufbau zum Scale-up Versuch	54
3.14.3	Bestimmung der Pumpenkennlinie und des Anlagen-Totvolumens	55
3.14.4	Durchführung der Immobilisierung	55
3.14.5	Durchführung des Hämoglobin-Verdau	58
3.14.6	Probenvorbereitung für die Analyse	59
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	61
4.1	Partikelcharakterisierung	61
4.2	Extraktionsstudien	63
4.3	Protokolloptimierung mittels statistische Versuchsplanung	64
4.3.1	Screening der Aktivierungsbedingungen mit EDC	64
4.3.2	Optimierung der Aktivierungsbedingungen mit EDC	68
4.3.3	Erweiterung des Onion-Designs um höhere EDC-Konzentrationen	72
4.3.4	Fazit aus der Optimierung der Partikelaktivierung mittels EDC	75
4.3.5	Optimierung der Kopplungsbedingungen von α -Chymotrypsin	75
4.3.6	Optimierung der Kopplungsbedingungen von Tyrosin-Tripeptid	76
4.4	Bestimmung der Enzym-/Peptidbeladung der Partikel mittels FTIR ATR	77
4.4.1	Calcium-Entfernung von den Immobilisaten	79
4.4.2	Erstellung multivariater Kalibrationsmodelle	81
4.5	Beladungskurven adsorptiver und kovalenter Immobilisierungen	82
4.5.1	Adsorptive Immobilisierung von α -Chymotrypsin	82
4.5.2	Kovalente Immobilisierung von α -Chymotrypsin	84
4.5.3	Kovalente Immobilisierung von Tyrosin-Tripeptid	90
4.6	Rezyklierung von α-Chymotrypsin-Immobilisaten im Labormaßstab	91
4.6.1	Rezyklierung adsorptiver α -Chymotrypsin-Immobilisate	91
4.6.2	Rezyklierung kovalenter α -Chymotrypsin-Immobilisate	93
4.6.3	Fazit aus den Rezyklierungen	96
4.7	Methodenentwicklung Aktivitätsassay Hämoglobin-Verdau	96
4.8	Scale-up Ergebnisse	98
4.8.1	Pumpenkennlinie und Anlagen-Totvolumen	98
4.8.2	Enzymimmobilisierung	99
4.8.3	Zwanzigfacher Hämoglobin-Verdau	100
4.8.4	Fazit des Scale-ups	105
5	FAZIT UND AUSBLICK	107
6	LITERATURVERZEICHNIS	109
7	ANHANG	117
7.1	Daten zur Protokolloptimierung mittels statistischer Versuchsplanung	117
7.1.1	Screening der Aktivierungsbedingungen mit EDC	117
7.1.2	Optimierung der Aktivierungsbedingungen mit EDC	118
7.1.3	Erweiterung des Onion-Designs um höhere EDC-Konzentrationen	119
7.1.4	Optimierung der Kopplungsbedingungen von α -Chymotrypsin	120
7.1.5	Optimierung der Kopplungsbedingungen von Tyrosin-Tripeptids	120
7.2	Akademischer Lebenslauf	122

1 EINLEITUNG

In der Mehrzahl der industriellen Biotransformationen werden Enzyme in freier Form verwendet, wodurch nur ein einmaliger Einsatz möglich ist. Durch hohe Enzymkosten ist in vielen Fällen jedoch eine Wiederverwendung wirtschaftlich interessant. Eine Möglichkeit zur Wiederverwendung ist die Immobilisierung des Enzyms auf einem Träger. Dies wird bereits bei einigen Produkten großtechnisch angewendet und führt teilweise zu jährlichen Produktionsmengen bis in den Millionen-Tonnenmaßstab (allen voran die Herstellung von Fructose-Glucose-Sirup aus Maisstärke) [1]. Die Immobilisierung findet dabei auf porösen Partikeln statt, die mechanisch, etwa über Filtration, abgetrennt werden. Für den Einsatz in kleineren Produktionsmengen hochpreisiger Chemikalien und pharmazeutischer Wirkstoffe wird durch den Einsatz von unporösen, magnetischen Mikropartikeln zur Immobilisierung eine weitere Separationsmethode ermöglicht. Durch das Anlegen eines externen magnetischen Feldes können die immobilisierten Enzyme sehr schnell aus dem Reaktionsmedium oder Produktstrom abgetrennt, gegebenenfalls gewaschen und erneut eingesetzt werden. Obwohl viele Immobilisierungsmethoden auf magnetischen Trägern und deren mögliche Anwendungsgebiete in der Literatur beschrieben und im Labormaßstab bereits in vielfältigen Anwendungen etabliert sind, gibt es bisher noch keinen technischen Prozess, der mit auf magnetischen Partikeln immobilisierten Enzymen umgesetzt ist.

Ziel der Arbeit war daher die Untersuchung des Einsatzes magnetischer Mikropartikel zur kovalenten Enzymimmobilisierung und die Anwendung der daraus resultierenden Immobilisate in einem halbtechnischen Beispielprozess. Im Rahmen des Projekts „Integrierte BioIndustrie 2021, Potential der Magnetbead-Technologie in der industriellen Biokatalyse“, in dem diese Arbeit durchgeführt wurde, wurden carboxylierte Magnetpartikel vom Projektpartner PerkinElmer chemagen zur Verfügung gestellt. Die kovalente Immobilisierung sollte mittels statistischer Versuchsplanung optimiert und zur direkten Quantifizierung der Partikelbeladung eine FTIR ATR basierete Methode entwickelt werden. Da auf Grund der geplanten Größe des Beispielprozesses sowohl das verwendete Enzym, als auch das verwendete Substrat einen nicht unerheblichen Kostenfaktor darstellten, wurden das relative billige und einfach zu beschaffende Enzym α -Chymotrypsin und für den halbtechnischen Einsatz das Substrat Hämoglobin eingesetzt. Weiterhin wurde im Labormaßstab ein Tyrosin-Tripeptid immobilisiert, um so den Einsatz von Trägersystem und Immobilisierungsmethode als Plattformanwendung zu demonstrieren.

2 STAND DER TECHNIK

2.1 Enzymimmobilisierung für die industrielle Biokatalyse

2.1.1 Industrieller Einsatz von Enzymen

Als Biokatalyse wird der Einsatz katalytisch aktiver Proteine, den Enzymen, in chemischen Reaktionen bezeichnet. Ursprünglich katalysieren Enzyme Reaktionen, die zum Überleben und Vermehren des Herkunftsorganismus notwendig sind, sie können jedoch auch in isolierter Form außerhalb lebender Zellen, z.B. in technischen Prozessen, eingesetzt werden [2]. Die biokatalysierte Umsetzung eines Ausgangsstoffs zu einem Produkt in einem oder zwei Schritten wird als Biotransformation bezeichnet und unterscheidet sich von der Fermentation, bei der deutlich mehr katalytische Schritte zwischen Substrat und Produkt liegen [3]. Die Definition ist nicht auf freie Enzyme beschränkt, auch Zellen, die zu einer spezifischen Umsetzung nur wenige Schlüsselenzyme einsetzen und metabolisch sonst nicht aktiv sind, fallen darunter [4]. Enzyme sind in ihrer Reaktion hochselektiv, arbeiten unter milden Bedingungen in Bezug auf pH, Temperatur und Lösungsmittel, sind ungiftig, biologisch abbaubar und können sogar Reaktionen durchführen, die mit konventioneller Chemie nicht möglich sind [2], [5].

Der industrielle Enzymeinsatz ist ein wachsender Multi-Milliarden-Markt mit einem Marktwert von 4,5 Mrd. \$ (2012), bzw. 4,8 Mrd. \$ (2013) und einem erwarteten Marktwert von 7,1 Mrd. \$ für 2018, bei einer jährlichen Wachstumsrate von 8,2 % [6]. Der Markt deckt den Enzymeinsatz in Waschmitteln, in der Textilproduktion, der Lebensmittelherstellung, der Papierherstellung, der Kraftstoffproduktion und der Abwasserbehandlung ab [5]. Ebenso finden Enzyme Einsatz in der biotechnologischen Forschung und Entwicklung, der Diagnostik und der pharmazeutischen Industrie [1]–[3]. Besonders häufig werden Hydrolasen eingesetzt (Amylasen, Proteasen, Cellulasen, Lipasen, etc.) [1], Straathof et al. fassten 2002 134 industriell genutzte Biotransformationsprozesse zusammen. Davon setzten 44 % Hydrolasen ein, gefolgt von 30 % Oxidoreduktasen. Der Rest entfiel auf Transferasen, Lyasen und Isomerasen. Gut ein Viertel der aufgeführten Prozesse setzten die Enzyme in immobilisierter Form ein [4]. End et al. stellten 2004 65 Prozesse zusammen, die ausschließlich immobilisierte Enzyme einsetzten, davon wurden 50 % tatsächliche zur Produktion verwendet, während sich die anderen 50 % im Labor- bis Pilotmaßstab befanden. 80 % dieser Prozesse setzten Hydrolasen ein [7]. Die mit immobilisierten Enzymen industriell hergestellten Produktmengen sind teils beträchtlich, in Tabelle 1 sind die neun Produkte mit der größten jähr-

lichen Produktionsmenge (bezogen auf 2013), die mit Hilfe immobilisierter Enzyme und quervernetzter Zellen hergestellt werden, aufgeführt [1].

Tabelle 1: Die größten Industrieprozesse im Jahr 2013, die immobilisierte Enzyme nutzen [1]. QZ = quervernetzte Zellen; IE = immobilisierte Enzyme (Immobilisierungsmethode nicht genannt); KIE = Kovalent immobilisierte Enzyme.

Enzym	Immobilisierung	Prozess	Produktmenge (t/a)
Glucose Isomerase	QZ, IE, KIE	Fructose-Glucose-Sirup aus Maissirup	10 ⁷
Nitril Hydratase	QZ	Acrylamid aus Acrylnitril	10 ⁵
Lipase	IE	Umesterung von Lebensmittelölen	10 ⁵
Lactase	IE	Lactose-Hydrolyse, Galactooligosaccharidsynthese	10 ⁵
Lipase	IE	Biodiesel aus Triglyceriden	10 ⁴
Penicillin G Acylase	KIE	Antibiotikamodifikationen	10 ⁴
Aspartase	QZ, IE	L-Asparaginsäure aus Fumarsäure	10 ⁴
Thermolysin	IE	Aspartamsynthese	10 ⁴
Lipase	IE, KIE	Racematspaltung von Alkoholen und Aminen	10 ³

2.1.2 Enzymimmobilisierung

Die Immobilisierung von löslichen Enzymen auf unlöslichen Trägern und die Anwendung dieser heterogenen Biokatalysatoren in technischen Prozessen haben einige entscheidende Vorteile. Teilweise ermöglicht erst die Immobilisierung den technischen Einsatz in Batch- oder kontinuierlicher Fahrweise, vor allem aber vereinfacht sich die Abtrennung der Enzyme aus der Reaktionslösung und deren Wiederverwendung [1], [8], [9]. Weiterhin kann sich die Immobilisierung positiv auf die Enzymstabilität in den Reaktionslösungen auswirken [2]. Dies führt zu einer besseren Prozesskontrolle bei reduzierten Prozesskosten, unter der Voraussetzung, dass die immobilisierten Enzyme weiterhin das Substrat auf die gewünschte Weise umsetzen [10]. Mögliche Nachteile der Immobilisierung sind die Veränderung des aktiven Zentrums des Enzyms und die Reduktion seiner Bewegungsfreiheit und daher eine verringerte Enzymaktivität [2], [8]. Verschiedene physikalische und chemische Eigenschaften müssen bei der Auswahl eines Trägers, einer Immobilisierungsmethode und der Betrachtung des Enzym/Träger-Systems berücksichtigt werden. Dazu gehören z.B. Größe, Form und Ladung, funktionelle Gruppen, Stabilität und Beständigkeit, Reaktionsparameter wie Aktivität, Selektivität, pH- und Temperaturprofil, weiterhin Sicherheitsbedenken und wirtschaftliche Faktoren [10], [11].

Neben der Immobilisierung auf oder in Trägern existiert die Möglichkeit der Vernetzung der Enzyme untereinander (engl. cross-linked enzyme aggregates, CLEA) und das Einbringen der Enzyme in löslicher Form in semipermeable Membranen. Auch die Immobilisierung von ganzen Zellen kann vorteilhaft sein, z.B. wenn eine Kofaktorregeneration notwendig ist oder

mehr als ein Enzym für eine Aufgabe eingesetzt werden muss [2], [4]. Die Immobilisierung kann adsorptiv, beispielweise durch hydrophobe Interaktion, ionische Bindung oder Metallchelatkombildung geschehen oder durch eine kovalente Bindung, der stärksten Form der Immobilisierung [2], [12]–[14]. Die kovalente Bindung minimiert die Gefahr eines Enzymverlusts (engl. leaching) in das Reaktionsmedium und die Verunreinigung des Produkts [12].

Tabelle 2: Funktionelle Gruppen in Proteinen, die für die Immobilisierung relevant sind [2], [8], [15].

Funktionelle Gruppe	pK _a	Durchschnittlicher Anteil in Proteinen [%]	Insgesamt vorhanden in α-Chymotrypsin / an der Proteinoberfläche verfügbar [Anzahl]
Amino-, bzw. Guanidino-			
Lysin-NH ₂	10,5		13 / >11
Arginin-NH ₂	> 12	7	2
N-Terminus Peptidkette	7,8		1
Carboxy-			
Aspartat-COO ⁻	3,9	4,8	21 / 7–8
Glutamat-COO ⁻	4,1	4,8	
C-Terminus Peptidkette	2,3		1
Andere			
Tyrosin-OH	9,9 / 10,9	3,4	4
Tryptophan-NH		1,2	7–8
Histidin- (Imidazolring)	6,9 / 6,0	3,4 / 2,2	
Cystein-SH	8,9		

Von der Trägerseite ausgehend sind eine große Anzahl funktioneller Gruppen beschrieben worden und können zur Enzymimmobilisierung eingesetzt werden. Ein Überblick dazu findet sich bei Cao [10]. Von Seite des Enzyms stehen neben dem N- und C-Terminus der Peptidkette auch die Seitenketten der Aminosäuren zur kovalenten Immobilisierung zur Verfügung, wenn sie sich an der Proteinoberfläche befinden. Tabelle 2 zeigt dazu, neben den pK_a-Werten der entsprechenden funktionellen Gruppen, deren durchschnittlichen Anteil in Proteinen, die Anzahl bei α-Chymotrypsin insgesamt und an der Proteinoberfläche verfügbar. Zumeist werden die Amino-Seitenketten von Arginin und Lysin sowie die Carboxy-Seitenketten von Asparaginsäure und Glutaminsäure zur Immobilisierung verwendet [2]. Der Protonierungszustand der verwendeten Gruppen ist von entscheidender Bedeutung für die dazu passenden Immobilisierungsreaktionen. Es ist wichtig, den pH-Wert der Kopplungsreaktion entsprechend der pK_a-Werte der funktionellen Gruppen anzupassen, da diese im deprotonierten (R-COO⁻), bzw. neutralen (R-NH₂) Zustand starke Nucleophile sind und somit eher kovalente Bindungen eingehen, als dies in protonierter Form der Fall ist [15].

2.1.3 Unporöse, magnetische Partikel zur Enzymimmobilisierung

Der Einsatz von magnetischen Partikeln in biomedizinischen, biochemischen und biotechnologischen Anwendungen ist weitverbreitet und beinhaltet unter anderem die Verwendung als NMR-Kontrastmittel, zum Nachweis von Bakterien, zur Wirkstoffverabreichung (engl. drug delivery), zur Proteinseparation und -aufreinigung und zur Enzymimmobilisierung [16], [17]. Im Folgenden wird allein auf den Einsatz magnetischer Partikel mit immobilisiertem Enzym als Biokatalysator eingegangen.

Die Anforderungen an magnetische Partikel sind eine hohe Magnetisierbarkeit, Stabilität und Biokompatibilität [17]. Eine besonders erwünschte Eigenschaft ist superparamagnetisches Verhalten. Superparamagnetismus bedeutet eine schnelle Aufmagnetisierung bei angelegtem magnetischem Feld und vernachlässigbare Remanenz (Restmagnetismus) und Koerzitivität (das notwendige magnetische Feld, um die Magnetisierung vollständig aufzuheben) [18], [19]. Das bedeutet, dass die Partikel magnetisiert werden, wenn sie einem magnetischen Feld ausgesetzt sind, aber keine permanente Magnetisierung (Remanenz) zeigen, sobald das Feld ausgeschaltet wird [17]. Um superparamagnetisches Verhalten zu zeigen, muss die Partikelgröße von Magnetitkristallen unterhalb einer kritischen Größe liegen, typischerweise befindet sich diese zwischen 10–20 nm. Magnetische Nanopartikel dieser Größe haben ein großes magnetisches Moment und verhalten sich wie riesige paramagnetische Atome. Superparamagnetisches Verhalten ist vorteilhaft, um die Partikelagglomeration in Folge einer vorhergegangenen Magnetseparation zu minimieren [18]. Magnetische Nanopartikel auf Eisenoxidbasis zeigen eine vielversprechende Biokompatibilität, d.h. sie stellen keine Gefahr für Mensch und Umwelt dar, und können mit organischen Materialien (Polymeren), metallischen Materialien (z.B. Gold) oder Oxiden (z.B. Silica oder Aluminum) funktionalisiert werden, um die Dispergierbarkeit zu erhöhen und die Einbringung bioaktiver Moleküle zu ermöglichen [17].

Es ist möglich direkt auf magnetische Nanopartikel zu immobilisieren. So wurde beispielsweise Lipase kovalent auf Partikel mit einer Größe von 12 nm gebunden [20]. Die direkte Kopplung hat mögliche Vorteile, wie ein großes Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis auf Grund der kleinen Größe und eine höhere spezifische Magnetisierung, da auf zusätzliche, unmagnetische Bestandteile verzichtet wird [19]. Die Nachteile dieser Partikel sind ihre chemische Reaktivität, die einfache Oxidierbarkeit durch Luftsauerstoff und die Instabilität gegenüber sauren Lösungen [18]. Daher ist der Einsatz synthetischer und natürlicher Polymere zur Beschichtung (engl. Coating) oder zum Einschluss (engl. Entrapment) der magnetischen Nanopartikel in eine Matrix vorteilhaft [16], [21]–[23]. Synthetische Polymere sind inert ge-

genüber mikrobiologischen Angriffen, zeigen eine hohe chemische Resistenz, ermöglichen den Einsatz komplexer Pufferkomponenten und sind zumeist billig und einfach verfügbar [19]. Ein möglicher Nachteil ist, dass das Coating mit Polymeren zur unspezifischen Adsorption von unerwünschten Komponenten führen kann (z.B. durch ionische oder hydrophobe Interaktion) [17].

Durch das Coating, bzw. den Einschluss der Nanopartikel in eine Polymermatrix kann sich die Größe der neu erstellten Partikel gegenüber den Nanopartikeln erhöhen, Partikelgrößen im Mikrometerbereich bis hin zu mehreren hundert Mikrometern sind möglich [22]. Abhängig von den Synthesemethoden und benutzten Polymeren können die neuen Partikel porös oder unporös gegenüber den zu immobilisierenden Komponenten sein. Poröse Partikel können zum einen eine größere Oberfläche für die Enzymimmobilisierung zur Verfügung stellen und die Enzyme durch die Immobilisierung in den Poren gegenüber harschen Umgebungsbedingungen schützen [24]. Zum anderen können sie zu Diffusionslimitierungen der Enzymreaktionen führen, da das Substrat erst in die Poren eindringen muss [25]. Unporöse Materialien auf der anderen Seite haben kleinere verfügbare Oberflächen für die Enzymimmobilisierung, aber das Enzym wird auf der "äußeren" Partikeloberfläche immobilisiert, wodurch eine Massentransferlimitierung, ebenso wie eventuelles Fouling in den Poren, minimiert wird. Solange sich die Partikelgröße in einem unteren Mikrometerbereich befindet, ist das Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis für die Immobilisierung auf unporösen Partikeln ausreichend [22]. Weitere wünschenswerte Eigenschaften unporöser, magnetischer Partikel sind [13]:

- Resistenz gegenüber Oxidation in wässrigen Lösungen
- Liganden / Enzyme sind aktiv und stabil auf der Oberfläche
- Stabile Verbindung zwischen immobilisierten Molekülen und der Oberfläche
- Mechanische Stabilität in gerührten Reaktoren
- Ausreichend magnetisches Verhalten für eine einfache Separation
- Keine (magnetische) Agglomeration im Reaktor

2.1.4 Einsatz magnetischer Polyvinylalkohol Partikel

Polyvinylalkohol (PVA) bietet Vorteile, die es als Matrixmaterial für die Magnetpartikelsynthese interessant machen: Es ist einfach verfügbar, billig, besitzt Hydroxylgruppen für chemische Reaktionen und hat einen hydrophilen Charakter [26], welcher zu geringen unspezifischen Proteinbindungen führt [27]. In der Literatur finden sich Arbeiten zu selbstsynthetisierten und kommerziellen magnetischen PVA Partikeln. Akgöl et al. synthetisierten magnetische PVA Partikel und immobilisierten Invertase kovalent auf diese Partikel über Carbonyldiimida-

zol (CDI). Die Partikelgröße betrug 5–40 μm und die Partikel waren porös. Die Immobilisate wurden in einem Festbettreaktor für die Hydrolyse von Saccharose eingesetzt und hydrolysierten nach 40 h Prozesszeit noch 83 % der aufgegebenen Saccharose (100 % Hydrolyseeffizienz während der ersten zwölf Stunden) [26]. Neri et al. befassten sich in drei Veröffentlichungen mit der Synthese und dem Einsatz magnetischer Polysiloxan-Polyvinylalkohol (POS-PVA) Partikel [28]–[30]. Die Partikel waren porös und dienten zur Immobilisierung von zwei β -Galactosidasen und einer Xanthin Oxidase und wurden für die Hydrolyse von Lactose [28], die Galactooligosaccharid (GOS)-Produktion während der Lactose-Hydrolyse [29] und die Oxidation von Xanthin zu Urea [30] eingesetzt. Die Immobilisate wurden in 10–20 Zyklen in den entsprechenden Reaktionssystemen wiederverwendet und zeigten anschließend 50–84 % ihrer ursprünglichen Aktivität. Bruno et al. immobilisierten Lipase auf ebenfalls selbst synthetisierte POS-PVA Partikel unter Verwendung von Glutaraldehyd und testeten das Immobilisat mit dem synthetischen Lipasesubstrat p-Nitrophenylpalmitat (pNPP). Nach sieben Zyklen zeigten die Immobilisate noch 11 % ihrer ursprünglichen Aktivität [31].

Kommerziell verfügbar sind magnetische PVA Partikel von PerkinElmer chemagen (Produktname: M-PVA). Die Synthese dieser Partikel in Wasser-in-Öl Emulsionen geht zurück auf die Arbeiten von Müller-Schulte [32], [33]. Chemagen bietet diese Partikel primär für die diagnostische DNA Aufreinigung aus Blut an, wie von Oster et al. beschrieben [27]. Neben dieser Verwendung werden M-PVA Partikel mit diversen Funktionalisierungen angeboten, welche Carboxy-, Amino- und Epoxy-Funktionalisierungen beinhalten. Die Verwendung carboxylierter M-PVA Partikel zur kovalenten Immobilisierung von Oligonucleotiden wurde ebenfalls von Oster beschrieben [27]. Es finden sich einige Veröffentlichungen zur Enzymimmobilisierung auf chemagen M-PVA Partikel in der Literatur. Die Arbeiten von Bozhinova et al. beinhalten die Immobilisierung von Penicillin Amidase auf epoxy- und aminofunktionalisierten M-PVA Partikeln, im Falle der Aminofunktionalisierung unter Verwendung von Glutaraldehyd [34], [35]. Die Immobilisate wurden zur Hydrolyse von Benzylpenicillin und zur Synthese von Cephalexin verwendet. Magario immobilisierte Naringinase auf aminofunktionalisierten M-PVA Partikeln mittels 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC). Das Immobilisat wurde zur Hydrolyse von di-Rhamnolipid zu mono-Rhamnolipid und l-Rhamnose verwendet und die Ergebnisse mit denen von Naringinase, immobilisiert auf porösen Sepharose Partikeln, verglichen [36], [37]. Hierbei zeigten die unporösen M-PVA Partikel einen höheren Umsatz des Substrats als die porösen Partikel, was mit der starken Diffusionslimitierung der Reaktionsrate im Falle der porösen Partikel erklärt wurde. Nach der Wiederverwendung über vier Zyklen zeigten die Immobilisate noch 75 % ihrer ursprünglichen Aktivität, wobei der Verlust von 25 % der ursprünglichen Aktivität bereits nach dem ersten Zyklus eintrat und die Aktivität anschließend konstant blieb [38]. Schultz immobilisierte Lipase auf epoxy-, carboxy-

und aminofunktionalisierten M-PVA Partikeln [39]–[42]. Die Immobilisierung auf carboxyfunktionalisierten Partikeln erfolgte mittels EDC. Die Immobilisate wurden auf ihre Zetapotentiale hin charakterisiert [39], weiterhin über 20 Zyklen rezykliert und mittels Hochgradient-Magnetseparator (HGMS) separiert [41]. Nach den 20 Zyklen hatten die Immobilisate noch 14 % ihrer ursprünglichen Aktivität. Marín-Navarro et al. immobilisierten β -Galactosidase auf epoxyfunktionalisierten M-PVA Partikeln und verwendeten das Immobilisat über zehn Zyklen für die Hydrolyse von Lactose und für die Synthese von Galactooligosaccharid (GOS) [43]. Alle aufgeführten magnetischen PVA Partikel und ihre jeweilige Anwendung sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Magnetische PVA Partikel und ihre Anwendung.

Partikel	Größe [µm]	Porosität	Enzym (Herkunftsorganismus)	Einsatz	Recycling / Aktivität nach Recycling	Quelle
Selbstsynthetisierte magnetische PVA Partikel	5–40	porös	Invertase (Bäckerhefe)	Saccharosehydrolyse	Festbettreaktor / nach 40 h 83 % der ursprünglichen Aktivität	[26]
Selbstsynthetisierte magnetische POS-PVA Partikel	20	porös	β -Galactosidase (Kluyveromyces lactis)	Lactosehydrolyse, oNPG-Assay	20 Zyklen oNPG / ca. 50 % der ursprünglichen Aktivität	[28]
Selbstsynthetisierte magnetische POS-PVA Partikel	20	porös	β -Galactosidase (Aspergillus oryzae)	Lactosehydrolyse, GOS Synthese	10 Zyklen Lactose / 84 % der ursprünglichen Aktivität	[29]
Selbstsynthetisierte magnetische POS-PVA Partikel	20	porös	Xanthin Oxidase (Kuhmilch)	Oxidation von Xanthin zu Urea	10 Zyklen / 83 % der ursprünglichen Aktivität	[30]
Selbstsynthetisierte magnetische POS-PVA Partikel	37	porös	Lipase (Mucor miehei)	pNPP-Assay	7 Zyklen / 11 % der ursprünglichen Aktivität	[31]
chemagen M-PVA E02 Epoxy- M-PVA N12 Amino- partikel	1–3	unporös	Penicillin Amidase (E.coli)	Benzylpenicillinhydrolyse, Cephalalexinsynthese	-	[34], [35]
chemagen M-PVA N12 Amino- partikel	1–3	unporös	Naringinase (Penicillium decumbens)	di-Rhamnolipidhydrolyse	4 Zyklen / 75 % der ursprünglichen Aktivität	[38]
chemagen M-PVA E02 Epoxy-, M-PVA N12 Amino-, M-PVA C12 Carboxypartikel	1–3	unporös	Lipase (Candida antarctica)	Tributyrylhydrolyse	20 Zyklen / 14 % der ursprünglichen Aktivität	[39]–[42]
chemagen M-PVA E02 Epoxy- partikel	1–3	unporös	β -Galactosidase (Thermotoga maritima)	Lactosehydrolyse, GOS Synthese	10 Zyklen Lactose / 60 % der ursprünglichen Lactosehydrolyse	[43]

2.2 Statistische Versuchsplanung zur Optimierung

Der Einsatz statistischer Methoden zur Planung von Versuchsreihen und Auswertung der daraus resultierenden Ergebnissen wird als statistische Versuchsplanung (engl. Design of Experiments, DoE) bezeichnet. Es geht, wie bei jeder Versuchsplanung, darum, den Einfluss der Änderung experimenteller Faktoreinstellungen auf das Resultat zu bestimmen [44]. Im Gegensatz zur „klassischen Herangehensweise“, bei der nur ein Faktor verändert wird, während alle anderen konstant gehalten werden (engl. Change One Separate thing at a Time, COST), werden bei DoE-Ansätzen mehrere Faktoren gleichzeitig variiert. Aus den Versuchsergebnissen werden empirische Modelle erstellt, die einen Zusammenhang zwischen Faktoreinstellung und Resultat mathematisch beschreiben und zur Vorhersage von Ergebnissen innerhalb der untersuchten Bereiche genutzt werden können. Dadurch ist es möglich, die Anzahl der notwendigen Versuche deutlich gegenüber dem COST-Ansatz zu verringern, selbst wenn quadratische Faktoreinflüsse eine Rolle spielen. Weiterhin ist es möglich zusätzliche Prozessinformationen zu gewinnen, da Wechselwirkungen zwischen Faktoren identifiziert werden können, was beim COST-Ansatz nicht möglich ist. Als dritter Vorteil kann beim DoE-Ansatz innerhalb des untersuchten Raums ein globales Optimum gefunden werden, während der COST-Einsatz gegebenenfalls nur ein lokales identifiziert [45]. Ein grafischer Vergleich der beiden Methoden ist in Abbildung 1 dargestellt. Eine Möglichkeit der Modellerstellung ist die Multiple Lineare Regression (MLR). Ein quadratisches, polynomiales Modell zur Regression der erhaltenen Ergebnisse einer DoE-Versuchsreihe folgt der allgemeinen Darstellung in Formel (2.1). Dabei bezeichnen β_0 , β_i , β_{ii} und β_{ij} die Regressionskoeffizienten für den Achsenabschnitt, lineare, quadratische und Interaktionsanteile. X_i und X_j sind unabhängige Faktoren.

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (2.1)$$

In der Praxis finden DoE-Ansätze Anwendung im Screening, in der Optimierung und der Untersuchung der Robustheit von Versuchsbedingungen und Prozessen. Im Screening sollen die wichtigsten Einflussfaktoren und deren Wertebereiche auf einen Prozess gefunden werden. Bei der Optimierung werden diese Einflussfaktoren genauer untersucht, mit dem Ziel ein empirisches Modell im untersuchten Bereich zu erstellen und so die Optimalwerte der Faktoren zu bestimmen. Bei der Untersuchung der Robustheit soll der Einfluss kleiner Schwankungen der Faktoren auf das Ergebnis untersucht werden, um so vertretbare Wer-

tebereich dieser Faktoren, beispielsweise für ein gleichbleibendes Produktionsergebnis zu identifizieren [46].

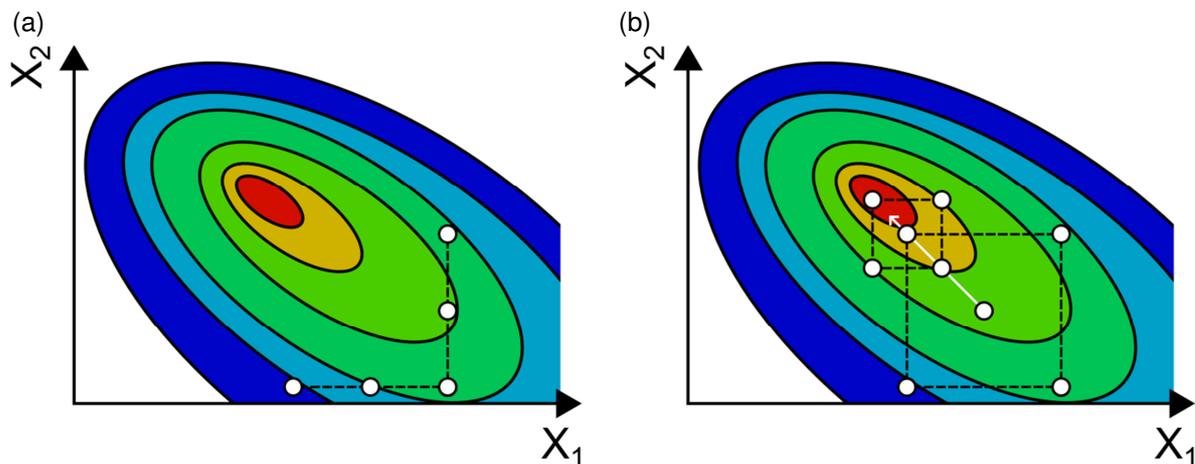


Abbildung 1: (a) Beim COST Ansatz wird, auf Grund der fehlenden Möglichkeit Wechselwirkungen zwischen Faktoren zu detektieren, nur ein Quasi-Optimum erreicht. Während X_2 konstant gehalten wird, wird X_1 über drei Experimente variiert. Vom Optimum dieser Variation (der Datenpunkt rechts unten) wird eine Variation von X_2 durchgeführt. (b) Beim DoE Ansatz werden beide Faktoren gleichzeitig variiert, wodurch verschiedene Abhängigkeiten identifiziert werden können und das mathematische Modell zeigt die Richtung des Optimums an. Durch eine weitere Versuchsreihe kann so das echte Optimum gefunden werden [44], [45], [47].

DoE wird zur Lösung verschiedenster Fragestellungen in chemischen und biotechnologischen Prozessen angewendet [48]. Besonders in der pharmazeutischen Wirkstoffforschung und -entwicklung hat der Einsatz von DoE in den letzten Jahren stark zugenommen. Einige Gründe für diesen Trend sind der gestiegene Zeit- und Kostendruck, regulatorische Anforderungen (die amerikanische Arzneimittelbehörde FDA erwartet bei der Einreichung neuer Wirkstoffe den Einsatz von DoE während der Forschung) und technologische Entwicklungen, wie z.B. High-throughput screening [49].

DoE bietet sich für alle biotechnologische Prozessschritte an, von der Optimierung des Prozessmediums und der Prozessparameter (z.B. Temperatur, pH, Feed-Rate, Rührergeschwindigkeit) im Upstream, über die Untersuchung von Aufreinigungsschritten (z.B. Separation via Chromatographie und Extended-Bed Adsorption) und die Optimierung der Biotransformation von Antibiotika-Vorstufen mittels immobilisierter Enzyme [47]. Auch die Synthese von, für Immobilisierungen einsetzbaren, Partikeln wurden mittels DoE untersucht und optimiert. Martin et al. setzten DoE zur Synthese von Polystyrol/Divinylbenzol-Copolymer Partikel mit magnetischem Edelstahlkern ein. Die notwendige Versuchsanzahl der acht untersuchten Faktoren (u.a. Rührerdrehzahl und Crosslinker-Konzentration) reduzierte sich dadurch von 256 auf 32 [50]. Biró et al. optimierten bei der Synthese von Chitosan Partikeln

zur Enzymimmobilisierung die vier untersuchten Faktoren (u.a. ebenfalls Rührerdrehzahl und Crosslinker-Konzentration) in insgesamt 43 Experimenten [51].

Die Enzymimmobilisierung selbst kann Gegenstand von DoE-Ansätzen sein: Gofferjé et al. verwendeten die Enzymbeladung als einen der vier untersuchten DoE-Faktoren bei der Untersuchung der Veresterung freier Pflanzenfettsäuren mit Glycerin unter Verwendung immobilisierter Lipase [52]. Die Immobilisierung einer kommerziellen Trypsin/Chymotrypsin-Mischung auf modifizierten Polyvinylchlorid Partikeln wurde von Li et al. mittels eines DoE-Ansatzes optimiert. Im Optimum besaßen die Immobilisate eine ähnliche Aktivität beim Caseinverdau wie das freie Enzymgemisch und zeigten nach sechs Rezyklierungen noch 70 % der ursprünglichen Aktivität [53]. Bei der Immobilisierung von α -Chymotrypsin auf magnetischen Chitosan Partikeln mittels EDC erzielte die DoE-Optimierung der Faktoren pH, Temperatur und Zeit über 15 Versuche bei Ju et al. eine ebenfalls vergleichbare Aktivität bei der Synthese von Dipeptid-Derivaten, verglichen mit dem freien Enzym und nach zwölf Rezyklierungen waren noch 60 % der ursprünglichen Aktivität vorhanden [54].

2.3 FTIR ATR zur quantitativen Proteinbestimmung

Neben der Bestimmung der Aktivität von immobilisierten Enzymen ist auch die Bestimmung der Beladung der unporösen M-PVA Partikel mit diesen Enzymen ein wichtiger Parameter zur Charakterisierung der Immobilisate. Im Labormaßstab wird die Masse des gebundenen Peptids oder Enzyms aus der Differenz der eingesetzten Biomolekülmasse und der nicht immobilisierten Biomolekülmasse, die nach der Immobilisierung in der Immobilisierungslösung und den nachfolgenden Waschlösungen quantifiziert werden kann, berechnet. Die direkte Bestimmung des gebundenen Biomoleküls mit bekannten nasschemischen Methoden, wie dem auf der Reduktion von Kupferionen mit anschließender Komplexierung mittels Bicinchoninsäure (engl. biconchonic acid, BCA) aufbauenden BCA-Assay, scheitert, da der Eisen(II)-anteil der Partikel selbst Kupfer reduziert und den BCA-Assay daher stört [55]. Bei anderen Assays, wie beispielsweise dem Proteinassay nach Bradford, kann der sich bildende Farbkomplex aus Comassie Blau und Biomolekül nicht mehr detektiert werden, da die Partikel die spektrometrische Messung unmöglich machen.

Die Beladung der Partikel im Labormaßstab zu bestimmen, etwa für Optimierungsversuche, ist über die indirekte Überstandsmethode zwar zeitintensiv, aber leicht möglich, bedingt durch kontrollier- und reproduzierbare Probenhandhabungen. Soll die Bestimmung der Beladung der Partikel auch der Prozesskontrolle in einem industriellen Prozess dienen, etwa um

ein eventuelles Desorbieren von Enzym in die Prozesslösung wegen einer fehlerhaften, nur vermeintlich kovalenten, Immobilisierung zu detektieren, so sind indirekte Methoden auf Grund der deutlich größeren Prozessvolumina und daher niedrigeren (eventuellen) Enzymkonzentrationen nicht mehr möglich. Weiterhin würden andere Biomoleküle, die eventuell in der Reaktionslösung enthalten sind, indirekte Methoden erschweren oder unmöglich machen.

Zur Lösung des Problems bietet sich eine direkte Methode der Quantifizierung von immobilisiertem Peptid oder Enzym auf magnetischen Partikeln mittels Fourier Transformierter Infrarot Spektroskopie (FTIR) an, im speziellen Fall der unporösen, kleinskaligen Partikel im Modus der Abgeschwächten Totalreflexion (engl. Attenuated Total Reflection, ATR). FTIR ATR wurde in jüngerer Vergangenheit vermehrt in der Bioprozesskontrolle eingesetzt [56]. Der Einsatz erfolgte zur Überwachung der Fermentation von Ethanol [57], Exopolysacchariden [58], Rhamnolipiden [59] und monoklonalen Antikörpern [60]. Ebenso wurden verschiedene Biotransformationen einer Amidase [61] und Nitril-Biotransformationen durch Bakterienzellen untersucht [62].

Das Messprinzip der FTIR im Modus ATR ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Im Gegensatz zur FTIR im Modus Transmission durchdringt der IR-Strahl die Probe nicht, sondern wird in einen ATR-Kristall, auf dem sich die Probe befindet, unter einem Winkel der Totalreflexion θ eingekoppelt. Unter der Voraussetzung, dass der Brechungsindex der Probe n_2 kleiner ist als der Brechungsindex des Kristalls n_1 , entsteht an der Grenzfläche zwischen Kristall und Probe ein evaneszentes Feld, das in die Probe mit einer geringen Eindringtiefe eindringen und nach den Auswahlregeln der IR-Spektroskopie (Dipolverschlebung durch die Anregung mittels IR-Strahl) wechselwirken kann.

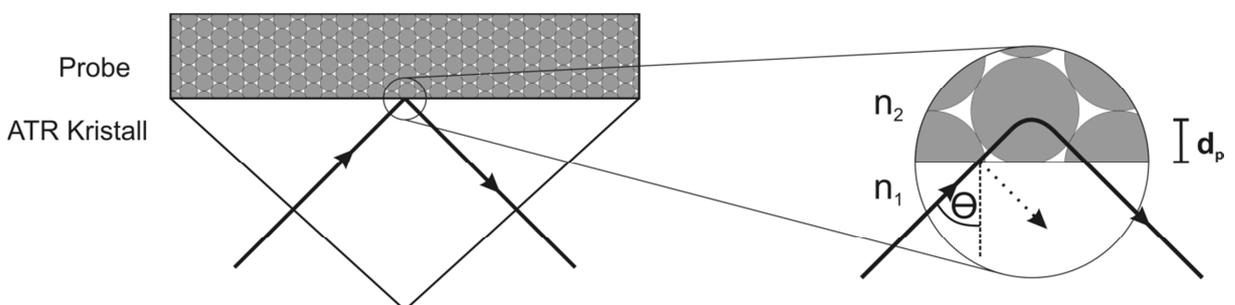


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Messprinzips der Abgeschwächten Totalreflexion.

Die Eindringtiefe berechnet sich mit der Wellenlänge λ , dem Kristall-Brechungsindex n_1 und dem Proben-Brechungsindex n_2 nach folgender Formel:

$$d_p = \frac{\lambda}{2 \pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \Theta - n_2^2}} \quad (2.2)$$

Der Vorteil der FTIR-Messung im ATR Modus gegenüber dem Transmissionsmodus liegt in der Möglichkeit opake, je nach Probenbeschaffenheit sogar schwarze Proben zu messen, welche im Transmissionsmodus den gesamten IR-Strahl absorbieren und daher eine Messung unmöglich machen würden. Weiterhin sind, auf Grund der geringen Eindringtiefe, auch Messungen in wässrigen Lösungen möglich [63], was in einigen der oben genannten Literaturbeispielen auch praktiziert wurde.

Um aus bekannten Proben eine Kalibration zu erstellen, gegen die unbekannte Proben quantifiziert werden können, bietet sich eine multivariate Kalibration an [64]–[67]. Anstatt, wie bei der univariaten Kalibration, nur einen einzelnen Wert des gemessenen Spektrums zur Kalibration zu verwenden, z.B. den Absorbanzwert oder die Integration einer spezifischen Bande, wird entweder das gesamte Spektrum oder ein bestimmter, größerer Teil des Spektrums zur Kalibration verwendet. Im Falle der M-PVA Partikel ermöglicht die multivariate Kalibration die Biomolekülquantifizierung, die per univariater Kalibration, auf Grund der überlappenden Banden der carboxylierten M-PVA Partikel und der gebundenen Biomoleküle, nur eingeschränkt durchführbar wäre.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Verwendete Geräte

Geräte und Zubehör	Hersteller: Bestellnummer
Alternating Gradient Magnetometer (AGM) Micromag 2900	Princeton Measurements
CIS 100 Partikelgrößenmessung	Galai
DX-500 Ionenchromatograph	Dionex
Enspire UV-Spektrometer	PerkinElmer
Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) XL 30 FEG	Philips
Eurostar digital Rührwerk	IKA Werke
Laborzentrifuge Centrifuge 5702 RH, 3000 RCF	Eppendorf
Liquid Handling Station JANUS 4-Channel mit Gripper	PerkinElmer
MagRack 6	GE Healthcare: 28-9489-64
Masterflex L/S Digital Standard Drive Schlauchpumpe	Cole-Parmer
Mikrotiterplatten 96 Well F-Boden	Brand: 781602
Mikrotiterplatten 96 Well U-Boden	Brand: 781600
Mikrozentrifugenröhrchen 1,5 ml, Safe-Lock	Eppendorf: 0030120086
Mikrozentrifugenröhrchen 2 ml, Safe-Lock	Eppendorf: 0030120094
Optima 8300 ICP-OES Spektrometer	PerkinElmer
Pilotanlage Durchfluss-Separator	ABBIS bio process automation: 65901001 (000076060)
Platinum ATR Einheit	Bruker Optik
Pumpschlauch für Durchfluss-Separator E-D Plex 9,5 mm ID	Thölen Pumpen: TEDM.037062
Silikonschlauch, peroxid-vernetzt 6 mm ID	VWR: 228-0718
Tensor 27 Spektrometer	Bruker Optik
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tygon Schlauch MHSL 4,8 mm ID	Ismatec: SC0832
Überkopfschüttler Reax 2	Heidolph
UV-Star Microtiterplatten 96 Well	Greiner Bio One: 655801
Vortex-Schüttler Stuart SA8	Bibby Scientific
Zentrifugenröhrchen SuperClear 15 ml	VWR: 525-0149
Zentrifugenröhrchen SuperClear 50 ml	VWR: 525-0155

3.2 Verwendete Chemikalien

Chemikalien/Materialien	Hersteller: Bestellnummer
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	Merck: 8.00907.0001, Roth 2156.2
2-Morpholinoethansäure-Monohydrat (MES)	Merck: 1061261000, Roth: 4256.3
Amplite Fluorimetric Aldehyde Quantitation Kit	AAT Bioquest: 10052
BCA Protein Assay Reagent Kit	Thermo Scientific Pierce: 23225
Calciumchlorid Dihydrat	Fluka: 21101, Merck: 1.02382.0500
DMSO	Merck: 102952
Essigsäure (100 %)	VWR: 20102320
Ethanol absolut	Merck: 1009832500
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Titriplex III)	Merck: 1084180250
Hämoglobin (bovin)	Sigma-Aldrich: H2625
HCl (32 %)	Merck:20254321, Roth: P074.3
HCl 1N (1mol/l)	Merck: 1090571000
Iod 0,05 mol/l (0,1 N)	VWR: 30917.295
NaCl	Merck
Natriumtetraborat	Merck: 106308
Natronlauge (32 %)	VWR: 28225290
N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide (Suc-AAPF-pNA)	Sigma-Aldrich: S7388
PVA (vollhydrolysiert, ca. 60000 g/mol)	Merck: 8.43866.1000
Tris	Carl Roth: 5429.2

3.3 Verwendete Partikel

Es wurden M-PVA Partikel vom Hersteller PerkinElmer chemagen Technologie GmbH verwendet. Diese Partikel haben eine Carboxy-Funktionalisierung auf der Oberfläche mit einem, vom Hersteller angegebenen, Funktionalisierungsgrad von 950 $\mu\text{mol COOH} / \text{g Partikel}$. Verwendet wurden folgende Chargen: C22-0125110 für die Extraktionsstudien sowie C22 C250 und C22 0104103 für die Immobilisierung. C22 Partikel haben laut der Spezifikation von chemagen einen mittleren Partikeldurchmesser von 1–3 μm . Für die Charge 0104103 gilt dies nicht, diese wurde von chemagen auf Grund eines zu kleinen mittleren Partikeldurchmessers als außerhalb der Spezifikation (engl. Out of Specification, OOS) definiert.

3.4 Partikelcharakterisierung

Die beiden Chargen carboxylierter M-PVA C22 Partikel, die für die Immobilisierung eingesetzt wurden (Chargen C250 und 0104103), wurden durch elektronenmikroskopische Aufnahmen, die Messung der Partikelgrößenverteilung sowie die Bestimmung der Magnetisierung charakterisiert. Zur Aufnahme von elektronenmikroskopischen Bildern wurde ein Philips

Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) XL 30 FEG eingesetzt. Für die Partikelgrößenverteilung der M-PVA Partikel wurde das Partikelgrößenmessgerät Galai CIS 100 verwendet, welches auf dem Prinzip der Laserabschattung basiert. Zur Bestimmung der Magnetisierung wurde ein Princeton Measurements Alternating Gradient Magnetometer (AGM) Micromag 2900 verwendet. Dies variiert die magnetische Feldstärke, die auf eine Probe wirkt, wodurch die magnetische Polarisation der Probe bestimmt wird. Durch die Auftragung der Polarisation über die Feldstärke ergibt sich die Magnetisierungskurve der Probe.

3.5 Verwendetes Enzym und Peptid

Zur Immobilisierung auf M-PVA Partikeln wurde bovines α -Chymotrypsin (EC: 3.4.21.1; Sigma-Aldrich: C4129) verwendet. α -Chymotrypsin ist eine Serinprotease und gehört damit zur Klasse der Hydrolasen. Es spaltet Peptidbindungen in Proteinen bevorzugt am C-Terminus nach Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin und Leucin. Die molare Masse beträgt 25,2 kDa, der isoelektrische Punkt 8,8. α -Chymotrypsin zeigt Aktivität im pH-Bereich 6–9,3 mit einem pH-Optimum von 7,8 und einem Temperaturoptimum von 37 °C. Calcium ist Cofaktor für α -Chymotrypsin [68].

Weiterhin wurde ein Tripeptid der Aminosäure Tyrosin (Abkürzung: YYY; Sigma-Aldrich: T2007) immobilisiert. Dieses Tripeptid wurde gewählt, da es mit einer molaren Masse von 508 Da gut fünfzigmal kleiner als α -Chymotrypsin ist und, im Gegensatz zu diesem, nur eine Aminogruppe am N-Terminus und keine Aminogruppen in den Seitenketten für die Immobilisierung zur Verfügung stellt. Da Tyrosin zu den aromatischen Aminosäuren gehört, lässt sich das Tripeptid ohne weiteren Assay direkt bei 280 nm UV-spektroskopisch quantifizieren und zeigt außerdem spezifische IR-Banden. Daher eignet sich das Tyrosin-Tripeptid als Modellmolekül sowohl für die Immobilisierung, als auch für die FTIR ATR Quantifizierung.

3.6 Verwendete Protein- und Enzymassays

3.6.1 Gesamtproteinbestimmung mittels BCA-Assay

Zur Konzentrationsbestimmung des freien und in Partikelüberständen enthaltenen α -Chymotrypsins wurde der Bicinchoninsäure (engl.: bicinchoninic acid, BCA) Assay verwendet. Beim BCA-Assay werden durch die in Lösung enthaltenen Proteine zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}) zu einwertigen Ionen (Cu^+) reduziert und bilden dann mit der Bicinchoninsäure einen Komplex, der bei 562 nm VIS-spektroskopisch nachgewiesen werden kann [69].

Als Standards wurden vom eingesetzten, freien α -Chymotrypsin geometrische Verdünnungsreihen (1:2 Verdünnungen) im Konzentrationsbereich 1,28–0,02 mg/ml in den entsprechenden Puffern verwendet. Zur Quantifizierung der Immobilisatbeladungen wurden die Proteinausgangslösung, die Inkubationslösung und die Waschlösungen per BCA analysiert und das gebundene Enzym per Differenzbildung bestimmt.

3.6.2 Bestimmung der Tyrosin-Tripeptid-Konzentration mittels UV 280

Zur Konzentrationsbestimmung des freien und in Partikelüberständen nach der Immobilisierung enthaltenen Tyrosin-Tripeptids wurden die Lösungen bei 280 nm UV-spektroskopisch in Greiner UV-Star Microtiterplatten bestimmt. Als Standards wurden vom freien Tyrosin-Tripeptid geometrische Verdünnungsreihen (1:2 Verdünnungen) im Konzentrationsbereich 1,28–0,02 mg/ml in den verwendeten Puffern eingesetzt. Im Falle der Immobilisate wurden die Peptidausgangslösung, die Inkubationslösung und die Waschlösungen analysiert und das gebundene Peptid per Differenzbildung bestimmt.

3.6.3 Bestimmung der Enzymaktivität mittels Suc-AAPF-pNA

Die Aktivität von freiem und immobilisiertem α -Chymotrypsin wurde mittels des Substrats N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilid (Suc-AAPF-pNA) durchgeführt [70]. Der Extinktionskoeffizient von Suc-AAPF-pNA beträgt $8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 410 nm und einem pH von 7,5 [71]. Als Aktivitätspuffer wurde 0,1 M Tris 0,02 M CaCl_2 pH 7,5 eingesetzt. Suc-AAPF-pNA wurde zu einer Konzentration von 20 mM in DMSO gelöst. Vor jeder Aktivitätsbestimmung erfolgte die Herstellung der Substratlösung durch eine 1:8 Verdünnung der 20 mM Stocklösung mit 0,1 M Tris 0,02 M CaCl_2 pH 7,5 zu einer finalen 2,5 mM Suc-AAPF-pNA-Konzentration.

Bestimmung der Aktivität des freien α -Chymotrypsins: 125 μl Substrat wurden bei 37 °C inkubiert. Der Aktivitätsassay wurde durch die Zugabe von 25 μl 0,02 g/l α -Chymotrypsinlösung zum vortemperiertem Substrat gestartet. Nach 1, 2, 3 und 5 min wurden 25 μl Probe entnommen und in 75 μl 11,5 % Essigsäure abgestoppt. 90 μl der abgestoppten Lösung wurden bei 410 nm analysiert. Die Aktivität von freiem Enzym berechnet sich wie folgt:

$$A = \frac{\frac{dAbs}{dt} \cdot V_A \cdot DF}{\varepsilon \cdot d \cdot V_p \cdot c} \quad (3.1)$$

A	Aktivität [U · mg ⁻¹]
dAbs/dt	Absorbanzzunahme [min ⁻¹]
V _A	Gesamtvolumen [ml]
DF	Verdünnungsfaktor auf Grund der Essigsäure
ε	Extinktionskoeffizient [ml · mmol ⁻¹ · cm ⁻¹]
d	Schichtdicke [cm]
V _P	Probenvolumen [ml]
c	Enzymkonzentration [mg · ml ⁻¹]

Bestimmung der Aktivität des immobilisierten α-Chymotrypsins: 125 µl Substrat wurden bei 37 °C inkubiert. Die Partikelsuspension mit einer Partikelkonzentration von 50 mg/ml wurde zuerst 1:2 in entsprechendem Lagerpuffer und anschließend 1:10 in Aktivitätspuffer verdünnt. Der Aktivitätsassay wurde durch die Zugabe von 25 µl verdünnter Partikelsuspension zum vortemperiertem Substrat gestartet und die Partikel durch Schütteln in Suspension gehalten. Nach 1, 2, 3 und 5 min wurden 25 µl Probe entnommen und in 75 µl 11,5 % Essigsäure abgestoppt. Die Partikel wurden separiert und 90 µl Überstand bei 410 nm analysiert. Äquivalent zum freien Enzym berechnet sich die Aktivität von immobilisiertem Enzym:

$$A = \frac{\frac{dAbs}{dt} \cdot V_A \cdot DF}{\varepsilon \cdot d \cdot V_p \cdot c_p} \quad (3.2)$$

A	Aktivität [U · g _{Partikel} ⁻¹]
dAbs/dt	Absorbanzzunahme [min ⁻¹]
V _A	Gesamtvolumen [ml]
DF	Verdünnungsfaktor auf Grund der Essigsäure
ε	Extinktionskoeffizient [ml · mmol ⁻¹ · cm ⁻¹]
d	Schichtdicke [cm]
V _P	Probenvolumen [ml]
c _P	Partikelkonzentration [mg · ml ⁻¹]

3.7 Immobilisierung auf magnetische Partikel

3.7.1 Immobilisierung mittels EDC

Als Reagenz zur kovalenten Kopplung (engl. Crosslinker) von Tyrosin-Tripeptid oder α -Chymotrypsin an die carboxylierten M-PVA Partikel wurde 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) verwendet. EDC gehört der Gruppe der Carbodiimide an und verknüpft Carboxygruppen über die Bildung des hochreaktiven Zwischenprodukts O-Acylisourea mit Aminogruppen mittels Peptidbindung ohne selbst innerhalb der neugeschaffenen Bindung zu verbleiben (sog. Zero Length Crosslinker), wie in Abbildung 3 dargestellt [15]. EDC ist im Gegensatz zu anderen Carbodiimiden wasserlöslich, wodurch die Immobilisierungsreaktion ohne den Einsatz organischer Lösungsmittel auskommt. Die Halbwertszeit des EDC-Zerfalls beträgt in 50 mM MES pH 7,0 Puffer bei 25 °C 22 h. EDC ist bei pH 5,0 sehr viel reaktiver, bei diesem pH reduziert sich die Halbwertszeit jedoch auf 3,9 h [72]. Die schnellsten Aktivierungen der Carboxygruppen werden für den Bereich pH 3,5–4,5 beschrieben, während die höchsten Kopplungsausbeuten bei pH 4–6 erzielt werden sollen [73]. Generell werden in der Literatur pH-Werte zwischen 4,5 und 7,5 für eine effektive Kopplung mittels EDC genannt [15]. Dies deckt sich mit den pK_a -Werten in Tabelle 2 in Kapitel 2.1.2: Carboxygruppen liegen über pH 4,5 mehrheitlich deprotoniert vor, während die Aminogruppen der Enzyme damit ausreichend neutral (also ungeladen) vorliegen, um eine Kopplung in den beschriebenen Fällen zu ermöglichen.

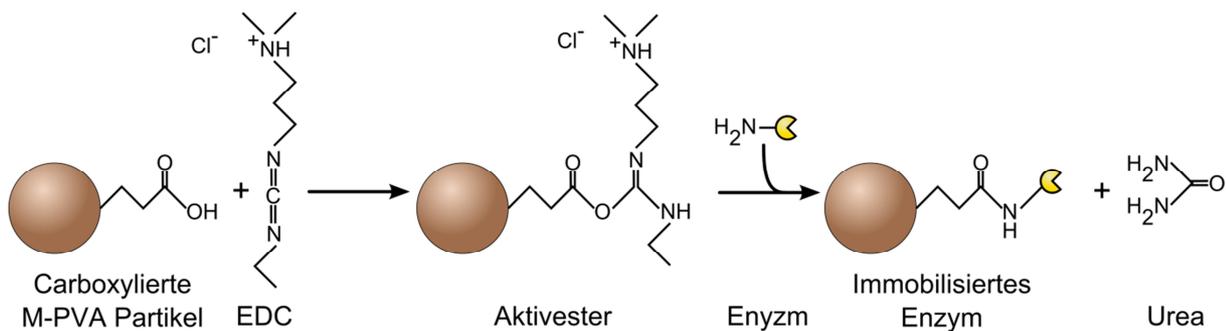


Abbildung 3: EDC-Aktivierung der carboxylierten Partikel und Enzymkopplung.

3.7.2 Vorbereitung und allgemeines Protokoll zur Partikelimmobilisierung

Der aufgeführte Umgang mit den Partikeln gilt für alle Versuche, soweit nicht anders aufgeführt.

Partikelseparation, Überstandsentfernung und Resuspendierung: Bei Waschungen im Labormaßstab wurde die Partikelsuspension in passende Mikrozentrifugenröhrchen gefüllt (1,5; 2; 15 oder 50 ml), die Partikel per Permanentmagnet vom Überstand getrennt bis dieser keine Trübung mehr aufwies (wenige Minuten) und der Überstand mittels Pipette entfernt oder dekantiert. Anschließend wurde frischer Puffer zu den Partikeln gegeben und diese per Vortexschüttler oder händischem Schütteln resuspendiert.

Vorbereitender Partikelwaschschritt: Bevor die Partikel eingesetzt wurden, wurde ein entsprechendes Volumen der gelieferten Partikelsuspension (Partikelkonzentration im Lieferzustand: 50–120 g/l) dreimal im dreifachen Volumen des einzusetzenden Puffers gewaschen.

Gravimetrische Partikelkonzentrationsbestimmung: Für die gravimetrische Partikelkonzentrationsbestimmung wurden HPLC Glasvials bei 60 °C im Trockenschrank mehrere Stunden vorgetrocknet und anschließend die Masse bestimmt. Die ausgewogenen Vials wurden mit 200 µl Partikelsuspension gefüllt, über Nacht bei 60 °C getrocknet und am nächsten Tag erneut die Masse bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte aus der Massendifferenz. Da sich die Partikel meist nicht in reinem MilliQ-Wasser befanden, wenn sie getrocknet wurden, wurde die Masse der in der Partikelsuspension enthaltenen Puffersalze subtrahiert und so die Konzentration der reinen Partikel berechnet.

Allgemeines EDC-Immobilisierungsprotokoll: Das hier angegebene Immobilisierungsprotokoll soll einen generellen Überblick über den Ablauf der Immobilisierungsreaktion geben. Die tatsächlichen Immobilisierungsparameter werden bei jedem Versuch tabellarisch aufgeführt. Die Immobilisierung der Partikel erfolgte in zwei Schritten: im ersten Schritt wurden die Partikel mit EDC aktiviert, im zweiten Schritt mit α -Chymotrypsin oder Tyrosin-Tripeptid gekoppelt.

Ein entsprechendes Volumen an Partikelsuspension wurde nach den initialen Waschschritten mit Aktivierungspuffer in Zentrifugationsröhrchen gefüllt, per Magnet separiert und der Überstand abgezogen. Anschließend erfolgte die Zugabe der EDC-Lösung und die Aktivierungssinkubation. Danach erfolgten Waschungen der Partikel mit Aktivierungspuffer, um überschüssiges EDC zu entfernen, die Zugabe der Enzymlösung und die Kopplungssinkubation. Im Anschluss wurden Waschungen mit Waschpuffer durchgeführt. Zur Lagerung wurden die Partikel mit Lagerpuffer gewaschen und bei 4 °C gelagert.

Die Partikel wurden auf ihre Beladung und ihre Aktivität hin analysiert. Als Benennungskonvention gilt: Peptid-, bzw. Enzymeinsatzkonzentration, Partikelbeladung und -aktivität sind auf Gramm Partikel normiert. Als spezifische Aktivität wird die Enzymaktivität des freien Enzyms pro Milligramm Enzymmasse bezeichnet. Für die Beladungsausbeute gilt Formel (3.3), die Masse an Enzym/Peptid in mg wird auf die Masse der Partikel in g normiert.

$$\text{Beladungsausbeute} = \frac{\text{Immobilisierte Masse Enzym, bzw. Peptid [mg / g]}}{\text{Eingesetzte Masse Enzym, bzw. Peptid [mg / g]}} \cdot 100 \% \quad (3.3)$$

Für die Aktivitätsausbeute gilt Formel (3.4), die Aktivität an α -Chymotrypsin in Units wird analog zu Formel (3.3) auf die Masse der Partikel in g normiert.

$$\text{Aktivitätsausbeute} = \frac{\text{Immobilisierte Aktivität } \alpha\text{-Chymotrypsin [U / g]}}{\text{Eingesetzte Aktivität } \alpha\text{-Chymotrypsin [U / g]}} \cdot 100 \% \quad (3.4)$$

3.8 Extraktionsstudien

Für den Einsatz der M-PVA Partikel in einem industriellen Prozess ist die Kenntnis der Stoffe, die sich unter Prozessbedingungen aus den Partikeln herauslösen, bzw. extrahieren lassen, von großer Bedeutung. Für Extraktionsstudien wurden ausschließlich Partikel ohne immobilisiertes Enzym untersucht. In Rücksprache mit dem Partikelhersteller PerkinElmer chemagen wurde auf die zur Partikelsynthese eingesetzten Reagenzien Magnetit (Eisenoxid), Cer, Acrylsäure, Polyvinylalkohol und Glutaraldehyd analysiert. Die carboxylierten M-PVA C22 Partikel (Charge: C22-0125110) wurden in einer wässrigen Suspension mit einer Konzentration von 50 mg/ml geliefert und für die Extraktionsstudien in verschiedenen Lösungsmitteln gewaschen. Als Versuchsbedingungen wurden Extreme der Reaktions- und Lagerbedingungen bei und nach der Immobilisierung gewählt. Als Lösungsmittel wurden MilliQ-Wasser, ein Hochsalzpuffer (0,1 M MES 0,5 M NaCl pH 5,5), 1 mM HCl und Ethanol (absolut) eingesetzt.

Für die Extraktionswaschungen wurden die Partikel aus der Ursuspension (Lieferzustand, Partikelkonzentration = 50 mg/ml) abgetrennt und zweimal mit gleichem Volumen MilliQ gewaschen und resuspendiert. Mit dieser Lösung erfolgte gravimetrisch eine Konzentrationsbestimmung der Partikel. Die Extraktionsversuche erfolgten in Doppelansätzen. Von den gewaschenen Partikeln wurden je 3 ml in 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und mit gleichem Volumen im entsprechenden Lösungsmittel gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Partikel mit Lösungsmittel auf 15 ml aufgefüllt, die Partikelkonzentration in

den Lösungsmitteln betrug daher 10 mg/ml. Es erfolgte eine Inkubation der Partikel für 24 h bei 60 °C, 750 rpm in einem Eppendorf Thermomixer. Die gewählte Temperatur lag außerhalb des Bereichs von 4 bis 37 °C der Reaktions- oder Lagerbedingungen. Nach der Inkubation erfolgte die Separation der Partikel von den Überständen per Zentrifugation für 10 min mittels einer Eppendorf Laborzentrifuge (Centrifuge 5702 RH, 3000 RCF) und anschließend per Permanentmagnet. Da Ethanol sowohl bei der Atomemissionsspektrometrie (engl. inductively coupled plasma optical emission spectrometry, ICP-OES) eine andere Gerätekonfiguration voraussetzt, als auch bei der Ionenchromatographie stört, wurden das Ethanol bei 60 °C verdampft und die Rückstände mit gleicher Menge MilliQ-Wasser aufgefüllt. Es erfolgte eine Analyse der Überstände mittels ICP-OES auf Eisen und Cer und mittels Anionenchromatographie auf Acrylsäure. Für den Polyvinylnachweis wurde eine Methode mittels basischer Iodlösung angewendet [74] und für den Aldehydnachweis ein kommerzielles Testkit (Amplite Fluorimetric Aldehyde Quantitation Kit) eingesetzt.

Für die ICP-OES wurde ein PerkinElmer Optima 8300 ICP-OES Spektrometer eingesetzt. Die Probenzufuhr erfolgte per Schlauchpumpe mit einem Volumenstrom von 0,8 ml/min, als Zerstäuber wurde ein Burgener Teflon MiraMist in einer Zyklonzerstäuberammer verwendet. Der Hochfrequenzgenerator hatte eine Frequenz von 40 MHz und eine Leistung von 1400 W. Die ICP-Torch war eine Quarzfackel und der Injektor aus Al₂O₃ (Durchmesser 2 mm). Die Argonvolumenströme betragen für das Plasma 15 l/min, für das Schubgas 0,6 l/min und für das Zerstäubergas 0,5 l/min. Die Plasmabetrachtung erfolgte axial. Der Monochromator zur Plasmabetrachtung hatte eine stickstoffgespülte Echelle-Optik mit 2 SCD-Detektoren (Auflösung bei 200 nm: ≤ 6 pm). Eisen wurde bei 234,830; 238,202; 238,863 und 259,938 nm, Cer bei 401,235; 413,373; 413,756; 418,657 und 456,228 nm detektiert. Die Integrationszeit betrug 1–5 s.

Für die Anionenchromatographie wurde ein Dionex DX-500 Ionenchromatograph mit einer 25 µl Probenschleife und einem ASRS 300 4 mm Suppressor verwendet. Als Chromatographiesäule wurde eine Thermo Scientific Ion Pac AG 11 (4x50 mm) Säule eingesetzt. Der Eluentstrom betrug 1 ml/min, der Gradient 1,5–35 mmol/l NaOH über 15 min.

Der PVA-Assay wurde nach [74] wie folgt angepasst: Zu 4 µl 0,05 mol/l Iodlösung und 100 µl 40 mg/ml Boraxlösung wurden 150 µl Probe gegeben und bei 694 nm in einem PerkinElmer Enspire UV-Spektrometer ausgelesen. Als Standard diente eine PVA-Lösung in den entsprechenden Lösungsmitteln (PVA vollhydrolysiert, molare Masse ca. 60000 g/mol) im Konzentrationsbereich 1–10 mg/l.

3.9 Protokolloptimierung mittels statistischer Versuchsplanung

3.9.1 Optimierung der kovalenten Immobilisierung

Die Immobilisierung von α -Chymotrypsin und Tyrosin-Tripeptid an C22 Partikel (Charge C250) wurde mittels DoE-Ansätzen näher untersucht und optimiert. Die beiden Schritte der Zweischrittimmobilisierung, Schritt 1 die Partikelaktivierung mittels EDC, Schritt 2 die Enzymkopplung auf den aktivierten Partikeln, wurden getrennt voneinander untersucht. Die Parameter des jeweils anderen Schritts wurden konstant gehalten. Die diesem Vorgehen zugrunde liegende Annahme war, dass sich die beiden Schritten nicht oder nur wenig gegenseitig beeinflussen und daher getrennt betrachtet werden können. Die Antworten des, mittels DoE, untersuchten Systems waren die Beladungs- und Aktivitätsausbeuten, die stets maximiert werden sollten. Die pH-Werte, die zu Beginn des DoEs verwendet wurden, basierten auf Vorversuchen, die wiederum auf Rücksprache mit PerkinElmer chemagen, Produktinformationen zu EDC [75] und Literaturdaten [15] basierten. Durch Vorversuche zeigte sich weiterhin, dass eine variierte Enzymeinsatzkonzentration innerhalb eines DoE-Experiments einen zu hohen Einfluss auf das Ergebnis hat und alle anderen Parameter überdeckt. Daher wurde die Enzymeinsatzkonzentration konstant gehalten. Für die Erstellung der Versuchspläne und zur Auswertung der Versuchsreihen wurde die DoE-Software MODDE, Version 9.0, Umetrics AB verwendet. Die Modellerstellung erfolgte mittels Multipler Linearer Regression (MLR). Die folgenden Ausführungen sind dem Handbuch entnommen [46], statistische Grundlagen können bei Montgomery nachvollzogen werden [45].

Die Evaluation des Modells geschieht mittels Varianzanalyse (engl. Analysis of Variance, ANOVA). Bei ANOVA werden die Quadratsummen der Werte einer Antwort betrachtet. Die gesamte Quadratsumme der beobachteten Werte aller Antworten y_i (engl. Sum of Squares total, SS_{total}) entspricht der Quadratsumme der durch das Modell berechneten Antwort (SS der Regression, SS_{Reg}) und der Fehlerquadratsumme (SS der Residuen, SS_{Resid}). Es gilt folgender Zusammenhang:

$$SS_{\text{total}} = SS_{\text{Reg}} + SS_{\text{Resid}} \quad (3.5)$$

Für die, um den Mittelwert korrigierten, SS_{total} gilt:

$$SS_{\text{total}} = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n} \quad (3.6)$$

Die multiple lineare Regression (MLR) berechnet die Koeffizienten des Modells so, dass SS_{Resid} , d.h. die Summe der quadrierten Abweichung zwischen dem beobachteten und dem angenäherten Wert, minimal ist. Für SS_{Resid} gilt damit, mit y_i als wahren Wert und \hat{y}_i als Wert aus der Regression:

$$SS_{\text{Resid}} = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (3.7)$$

Mittels des Bestimmtheitsmaßes des Modells R^2 lassen sich Aussagen über die Anpassung der Versuchsdaten (beobachtete Antworten) an die Modelldaten machen, wobei 0 keinen Zusammenhang und 1 ein perfektes Modell bedeutet:

$$R^2 = 1 - \frac{SS_{\text{Resid}}}{SS_{\text{total}}} \quad (3.8)$$

Die Güte des Modells zur Vorhersage lässt sich mit dem Fehlerquadrat der Vorhersage (engl. Prediction Error Sum of Squares, PRESS) und dem Bestimmtheitsmaß der Vorhersage $R^2_{\text{Vorhersage}}$, bzw. Q^2 , ähnlich wie bei der multivariaten Modellerstellung der FTIR ATR Methode (Kapitel 3.10.4), bewerten:

$$\text{PRESS} = \sum (y_i - y_{i,\text{Vorhersage}})^2 \quad (3.9)$$

Und für $R^2_{\text{Vorhersage}}$, bzw. Q^2 gilt:

$$Q^2 = R^2_{\text{Vorhersage}} = 1 - \frac{\text{PRESS}}{SS_{\text{total}}} \quad (3.10)$$

Die nicht im Modell abgebildete Variation SS_{Resid} lässt sich nach Formel (3.11) weiter zerlegen:

$$SS_{\text{Resid}} = SS_{\text{Modellfehler}} + SS_{\text{Wiederholungsfehler}} \quad (3.11)$$

Diese Zerlegung ist den Ursachen der nicht erklärten Variation geschuldet. $SS_{\text{Modellfehler}}$ ist im Umstand begründet, dass das Modell das System nicht perfekt beschreibt, $SS_{\text{Wiederholungsfehler}}$

entstammt den Variationen, die bei der Mehrfachbestimmung eines Experiments auftreten. Zur Berechnung von $SS_{\text{Wiederholungsfehler}}$ wird daher allein das dreifachbestimmte Zentralpunktexperiment herangezogen. Durch die Subtraktion von $SS_{\text{Wiederholungsfehler}}$ von SS_{Resid} wird $SS_{\text{Modellfehler}}$ erhalten. Durch die Division der SS durch die Freiheitsgrade (engl. Degree of Freedom, DF) wird die Varianz (engl. Mean squares, MS) berechnet:

$$MS = \frac{SS}{DF} \quad (3.12)$$

Für ein gutes Modell sind sowohl der Modellfehler, als auch der Wiederholungsfehler klein und von ähnlicher Größe. Dies lässt sich mittels dem „Lack of Fit“ Test, eines F-Tests der Varianzen für den Modellfehler und den Wiederholungsfehler formell testen.

$$F = \frac{MS_{\text{Modellfehler}}}{MS_{\text{Wiederholungsfehler}}} \quad (3.13)$$

Aus dem F-Wert wird der p-Wert ermittelt (siehe dazu die Ausführungen bei Montgomery [45]), ist dieser größer als der p-Wert von 0,05 so hat der Modellfehler die gleiche Größenordnung wie der Wiederholungsfehler. Das bedeutet einen kleinen Modellfehler und damit eine gute Anpassung der wahren Daten durch das Modell. Das Modell kann damit als statistisch valide angesehen werden.

Die Reproduzierbarkeit beschreibt die Varianz der Antwort unter gleichen Faktorbedingungen, d.h. beim dreifach bestimmten Zentralpunkt im Vergleich mit der gesamten Varianz der Antwort. Ein Wert von 1 bedeutet eine perfekte Reproduzierbarkeit.

$$\text{Reproduzierbarkeit} = 1 - \left(\frac{MS_{\text{Wiederholungsfehler}}}{MS_{\text{total}}} \right) \quad (3.14)$$

Zu Beurteilung der Modellgüte wurden die vier Modellparameter Bestimmtheitsmaß (R^2), Bestimmtheitsmaß der Vorhersage (Q^2), Modelvalidität (in Form des p-Werts des Lack of Fit Tests) und Reproduzierbarkeit herangezogen und basierend auf dem Handbuch zur Software wie folgt bewertet:

- Die Differenz zwischen $R^2 - Q^2$ soll kleiner 0,2 bis 0,3 sein.
- Q^2 soll größer 0,5 sein.
- Die p-Wert des Lack of Fit Tests soll größer als 0,05 sein, damit gilt das Modell als valide.
- Die Reproduzierbarkeit soll größer als 0,5 sein.

Zu den für jedes Modell berechneten Koeffizienten werden immer Vertrauensintervalle (95 % Konfidenzintervalle) angegeben. Diese Vertrauensintervalle werden nicht aus den Zentralpunktexperimenten berechnet, sondern aus den gesamten Daten, auf denen das Modell basiert, unter Annahme einer t-Verteilung, abgeschätzt. Eine t-Verteilung ist, abhängig von der Zahl der Freiheitsgrade, flacher als eine Normalverteilung. Je mehr Freiheitsgrade verfügbar sind, desto mehr nähert sich die t-Verteilung der Normalverteilung an. Die Betrachtung des Betrags des Konfidenzintervalls ist wichtig, um zu entscheiden, ob ein Koeffizient Auswirkungen auf das erstellte Modell hat. Ist der Betrag des Konfidenzintervalls mindestens doppelt so groß wie der Wert des Koeffizienten, ist auch 0 ein möglicher Wert. Der Koeffizient hat damit keinen Einfluss, kann aus dem Modell entfernt und dieses neu berechnet werden. Dieses Vorgehen wird so lange durchgeführt, bis nur noch statistisch relevante Koeffizienten im Modell vorhanden sind.

3.9.2 Screening der Aktivierungsbedingungen mit EDC

Als erstes wurde für die Aktivierungsbedingungen mit EDC ein Screening-DoE durchgeführt, um einen ersten Eindruck über die wichtigen Faktoren und entsprechenden Faktoreinstellungen zu erhalten. Für das Screening wurde ein zweistufiger, vollfaktorieller Screening Versuchsaufbau verwendet. Die Immobilisierung erfolgte nach den in Tabelle 4 dargestellten Parametern. 23 mg Partikel wurden für jeden Versuchsansatz verwendet, das Volumen der EDC-Lösung und Waschungen betrug jeweils 500 μl . Die Einsatzkonzentration an α -Chymotrypsin betrug 31 mg/g Partikel. Nach der EDC-Aktivierung wurden die Partikel zweimal in Aktivierungspuffer gewaschen, nach der Enzymkopplung fünfmal mit 0,1 M Tris 0,02 M CaCl_2 pH 9. Die Enzymbeladung der Partikel wurde mittels BCA bestimmt, die Aktivität per Suc-AAPF-pNA-Assay. Der Aktivierungspuffer war MES-Puffer, dieser besitzt einen pK_a -Wert von 6,15 [76]. Inklusiv der drei Versuche zum Zentralpunkt ergaben sich in diesem DoE-Ansatz 19 Versuche. Die Versuchsbedingungen der Einzelversuche sind mit den Ergebnissen zusammen in Tabelle 29 im Abschnitt 7.1.1 im Anhang dargestellt.

Tabelle 4: Variierte und konstante Parameter des Screening-DoEs zur Partikelaktivierung.

Varierte Parameter zur Partikelaktivierung		Konstante Parameter der Enzymkopplung	
pH Aktivierung (0,1 M MES)	5,3; 5,5; 5,7	pH Kopplung (0,1 M MES)	7,1
Aktivierungstemperatur [°C]	11; 24; 37	Kopplungstemperatur [°C]	25
Aktivierungszeit [min]	10; 22,5; 35	Kopplungszeit [h]	2,5
EDC-Konzentration [g EDC / g Partikel]	0,18; 0,22; 0,27		

3.9.3 Optimierung der Aktivierungsbedingungen mit EDC

Basierend auf den Screening-Ergebnissen zur Partikelaktivierung (Kapitel 4.3.1 im Ergebnisteil) wurde ein größerer Optimierungsversuch zur Aktivierung von M-PVA C22 Partikeln durchgeführt. Für den Optimierungsansatz mittels Response Surface Modelling (RSM) wurde ein sog. Onion-Design verwendet. Die Idee hinter diesem "Zwiebelschalen"-Modell ist, dass nicht nur drei Wertevariationen pro Parameter (niedriger Wert, Zentralpunkt, hoher Wert) in das Modell einfließen, sondern in "Schalen" mehr Wertevariationen untersucht werden, in diesem Fall drei niedrige und drei hohe Werte. Idealerweise zeigt sich dann ein Parameteroptimum innerhalb des untersuchten Bereichs und nicht nur die Richtung, in der dieses Optimum, basierend auf dem Modell, liegt. Weiterhin sollten über die Erhöhung der Schritte Aussagen zur Robustheit der Aktivierung möglich sein, d.h. darüber in wie fern kleinere Variationen Einfluss auf das Immobilisierungsergebnis haben, was gerade im Hinblick auf einen Scale-up der Immobilisierung von Interesse ist. Da ein vollfaktorieller Versuchsplan zu viele Einzelversuche benötigen würde, wurde die Versuchsanzahl durch einen „Determinanten Optimalen“ (D-Optimal) Algorithmus reduziert [44].

Als Modellparameter wurden wiederum die EDC-Konzentration, der pH-Wert, die Aktivierungszeit und die Aktivierungstemperatur verwendet. Beim Screening-DoE wurde der pH-Wert im Bereich 5,3–5,7 zwar als nicht signifikant identifiziert, da dies aber keine Rückschlüsse für einen erhöhten Wertebereich (5,3–6,5) zulässt, wurde er erneut als Parameter aufgenommen. Alle Parameter wurden in je 7 Schritten variiert. Die Variationen sind in Tabelle 5 dargestellt. Die Einsatzkonzentration an α -Chymotrypsin bei diesem DoE-Ansatz betrug $37,4 \pm 1,7$ mg/g. Alle anderen Versuchsbedingungen entsprachen denen des Screening-Versuchs (siehe Kapitel 3.9.2). Inklusive der drei Zentralpunktversuche ergaben sich 44 Versuche in diesem DoE-Ansatz. Die Versuchsbedingungen der Einzelversuche sind mit den Ergebnissen zusammen in Tabelle 30 im Abschnitt 7.1.2 im Anhang dargestellt.

Tabelle 5: Variierte und konstante Parameter des RSM Onion-Designs zur Partikelaktivierung.

Varierte Parameter zur Partikelaktivierung		Konstante Parameter der Enzymkopplung	
pH Aktivierung (0,1 M MES)	5,3; 5,5; 5,7; 5,9; 6,1; 6,3; 6,5	pH Kopplung (0,1 M MES)	7,1
Aktivierungstemperatur [°C]	10; 15; 20; 25; 30; 35; 40	Kopplungstemperatur [°C]	25
Aktivierungszeit [min]	6; 16; 26; 36; 46; 56; 66	Kopplungszeit [h]	2,5
EDC-Konzentration	0,05; 0,12; 0,19; 0,27; 0,34;		
[g EDC / g Partikel]	0,42; 0,49		

3.9.4 Erweiterung des Onion-Designs um höhere EDC-Konzentrationen

Da im Onion-Design noch kein klares Optimum gefunden wurde, gerade in Bezug auf die EDC-Konzentration (siehe Kapitel 4.3.2 im Ergebnisteil), wurde als letzte Untersuchung der Aktivierungsbedingungen der Wertebereich des Onion-Designs erweitert, um EDC-Konzentrationen bis 1,3 g EDC / g Partikel abzudecken. Diese Konzentration entspricht dem achtfachen molaren Überschuss an EDC-Molekülen gegenüber den zur Verfügung stehenden Carboxygruppen auf der Partikeloberfläche (900 $\mu\text{mol COOH}$ / g Partikel). Es wurde ein konstanter pH-Wert von 5,3 verwendet, während die Aktivierungstemperatur und die Aktivierungszeit im gleichen Wertebereich wie das Onion-Design waren, jedoch mit weniger Zwischenschritten. Die Einsatzkonzentration an α -Chymotrypsin bei den Versuchen zur Erweiterung des Onion-Designs betrug, wie beim Onion-Design, $37,4 \pm 1,7$ mg/g. Alle anderen Versuchsbedingungen entsprachen, ebenfalls wie beim Onion-Design, denen des Screening-Versuchs (Kapitel 3.9.2). MODDE erlaubt durch die Nutzung eines sog. D-Optimalen Optimierungsdesigns das Einlesen der Datenpunkte aus dem Onion-Design und ergänzt den restlichen, abzudeckenden Raum. Dadurch ergaben sich, inklusive drei neuer Zentralpunktversuche, 18 zusätzliche Versuche. Die Parameter der Design-Erweiterung sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Die Versuchsbedingungen der Einzelversuche sind mit den Ergebnissen zusammen in Tabelle 31 im Abschnitt 7.1.3 im Anhang dargestellt.

Tabelle 6: Variierte und konstante Parameter der Modellerweiterung des Onion-Designs zur Partikelaktivierung.

Varierte Parameter zur Partikelaktivierung		Konstante Parameter der Enzymkopplung	
pH Aktivierung (0,1 M MES)	5,3	pH Kopplung (0,1 M MES)	7,1
Aktivierungstemperatur [°C]	10; 20; 25; 30; 40	Kopplungstemperatur [°C]	25
Aktivierungszeit [min]	6; 26; 36; 46; 66	Kopplungszeit [h]	2,5
EDC-Konzentration [g EDC / g Partikel]	0,68; 0,89; 1,30		

3.9.5 Optimierung der Kopplungsbedingungen von α -Chymotrypsin

Nach der Optimierung der Aktivierung der C22 Partikel mittels EDC wurde ein DoE für die Optimierung der Kopplungsbedingungen des α -Chymotrypsins durchgeführt. Es wurde ein zweistufiger, vollfaktorischer Versuchsplan gewählt. Die konstanten und variierten Parameter dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Einsatzkonzentration an α -Chymotrypsin betrug $42 \pm 0,6$ mg/g. Die Partikel wurden nach der Aktivierung zweimal in doppeltem Volumen in Aktivierungspuffer 0,1 M MES pH 5,3 gewaschen, bevor die Enzymlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten zugegeben und bei den angegebenen Tem-

peraturen und Zeiten inkubiert wurden. Als Puffer wurde 0,1 M MES verwendet. Das sonstige Vorgehen entsprach dem des Screening-Versuchs zur Aktivierung (Kapitel 3.9.2). Die Versuchsbedingungen der Einzelversuche sind mit den Ergebnissen zusammen in Tabelle 32 im Abschnitt 7.1.4 im Anhang dargestellt.

Tabelle 7: Variierte und konstante Parameter des DoEs zur Optimierung der α -Chymotrypsinkopplung.

Konstante Parameter zur Partikelaktivierung		Varierte Parameter der Enzymkopplung	
pH Aktivierung (0,1 M MES)	5,3	pH Kopplung (0,1 M MES)	5,3; 6,2; 7,1
Aktivierungstemperatur [°C]	11	Kopplungstemperatur [°C]	11; 24; 37
Aktivierungszeit [min]	35	Kopplungszeit [h]	1; 2,5; 4
EDC-Konzentration [g EDC / g Partikel]	0,23		

3.9.6 Optimierung der Kopplungsbedingungen von Tyrosin-Tripeptid

Für das Tyrosin-Tripeptid wurde ebenfalls ein DoE für die Optimierung der Kopplungsbedingungen durchgeführt. Es wurde ein zweistufiger, vollfaktorieller Versuchsplan gewählt. Die konstanten und variierten Parameter sind in Tabelle 8 zusammengestellt. Da das Tyrosin-Tripeptid mit dem N-Terminus der Peptidkette nur eine Aminogruppe zur Kopplung enthält und keine Aminogruppen in den Seitenketten, ist davon auszugehen, dass der zur Kopplung optimale pH deutlich über dem pK_a -Wert der Aminogruppe liegt ($pNH_2 = 9,11$ [77]), da für eine vollständige Kopplung alle Aminogruppen neutral vorliegen müssen. Für die drei eingesetzten pH-Werte wurden als Puffer 0,1 M Tris pH 8,5; 0,1 M CAPS pH 10,25 und 0,1 M Phosphat pH 12 eingesetzt. Die Einsatzkonzentration an Tyrosin-Tripeptid betrug 54 ± 6 mg/g. Das sonstige Vorgehen entsprach dem des Screening-Versuchs zur Aktivierung (Kapitel 3.9.2). Die Versuchsbedingungen der Einzelversuche sind mit den Ergebnissen zusammen in Tabelle 33 im Abschnitt 7.1.5 im Anhang dargestellt.

Tabelle 8: Variierte und konstante Parameter des DoEs zur Tyrosin-Tripeptidkopplung.

Konstante Parameter zur Partikelaktivierung		Varierte Parameter der Peptidkopplung	
pH Aktivierung	5,3	pH Kopplung	8,5; 10,25; 12
Aktivierungstemperatur [°C]	11	Kopplungstemperatur [°C]	11; 24; 37
Aktivierungszeit [min]	6	Kopplungszeit [h]	1; 2,5; 4
EDC-Konzentration [g EDC / g Partikel]	0,71		

3.10 Bestimmung der Enzym-/Peptidbeladung der Partikel mittels FTIR ATR

3.10.1 Calcium-Entfernung von den Immobilisaten

Aus Vorversuchen war der große Einfluss von Calcium auf die Aufnahme der FTIR ATR Spektren bekannt. Da Calcium als Cofaktor von α -Chymotrypsin in der Waschlösung nach der kovalenten Immobilisierung verwendet wird, musste geklärt werden, ob sich Calcium von den Immobilisaten entfernen lässt. Dafür wurde der Komplexbildner Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) verwendet. Es wurden C22 Partikel (Charge C250) nach dem Protokoll für diese Partikel in Kapitel 3.11.2 mit einer Enzymeinsatzkonzentration von 49 mg/g immobilisiert und anschließend entsprechend dem Protokoll mit 0,1 M Tris 0,02 M CaCl_2 pH 9 gewaschen. Partikelproben ohne immobilisiertes α -Chymotrypsin und die Immobilisate wurden folgenden Waschungen in jeweils dreifachem Überschuss unterzogen (Partikelkonzentration aller Proben vor den Waschungen: 34 mg/ml):

- I. Partikel im Lieferzustand dreimal in 0,1 M MES pH 5,3 gewaschen
- II. Partikel nach der MES-Waschung (I) zweimal in MilliQ gewaschen
- III. Partikel wie Immobilisate in 0,1 M Tris 0,02 M CaCl_2 pH 9 gewaschen und zusätzlich
 1. Partikel zweimal mit 0,02 M EDTA 0,1 M MES pH 5,3 gewaschen
 2. Partikel nach der EDTA-Waschung (III.1) zweimal mit MilliQ gewaschen
- IV. Immobilisate in 0,1 M Tris 0,02 M CaCl_2 pH 9 gewaschen und zusätzlich
 1. Immobilisate zweimal mit 0,1 M MES pH 5,3 gewaschen
 2. Immobilisate nach der MES-Waschung (IV.1) zweimal mit MilliQ gewaschen
- V. Immobilisate in 0,1 M Tris 0,02 M CaCl_2 pH 9 gewaschen und zusätzlich zweimal mit 0,02 M EDTA 0,1 M MES pH 5,3 gewaschen
- VI. Immobilisate nach der EDTA-Waschung (V) zweimal mit MilliQ gewaschen

Die Überstände der Waschungen wurden vor dem Trocknen der Partikel abgezogen, eine zusätzliche Waschung, wie in Kapitel 3.10.2 beschrieben, erfolgte nicht. Die FTIR ATR Messung wurde nach Kapitel 3.10.3 durchgeführt.

3.10.2 Vorbereitende Waschungen und Trocknung zur FTIR ATR Messung

Je 100 μl Partikelsuspension (bei einer Partikelkonzentration von 50 mg/ml) wurden in dreifachem Überschuss für jeweils 5 min bei 1400 rpm und 25 °C zweimal in 0,1 M MES 0,02 M EDTA pH 5,3 gewaschen um eventuelles Calcium zu entfernen und zweimal in MilliQ-Wasser um den Puffer zu entfernen. Die Waschungen erfolgten in 2 ml Mikroreaktionsgefä-

Ben im Thermomixer. Der Überstand wurden anschließend abgezogen und verworfen und die Partikel über Nacht bei 60 °C im Trockenschrank getrocknet.

3.10.3 Durchführung FTIR ATR Messungen

Für die FTIR ATR Messungen wurde ein Bruker Optik Tensor 27 Spektrometer mit einem Raumtemperatur Detektor aus deuteriertem Triglycinsulfat (engl. room temperature deuterated tri glycinesulfate, RT-DTGS) mit einer Bruker Optik Platinum ATR Einheit (Diamantkristall mit einfacher Strahlbrechung) verwendet. Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur (klimatisiert auf 22 ± 1 °C) mit Hilfe der Software Bruker OPUS 7.2 aufgenommen. Die Spektren wurden im Wellenzahlenbereich 4000 cm^{-1} bis 400 cm^{-1} mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} gegen einen Luft-Background aufgenommen. 64 Scans wurden pro Spektrum gemittelt. Pro Probe wurden ca. 5 mg getrockneter Partikel leicht gemörsert, auf die ATR-Einheit gegeben und der Stempel der Einheit geschlossen, um einen gleichmäßigen Anpressdruck der Probe auf den Kristall zu gewährleisten. Proben, die zur Erstellung eines Kalibrationsmodells dienten, wurden zwanzigmal gemessen. Bei unbekanntenen Proben, die gegen das Modell quantifiziert wurden, erfolgte eine zehnmalige Messung. Zwischen den Messungen wurden die Proben per Spatel auf dem ATR Kristall bewegt und neu angeordnet, um so möglichst viele unterschiedliche Partikel im Strahlengang zu vermessen und einen Querschnitt über die Probe zu erhalten. Zwischen verschiedenen Proben wurde der Kristall mit 80 % Ethanol gereinigt. Der Einfluss von atmosphärischem Wasser wurde in der OPUS Software kompensiert. Alle Spektren wurden vektornormalisiert, um Offset-Variationen zwischen den Spektren sowie unterschiedliche Probendicken auszugleichen [78]. Die Vektornormalisierung berechnet zuerst den durchschnittlichen y-Wert des Spektrums. Dieser wird dann vom Spektrum subtrahiert, wodurch sich das Spektrum bei $y = 0$ zentriert. Anschließend wird die Summe der Quadrate aller y-Werte gebildet und das Spektrum durch die Wurzel dieses Wertes dividiert [79].

3.10.4 Erstellung multivariater Kalibrationsmodelle

Für die Erstellung der multivariaten Kalibration wurde die Partial Least Square (PLS) Methode des Quant 2 Pakets der OPUS Software verwendet, in welchem der PLS1 Algorithmus implementiert ist. Eine vertiefte Einführung in die Methode ist im Leitfaden „Multivariate Kalibration“ von Conzen [67] gegeben. Vereinfacht ausgedrückt werden für die multivariate Kalibration Spektrendaten Punkt für Punkt zeilenweise in eine Matrix X geschrieben, eine Eigenvektorzerlegung durchgeführt und mit einer zweiten Matrix Y, in der die zugehörigen Konzentrationen enthalten sind, über den Regressionsvektor b korreliert:

$$Y = X \cdot b \quad (3.15)$$

Dieser Regressionsvektor kann mittels Partial Least Square Regression (PLS-Regression) berechnet werden. Für die Berechnung von b werden nur die Spektrenbereiche verwendet, die einen Zusammenhang zwischen Y und X zeigen, analytisch also relevant sind. Per BCA bestimmte Beladungen wurden für die Kalibrationen als Referenzwerte verwendet. Die Validierung erfolgte per Kreuzvalidierung (Leave-One-Out Validierung). Das bedeutet, dass alle Proben sowohl zur Kalibration, als auch zur Validierung eingesetzt werden. Dazu wird jede Probe einmal zur Erstellung eines Kalibriermodells weggelassen und gegen dieses Modell vorhergesagt. Das geschieht so lange, bis jede Probe einmal ausgelassen wurde. Dies unterscheidet die Kreuzvalidierung von der Test-Set-Validierung, bei der separate Kalibrations- und Validierungsprobensets zur Modellerstellung verwendet werden. Der Vorteil der Kreuzvalidierung gegenüber der Test-Set-Validierung liegt in der niedrigeren benötigten Probenanzahl [65], [67], [78]. Das resultierende Modell wurde hinsichtlich eines möglichst guten Bestimmtheitsmaß $R^2_{\text{Vorhersage}}$ zwischen Vorhersage und Referenzwert und eines möglichst kleinen quadratischen Mittelwertfehlers der Kreuzvalidierung (engl. root mean square error of cross validation, RMSECV) optimiert. Für $R^2_{\text{Vorhersage}}$ gilt:

$$R^2_{\text{Vorhersage}} = \left(1 - \frac{\sum (y_{i, \text{wahr}} - y_{i, \text{Vorhersage}})^2}{\sum (y_{i, \text{wahr}} - y_{i, \text{Mittelwert}})^2} \right) \cdot 100 \% \quad (3.16)$$

In der Formel steht $y_{i, \text{wahr}}$ für den Referenzwert und $y_{i, \text{Vorhersage}}$ für den vom Modell vorhergesagten Wert. Der Mittelwert der Referenzwerte $y_{i, \text{Mittelwert}}$ berechnet sich nach Formel (3.17) mit n für die Anzahl der Spektren:

$$y_{i, \text{Mittelwert}} = \frac{\sum y_{i, \text{wahr}}}{n} \quad (3.17)$$

Für den RMSECV gilt:

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum (y_{i, \text{wahr}} - y_{i, \text{Vorhersage}})^2} \quad (3.18)$$

Wie an der Formel zu erkennen ist, wird der RMSECV ähnlich der Standardabweichung eines Mittelwerts berechnet, mit dem Unterschied das mit $y_{i, \text{wahr}}$ nicht der Mittelwert, sondern der Referenzwert verwendet wird. Daher wird die Vorhersagegenauigkeit des Modells mit \pm RMSECV angegeben, wobei $2 \times$ RMSECV dem 95 % Konfidenzintervall entspricht. Das Modell wurde weiterhin auf einen minimalen Rang (ein Synonym für die Anzahl der verwendeten PLS-Faktoren, also Eigenvektoren der Matrix X) hin optimiert, damit weder unbekannte Konzentrationsdaten unvollständig erklärt werden (Underfitting), noch ein überbestimmtes Modell, auf Grund der Interpretation des Hintergrundrauschens (Overfitting), erhalten wird [60], [64]. Zusätzlich zu dieser „internen“ Kreuzvalidierung wurden noch verschiedene „externe“ Validierungsproben erstellt und gegen die passenden Modelle gemessen. Für das Tyrosin-Tripeptid wurden sechs neue Proben immobilisiert und gegen das Tyrosin-Modell gemessen (Kapitel 3.11.3), für die adsorptive α -Chymotrypsin-Immobilisierung wurde eine Konzentration in Doppelansätzen immobilisiert und unter (desorbierendem) Aktivitätsassay-pH rezykliert (Kapitel 3.11.1 und 3.12.1). Für die Validierung der kovalenten α -Chymotrypsin-Immobilisierung wurden für zwei Partikelchargen (C250 und 0104103) Beladungskurven erstellt und diese gegeneinander gemessen (Kapitel 3.11.2), sowie für eine dieser Partikelchargen (C250) zwei Konzentrationen in Doppelansätzen immobilisiert und ebenfalls unter Aktivitätsassay-pH Bedingungen rezykliert (Kapitel 3.12.2). Das Modell der anderen Partikelcharge (0104103) diente zur Quantifizierung der Partikelbeladung unter halbtechnischen Bedingungen (Kapitel 3.14).

3.11 Beladungskurven adsorptiver und kovalenter Immobilisierungen

3.11.1 Adsorptive Immobilisierung von α -Chymotrypsin

Um die mögliche adsorptive Beladung von α -Chymotrypsin auf C22 Partikeln (Charge C250) zu bestimmen, wurden zehn Einsatzkonzentrationen im Konzentrationsbereich 4,3–140,4 mg/g in Doppelansätzen eingesetzt. Die adsorptive Immobilisierung erfolgte nach den in Tabelle 9 dargestellten Parametern. Die Partikel wurden entsprechend Kapitel 3.7.2 vorbereitet. 23 mg Partikel wurden für jeden Versuchsansatz verwendet, das Volumen der Enzym-

Lösung und Waschungen betrug jeweils 500 μl . Nach der Enzymkopplung wurden die Partikel sechsmal mit 0,1 M MES pH 5,5 gewaschen. Die Enzymbeladung der Partikel wurde mittels BCA bestimmt, die Aktivität per Suc-AAPF-pNA-Assay. Um eine Desorption von α -Chymotrypsin während der Vorbereitung für die FTIR ATR Messungen zu vermeiden, wurden die Partikel nicht in EDTA-Lösung und MilliQ gewaschen, wie in Kapitel 3.10.2 beschrieben, sondern nach der Überstandsentfernung des MES-Puffers nur getrocknet. Die Validierung des erstellten FTIR ATR Modells erfolgte durch den rezyklierten Einsatz adsorptiver Immobilisate unter Desorptionsbedingungen (Kapitel 3.12.1).

Tabelle 9: Parameter der adsorptiven Immobilisierung von α -Chymotrypsin auf C22 C250 Partikeln zur Erstellung einer Beladungskurve.

Parameter	C22 C250
Enzymeinsatzkonzentration [mg α -Chymotrypsin / g Partikel]	4–140
Kopplungspuffer	0,1 M MES pH 5,5
Temperatur Kopplung [$^{\circ}\text{C}$]	37
Kopplungszeit [h]	1
Wasch- und Lagerpuffer	0,1 M MES pH 5,5
Anzahl Waschungen	6

3.11.2 Kovalente Immobilisierung von α -Chymotrypsin

Basierend auf den DoE-Ergebnissen (Kapitel 4.3 im Ergebnisteil) wurden Beladungskurven der kovalenten EDC-Immobilisierung von α -Chymotrypsin auf zwei verschiedenen C22 Partikelchargen (C250 und 0104103) erstellt.

Für die **C250** Charge wurden zehn verschiedene α -Chymotrypsin-Konzentrationen in Doppelansätzen immobilisiert. Die Immobilisierungsparameter sind in Tabelle 10 zusammengefasst. 18 mg Partikel wurden für jeden Versuchsansatz verwendet, das Volumen der EDC-Lösung, Kopplungslösung und Waschungen nach der Kopplung betrug jeweils 500 μl . Zwischen Aktivierung und Kopplung erfolgten zwei Waschungen in 1000 μl Aktivierungspuffer. Die Enzymbeladung der Partikel wurde mittels BCA bestimmt. Für die FTIR ATR Kalibration wurden 200 μl Partikelsuspension jeder Probe (10 mg Partikel) entsprechend Kapitel 3.10.2 gewaschen und per IR gemessen. Die Aktivität der Partikel wurde per Suc-AAPF-pNA-Assay bestimmt.

Für die Charge **0104103** wurden zwanzig verschiedene α -Chymotrypsin-Konzentrationen in Einfachansätzen immobilisiert. Die Immobilisierungsparameter sind ebenfalls in Tabelle 10 zusammengefasst. 17 mg Partikel wurden für jeden Versuchsansatz verwendet, das Volu-

men der EDC-Lösung, Kopplungslösung und Waschungen nach der Kopplung betrug jeweils 500 µl. Zwischen Aktivierung und Kopplung erfolgten zwei Waschungen in 800 µl Aktivierungspuffer. Die Enzymbeladung der Partikel wurde mittels BCA bestimmt. Für die FTIR ATR Kalibration wurden 200 µl Partikelsuspension jeder Probe (10 mg Partikel) entsprechend Kapitel 3.10.2 gewaschen und per IR gemessen. Die Aktivität der Partikel wurde per Suc-AAPF-pNA-Assay bestimmt. Validiert wurden die beiden erstellten FTIR ATR Modelle durch eine Quantifizierung der Proben der jeweils anderen Beladungskurve.

Tabelle 10: Parameter der kovalenten Immobilisierung von α -Chymotrypsin auf C22 Partikeln zur Erstellung einer Beladungskurve.

Parameter	C22 C250	C22 0104103
1. Partikelaktivierung		
Aktivierungspuffer	0,1 M MES pH 5,3	0,1 M MES pH 5,3
Aktivierungstemperatur [°C]	11	11
Aktivierungszeit [min]	35	30
EDC-Konzentration [g EDC / g Partikel]	0,22	0,59
2. Enzymkopplung		
Enzymeinsatzkonzentration [mg α -Chymotrypsin / g Partikel]	6–112	5–88
Kopplungspuffer	0,1 M MES pH 7,1	0,1 M MES pH 7,1
Temperatur Kopplung [°C]	25	25
Kopplungszeit [h]	2,5	2,5
Waschpuffer	0,1 M Tris 0,02 M CaCl ₂ pH 9	0,1 M Tris 0,02 M CaCl ₂ pH 9
Anzahl Waschungen	6	6
Lagerpuffer	0,1 M MES pH 5,3	0,1 M Tris 0,02 M CaCl ₂ pH 9

3.11.3 Kovalente Immobilisierung von Tyrosin-Tripeptid

Basierend auf den DoE-Ergebnissen (Kapitel 4.3 im Ergebnisteil) wurden 18 verschiedene Tyrosin-Tripeptid-Konzentrationen auf C22 Partikel (Charge C250) mittels EDC immobilisiert. Die Immobilisierungsparameter sind in Tabelle 11 zusammengefasst. 19 mg Partikel wurden für jeden Versuchsansatz verwendet, das Volumen der EDC-Lösung und Waschungen nach der Kopplung betrug jeweils 500 µl. Zwischen Aktivierung und Kopplung erfolgten zwei Waschungen in 1000 µl Aktivierungspuffer. Die Peptidbeladung der Partikel wurde mittels UV 280 nm bestimmt. Für die FTIR ATR Kalibration wurden 10 mg Partikel entsprechend Kapitel 3.10.2 gewaschen und per IR gemessen. Um das aus den Ergebnissen erstellte FTIR ATR Kalibrationsmodell zu validieren, wurden nach dem gleichen Protokoll sechs weitere Immobi-

lisate mit Peptideinsatzkonzentration von 12–71 mg/g erstellt und gegen das Kalibrationsmodell gemessen.

Tabelle 11: Parameter der kovalenten Immobilisierung von Tyrosin-Tripeptid auf C22 C250 Partikeln zur Erstellung einer Beladungskurve.

Parameter	C22 C250
1. Partikelaktivierung	
Aktivierungspuffer	0,1 M MES pH 5,3
Aktivierungstemperatur [°C]	11
Aktivierungszeit [min]	6
EDC-Konzentration [g EDC / g Partikel]	0,84
2. Peptidkopplung	
Peptideinsatzkonzentration [mg YYY / g Partikel]	6–107
Kopplungspuffer	0,1 M Phosphat pH 12
Temperatur Kopplung [°C]	25
Kopplungszeit [h]	2,5
Wasch- und Lagerpuffer	0,1 M MES pH 5,3
Anzahl Waschungen	6

3.12 Rezyklierung von α -Chymotrypsin-Immobilisaten im Labormaßstab

Um die erstellten FTIR ATR Modelle für adsorptiv und kovalent immobilisiertes α -Chymotrypsin auf der C22 Partikelcharge C250 zu validieren, sowie die Desorption unter den pH-Bedingungen des Aktivitätsassays (pH 7,5) zu untersuchen, wurden Rezyklierungen dieser Immobilisate durchgeführt.

3.12.1 Rezyklierung adsorptiver α -Chymotrypsin-Immobilisate

Es wurde eine dreimalige Rezyklierung von adsorptiven α -Chymotrypsin-Immobilisaten durchgeführt. Die Immobilisierung erfolgte im Doppelansatz nach dem Protokoll in Kapitel 3.11.1 und die Enzymeinsatzkonzentration betrug 116 mg/g. Für die Rezyklierung wurden 100 mg Immobilisate in 2,5 ml 0,1 M MES pH 5,5 eingesetzt, was einer Partikelkonzentration von 40 mg/ml entsprach. Die Partikel wurden in 15 ml Zentrifugationsröhrchen einmal mit 2,5 ml 0,1 M Tris pH 7,5 gewaschen und im gleichen Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde für 15 min bei 25 °C und 750 rpm auf einem Thermomixer geschüttelt. Anschließend wurden die Partikel zweimal in 2,5 ml 0,1 M MES pH 5,5 gewaschen und resuspendiert. Aus dieser Suspension wurden 600 μ l Probe für die Analyse entnommen. Für die folgenden beiden Zyklen wurden die Volumina der Puffer entsprechend dem neuen Suspensionsvolumen

skaliert (1,9 und 1,3 ml), so dass die Partikelkonzentration von 40 mg/ml konstant gehalten wurde. Jeder Überstand wurde per BCA analysiert, die entnommenen Proben wurden zur Bestimmung der Partikelkonzentration, der Aktivität und der Beladung per FTIR ATR verwendet. Die Vorbereitung für die FTIR ATR Messung erfolgte wie in Kapitel 3.11.1 durch Überstandsentsfernung und Trocknung ohne zusätzliche Waschungen.

3.12.2 Rezyklierung kovalenter α -Chymotrypsin-Immobilisate

Es wurde eine fünfmalige Rezyklierung von kovalenten α -Chymotrypsin-Immobilisaten durchgeführt. Als Prozesslösung wurde bovines Hämoglobin zu einer Konzentration von 1 mg/ml in 0,1 M Tris 0,02 M CaCl_2 pH 7,5 gelöst.

Zwei α -Chymotrypsin-Einsatzkonzentrationen, 35 mg/g und 52 mg/g, wurden in Doppelsätzen nach dem Protokoll in Kapitel 3.11.2 für C22 C250 Partikel immobilisiert. Für die Rezyklierung wurden je 200 mg Immobilisate verwendet. Die Immobilisate wurden zweimal in 5 ml 0,1 M Tris 0,02 M CaCl_2 pH 7,5 gewaschen und in 30 ml Hämoglobin-Prozesslösung resuspendiert. Die Partikelkonzentration in der Prozesslösung betrug damit 6,7 mg/ml. Die Prozesslösung mit Immobilisaten wurde für 1 h bei 25 °C im Überkopfschüttler geschüttelt. Im Anschluss wurden die Partikel zweimal in 10 ml 0,1 M Tris 0,02 M CaCl_2 pH 7,5 gewaschen und in 5 ml desselben Puffers resuspendiert (Partikelkonzentration 40 mg/ml). Aus dieser Suspension wurden 600 μl Probe für die Analyse entnommen. Für die folgenden vier Zyklen wurden die Volumina der Puffer entsprechend dem neuen Suspensionsvolumen skaliert, so dass die Partikelkonzentrationen konstant gehalten wurden. Die entnommenen Proben wurden zur Bestimmung der Partikelkonzentration, der Aktivität und der Beladung per FTIR ATR verwendet. Da unverdautes und verdautes Hämoglobin an die Immobilisate adsorbiert, wurden die Proben für die FTIR ATR Messungen zunächst fünfmal in dreifachem Überschuss in 0,01 M HCl gewaschen, um Hämoglobin und Verdaubuchstücke zu entfernen. Die restlichen vorbereitenden Waschungen für die FTIR ATR Messungen erfolgten nach Kapitel 3.10.2. Das verdaute Hämoglobin wurde nicht weiter analysiert.

3.13 Methodenentwicklung Aktivitätsassay Hämoglobin-Verdau

Im Scale-up der Rezyklierung kovalenter α -Chymotrypsin-Immobilisate auf einen Maßstab von 50 g Immobilisat und 5 l Reaktionsvolumen (Kapitel 3.14) sollte der Hämoglobin-Verdau durch die Immobilisate auch quantitativ bestimmt werden. Daher wurde ein Aktivitätsassay

auf Basis dieses Verdau erstellt. Als Aktivitätspuffer diente 0,1 M Tris 0,02 M CaCl₂ pH 7,5; als Substrat wurde 1 g/l Hämoglobin in diesem Puffer gelöst.

Absorptionsmaximum: In Vorversuchen war die Entfärbung der rotbraunen Hämoglobin-Lösung nach Zugabe von α -Chymotrypsin festgestellt worden, daher wurden von einem Hämoglobin-Verdau mit immobilisiertem α -Chymotrypsin VIS-Spektren in 96 Wellplatten (aus Polystyrol, keine UV-Platten) von Hämoglobin im Bereich 305–800 nm aufgenommen, um so das Absorptionsmaximum der Färbung zu bestimmen. Es wurden C22 Partikel (Charge 0104103) nach dem Protokoll in Kapitel 3.11.2 mit einer Enzymbeladung von 49 mg/g und einer Partikelkonzentration von 10 g/l in 1,8 ml Substrat bei 37 °C in 2 ml Mikroreaktionsgefäßen bei 1400 rpm im Thermomixer inkubiert. Stündliche wurden 100 μ l Probe entnommen, die Partikel per Permanentmagnet separiert und 90 μ l Überstand in 96-Wellplatte analysiert.

Extinktionskoeffizient: Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten wurden drei Einwaagen Hämoglobin (20 mg) zu je 10 mg/ml in Aktivitätspuffer gelöst und je zwölf Verdünnungen im Konzentrationsbereich 0,02–10 mg/ml erstellt. Dreimal 90 μ l Probe wurden pro Konzentration bei 407 nm in 96-Wellplatten analysiert. Mit den Absorbanzen der Konzentrationen 0,16–2 mg/ml wurde nach Lambert-Beer, Formel (3.19), der Extinktionskoeffizient berechnet und gemittelt. Als molare Masse von Hämoglobin wurde 64,5 kDa verwendet [80].

$$\text{Abs.} = \varepsilon \cdot d \cdot c \quad (3.19)$$

Abs.	Absorbanz [-]
ε	Extinktionskoeffizient [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
d	Schichtdicke [cm]
c	Konzentration [mol/l]

Bestimmung der Aktivität des freien α -Chymotrypsins: 1,8 ml Substrat wurden bei 37 °C in 2 ml Mikroreaktionsgefäßen bei 1400 rpm im Thermomixer inkubiert und der Verdau durch die Zugabe von 50 μ l Enzymlösung (Enzymkonzentrationen dieser Lösung: 5,8; 17,3 und 22,7 mg/ml) gestartet. Stündlich wurden 90 μ l Probe genommen und bei 407 nm analysiert. Die Aktivität berechnet sich, ebenso wie die Aktivität beim Suc-AAPF-pNA-Verdau, nach Formel (3.1). Da die Extinktionszunahme auf Grund der Entfärbung negativ ist, wurde von dieser der Betrag verwendet.

Bestimmung der Aktivität des immobilisierten α -Chymotrypsins: Für die Aktivität der Immobilisate, sowohl im Labor, als auch im 5 l Scale-up wurde das Substrat mit Immobilisat zu einer Partikelkonzentration von 10 g/l versetzt. Genommene Proben wurden am Permanentmagnet von den Immobilisaten separiert und 90 μ l Überstand bei 407 nm analysiert. Die Aktivität berechnet sich wie folgt:

$$A = \frac{\frac{dE}{dt} \cdot 1000}{\varepsilon \cdot d \cdot c_P} \quad (3.20)$$

A	Aktivität [$U \cdot g_{\text{Partikel}}^{-1}$]
dE/dt	Extinktionszunahme [min^{-1}]
ε	Extinktionskoeffizient [$\text{ml} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
d	Schichtdicke [cm]
c_P	Partikelkonzentration im Gesamtansatz [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]
1000	Umrechnungsfaktor von $U/\text{mg}_{\text{Partikel}}$ auf U/g_{Partikel} [$\text{mg} \cdot g_{\text{Partikel}}^{-1}$]

Im Labormaßstab erfolgte die Aktivitätsbestimmung in 2 ml Mikroreaktionsgefäßen bei 37 °C und 1400 rpm. Es wurden fünf Immobilisate mit C22 Partikel (Charge 0104103) nach dem Protokoll in Kapitel 3.11.2 im Beladungsbereich 16–63 mg/g hergestellt und verwendet. Im Scale-up wurden die Parameter wie in Kapitel 3.14.5 beschrieben, verwendet.

3.14 Scale-up der Rezyklierung kovalenter α -Chymotrypsin-Immobilisate

Nach der Rezyklierung der α -Chymotrypsin-Immobilisate im Labormaßstab (Kapitel 3.12.2) wurde ein Verdau von bovinem Hämoglobin im halbtechnischen Technikums-Maßstab durchgeführt. Es sollte sowohl die Immobilisierung in diesem Maßstab gezeigt werden, als auch der zwanzigfache, repetitive Einsatz der Immobilisate. Folgende Zielparameter wurden für den Scale-up gewählt:

- Das Reaktionsvolumen des Hämoglobin-Verdaus sollte 5 l betragen.
- Die Partikelkonzentration im Reaktionsvolumen sollte 10 g/l sein. Daraus resultierte eine benötigte Masse von 50 g mit α -Chymotrypsin immobilisierter Partikel zur Durchführung des Prozesses.
- Als die Zielbeladung der C22 Partikel mit α -Chymotrypsin wurde 50 mg/g gewählt.

3.14.1 Durchfluss-Separator

Für den halbtechnischen Maßstab wurde für die Separation der Partikel von den Immobilisierungs-, Waschungs- und Reaktionslösungen ein Durchfluss-Separator nach dem Rotor-Stator-Prinzip verwendet (Abbildung 4). Dabei handelt es sich um eine Pilotanlage der Firma ABBIS bio process automation, die auf eine gemeinsame Entwicklung des KITs, chemagens und ABBIS zurückgeht und auf einem Patent von Franzreb und Reichert [81] beruht. Der Einsatz dieser Pilotanlage zur Hormon-Aufreinigung wurde von Müller beschrieben [82].

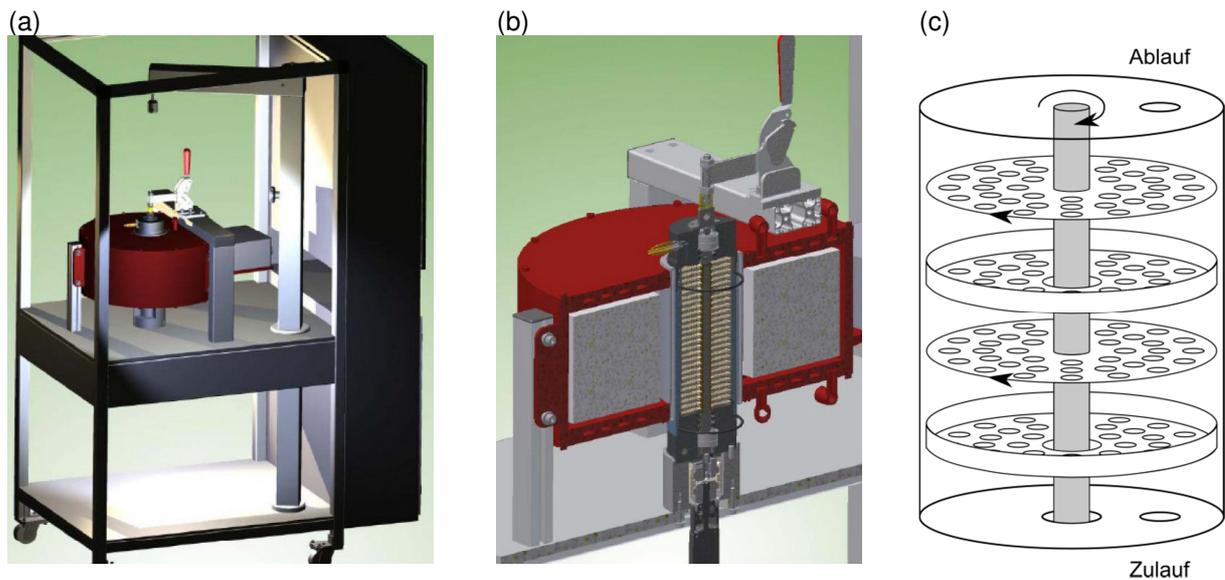


Abbildung 4: (a) Durchfluss-Separator, (b) Querschnitt durch den Elektromagneten und die Filterkammer. Die Abbildung wurde dem Handbuch des Separators entnommen (© ABBIS bio process automation). (c) Schematische Darstellung der Filterkammer nach dem Rotor-/Stator Prinzip.

Der Durchfluss-Separator nutzt eine Filtermatrix aus perforierten Scheiben ferromagnetischen Stahls. Die Filterkammer hat ein Volumen von 980 ml. Die magnetische Flussdichte beträgt bei eingeschaltetem Elektromagnet im Zentrum der Bohrung 0,25 T. Die Filtermatrix besteht aus abwechselnd beweglichen (Rotoren) und starren (Statoren) Scheiben, wie in Abbildung 4c dargestellt. Nach der Separation der Partikel, d.h. wenn der Filter mit Partikel beladen und mit frischer Lösung befüllt ist, können durch die zentrale Welle die beweglichen Scheiben rotiert werden. Die Rotor-Stator-Anordnung sorgt dabei für eine homogene Resuspendierung der Partikel in der Lösung.

3.14.2 Anlagenaufbau zum Scale-up Versuch

Sowohl die Immobilisierung der Partikel mit α -Chymotrypsin, als auch der zwanzigfache Hämoglobin-Verdau mit diesen Immobilisaten wurde mit Hilfe eines Doppelwand-Glasreaktors (Arbeitsvolumen 10 l) für die entsprechenden Reaktionen und des Durchfluss-Separators für die Abtrennung der Partikel aus den Suspensionsüberständen durchgeführt. Der Reaktor wurde mittels Kryostat temperiert und mit einem Schrägblatt-Teflonrührer gerührt (Durchmesser 10 cm; Abbildung 6b). Das Verfahrensschema mit Reaktor, Durchfluss-Separator und zwei Puffervorlagen ist in Abbildung 5 dargestellt. Die im Folgenden beschriebenen Ventilpositionen beziehen sich auf die beiden Mehrwegeventile des Durchfluss-Separators. So meint z.B. Ventil 1.2 das Ventil 1 mit Zulaufposition 2, usw. In einem Vorversuch wurde das Fassungsvermögen der Separatorkammer auf 150 g M-PVA Partikel bestimmt.

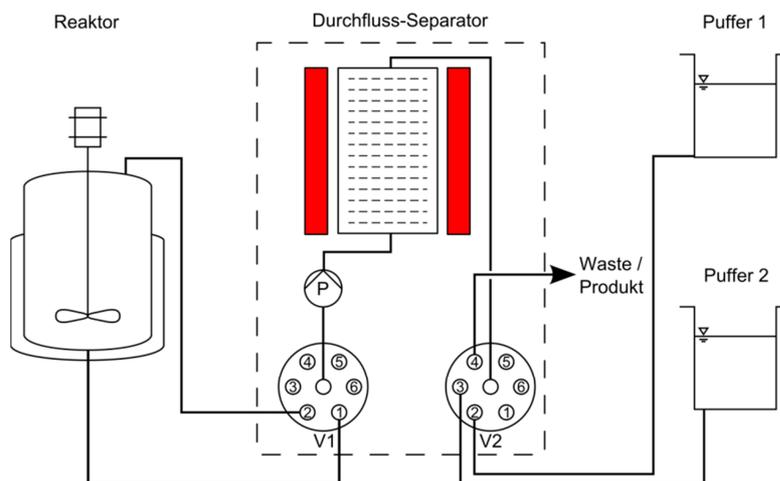


Abbildung 5: Verfahrensschema des Scale-up-Versuchs mit Glasreaktor, Durchfluss-Separator und den Puffervorlagebehältern. Die Pumpe (P) ist in der Pumprichtung Ventil 1 (V1) über die Separatorkammer zu Ventil 2 (V2) dargestellt.

Vor der Immobilisierung wurden alle Tygenschläuche im Durchfluss-Separator sowie der Pumpschlauch nach Herstellerangaben ersetzt. Alle externen Schläuche wurden durch neue Silikonschläuche ersetzt. Der Reaktor wurde mechanisch gesäubert und das Gesamtsystem intensiv mit vollentsalztem Wasser gespült. Der Gesamtaufbau während eines Hämoglobin-Verdaus ist in Abbildung 6a gezeigt.

(a)



(b)

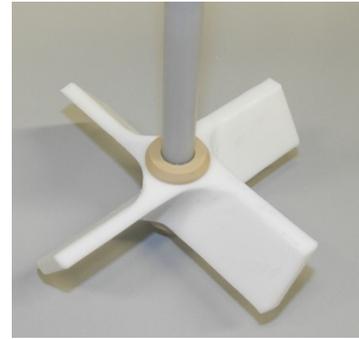


Abbildung 6: (a) Gesamtaufbau des Scale-up-Versuchs mit 10l-Glasreaktoren, Kryostat und Durchfluss-Separator während eines Hämoglobin-Verdaus. (b) Verwendeter Schrägblatt-Teflonrührer (d = 10 cm).

3.14.3 Bestimmung der Pumpenkennlinie und des Anlagen-Totvolumens

Vor der Immobilisierung wurde die Pumpenkennlinie der im Durchfluss-Separator verbauten Schlauchpumpe bestimmt. Die Pumpensteuerung erfolgt in der Steuerungssoftware in Prozentangabe. In 10 % Schritten wurde erst im Vorlauf und anschließend im Rücklauf je 2 min Wasser gepumpt und die Masse gravimetrisch bestimmt. Dieses Vorgehen wurde dreimal wiederholt und die entsprechenden Volumenströme gemittelt. Die Berechnung des Anlagen-Totvolumens erfolgte mittels der Schlauchinnendurchmesser (Silikon: 6 mm; Tygon: 4,8 mm; Pumpschlauch: 9,5 mm) und entsprechenden Schlauchlängen sowie unter Berücksichtigung des Filterkammervolumens von 980 ml.

3.14.4 Durchführung der Immobilisierung

Vor der Immobilisierung wurden 70 g C22 Partikel (Charge 0104103) in einer 1 l Schottflasche auf die pH-Bedingung der Immobilisierung eingestellt. Als Permanentmagnet wurde die in Abbildung 7 gezeigte Magnetplatte verwendet. Zuerst wurde der pH-Wert der Lieferlösung mit 32 % HCl auf 5,3 eingestellt, anschließend wurden die Partikel zweimal mit 0,1 M MES

pH 5,3 gewaschen. Der Abzug der Überstände erfolgte per Schlauchpumpe, das Resuspendieren per Rührwerk und Teflonrührer direkt in der Schottflasche. Alle weiteren Schritte wurden im Glasreaktor (siehe Abbildung 5 und Abbildung 6) durchgeführt.



Abbildung 7: Magnetplatte und Schlauchpumpe, die zur Partikelwaschung vor der Immobilisierung eingesetzt wurden.

Die Manteltemperatur des Reaktors betrug für die Immobilisierung 11 °C. Die Rührgeschwindigkeit im Reaktor betrug über die gesamte Immobilisierung 250 rpm. Im Reaktor wurden 56 g pH-eingestellter Partikel in 0,1 M MES pH 5,3 vorgelegt. Die Partikelsuspension wurde mit eingeschaltetem Magneten über den Ablauf des Reaktors durch die Separatorkammer gepumpt (Ventil 1.1 in Abbildung 5) und separiert. Der klare Überstand der Partikel wurde verworfen (Ventil 2.4, Waste). Zum Nachspülen der Leitungen wurden 2 l 0,1 M MES pH 5,3 in den Reaktor gefüllt und ebenfalls durch den Separator gepumpt. Im Anschluss wurde der Magnet ausgeschaltet, der Motor des Rotors in der Separatorkammer für 30 s auf 100 % Leistung geschaltet und die Partikel in der Separatorkammer resuspendiert. Die Pumprichtung der Schlauchpumpe wurde umgedreht und die Partikel mit 2l frischem 0,1 M MES pH 5,3 (Ventil 2.2) in den Reaktor (Ventil 1.2) gespült und dort gerührt. Nach dieser Partikelwaschung wurde zu den 2 l Partikelsuspension eine EDC-Lösung gegeben (0,42 g EDC / g Partikel, gelöst zu 100 mg/ml in 0,1 M MES pH 5,3) und die Partikel für 30 min aktiviert.

Nach der Partikelaktivierung wurde die Partikelsuspension mit eingeschaltetem Magneten über den Ablauf des Reaktors durch die Separatorkammer gepumpt (Ventil 1.1) und separiert. Der klare Überstand der Partikel wurde verworfen (Ventil 2.4, Waste). Zum Auswaschen überschüssigen EDCs von den Partikeln wurden 3 l 0,1 M MES pH 5,3 in den Reaktor gefüllt. Mit 1,5 l wurde das Kammervolumen des Separators (980 ml) getauscht, dann der Magnet aus- und der Motor des Rotors in der Separatorkammer für 30 s auf 100 % Leistung eingeschaltet. Diese Partikelwaschung der aktivierten Partikel wurde noch einmal wiederholt,

wobei der Reaktor geleert wurde. Es wurden 2 l MES pH 7,1 in den Reaktor gefüllt und die Partikelwaschung ein weiteres Mal durchgeführt, bis der Reaktor geleert war. Die Pumprichtung der Schlauchpumpe wurde umgedreht und die Partikel mit 2 l frischem 0,1 M MES pH 7,1 Puffer (Ventil 2.3) in den Reaktor (Ventil 1.2) gespült und dort gerührt. Nach diesen insgesamt drei Waschungen wurde zu den aktivierten Partikeln eine α -Chymotrypsinlösung gegeben (50 mg α -Chymotrypsin / g Partikel, gelöst zu 10 mg/ml in 1 mM HCl), die Reaktortemperatur auf 25 °C erhöht und die Partikel für 2,5 h inkubiert.

Tabelle 12: Parameter der Immobilisierung von α -Chymotrypsin auf C22 Partikeln im Scale-up Versuch.

Parameter	C22 0104103
1. Partikelaktivierung	
Aktivierungspuffer	0,1 M MES pH 5,3
Aktivierungstemperatur [°C]	11
Aktivierungszeit [min]	30
EDC-Konzentration [g EDC / g Partikel]	0,42
2. Enzymkopplung	
Enzymeinsatzkonzentration [mg α -Chymotrypsin / g Partikel]	50
Kopplungspuffer	0,1 M MES pH 7,1
Temperatur Kopplung [°C]	25
Kopplungszeit [h]	2,5
Waschpuffer	0,1 M Tris 0,02 M CaCl ₂ pH 9
Anzahl Waschungen	6
Lagerpuffer	0,1 M Tris 0,02 M CaCl ₂ pH 9

Nach der Enzymkopplung wurde die Partikelsuspension mit eingeschaltetem Magneten über den Ablauf des Reaktors durch die Separatorkammer gepumpt (Ventil 1.1) und separiert. Der Inkubationsüberstand der Partikel wurde beprobt und verworfen (Ventil 2.4, Waste). Zum Waschen der Partikel wurden 6 l 0,1 M Tris 0,02 M CaCl₂ pH 9 in den Reaktor gefüllt. Mit 1 l wurde das Kammervolumen des Separators getauscht, wobei der Überstand an Ventil 2.4 vor dem Verwerfen ebenfalls beprobt wurde. Der Magnet wurden aus- und der Motor des Rotors in der Separatorkammer für 30 s auf 100 % Leistung eingeschaltet. Diese Partikelwaschung der Immobilisate wurde insgesamt sechsmal durchgeführt, wobei der Reaktor geleert wurde. Die Pumprichtung der Schlauchpumpe wurde umgedreht und die Partikel mit 4 l frischem 0,1 M Tris 0,02 M CaCl₂ pH 9 Puffer (Ventil 2.2) in den Reaktor (Ventil 1.2) gespült. Die Partikel wurden im Reaktor über Nacht gelagert, gerührt bei einer Temperatur von 6 °C. Die Parameter der Immobilisierung sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Es wurden 250 ml Partikelsuspension als Rückstellprobe entnommen. Damit erfolgte die Bestimmung der Partikelkonzentration, der Beladung der Partikel per FTIR ATR sowie der Aktivität mittels Suc-AAPF-pNA und eines Hämoglobin-Verdaus im Labormaßstab (wie in Kapitel 3.13). Die Probenvorbereitung ist in Kapitel 3.14.6 beschrieben. Die Überstandsproben der Inkubations- und Waschlösungen wurden mittels BCA analysiert.

3.14.5 Durchführung des Hämoglobin-Verdaus

Für den zwanzigfach rezyklierten Hämoglobin-Verdau wurden alle im Reaktor nach der Immobilisierung gelagerten Partikel (Partikel zur Immobilisierung abzüglich Rückstellprobe = 52 g) eingesetzt. Die Manteltemperatur des Reaktors betrug während der gesamten Versuchslaufzeit 37 °C. Die Pumpleistung im Vorlauf (von Ventil 1 auf Ventil 2) betrug immer 50 %, die Pumpleistung im Rücklauf (von Ventil 2 auf Ventil 1) immer 70 %.

Die Partikelsuspension wurde mit eingeschaltetem Magneten über den Ablauf des Reaktors durch die Separatorkammer gepumpt (Ventil 1.1 in Abbildung 5) und separiert. Der klare Überstand der Partikel wurde verworfen (Ventil 2.4, Waste). Zum Nachspülen der Leitungen wurden 1,5 l 0,1 M Tris 0,02 M CaCl₂ pH 7,5 in den Reaktor gefüllt und ebenfalls durch den Separator gepumpt. Im Anschluss wurde der Magnet ausgeschaltet, der Motor des Rotors in der Separatorkammer für 30 s auf 100 % Leistung geschaltet und die Partikel in der Separatorkammer resuspendiert. Danach wurde die Pumprichtung der Schlauchpumpe umgedreht und die Partikel mit 2 l Substratstocklösung (2,5 g/l Hämoglobin in 0,1 M Tris 0,02 M CaCl₂ pH 7,5; Ventil 2.3) in den Reaktor (Ventil 1.2) gespült und gerührt. Um das Zielvolumen von 5 l im Reaktor und damit die Hämoglobin-Zielkonzentration von 1 g/l zu erreichen, wurde anschließend an Ventil 2.3 auf 0,1 M Tris 0,02 M CaCl₂ pH 7,5 umgestellt und mit diesem Puffer das Reaktionsvolumen auf 5 l aufgefüllt. Beim Rückpumpen der Partikel wurde jede Minute die Pumpe aus- und der Motor des Rotors in der Separatorkammer für 30 s auf 100 % Leistung eingeschaltet, um das vollständige Ausspülen der Partikel zu garantieren. Damit wurde der Motor pro Partikel-Prozessierung insgesamt vier- bis fünfmal eingeschaltet. Während der Motor in Betrieb war, wurde nicht gepumpt.

Als Startpunkt der Reaktion T₀ wurde der Zeitpunkt gewählt, bei dem die Partikel im vollständigen Volumen im Reaktor vorlagen, d.h. nach der abgeschlossenen Partikel-Prozessierung. Die Gesamtzeit der Partikel-Prozessierung vor Beginn der Reaktion betrug 30–40 min. Ab dem Zeitpunkt T₀ betrug die Reaktionszeit 23 h, mit Ausnahme von vier Zyklen, bei denen die Reaktionszeiten länger waren (z.B. auf Grund von Wochenenden). Dies

betriff Zyklus 6 (4 Tage Reaktionszeit), Zyklus 11 (3 Tage) sowie Zyklus 16 und 18 (jeweils 2 Tage).

Zum Zeitpunkt T₀ wurden 10 ml Probe zur Analyse aus dem Reaktor entnommen. Weiterhin wurde in regelmäßigen Abständen (alle 1–2 h) 500 µl Probe für die Bestimmung des Hämoglobin-Verdaus entnommen. Mit den T₀-Proben wurden die Partikelkonzentration, die Beladung (mittels FTIR ATR) und die Aktivität (mittels Suc-AAPF-pNA-Assay) bestimmt. Der Partikelüberstand diente zur Bestimmung der Hämoglobin-Einsatzkonzentration. Die notwendige Probenvorbereitung wird im Folgenden (Kapitel 3.14.6) beschrieben. Nach den zwanzig Zyklen wurden die Partikel mit 5 l 0,1 M Tris 0,02 M CaCl₂ pH 9 aus dem Separator direkt in eine 5 l Schottflasche gespült und gelagert.

3.14.6 Probenvorbereitung für die Analyse

Für die Bestimmung der Partikelkonzentration wurden dreimal 1,25 ml Partikelsuspension dreimal mit 1 ml 0,01 M HCl gewaschen und resuspendiert und bei 60 °C im Trockenschrank getrocknet. Für die FTIR ATR Messungen wurden die Partikel aus 1 ml Partikelsuspension im Thermomixer für 5 min bei 1400 rpm und 25 °C mit je 1 ml Waschvolumen fünfmal in 0,01 M HCl gewaschen, um adsorbiertes Hämoglobin zu entfernen und anschließend, wie in Kapitel 3.10.2 beschrieben, zweimal in 0,1 M MES 0,02 M EDTA pH 5,3 und zweimal in MilliQ-Wasser. Der Überstand wurde anschließend abgezogen und die Partikel über Nacht bei 60 °C im Trockenschrank getrocknet. Für die Bestimmung der Partikelaktivität mittels Suc-AAPF-pNA wurden immer zwei Proben analysiert, zum einen die Rückstellprobe der Partikel nach der Immobilisierung, die über die Laufzeit des zwanzigfachen Hämoglobin-Verdaus bei 4 °C lagerte, zum anderen die T₀-Probe der einzelnen Zyklen. Die Rückstellprobe wurde zunächst 1:6,4 mit 0,1 M Tris 0,02 CaCl₂ pH 7,5 verdünnt, bei den T₀-Proben erfolgte die Verdünnung 1:4. Von diesen Verdünnungen wurden 1,25 ml dreimal mit 1 ml 0,1 M Tris 0,02 M CaCl₂ pH 7,5 gewaschen und resuspendiert. In Vierfachansätzen wurden je 25 µl dieser Partikelsuspensionen wie in Kapitel 3.6.3 beschrieben mit Suc-AAPF-pNA-Substrat inkubiert. Für die Bestimmung des Hämoglobin-Verdaus wurden die Partikel von 500 µl Partikelsuspension abgetrennt und dreimal 90 µl Überstand in 96-Wellplatten bei 407 nm ausgelesen.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Partikelcharakterisierung

Die beiden Chargen carboxylierter M-PVA C22 Partikel, die für die Immobilisierung eingesetzt wurden (Chargen C250 und 0104103), wurden durch elektronenmikroskopische Aufnahmen, Messung der Partikelgrößenverteilung sowie Bestimmung der Magnetisierung charakterisiert. Die Partikelgrößenverteilungen des oberflächengewichteten Sauterdurchmessers sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Partikelgrößenverteilung der C22 Partikel.

Partikel und Charge	Mittlerer Partikeldurchmesser [μm]	D10 [μm]	D50 [μm]	D90 [μm]
C22 C250	$1,97 \pm 1,46$	0,77	1,36	4,34
C22 0104103	$1,32 \pm 1,28$	0,77	0,92	2,26

In Abbildung 8 sind weiterhin die Histogramme und Verteilungssummen für die C22 Partikel der Chargen C250 und 0104103 gezeigt. Die mittleren Partikeldurchmesser decken sich mit dem von chemagen angegebenen Wert (1–3 μm). Aus dem Histogramm für C22 0104103 zeigt sich jedoch eine starke Verschiebung in Richtung der 0,5–1,0 μm Säule und das dadurch bedingte steilere Ansteigen der Verteilungssummenfunktion. Diese Charge wurde von chemagen auf Grund einer zu kleinen Partikelgröße als „Out of Specification“ definiert, was sich durch die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung bestätigt.

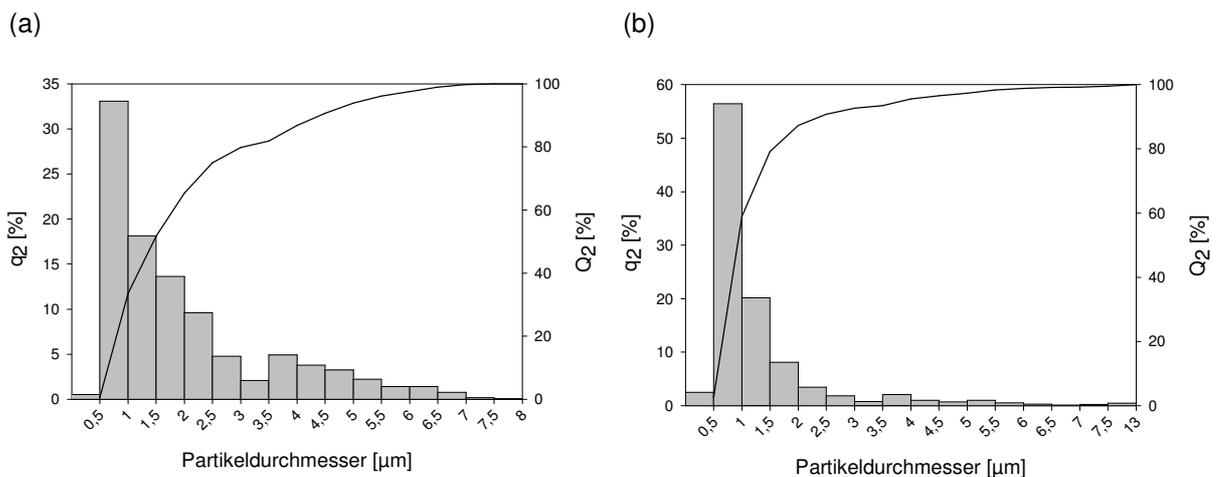


Abbildung 8: Histogramme und Verteilungssummen der oberflächengewichteten Partikelgrößenverteilungen für (a) C22 Partikel der Charge C250 und (b) C22 Partikel der Charge 0104103.

Die Magnetisierungskurve für C250 Partikel ist in Abbildung 9 dargestellt. Das angelegte magnetische Feld wurde jeweils von negativen zu positiven Werten und zurück durchfahren. Beide Kurven sind dargestellt. Da diese praktisch durch den Nullpunkt gehen, liegt nach Wegnahme des externen Feldes eine Restmagnetisierung $< 1\%$ vor. Daher zeigen die Partikel nahezu superparamagnetisches Verhalten, woraus sich ergibt, dass die in der PVA-Matrix eingebetteten Magnetit-Nanopartikel eine Größe um 10 nm haben und eine vollständige Resuspendierung der Partikel nach Wegnahme des magnetischen Feldes möglich ist. Für die Partikel der Charge 0104103 ist der Verlauf nahezu identisch. Die Sättigungsmagnetisierung der beiden Partikelchargen erreicht $35\text{-}37\text{ Am}^2/\text{kg}$, was eine schnelle Abscheidung auch bei geringem Magnetfeld ermöglicht [83].

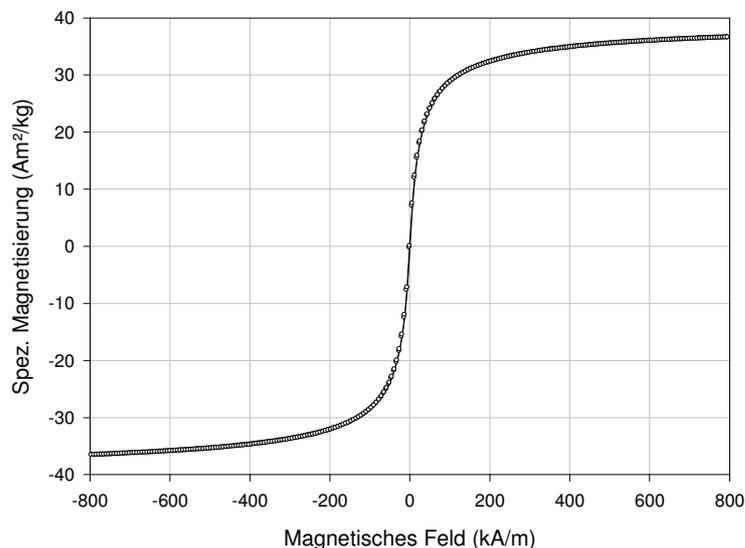


Abbildung 9: Magnetisierungskurve für M-PVA C22 Partikel (Charge C250).

Anhand der ESEM Bilder der C22 Partikel (Abbildung 10) zeigt sich die Kugelform der Partikel ohne sichtbare Poren. Bei der Partikelgröße bestätigen die Aufnahmen qualitativ die per Partikelgrößenmessung CIS 100 bestimmten Größen.

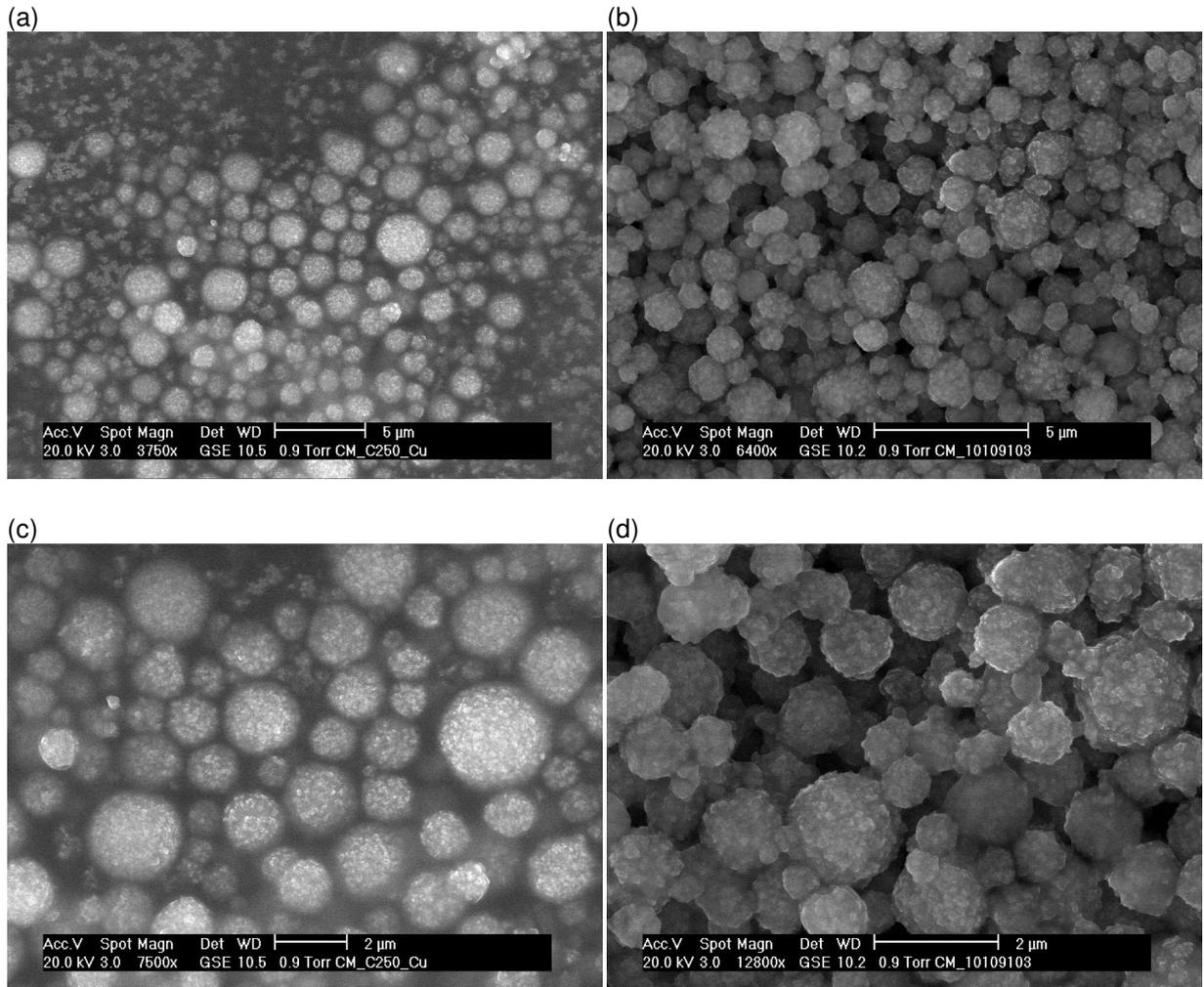


Abbildung 10: ESEM Bilder der C22-250 (a und c) und C22-0104103 (b und d) Partikel. Die kleinen Fragmente in Bild (a) oben links stammen vom Trägerkunststoff und gehören nicht zu den Partikeln.

4.2 Extraktionsstudien

Mit Hilfe von Extraktionsstudien wurde untersucht, ob sich aus den verwendeten M-PVA C22 Partikeln unter Prozessbedingungen mit Hilfe gängiger Prozesslösungsmitteln Spuren der zur Partikelsynthese eingesetzten Stoffe herauslösen lassen. Die Ergebnisse der Extraktionsstudien sind in Tabelle 14 dargestellt. Die höchste Eisenkonzentration lässt sich mit reinem MilliQ-Wasser nachweisen (1,14 bzw 1,05 mg/l). Für alle anderen Lösungsmittel liegt die Eisenkonzentration deutlich unter 1 mg/l. Die Cer-Konzentration liegt für alle Proben unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,04 mg/l. Die Acrylsäurekonzentration liegt für alle Proben unter der Bestimmungsgrenze von 0,16 mg/ml. Ebenfalls unterhalb der Bestimmungsgrenze liegen die PVA-Konzentrationen mit Ausnahme der Ethanolproben, bei denen die PVA-Konzentration zwischen 1,9 und 2,9 mg/l beträgt. Aldehydgruppen (durch den Ein-

satz von Glutaraldehyd bei der Partikelsynthese) konnten bei keiner der Proben nachgewiesen werden.

Tabelle 14: Ergebnisse der Extraktionsstudien, Fe = Eisen, Ce = Cer, AS = Acrylsäure; AG = Aldehydgruppen.

Probe	Fe [mg/l]	Ce [mg/l]	AS [mg/l]	PVA [mg/l]	AG [μ mol/l]
Wasser					
Hintergrund	< 0,02	< 0,04	< 0,16	< 1	< 10
Probe 1	1,14 \pm 0,23	< 0,04	< 0,16	< 1	< 10
Probe 2	1,05 \pm 0,21	< 0,04	< 0,16	< 1	< 10
Ethanol					
Probe 1	0,034 \pm 0,002	< 0,04	< 0,16	2,9 \pm 0,08	< 10
Probe 2	0,036 \pm 0,001	< 0,04	< 0,16	1,9 \pm 0,13	< 10
1 mM HCl					
Hintergrund	< 0,02	< 0,04	< 0,16	< 1	< 10
Probe 1	0,73 \pm 0,12	< 0,04	< 0,16	< 1	< 10
Probe 2	0,51 \pm 0,06	< 0,04	< 0,16	< 1	< 10
0,1 M MES 0,5 M NaCl					
Hintergrund	< 0,02	< 0,04	- (MES stört)	< 1	< 10
Probe 1	0,049 \pm 0,005	< 0,04	- (MES stört)	< 1	< 10
Probe 2	0,039 \pm 0,007	< 0,04	- (MES stört)	< 1	< 10

4.3 Protokolloptimierung mittels statistische Versuchsplanung

Die Zweischrümmobilisierung von α -Chymotrypsin und Tyrosin-Tripeptid wurde mittels DoE-Ansätzen optimiert. Zunächst wurde nach den Einflussfaktoren der Aktivierungsbedingungen der Partikel mit EDC gescreent und diese anschließend optimiert, darauf folgend wurden die Kopplungsbedingungen des Enzyms, bzw. des Peptids optimiert.

4.3.1 Screening der Aktivierungsbedingungen mit EDC

Das Screening der Aktivierungsbedingungen der C22 Partikel mit EDC wurde durchgeführt, um einen ersten Eindruck der wichtigen Faktoren und entsprechenden Faktoreinstellungen innerhalb eines zweistufigen, vollfaktoriellen Versuchsaufbaus zu erhalten. Die Ergebnisse der Einzelversuche sind in Tabelle 29 in Kapitel 7.1.1 im Anhang aufgeführt. Mit Ausnahme von sechs Versuchen (# 3, 4, 7, 8, 15 und 16) wurden Beladungsausbeuten ≥ 87 % erreicht. Bei den sechs Versuchen mit kleinerer Beladungsausbeute (38–65 %) war die Aktivierung bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt worden. Zwei andere Versuche mit Beladungs-

ausbeuten $\geq 87\%$ (# 11 und 12) waren zwar auch bei dieser Temperatur durchgeführt worden, hatten aber entweder niedrigere Aktivierungszeiten oder höhere EDC-Konzentrationen.

Das freie α -Chymotrypsin hatte eine spezifische Aktivität von 109 U/mg. Normiert auf die eingesetzte Enzymmenge pro Gramm Partikel von 31 mg/g ergibt sich eine eingesetzte freie Aktivität pro Gramm Partikel von 3436 U/g. Die Aktivitätsausbeute in dieser Versuchsreihe nach der Immobilisierung lag bei 3–33 %. Die Aktivitätsausbeute korreliert nicht linear mit der Beladungsausbeute. So haben die die Partikel mit einer Beladungsausbeute von $\geq 87\%$ zwar eine Aktivitätsausbeute von $> 20\%$, skalieren aber nicht linear im Bereich 20–33 % Aktivitätsausbeute mit der Beladungsausbeute von 87–98 %. Der Versuch # 3 zeigt sogar bei einer Beladungsausbeute von nur 65 % eine Aktivitätsausbeute von 21 %.

Zur Modellerstellung mittels MLR wurden die, im untersuchten Intervall, nicht signifikanten Faktoren entfernt. Jene Faktoren also, deren Konfidenzintervalle betragsmäßig doppelt so groß waren wie die Faktorwerte, womit auch 0 einen möglichen Faktorwert darstellt. Diese nicht signifikanten Faktoren waren der pH und alle Interaktionsterme mit dem pH. Im Falle der Aktivitätsausbeute wird auch die EDC-Konzentration als nicht signifikant angezeigt, da aber Interaktionsterme mit EDC signifikant waren, konnte der lineare Koeffizient nicht entfernt werden. Ohne lineare Koeffizienten ist es nicht möglich, Interaktionskoeffizienten oder quadratische Koeffizienten im Modell zu berücksichtigen. Auf Grund der freiwerdenden Freiheitsgrade war es möglich einen quadratischen Term in das Modell einzufügen, um dieses zu verbessern [46]. Für die beschriebene Auswertung fiel die Wahl auf die Temperatur, da diese als Einzelfaktor den höchsten Einfluss hat. Die Modellparameter der beiden erstellten Modelle für die Beladungs- und Aktivitätsausbeute sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Modellparameter der Screening-Modelle für die Beladungs- und Aktivitätsausbeute, nach dem Entfernen der nichtsignifikanten Koeffizienten aus dem Modell.

Modellparameter	Beladungsausbeute	Aktivitätsausbeute
R^2	0,97	0,95
Q^2	0,93	0,98
p-Wert (Lack of Fit)	0,088	0,237
Reproduzierbarkeit	1,0	0,99

Für R^2 und Q^2 zeigen beide Modelle Werte nahe 1. Auf Grund der eng beieinander liegenden Ergebnisse der dreifach bestimmten Zentralpunktexperimente, sowohl für die Beladung, als auch für die Aktivität, bestehen beide Modelle den Lack of Fit Test (Bedingung $p > 0,05$), sind also statistisch valide, bei sehr hoher Reproduzierbarkeit.

Die Schaubilder der signifikanten Koeffizienten der beiden Modelle sind in Abbildung 11 dargestellt. Die linearen Terme des Koeffizienten-Plots (Temperatur, Zeit, EDC-Konzentration) erlauben erste Aussagen über ihren Einfluss auf die Beladungs-, bzw. Aktivitätsausbeute, ausgehend vom Zentralpunkt. Die Balkenhöhe hat dieselbe Einheit wie die Antworten, d.h. bei ansonsten unveränderten Zentralpunktbedingungen verschlechtert beispielsweise eine Temperaturerhöhung die Beladungsausbeute. Es zeigt sich, dass sowohl für die Beladungsausbeute, als auch die Aktivitätsausbeute die gleichen Faktoren wichtig sind, wenn auch für die Aktivitätsausbeute in geringerem Maß. Es ist ersichtlich, dass sowohl niedrige Aktivierungstemperaturen, als auch niedrige Aktivierungszeiten höhere Beladungs- und Aktivitätsausbeuten erlauben. Höhere EDC-Konzentrationen sind zumindest für die Beladung vorteilhaft, auch wenn sie weniger Einfluss als die anderen beiden Parameter haben. Weiterhin wird ersichtlich, dass es Wechselwirkungen zwischen Temperatur/EDC-Konzentration, Temperatur/Zeit und Zeit/EDC-Konzentration gibt.

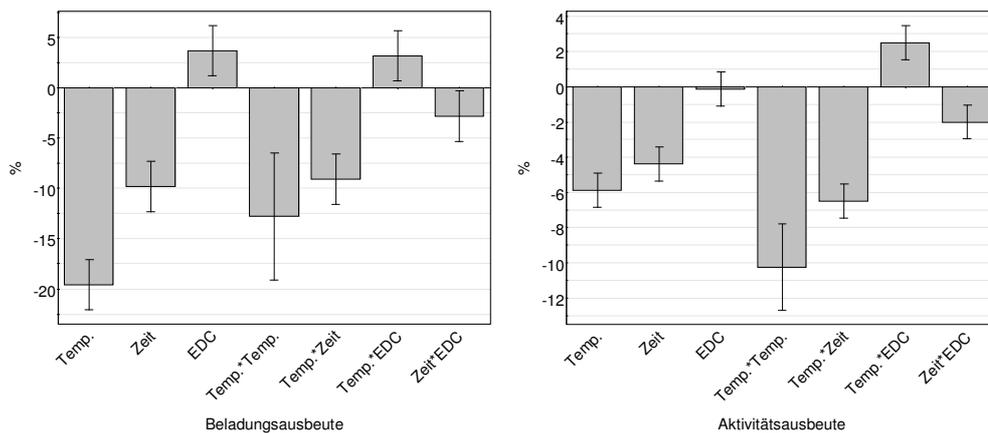


Abbildung 11: Schaubilder der signifikanten Koeffizienten des Screening-DoEs zur Partikelaktivierung.

Die Vorhersagen des DoE-Modells sind in Abbildung 12 dargestellt. Für die Beladungsausbeute zeigt das Modell die Abhängigkeit von der Temperatur und der EDC-Konzentration. So sind die beiden niedrigen Temperaturen 11 und 24 °C mit vorhergesagten Beladungsausbeuten zwischen 80 und 100 %, abhängig von der EDC-Konzentration, besser geeignet als 37 °C mit Ausbeuten zwischen 40 und 80 %. Bei 24 und 37 °C zeigt sich zudem der Trend in Richtung niedrigerer Immobilisierungszeit in Kombination mit hoher EDC-Konzentration für eine möglichst hohe Ausbeute. Für die Aktivitätsausbeute zeigen die Graphen für 24 °C und 37 °C einen Verlauf, der sich weitestgehend mit den Graphen für die Beladungsausbeute deckt. Auch hier sind höhere Ausbeuten bei 24 °C zu erwarten als bei 37 °C. Die Trends zu hohen EDC-Konzentrationen und niedrigen Aktivierungstemperaturen zeigen sich auch hier. Der Trend, dass die Aktivität maximal wird bei mittlerer Temperatur (24 °C), hoher EDC-

Konzentration und niedriger Aktivierungszeit, ist durch die Ergebnisse des Zentralpunkts gegeben (# 17–19), welche mit die höchsten Aktivitätsausbeuten des DoEs liefern. Für die niedrige Temperatur von 11 °C zeigt sich ein umgekehrter Trend mit höher zu erwartenden Aktivitätsausbeuten bei niedrigen EDC-Konzentrationen und langen Aktivierungszeiten, ein Trend der vor allem aus den Versuchen # 5 und 6 herrührt. Beide Versuche wurden bei 11 °C für 35 min mit einer EDC-Konzentration von 0,18 g/g aktiviert und zeigen mit 33 %, bzw. 31 % Aktivitätsausbeute die höchsten Werte dieses DoEs.

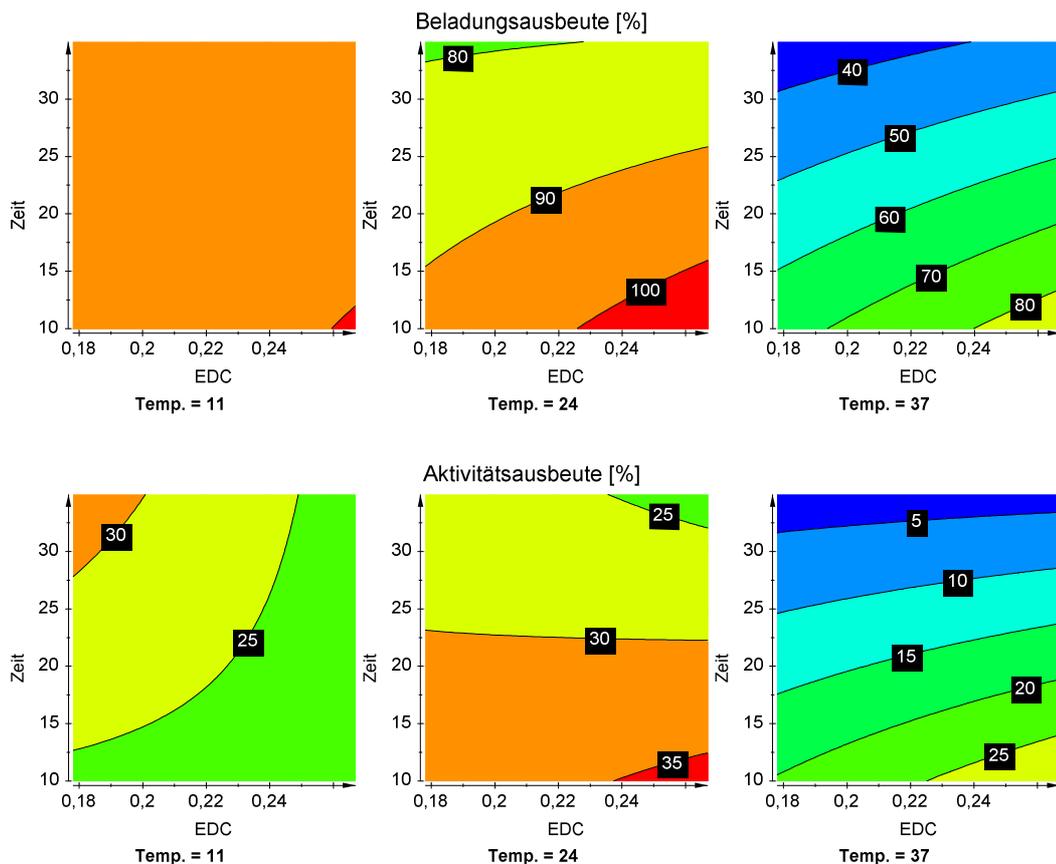


Abbildung 12: Konturplots zur Vorhersage der Beladungsausbeute (oben) und Aktivitätsausbeute (unten) des DoEs zum Screening der Aktivierungsparameter mit EDC. Die Einheiten sind Zeit in Minuten, EDC-Konzentration in g/g und Temperatur in °C.

Diese Ergebnisse geben jeweils nur die Richtung vor, in der sich ein Optimum der Aktivierungsbedingungen befindet, ohne das Optimum selbst zu zeigen. Daher wurde beschlossen, die Partikelaktivierung in einem Optimierungs-DoE mit erhöhtem Wertebereich und größerer Versuchsanzahl erneut zu untersuchen (siehe Kapitel 3.9.3).

4.3.2 Optimierung der Aktivierungsbedingungen mit EDC

Basierend auf den Screening-Ergebnissen zur Partikelaktivierung mittels EDC wurde ein größerer Optimierungs-DoE mit fünf Wertevariationen pro Parameter, ein sog. Onion-Design, durchgeführt. Gegenüber dem Screening-DoE zur Partikelaktivierung verschiebt sich der Zentralpunkt des Onion-Designs, weiterhin sind die Wertebereiche für alle Parameter deutlich erweitert. So ist beispielsweise der alte Maximalwert der EDC-Konzentration (0,27 g/g) der neue Zentralpunkt. Die Ergebnisse der Einzelversuche sind in Tabelle 30 in Abschnitt 7.1.2 im Anhang wiedergegeben. Die Ergebnisse des untersuchten erweiterten Wertebereichs reichen für die Beladungsausbeute über den kompletten Bereich von 0–100 %, d.h. zwischen keiner Beladung und Vollbeladung ist jede Ausbeute möglich. Im Gegensatz zum Screening zeigt dieses DoE für nur 11 von 44 Versuchen eine Beladungsausbeute > 84 %. Bei diesen hohen Beladungsausbeuten sind zwei (# 28 und 30) zu finden, die mit einer Temperatur von 40 °C aktiviert wurden. Bei diesen beiden Versuchen waren die Aktivierungszeiten die kürzesten im DoE (6 min) und die EDC-Konzentrationen die höchsten (0,49 g/g). Die anderen Versuche mit hoher Beladungsausbeute sind im Temperaturbereich 10–25 °C über den gesamten Bereich von untersuchter Aktivierungszeit und EDC-Konzentration aktiviert worden.

Bei der Aktivitätsausbeute beträgt der Maximalwert 28 %, der Maximalwerte des Screening-DoEs von 33 % wird nicht erreicht. Neben Abweichungen auf Grund der Aktivitätsbestimmung ist hier die erhöhte Enzymeinsatzkonzentration von $37,4 \pm 1,7$ mg/g beim Onion-Design gegenüber 31 mg/g beim Screening-DoE zu beachten. Der Wert für die eingesetzte Enzymaktivität liegt mit 3786 ± 272 U/g allerdings im gleichen Bereich wie beim Screening-DoE (3436 U/g). Aktivitätsausbeuten von > 20 % korrelieren wie beim Screening nicht zwangsläufig mit einer hohen Beladungsausbeute. So sind bei den Versuchen # 2, 4, 5, 13, 19, 24, 39 und dem Zentralpunkt (# 42, 43, 44) die Aktivitätsausbeuten > 19 %, obwohl die Beladungsausbeuten im Bereich 14–54 % und damit deutlich entfernt von einer Vollbeladung sind.

Auch beim Onion-Design wurden die nicht signifikanten Faktoren entfernt. So wurde der Aktivierungs-pH sowie alle zugehörigen Interaktionsterme und der quadratische Term zum pH als nicht signifikant aus dem Modell entfernt, d.h. der pH hat im untersuchten Bereich (5,3–6,5) keinen Einfluss auf die beiden Antwortparameter, das System ist robust in diesem Bereich. Weiterhin entfernt wurden für die EDC-Konzentration alle Interaktionsterme und der quadratische Term. Während beim Screening aus dem Hinzufügen eines quadratischen Terms für die Temperatur eine Modellverbesserung resultierte, wurde dieser quadratische

Term beim Optimierungsdesign als nicht signifikant ebenfalls entfernt. Beim Modell für die Aktivitätsausbeute wurde schließlich noch der quadratische Zeitterm entfernt. Die Modellparameter der beiden erstellten Modelle des Onion-Designs für die Beladungs- und Aktivitätsausbeute sind in Tabelle 16 aufgeführt. Für R^2 und Q^2 zeigt die Tabelle niedrigere Werte als beim Screening-DoE, die Anpassung des Modells an die Daten, bzw. die Vorhersage der Daten durch das Modell ist somit weniger gut als beim Screening. Da dieses Modell auf 44 Einzelversuchen aufbaut, kann dies auf eine Überbestimmtheit dieses komplexeren Modells hindeuten. Durch die eng beieinander liegenden Zentralpunktwerte, sowohl für die Beladung, als auch für die Aktivität, ergibt sich wieder eine hohe Reproduzierbarkeit. Auf Grund des bestandenen Lack of Fit Tests sind beide Modelle valide.

Tabelle 16: Modellparameter der Onion-Design-Modelle für die Beladungs- und Aktivitätsausbeute, nach dem Entfernen der nichtsignifikanten Koeffizienten aus dem Modell.

Modellparameter	Beladungsausbeute	Aktivitätsausbeute
R^2	0,73	0,64
Q^2	0,61	0,53
p-Wert (Lack of Fit)	0,229	0,198
Reproduzierbarkeit	0,92	0,91

In Abbildung 13 sind die Schaubilder der signifikanten Faktoren des Modells dargestellt. Verglichen mit dem Screening-DoE sind weniger Faktoren für das Modell signifikant. Die linearen Terme des Koeffizienten-Plots (Temperatur, Zeit, EDC-Konzentration) zeigen, ausgehend vom Zentralpunkt, dieselben Vorzeichen wie beim Screening, sowohl bei der Beladungs-, als auch bei der Aktivitätsausbeute.

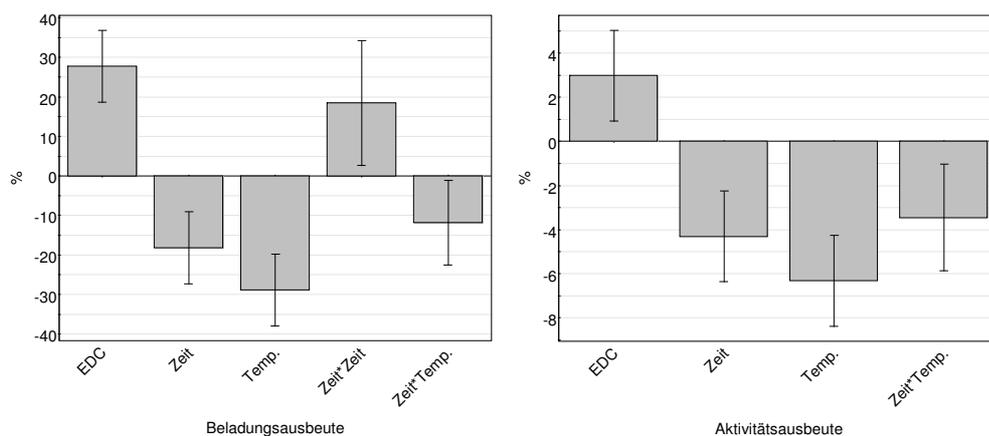


Abbildung 13: Schaubilder der signifikanten Koeffizienten des Onion-Designs zur Partikelaktivierung.

Im Gegensatz zum Screening zeigt sich auch bei der Aktivitätsausbeute der positive Effekt einer erhöhten EDC-Konzentration. Als einzige Wechselwirkung im Onion-Design verbleibt

die Zeit/Temperatur, hier zeigt der zugehörige Koeffizient, wie schon beim Screening, in die negative Richtung. Für die Beladungsausbeute ist noch der quadratische Term der Zeit in positiver Richtung signifikant.

Die Vorhersagenplots für die Beladungs- und Aktivitätsausbeute für das Onion-Design sind in Abbildung 14 dargestellt. Das Onion-Design zeigt, wie schon das Screening-Modell, die starke Abhängigkeit der Beladungsausbeute von der EDC-Konzentration. Die höchsten vorhergesagten Beladungsausbeuten werden für hohe EDC-Konzentrationen und Temperaturen $< 25\text{ °C}$ vorhergesagt. Wieder zeigen die Schaubilder mit den beiden höheren Temperaturen (25 und 40 °C) den Trend in Richtung niedrigerer Immobilisierungszeit in Kombination mit hoher EDC-Konzentration für eine möglichst hohe Ausbeute. Im Schaubild für die Aktivierungstemperatur von 10 °C ist die niedrige Aktivierungszeit laut der Vorhersage vorteilhaft, auch wenn bei hoher Aktivierungszeit ebenfalls Vollbeladung vorhergesagt wird, der Bereich jedoch kleiner ausfällt. Die gebogene Form der Vorhersagen in diesem Schaubild, die aus dem quadratischen Zeitterm resultiert, ist für die Beladungsausbeute physikalisch nur schwer zu erklären. Es bedeutet, dass bis zu einem Zeitpunkt (in diesem Fall 30 min) mehr α -Chymotrypsin-Moleküle binden als oberhalb dieses Zeitpunkts. Ab dem Überschreiten dieses Zeitpunkts binden nicht mehr alle Moleküle, etwa durch EDC-Hydrolyse, um ab dem Überschreiten eines weiteren Zeitpunkts (55 min) wieder zu binden. Selbst unter der Annahme, dass hydrolysierte EDC-Moleküle bereits aktivierte COOH-Gruppen wieder frei geben, wonach neue, noch nicht hydrolysierte EDC-Moleküle diese wieder aktivieren können, wäre dieser Vorgang eher konstant über die entsprechenden Gruppen zu erwarten und würde daher auch zu einer konstanten Beladungsausbeute bis zu einem bestimmten Zeitpunkt mit anschließender Abnahme führen. Auf keinen Fall aber zu einer erneuten Erhöhung. Diese Vorhersage wird jedoch durch ein Versuchsergebnis (# 35) gedeckt.

Der Unterschied in den relativen Beladungsausbeuten, die beim Onion-Design insgesamt niedriger sind als beim Screening, liegt an der erhöhten Enzymeinsatzkonzentration von $37,4 \pm 1,7\text{ mg/g}$ im Gegensatz zu den 31 mg/g beim Screening. Absolut waren die am höchsten erreichten Beladungen beim Onion-Design mit $37,5\text{ mg/g}$ höher als die beim Screening erreichten mit $30,7\text{ mg/g}$. Wird die Vorhersage des Onion-Designs im gleichen Wertebereich wie beim Screening mit den Vorhersagen des Screenings verglichen, so decken sich die Aussagen für die absoluten Beladungen.

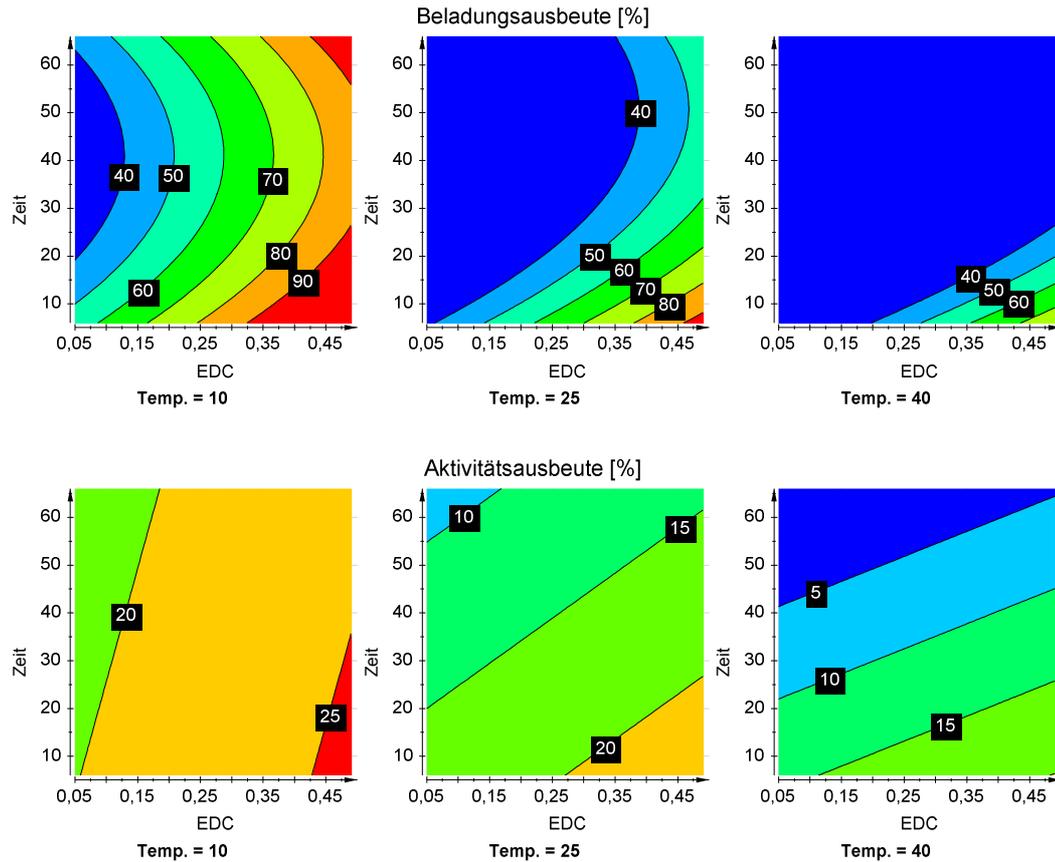


Abbildung 14: Konturplots zur Vorhersage der Beladungsausbeute (oben) und Aktivitätsausbeute (unten) des Onion-Designs. Die Einheiten sind Zeit in Minuten, EDC-Konzentration in g/g und Temperatur in °C.

Werden die Graphen der Vorhersage der Aktivitätsausbeute mit denen der Beladungsausbeute verglichen, ist zunächst auffällig, dass auch bei Beladungsausbeuten von nur 60–70 % noch Aktivitätsausbeuten > 20 % vorhergesagt werden (rechts unten in den mittleren Schaubildern). Offensichtlich korrelieren die Ausbeuten nicht zwangsläufig, was sich bereits an den Ergebnissen der Einzelversuche zeigte (s.o.) und daher auch in das Modell einfließt. Wie im Screening sind aber niedrigere Aktivierungstemperaturen vorteilhaft für die Aktivitätsausbeuten, ebenso zeigen sich die Trends zu hohen EDC-Konzentrationen und niedrigen Aktivierungszeiten. Beim Screening zeigten zwei Versuche (# 5 und # 6) bei niedriger Temperatur, niedriger EDC-Konzentration und längerer Aktivierungszeit Aktivitätsausbeuten > 30 %, dies lässt sich im Onion-Design nicht bestätigen und legt den Schluss nahe, dass es sich dabei um Ausreißer handelte. Auch die absoluten Aktivitäten dieser beiden Versuche waren höher als alle im Onion-Design erhaltenen.

Der erweiterte Wertebereich bestätigt die Trends des Screening-DoEs, zeigt aber weder für die Beladungsausbeute, noch für die Aktivitätsausbeute ein Optimum innerhalb des Modells,

alle optimalen Bedingungen befinden sich im oberen Randbereich der EDC-Konzentration. Daher wurde das Onion-Design um den EDC-Wertebereich bis 1,3 g/g erweitert (siehe Kapitel 3.9.4).

4.3.3 Erweiterung des Onion-Designs um höhere EDC-Konzentrationen

Da im Onion-Design noch kein klares Optimum gefunden worden war, gerade in Bezug auf die EDC-Konzentration, wurde als letzte Untersuchung der Aktivierungsbedingungen der Wertebereich des Onion-Designs erweitert, um EDC-Konzentrationen bis 1,3 g EDC / g Partikel abzudecken. Die Einzelergebnisse der D-Optimalen Erweiterung des Onion-Designs sind in Tabelle 31 im Abschnitt 7.1.3 im Anhang dargestellt. Der neue Zentralpunkt (# 16–18) wurde mit einer EDC-Konzentration von 0,89 g EDC / g Partikel durchgeführt. Die Beladungsausbeuten liegen, mit Ausnahme der Versuche # 9 und 13, bei über 81 %, bei zwölf der achtzehn Versuche liegt die Beladungsausbeute sogar über 90 %. Die Aktivitätsausbeuten sind bei neun Versuchen über 20 %. Auffällig ist, dass Versuch # 12 die höchsten Aktivitätsausbeute (28 %) der Erweiterung und sogar des ganzen Onion-Ansatzes besitzt. Diese Probe wurde mit einer Temperatur von 40 °C für 46 min aktiviert, allerdings auch mit der höchsten EDC-Konzentration des DoEs von 1,3 g/g. Im direkten Vergleich mit Versuch # 13, bei dem bei 40 °C für 66 min mit derselben Konzentration aktiviert wurde, wird deutlich, dass die höchste Beladungs- und Aktivitätsausbeute direkt neben der zweitniedrigsten Beladungs- und Aktivitätsausbeute liegt. Offensichtlich toleriert das System durch die hohe EDC-Konzentration auch hohe Temperaturen und lange Inkubationszeiten bis zu einem gewissen Grad.

Die Ergebnisse der 18 neuen Versuche wurden zusammen mit den 44 Versuchen des ursprünglichen Onion-Designs zu in einem D-Optimalen Optimierungsmodell zusammengesetzt und nicht signifikante Terme wiederum entfernt. Im Einzelnen waren das der quadratische Term der Temperatur und der Interaktionsterm EDC-Konzentration/Aktivierungszeit. Weiterhin wurde für das Modell der Beladungsausbeute der quadratische Zeitterm und der Interaktionsterm EDC-Konzentration/Aktivierungstemperatur entfernt und für die Aktivitätsausbeute der quadratische EDC-Term. Die Modellparameter der beiden erstellten Modelle des Onion-Designs für die Beladungs- und Aktivitätsausbeute sind in Tabelle 17 aufgeführt. Die Werte von R^2 und Q^2 sind in einem ähnlichen Bereich wie im Onion-Design. Der Lack of Fit Test zur Beurteilung der Modellvalidität wurde für die Beladungsausbeute mit $p = 0,048 < 0,05$ knapp nicht bestanden. Auf Grund der nur knappen Unterschreitung wird das Modell trotzdem ausgewertet. Auch die Reproduzierbarkeit der Modelle verschlechtert sich gegenüber dem ursprünglichen Onion-DoE.

Tabelle 17: Modellparameter der D-Optimal erweiterten Onion-Design-Modelle für die Beladungs- und Aktivitätsausbeute, nach dem Entfernen der nichtsignifikanten Koeffizienten aus dem Modell.

Modellparameter	Beladungsausbeute	Aktivitätsausbeute
R^2	0,71	0,62
Q^2	0,65	0,51
p-Wert (Lack of Fit)	0,048	0,328
Reproduzierbarkeit	0,86	0,66

In Abbildung 15 sind die Schaubilder der signifikanten Faktoren des Modells wiedergegeben. Die Koeffizienten der linearen Terme EDC-Konzentration, Aktivierungszeit und Aktivierungstemperatur geben vom neuen Zentralpunkt aus wieder den Einfluss auf die beiden Ausbeuten an und zeigen wieder für die EDC-Konzentration in positive Richtung, für die Aktivierungszeit und Aktivierungstemperatur in negative. Ebenfalls die gleiche Richtung wie aus dem Onion-Design zeigt der Koeffizient des Interaktionsterms Aktivierungszeit/Aktivierungstemperatur.

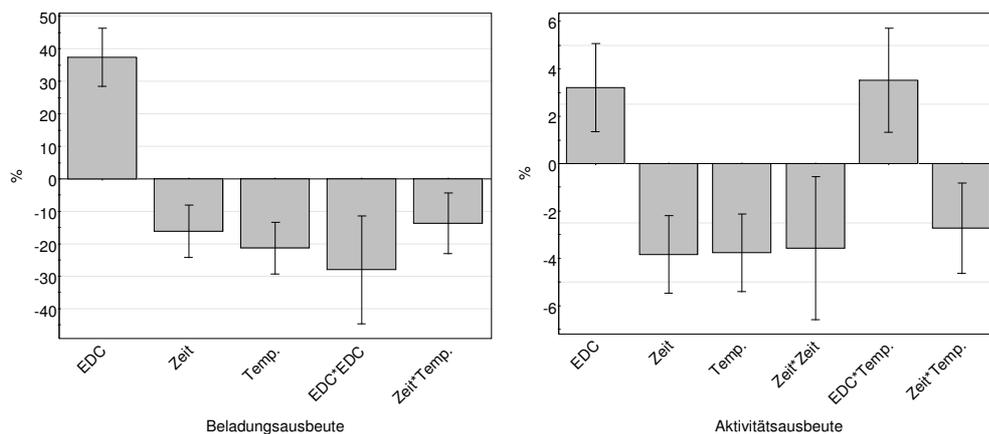


Abbildung 15: Schaubilder der signifikanten Koeffizienten der D-Optimalen Erweiterung des Onion-Design-DoEs zur Partikelaktivierung.

Die Vorhersagen des erweiterten Modells (Abbildung 16) zeigen jetzt die Optimalwerte des untersuchten Systems an, nicht mehr nur Trends. Für die Beladungsausbeute ist offensichtlich, dass eine Vollbeladung, d.h. Vorhersagen für die Beladungsausbeute > 90 %, bei einer EDC-Konzentration ab 0,53 g/g, niedrigen Aktivierungstemperaturen und niedrigen Aktivierungszeiten erreicht wird. Mit steigender Temperatur muss immer mehr EDC eingesetzt werden, um noch Vollbeladung zu erreichen, ebenso führen auch längere Aktivierungszeiten zu schlechteren Ergebnissen. Beides spricht für die Hydrolyse des EDCs im wässrigen Milieu bei erhöhten Temperaturen. Die Vorhersagen der Beladungsausbeute decken sich im Wesentlichen mit denen des Onion-Designs ohne Erweiterung, auch wenn hier höhere EDC-Konzentrationen als für eine Vollbeladung notwendig vorhergesagt werden. Da in diesem

Modell aber mehr als 60 Einzelergebnisse zur Modellbildung herangezogen wurden, ist das Modell tendenziell überbestimmt [46], weshalb die Modellvalidität und Reproduzierbarkeit sinkt. Weiterhin wurde ein viel größerer EDC-Konzentrationsbereich durch weniger Versuche abgedeckt als im Onion-Modell ohne Erweiterung.

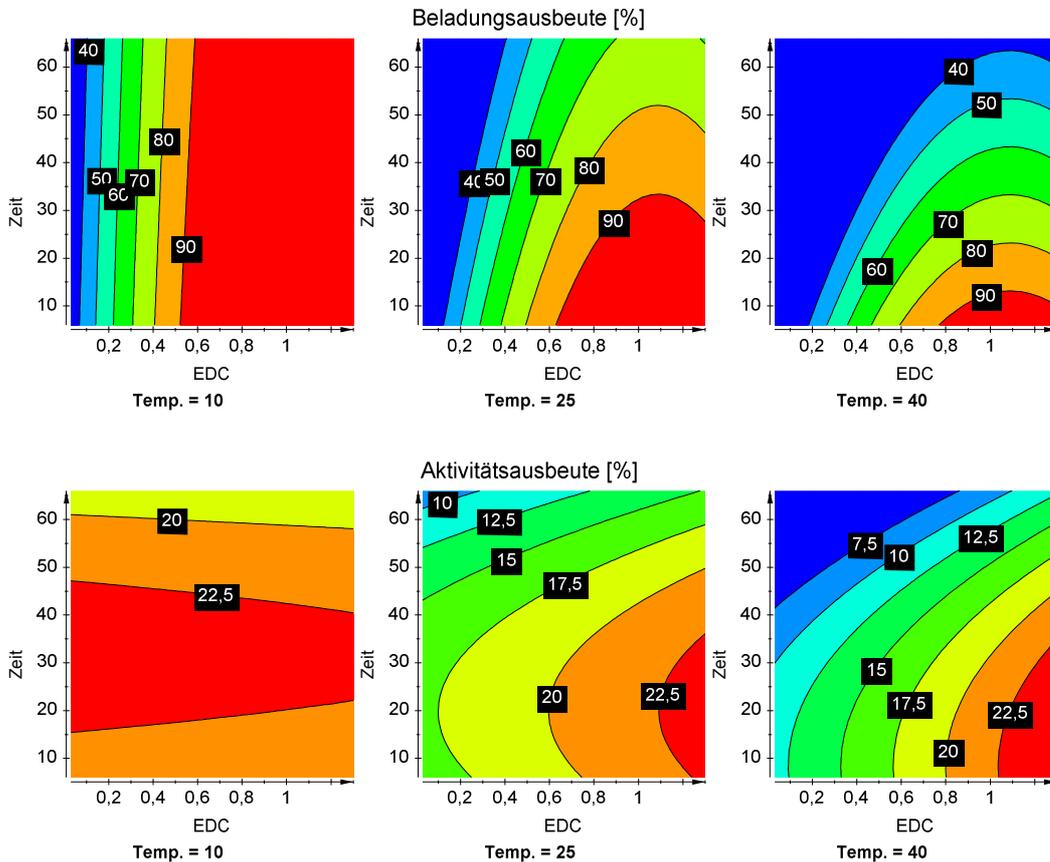


Abbildung 16: Konturplots zur Vorhersage der Beladungsausbeute (oben) und Aktivitätsausbeute (unten) der D-Optimalen Erweiterung des Onion-Designs. Die Einheiten sind Zeit in Minuten, EDC-Konzentration in g/g und Temperatur in °C.

Auch für die Aktivitätsausbeute werden niedrigere Temperaturen als besser für das Ergebnis vorhergesagt. Da die Erweiterung im Mittel Aktivitätsausbeuten von 19–21 % hervorbrachte, wird auch bei den Vorhersagen nur noch ein Bereich für > 22,5 % angegeben und nicht mehr > 25 %, wie beim Onion-Design ohne Erweiterung. Aus den Vorhersagen wird deutlich, dass höhere Temperaturen und auch Aktivierungszeiten durch hohe EDC-Konzentrationen ausgeglichen werden können. Die Tendenz, dass niedrige Aktivierungstemperaturen und niedrige Aktivierungszeiten zu höheren Ausbeuten bei der Beladung führen, zeigt sich auch für die Aktivitätsausbeute. Da die Aktivität aber nicht zwangsläufig mit der Beladung proportional verläuft, reichen auch schon niedrige EDC-Konzentrationen für hohe Aktivitätsausbeuten aus.

4.3.4 Fazit aus der Optimierung der Partikelaktivierung mittels EDC

Die Partikelaktivierung mittels EDC wurde durch ein Screening-DoE und anschließendes D-Optimales Onion-Design DoE optimiert. Folgende Schlüsse werden als Fazit aus den DoE-Versuchen zur Partikelaktivierung gezogen: Der untersuchte pH-Bereich (5,3–6,5) hat nur wenig bis keinen Einfluss auf die Ausbeuten der Beladung und Aktivität. Bei nachfolgenden Versuchen wurde der Aktivierungs-pH der Vorversuche von 5,3 daher beibehalten. Die Aktivierungstemperatur hat großen Einfluss auf die Ausbeuten, hier gilt, je niedriger die Temperatur des untersuchten Bereichs, desto besser. Daher wurden Temperaturen im Bereich 10–15 °C für nachfolgende Aktivierungen eingesetzt. Auch die Aktivierungszeit hat großen Einfluss. Hier ist das System bis 40 min robust, darüber verringern sich die Ausbeuten. Für nachfolgende Versuche wurden daher keine Aktivierungszeiten > 35 min verwendet. Diese Zeitspanne reicht aber für die Handhabung der aktivierten Partikel aus, auch im Hinblick auf einen Scale-up. Auch bei der EDC-Konzentration zur Aktivierung zeigt das System eine Robustheit, hohe Konzentrationen verschlechtern die Ausbeuteergebnisse nicht. Weiterhin bestätigt sich die Wahl des 0,1 M Tris 0,02 M CaCl₂ pH 9 Puffers als geeigneter Waschpuffer nach der Enzymkopplung, da die Optimierungsversuche einige Aktivierungsbedingungen zeigten, bei denen sich die Beladung der Partikel nach der Enzyminkubation nahezu vollständig desorbieren ließ, die Beladungsausbeute also gegen 0 ging. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass das EDC, bzw. der gebildete Aktivester hydrolysiert wurde, das Enzym in diesem Fall adsorptiv und nicht kovalent gebunden wurde und daher desorbiert werden konnte.

4.3.5 Optimierung der Kopplungsbedingungen von α -Chymotrypsin

Nach der Optimierung der Aktivierung der C22 Partikel mittels EDC wurde ein DoE für die Optimierung der Kopplungsbedingungen des α -Chymotrypsins durchgeführt. Die Einzelergebnisse der Optimierung der Kopplung von α -Chymotrypsin sind in Tabelle 32 im Kapitel 7.1.4 im Anhang dargestellt. Die Beladungsausbeuten liegen zwischen 77 und 90 %, die Aktivitätsausbeuten zwischen 19 und 27 %. Bei den untersuchten Parametern ist für die Beladungsausbeute keiner für das Ergebnis signifikant, bei der Aktivitätsausbeute ist nur der pH signifikant. Die Modellparameter des erstellten Modells für die Aktivitätsausbeute sind in Tabelle 18 aufgeführt. Der hohe pH-Werte (in diesem Fall pH 7,1) ist nach diesen Ergebnissen für die Aktivitätsausbeute besser als die untersuchten niedrigen (5,3 und 6,2). Dies wurde bei der Erstellung der Beladungskurven von α -Chymotrypsin (Kapitel 3.11.2) berücksichtigt. Da die Kopplung nach diesem Ergebnis nur noch vom pH abhängt und sonst keine Einflussfaktoren mehr besitzt, bestätigt sich noch einmal die Wichtigkeit der Partikelaktivierung mit EDC.

Tabelle 18: Modellparameter des Modells für die Aktivitätsausbeute zur Optimierung der Kopplungsbedingungen von α -Chymotrypsin, nach dem Entfernen der nichtsignifikanten Koeffizienten aus dem Modell. Als einzig signifikanter Koeffizient verbleibt für die Aktivitätsausbeute der pH-Wert.

Modellparameter	Aktivitätsausbeute
R^2	0,68
Q^2	0,52
p-Wert (Lack of Fit)	0,290
Reproduzierbarkeit	0,85

4.3.6 Optimierung der Kopplungsbedingungen von Tyrosin-Tripeptid

Für das Tyrosin-Tripeptid wurde ebenfalls ein DoE für die Optimierung der Kopplungsbedingungen durchgeführt. Die Einzelergebnisse der Optimierung der Kopplung des Tyrosin-Tripeptids sind in Tabelle 33 im Abschnitt 7.1.5 im Anhang dargestellt. Die Beladungsausbeuten liegen zwischen 54 und 90 %. Obwohl Tris auf Grund der verfügbaren Aminogruppen des Puffers eigentlich nicht zur Kopplung von Biomolekülen auf EDC-aktivierten Partikeln eingesetzt werden sollte, zeigen die Ergebnisse, dass es keinen Unterschied macht, ob das Tyrosin-Tripeptid mit Tris pH 8,5 oder CAPS 10,25 immobilisiert wird, beide Beladungsausbeuten sind ähnlich. Für die Erstellung des Modells ist von den untersuchten Parametern für die Beladungsausbeute nur der pH signifikant, die Kopplungszeit und Kopplungstemperatur sind nicht signifikant.

Tabelle 19: Modellparameter des Modells für die Beladungsausbeute zur Optimierung der Kopplungsbedingungen von Tyrosin-Tripeptid, nach dem Entfernen der nichtsignifikanten Koeffizienten aus dem Modell. Als einzig signifikanter Koeffizient verbleibt für die Beladungsausbeute der pH-Wert.

Modellparameter	Beladungsausbeute
R^2	0,70
Q^2	0,59
p-Wert (Lack of Fit)	0,274
Reproduzierbarkeit	0,87

Der hohe pH-Wert von 12 ist besser für die Beladungsausbeute als die beiden anderen (pH 8,5 und 10,25) und führt im Mittel zu einer Beladungsausbeute von 88 %. Dies wurde bei der Erstellung der Beladungskurve des Tyrosin-Tripeptids (Kapitel 3.11.3) berücksichtigt. Das Ergebnis bestätigt die Annahme, die vor dem Versuch getroffen wurde, nämlich, dass der pH für die Kopplung des Tyrosin-Tripeptids höher liegen muss als bei α -Chymotrypsin, da es mit dem N-Terminus der Peptidkette nur eine Aminogruppe zur Kopplung enthält. Der zur Kopplung optimale pH muss aus diesem Grund deutlich über dem pK_a -Wert des N-Terminus liegen ($pNH_2 = 9,11$ [77]), da für eine vollständige Kopplung alle Aminogruppen neutral vorliegen müssen.

4.4 Bestimmung der Enzym-/Peptidbeladung der Partikel mittels FTIR ATR

Mittels FTIR ATR wurde eine Methode zur Quantifizierung der immobilisierten Biomolekülmasse auf den carboxylierten M-PVA Partikeln erstellt. Ein Beispiel für zwei FTIR ATR Spektren von getrockneten M-PVA C22 Partikeln ohne und mit immobilisiertem α -Chymotrypsin (63 mg/g) ist in Abbildung 17 für den gesamten aufgenommenen IR-Bereich (Wellenzahl 4000–400 cm^{-1}) und als Ausschnitt für den Bereich 1800–800 cm^{-1} in Abbildung 18 gezeigt. Die in den Schaubildern aufgeführten Wellenzahlen zeigen die wichtigsten Bandenzuordnungen der Spektren an, die in Tabelle 20 zusammengefasst sind. Die Regionen mit den größten Veränderungen zwischen den beiden Spektren sind die Amid I und Amid II Banden. Zwar wurde für die multivariate Modellerstellung, wie in Kapitel 4.4.2 angeführt, entweder der gesamten Wellenzahlenbereich oder der Abschnitt 1800–770 cm^{-1} verwendet, bei den Amid I und II Banden sind die Änderungen auf Grund von immobilisiertem Enzym jedoch auch direkt mit bloßem Auge sichtbar.

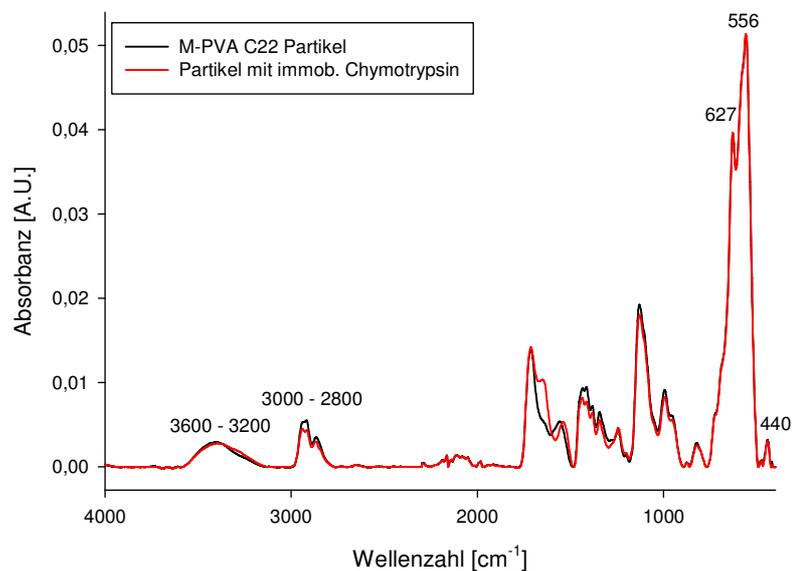


Abbildung 17: Beispiele für FTIR ATR Spektren, M-PVA C22 Partikel ohne immobilisiertes Enzym und mit 63 mg/g kovalent immobilisiertem α -Chymotrypsin im gesamten aufgenommenen IR-Bereich von 4000–400 cm^{-1} .

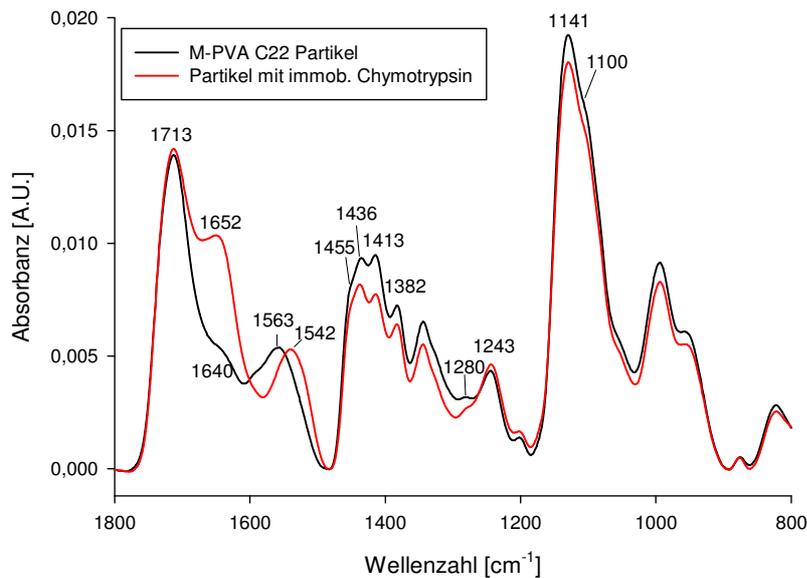


Abbildung 18: Ausschnitt aus den FTIR ATR Spektren der C22 Partikel ohne und mit kovalent immobilisiertem α -Chymotrypsin im Bereich 1800–800 cm^{-1} .

Tabelle 20: Bandenzuordnung für die FTIR ATR Spektren von M-PVA C22 Partikel ohne und mit immobilisiertem α -Chymotrypsin.

Bande [cm^{-1}]	Zuordnung	Quelle
3200–3600	O-H Streckung	[84]–[86]
2800–3000	C-H Alkylstreckung	[85], [86]
1713	C=O Streckung der Carboxygruppe	[84], [85]
1652	Amid I von α -Chymotrypsin (vorrangig C=O Streckung der Peptidbindung)	[87], [88]
1640	C=O Streckung aliphatischer Ester, Acetat (PVA) oder Wasser	[85], [86]
1563	Asymmetrische Streckung des Carboxylat-Anions (COO^-)	[84]
1542	Amid II von α -Chymotrypsin (N-H Deformation und C-N Streckung der Peptidbindung)	[87], [88]
1455 (in der Schulter)	CH_2 Streckung	[84]
1436	CH_2 Deformation	[86]
1413	Symmetrische Streckung des Carboxylat-Anions (COO^-)	[84]
1382	CH_2 Schaukel	[86]
1280	C-O Streckungen	[84]
1243	CH Wippe	[86]
1141	C-O-C Streckung	[86]
1100	C-O Streckung	[86]
627, 556, 440	Fe-O Streckung (Magnetit)	[89]

4.4.1 Calcium-Entfernung von den Immobilisaten

Um den Einfluss des Calciums auf die FTIR ATR Spektren und die Entfernung mittels EDTA zu untersuchen, wurden Waschversuche von Partikeln ohne und mit immobilisiertem α -Chymotrypsin durchgeführt. Die Spektren im Wellenzahlenbereich 1800–770 cm^{-1} sind in Abbildung 19 gezeigt.

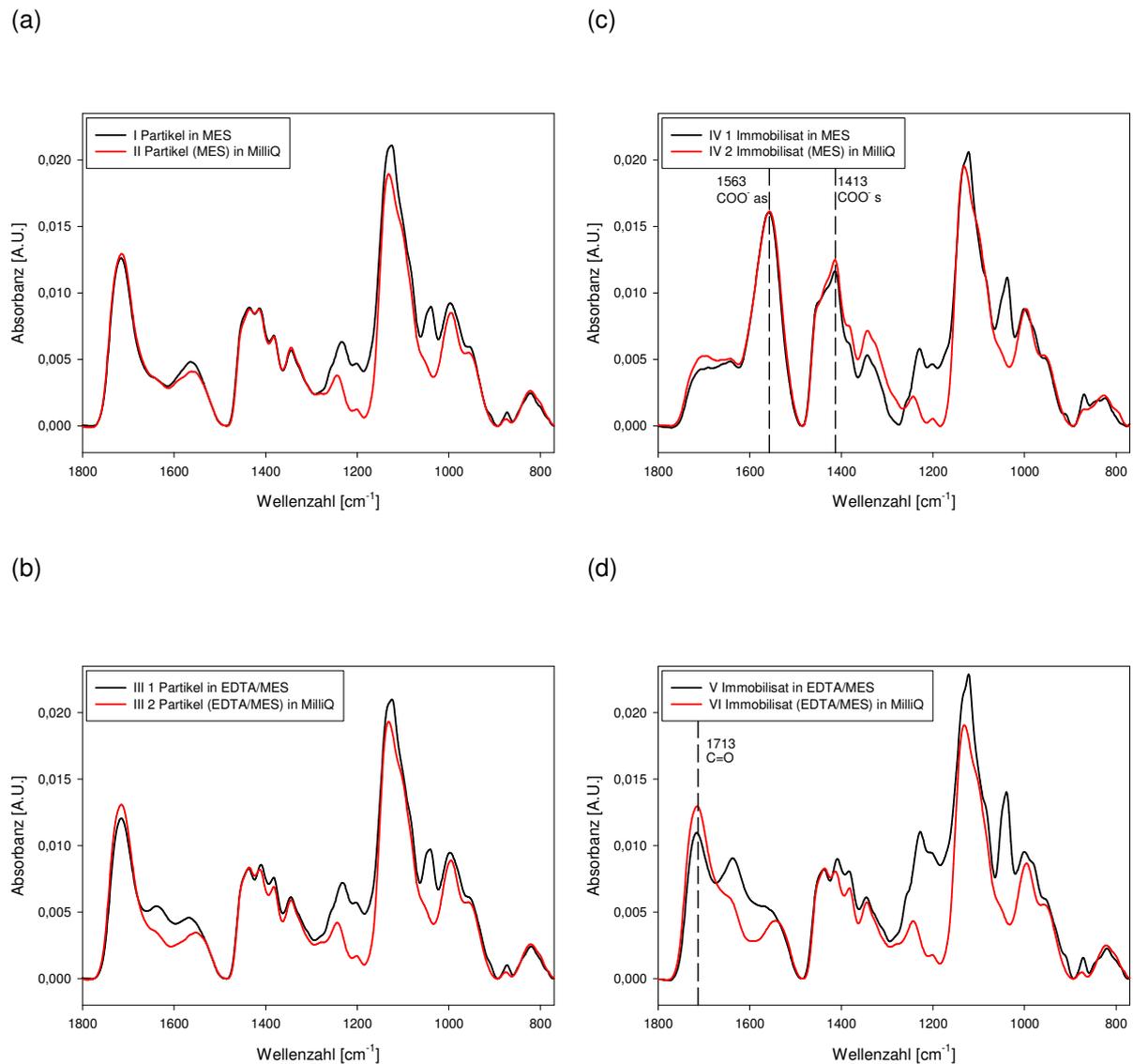


Abbildung 19: FTIR ATR Spektren (a) von Partikeln nach MES- und MilliQ-Waschungen, (b) von Partikeln, die äquivalent den Immobilisaten während der Immobilisierung und anschließend in EDTA/MES und MilliQ gewaschen wurden, (c) von Immobilisaten nach MES und MilliQ-Waschungen und (d) Immobilisaten nach EDTA/MES- und MilliQ-Waschungen. Die Puffer in den Klammern sind jeweils die, mit denen vor der MilliQ-Waschung gewaschen wurde.

In Abbildung 19a ist deutlich der Einfluss des MES-Puffers gegenüber den mit MilliQ gewaschenen Partikeln ohne verbleibende Puffersalze zu sehen. Die zusätzliche Absorbanz in den Bereichen 1564, 1231, 1126, 1040 und 874 cm^{-1} gehen auf das MES-Molekül zurück. Wenn die Partikel der gleichen Waschungsprozedur wie die Immobilisate unterzogen werden (MES-Puffer zur pH-Einstellung und Inkubation, Waschung in 0,1 M Tris 0,02 M CaCl_2 pH 9 nach der Inkubation) und anschließend zweimal in 0,02 M EDTA 0,1 M MES pH 5,3 gewaschen werden (Spektrum III 1 in Abbildung 19b) kommt eine zusätzliche Bande auf Grund des EDTAs bei 1636 cm^{-1} hinzu. Sowohl EDTA, als auch MES lassen sich jedoch durch Wasser vollständig entfernen, so dass die Spektren II und III 2 in Abbildung 19a und b vollständig deckungsgleich sind.

Im Falle der Immobilisate, die nicht mit EDTA sondern nach der Immobilisierung nur mit MES-Puffer (IV 1), bzw. MES-Puffer und MilliQ (IV 2) gewaschen wurden (Abbildung 19c), sind asymmetrische und symmetrische Streckschwingung des deprotonierten Carboxylat-Ions bei 1563 und 1413 cm^{-1} [84] deutlich erkennbar. Da die Partikel auf Grund der Waschung mit 0,1 M MES Puffer im pH-Bereich 5,3 liegen müssen, muss der deprotonierte Zustand des Carboxylat-Ions auf eine Komplexierung mit Calcium zurückgehen, die auch im leicht sauren Milieu bestehen bleibt, da ansonsten das Carboxylat-Ion vorwiegend protoniert sein und die C=O Streckschwingung bei 1713 cm^{-1} zeigen müsste [90]. Aus Abbildung 19c geht weiter hervor, dass die MilliQ-Waschung zwar das MES entfernt, jedoch nicht die Komplexierung der Carboxygruppen aufheben kann. Die große Anzahl der Carboxygruppen auf den Partikeln, die selbst mit immobilisiertem Enzym noch vorhanden ist, geht auf den hohen Funktionalisierungsgrad der Partikel mit 950 $\mu\text{mol COOH} / \text{g Partikel}$ zurück, von dem nur ein niedriger Prozentsatz bei der Immobilisierung verbraucht wird.

Werden die Immobilisate nach der Immobilisierung mit 0,02 M EDTA 0,1 M MES pH 5,3 (Spektrum V) und anschließend noch mit MilliQ (Spektrum VI) gewaschen, wie in Abbildung 19d gezeigt, so wird im ersten Fall wieder die Bande bei 1636 cm^{-1} sichtbar, die auf das EDTA zurückgeht. Im zweiten Fall werden die Amid I und II Banden bei 1652, bzw. 1542 cm^{-1} sichtbar, die vom Enzym herrühren und jetzt, da sowohl das Calcium, als auch alle anderen Störreinfluss weg gewaschen wurden, erkennbar sind. Ebenfalls sichtbar ist die oben erwähnte C=O Streckschwingung bei 1713 cm^{-1} , welche die Protonierung der freien Carboxygruppen zeigt. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die vorbereitenden Waschungen mit 0,02 M EDTA 0,01 M MES pH 5,3 und MilliQ, wie in Kapitel 3.10.2 beschrieben, für alle FTIR ATR Proben, wenn nicht explizit anders erwähnt, durchgeführt.

4.4.2 Erstellung multivariater Kalibrationsmodelle

Für die Erstellung der multivariaten Kalibration wurde die Partial Least Square (PLS) Methode des Quant 2 Pakets der OPUS Software verwendet. Jede Kalibrationsprobe wurde zwanzigmal gemessen, für jede Kalibration wurden entweder 20 Beladungen in Einfachansätzen oder 10 Beladungen in Doppelansätzen (wie in Kapitel 3.11 beschrieben) verwendet. Abbildung 20 zeigt das Ergebnis einer FTIR ATR Modellerstellung am Beispiel des kovalent immobilisierten α -Chymotrypsins auf C22 Partikel der Charge C250. Das Modell wurde bei der Erstellung kreuzvalidiert, d.h. jede Probe wurde einmal zur Erstellung eines Kalibrationsmodells weggelassen und gegen dieses Modell vorhergesagt. Dies wurde so lange durchgeführt, bis jede Probe einmal ausgelassen worden war. Die aus diesem Modell vorhergesagten Beladungen sind in Abbildung 20 über den per BCA ermittelten, wahren Beladung aufgetragen. Es ist ersichtlich, dass das Modell eine hohe Vorhersagegenauigkeit besitzt, begründet durch den niedrigen, einfachen Vorhersagefehler RMSECV und durch das Bestimmtheitsmaß $R^2_{\text{Vorhersage}}$, welches nahe dem idealen Wert von 100 % ist.

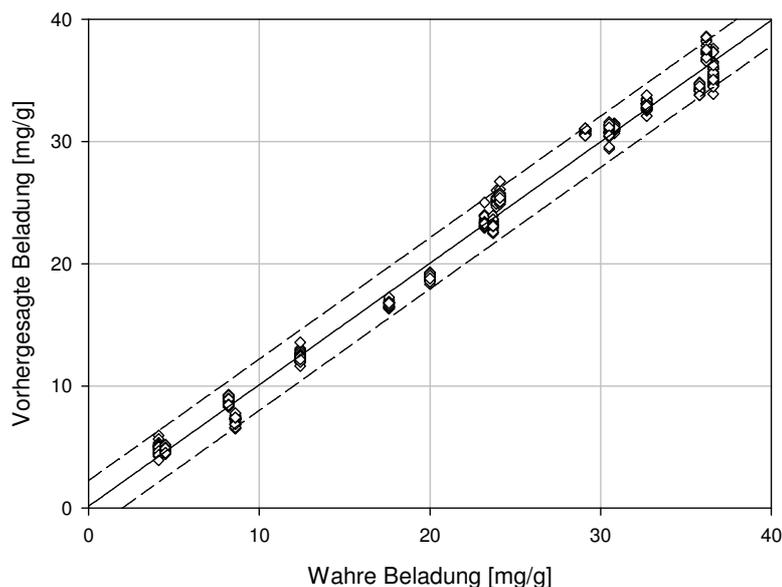


Abbildung 20: Ergebnis der kreuzvalidierten Modellerstellung für kovalent immobilisiertes α -Chymotrypsin mit folgenden Eigenschaften: Rang = 7, $R^2_{\text{Vorhersage}} = 96,8 \%$, RMSECV = 3,1 mg/g.

In Tabelle 21 sind die Parameter der Kreuzvalidierung der erstellten Modelle für α -Chymotrypsin und Tyrosin-Tripeptid dargestellt. Diese basieren auf den Beladungskurven für die Immobilisierung von α -Chymotrypsin und Tyrosin-Tripeptid (Kapitel 3.11). Die Ergebnisse der externen Validierungen der Modelle sind daher in Kapitel 4.5 gezeigt.

Tabelle 21: Multivariate FTIR ATR Modelle für adsorptiv und kovalent immobilisiertes α -Chymotrypsin und kovalent immobilisiertes Tyrosin-Tripeptid. Alle Immobilisate wurden mit M-PVA C22 Partikel erstellt. CT = α -Chymotrypsin, YYY = Tyrosin-Tripeptid.

	Methode	Partikel-charge	Beladungs-bereich [mg/g]	Wellenzahl-bereich [cm ⁻¹]	R ² _{Vorhersage} [%]	Rang	RMSECV [mg/g]
CT	adsorptiv	C250	4–140	1800–770	99,5	4	2,9
CT	kovalent	C250	6–63	4000–400	96,8	7	3,1
CT	kovalent	104103	5–81	1800–770	97,4	4	3,7
YYY	kovalent	C250	5–100	1800–770	97,9	4	4,2

Alle Modelle, mit Ausnahme der kovalenten Immobilisierung von α -Chymotrypsin auf C22 Partikel der Charge C250, wurden im Wellenzahlenbereich 1800–770 cm⁻¹ kalibriert, in dem sich die größten Bandenintensitätsänderungen auf Grund unterschiedlicher Beladungen befinden, wie bereits in Abbildung 18 gezeigt. Die Kalibration der kovalenten Immobilisierung von α -Chymotrypsins auf C22 Partikeln der Charge C250 erfolgte über den gesamten Wellenzahlenbereich (mit Ausnahme der atmosphärischen CO₂-Banden, 2400–2300 cm⁻¹), da dies nach den Vorgaben der multivariaten Kalibration (R²_{Vorhersage} möglichst nahe an 1, minimaler RMSECV) das bessere Modell lieferte.

Es soll abschließend noch auf einen weiteren Vorteil der direkten Beladungsbestimmung mittels FTIR ATR hingewiesen werden: Zusätzlich zu den beschriebenen Vorteilen ist auch die Bestimmung der Partikelkonzentration für diese Methode nicht notwendig.

4.5 Beladungskurven adsorptiver und kovalenter Immobilisierungen

4.5.1 Adsorptive Immobilisierung von α -Chymotrypsin

Um die mögliche adsorptive Beladung von α -Chymotrypsin auf den C22 Partikeln (Charge C250) zu bestimmen, wurden zehn Einsatzkonzentrationen im Konzentrationsbereich 4,3–140,4 mg/g in Doppelansätzen eingesetzt. Die Beladungen und Aktivitäten der M-PVA Partikel für adsorptiv immobilisiertes α -Chymotrypsin in diesem Einsatzkonzentrationsbereich sind in Abbildung 21a dargestellt. Weiterhin sind in Abbildung 21b die zugehörigen Beladungs- und Aktivitätsausbeuten gezeigt. Adsorptiv gebunden wurden 4,3–133,5 mg/g, abhängig von der jeweils eingesetzten Konzentration.

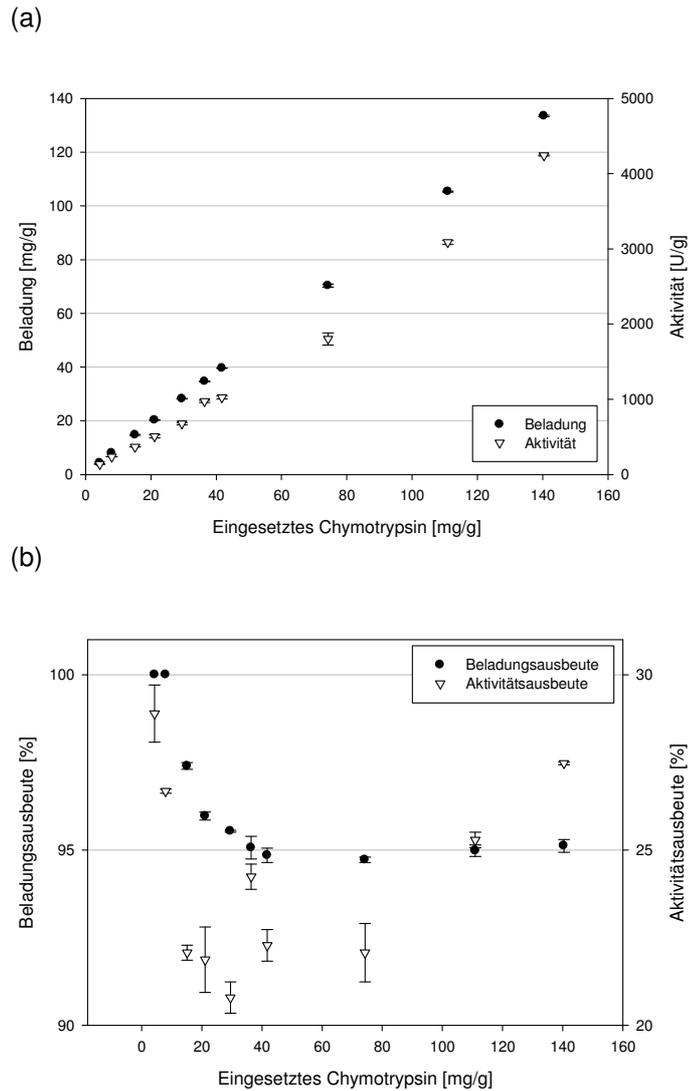


Abbildung 21: (a) Adsorptive Beladung (linke Ordinate) und Aktivität (rechte Ordinate) von immobilisiertem α -Chymotrypsin auf C22 Partikeln der Charge C250. (b) Die zugehörigen Beladungs- (linke Ordinate) und Aktivitätsausbeuten (rechte Ordinate).

Daraus ergeben sich Beladungsausbeuten zwischen 100 und 95 % und damit eine vollständige Enzymadsorption aus den Immobilisierungslösungen. Die adsorptive Immobilisierung ist ein Resultat der Kationenaustauscher-Funktionalität der Partikel auf Grund ihrer Carboxylierung, die oberhalb von pH 4 zum Carboxylat-Ion dissoziiert [91]. Der isoelektrische Punkt von bovinem α -Chymotrypsin beträgt 8,75 [92], d.h. unter den Bedingungen der adsorptiven Immobilisierung (pH 5,5) ist α -Chymotrypsin positiv geladen. Die spezifische Aktivität des freien Enzyms betrug 110 U/mg. Die Aktivitäten der Partikel liegen zwischen 136 und 4242 U/g, die Aktivitätsausbeute beträgt damit zwischen 21 % und 29 %. Wie in Kapitel 4.6.1 gezeigt wird, desorbiert α -Chymotrypsin anteilig unter den pH-Bedingungen des Aktivitätsassays (pH 7,5), daher ist die Partikelaktivität nicht nur auf das gebundenen Enzym zurück zu führen, sondern auch auf das während des Assays desorbierte und damit wieder freie Enzym.

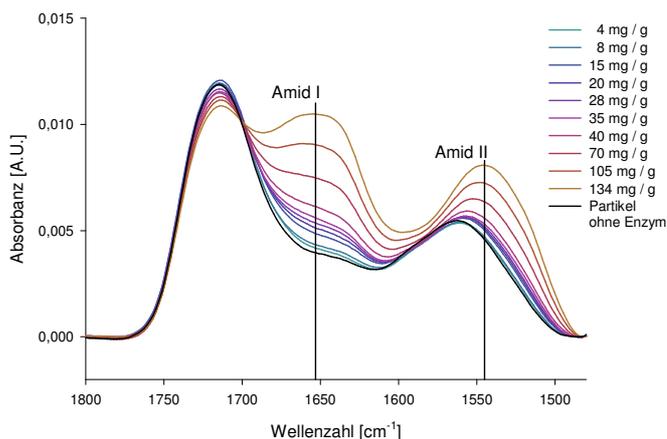


Abbildung 22: Ein FTIR Spektrum pro adsorptiver Beladung zusammen mit einem Partikelspektrum ohne Enzym im Wellenzahlbereich 1800–1450 cm^{-1} .

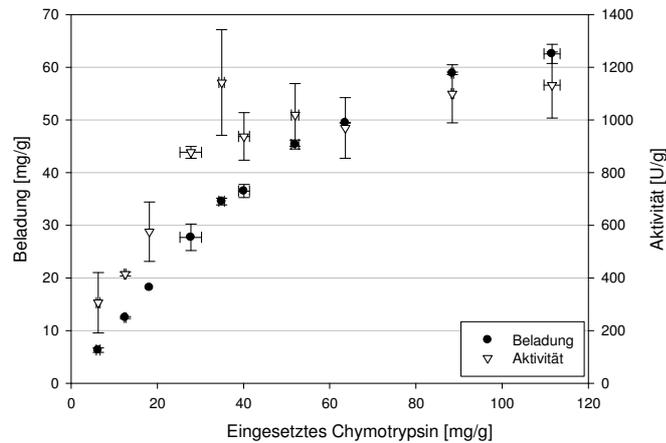
Von jeder der zwanzig Proben (zehn Konzentrationen in Doppelansätzen) wurden jeweils 20 FTIR ATR Spektren, wie in Kapitel 3.10.3 beschrieben, aufgenommen. In Abbildung 22 sind die Amid I und Amid II Regionen mittels eines Spektrums pro Beladung gezeigt. Es ist deutlich sichtbar, wie höhere Beladungen zu höheren Absorbanzen führen. Die Partikel ohne Enzym wurden vor der FTIR ATR Messung im gleichen MES-Puffer gewaschen, der auch bei der Enzymadsorption eingesetzt wurde. Mit den Spektren wurde ein multivariates Kalibrationsmodell erstellt, dessen Parameter in Tabelle 21 im Kapitel 4.4.2 dargestellt sind. Mit Hilfe des Modells wurden die Beladung der Proben aus dem Rezyklierungsversuch adsorptiver Immobilisate (Kapitel 3.12.1) quantifiziert und gleichzeitig, durch eine parallele BCA-Auswertung, das Modell validiert.

4.5.2 Kovalente Immobilisierung von α -Chymotrypsin

Basierend auf den DoE-Ergebnissen zur EDC-Aktivierung und α -Chymotrypsin-Kopplung wurden für zwei Chargen C22 Partikel (C250 und 0104103) Beladungskurven für die kovalente Enzymimmobilisierung erstellt. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der Beladungskurve für die Immobilisierung von α -Chymotrypsin auf C22 Partikeln der Charge **C250** zusammengefasst. Weiterhin sind die zugehörigen Beladungs- und Aktivitätsausbeuten dargestellt.

Die Beladung zeigt einen linearen Anstieg bis zu einer Enzymeinsatzkonzentration von 52 mg/g. Die Beladungsausbeute liegt in diesem Bereich zwischen 100 und 87 %. Die höchste absolute Beladung von 63 mg/g wird für die höchste Einsatzkonzentration (112 mg/g) erreicht. Im Einsatzkonzentrationsbereich von 64 bis 112 mg/g fällt die Beladungsausbeute von 77 auf 56 % ab.

(a)



(b)

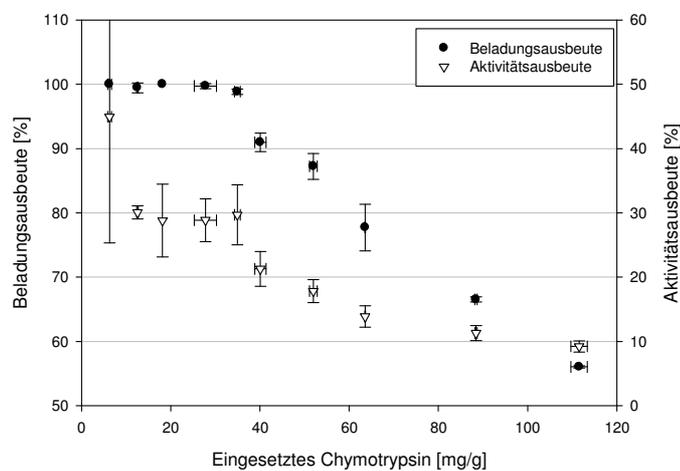


Abbildung 23: (a) Kovalente Beladung (linke Ordinate) und Aktivität (rechte Ordinate) von immobilisiertem α -Chymotrypsin auf C22 Partikeln der Charge C250. (b) Die zugehörigen Beladungs- (linke Ordinate) und Aktivitätsausbeuten (rechte Ordinate).

Die Aktivität der Immobilisate liegt zwischen 306 U/g für die niedrigste Einsatzkonzentration und erreicht einen konstanten Wert von 1000–1100 U/g ab einer Enzymbeladung von 35 mg/g. Mit einer ermittelten spezifischen Aktivität für das freie Enzym von 110 U/mg ergibt sich eine Abnahme der Aktivitätsausbeute von 45 % bei einer Beladung von 6 mg/g auf 9 % bei einer Beladung von 63 mg/g. Die große Standardabweichung bei der Aktivitätsausbeute von 45% für eine Beladung von 6 mg/g lässt darauf schließen, dass eine der beiden doppelbestimmten Beladungen einen Ausreißer bei der Aktivität darstellt, so dass die Aktivitätsausbeuten für die niedrigen Beladungen eher im Bereich von 30 % zu finden sind. Bis zu einer Einsatzbeladung von 40 mg/g befinden sich die Aktivitätsausbeuten damit im gleichen Bereich wie für die adsorptive Beladung (20–30 %). Das ist besonders hervorzuheben, da, wie in Kapitel 4.5.1 angeführt, davon auszugehen ist, dass bei der adsorptiven Beladung Enzym unter den Bedingungen des Aktivitätsassays desorbiert und wieder als freies Enzym vorliegt.

Die FTIR ATR Spektren des Wellenzahlenbereichs 1800–1470 cm^{-1} sind in Abbildung 24 dargestellt. Die FTIR ATR Spektren zeigen für die Amid I und Amid II Banden deutlich die Zunahme der Enzymbeladung. Die Ergebnisse der FTIR ATR Modellerstellung sind in Kapitel 4.4.2 zusammengefasst. Zur Validierung dieses Modells und zur Demonstration seines Einsatzes in der Prozesskontrolle wurden zwei α -Chymotrypsin-Konzentrationen in Doppelsätzen immobilisiert und rezykliert, wie in Kapitel 3.12.2 dargestellt.

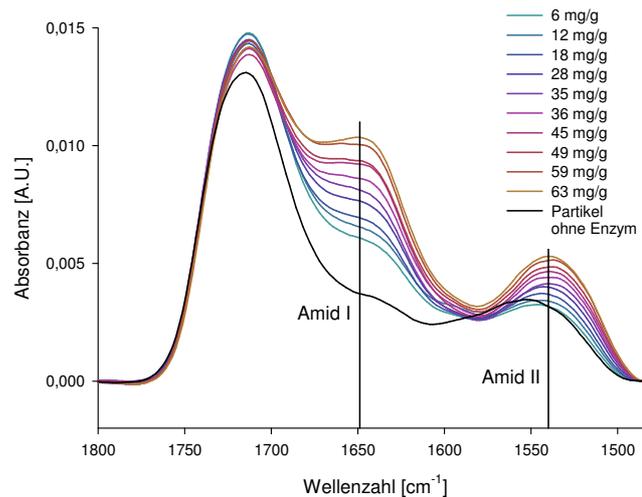


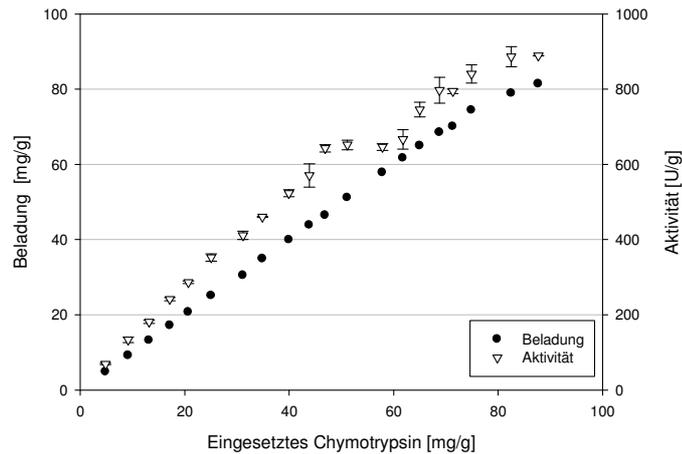
Abbildung 24: FTIR ATR Spektren für jede Beladung zusammen mit den Partikeln ohne immobilisiertes Enzym im Wellenzahlbereich 1800–1450 cm^{-1} .

Für α -Chymotrypsin Immobilisate der Partikelcharge **0104103** sind die Beladungen und die zugehörigen Beladungs- und Aktivitätsausbeuten in Abbildung 25 dargestellt. Die Beladung zeigt einen linearen Anstieg über die gesamte Einsatzkonzentration von α -Chymotrypsin (5–88 mg/g) und erreicht entsprechend Beladungsausbeuten von 98–100 % für alle Werte mit Ausnahme der beiden höchsten Einsatzkonzentration, wo die Beladungsausbeute auf 96 % (Einsatzkonzentration: 83 mg/g) und 93 % (Einsatzkonzentration: 88 mg/g) sinkt. Die absolute Beladung beträgt für die höchste Einsatzkonzentration 81 mg/g. Die Aktivität der Immobilisate liegt zwischen 69 U/g für die niedrigste Einsatzkonzentration und 890 U/g für die höchste. Die Aktivitäten der beiden höchsten Einsatzkonzentrationen sind im Rahmen der Standardabweichung gleich. Mit einer spezifischen Enzymaktivität von 103 U/mg ergeben sich Aktivitätsausbeuten von 14 % bis 10 % über die Zunahme der Einsatzkonzentration.

Beim Vergleich der Beladungskurven für die Partikelchargen C250 und 0104103 wird deutlich, dass letztere höhere Beladungen zulässt, gleichzeitig die absoluten Partikelaktivitäten aber geringer ausfallen. Da die Charge 0104103 von chemagen als Out of Specification, auf Grund der zu kleinen Partikelgröße, definiert wurde, was sich auch bei der Bestimmung der

Partikelgrößenverteilung bestätigte, liegt der Schluss nahe, dass die kleineren Partikel auf Grund ihrer höheren spezifischen Oberfläche die höhere Beladung erlauben, gleichzeitig aber auch eine rigidere Immobilisierung der Enzyme verursachen. Letzteres kann auch durch den fast dreifachen EDC-Einsatz bei der Partikelaktivierung (0,22 g/g bei der C250 Charge und 0,59 g/g bei der 0104103 Charge) begünstigt worden sein.

(a)



(b)

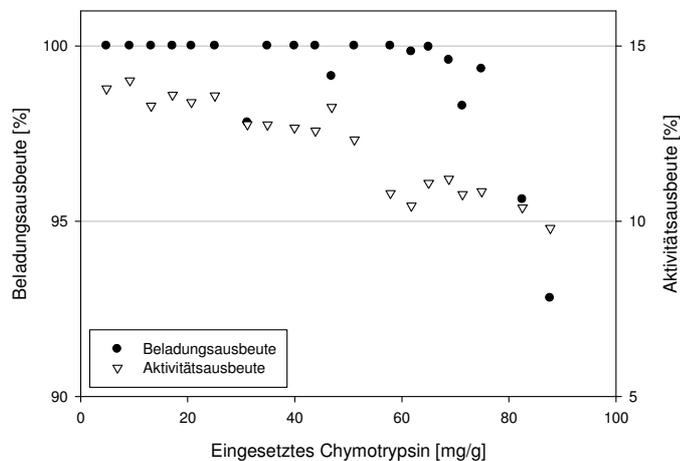


Abbildung 25: (a) Kovalente Beladung (linke Ordinate) und Aktivität (rechte Ordinate) von immobilisiertem α -Chymotrypsin auf C22 Partikeln der Charge 0104103. (b) Die zugehörigen Beladungs- (linke Ordinate) und Aktivitätsausbeuten (rechte Ordinate).

Ebenso wie bei den C250 Immobilisaten zeigen die FTIR ATR Spektren der 0104103 Charge für die Amid I und Amid II Banden deutlich die Zunahme der Enzymbeladung (Abbildung 26). Bei den C22 Partikeln ohne immobilisiertes Enzym zeigt die Charge 0104103 im Wellenzahlenbereich $1800\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ qualitativ das gleiche Spektrum wie die Charge C250. Die unterschiedliche Partikelgröße hat demnach keinen Einfluss auf das FTIR ATR Ergebnis. Die Er-

gebnisse der FTIR ATR Modellerstellung sind in Kapitel 4.4.2 zusammengefasst. Das Modell wurde für die Prozesskontrolle des Scale-up Versuchs (Kapitel 3.14) verwendet.

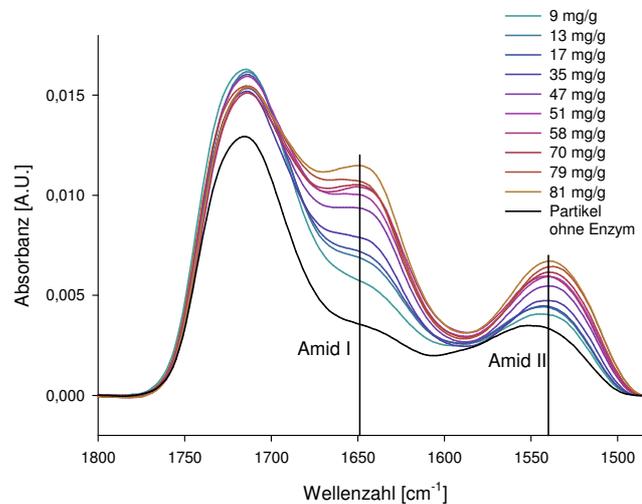


Abbildung 26: FTIR ATR Spektren für jede Beladung zusammen mit den Partikeln ohne immobilisiertes Enzym im Wellenzahlbereich 1800–1450 cm⁻¹.

Als weitere externe Validierung der beiden FTIR ATR Modelle für immobilisiertes α -Chymotrypsin auf C22 Partikeln wurden die Spektren des einen Modells gegen das jeweils andere quantifiziert. Die Ergebnisse dieser Quantifizierung sind in Tabelle 22 für die Auswertung der Immobilisate der Partikelcharge 0104103 gegen das Modell der C250 Partikel und in Tabelle 23 für die Auswertung der Immobilisate der Partikelcharge C250 gegen das Modell der 0104103 Partikel dargestellt. Die Standardabweichungen der FTIR ATR Ergebnisse beziehen sich auf die zwanzig FTIR ATR Messungen, die pro Probe durchgeführt wurden.

Aus Tabelle 22 geht hervor, dass das Modell die BCA-Beladungen, mit Ausnahme der letzten Probe (# 13), im Rahmen der doppelten Vorhersagegenauigkeit ($2 \times \text{RMSECV} = 6,2 \text{ mg/g}$) wiedergibt. Die BCA-Beladung der letzten Probe ist sehr nahe an der Kalibrationsgrenze des Modells von 63 mg/g , was die Abweichung von $10,6 \text{ mg/g}$ erklären kann. Wie aus Tabelle 23 ersichtlich, liegen die meisten wahren Werte der Beladungen ebenfalls innerhalb der doppelten Vorhersagegenauigkeit des Modells ($2 \times \text{RMSECV} = 7,4 \text{ mg/g}$). Eine Ausnahme bildet Probe # 3, bei der sich die Vorhersage in der dreifachen Vorhersagegenauigkeit befindet und vom Modell um $10,1 \text{ mg/g}$ zu niedrig vorhergesagt wird.

Als Fazit aus dieser Quantifizierung der Proben einer Beladungskurve mit dem Modell einer anderen lässt sich festhalten, dass die FTIR ATR Methode im Rahmen der Vorhersagegenauigkeit der erstellten Modelle die per BCA ermittelten Werte sehr gut wiedergibt. Es zeigt

sich, dass die Methode auch chargenübergreifend in Bezug auf die Partikel angewendet werden kann, ein wichtiger Aspekt im Hinblick auf den Einsatz in der Prozesskontrolle.

Tabelle 22: Auswertung der 0104103 Spektren mittels des C250 Modells.

Nr.	BCA Beladung [mg/g]	FTIR ATR Beladung [mg/g]	Δ [mg/g]
1	9,2	11,0 \pm 0,6	1,8
2	13,2	17,7 \pm 0,6	4,5
3	17,2	21,3 \pm 0,4	4,1
4	20,7	25,8 \pm 1,8	5,1
5	25,1	27,5 \pm 0,4	2,4
6	30,5	32,3 \pm 0,6	1,8
7	34,9	34,1 \pm 0,9	0,8
8	40,0	37,1 \pm 1,2	2,9
9	43,9	41,1 \pm 1,1	2,7
10	46,5	46,9 \pm 1,3	0,4
11	51,1	51,2 \pm 2,0	0,1
12	57,9	52,3 \pm 2,0	5,6
13	61,7	51,1 \pm 1,6	10,6

Tabelle 23: Auswertung der C250 Spektren mittels des 0104103 Modells.

Nr.	BCA Beladung [mg/g]	FTIR ATR Beladung [mg/g]	Δ [mg/g]
1	12,3	5,8 \pm 0,8	6,5
2	12,7	5,5 \pm 1,2	7,2
3	18,2	8,0 \pm 1,1	10,1
4	18,2	14,9 \pm 1,0	3,2
5	26,0	22,3 \pm 0,8	3,7
6	29,4	22,2 \pm 1,2	7,2
7	34,0	29,6 \pm 0,7	4,3
8	35,1	36,3 \pm 1,4	1,3
9	36,1	39,2 \pm 0,7	3,1
10	36,9	39,2 \pm 1,3	2,3
11	44,0	45,2 \pm 0,6	1,2
12	46,6	47,7 \pm 0,7	1,1
13	47,8	49,9 \pm 0,4	2,1
14	51,0	53,1 \pm 1,6	2,1
15	58,5	54,4 \pm 1,0	4,0
16	59,2	53,0 \pm 1,6	6,2
17	61,6	56,5 \pm 0,8	5,2
18	63,4	58,4 \pm 0,7	5,0

4.5.3 Kovalente Immobilisierung von Tyrosin-Tripeptid

Wie für α -Chymotrypsin wurde auch für Tyrosin-Tripeptid, basierend auf den DoE-Ergebnissen zur EDC-Aktivierung und Tripeptidkopplung, eine Beladungskurve für die kovalente Peptidimmobilisierung auf C22 Partikeln (Charge C250) erstellt. Die Beladungskurve des Tyrosin-Tripeptids ist in Abbildung 27a dargestellt. Die Beladungsausbeuten liegen zwischen 91 und 99 %. Im untersuchten Konzentrationsbereich ist noch keine Sättigung der Partikel mit dem Tripeptid eingetreten und die Beladung steigt nahezu linear mit der Einsatzkonzentration. Die höchste Beladung von 100 mg/g wird auch mit der höchsten Einsatzkonzentration von 107 mg/g erreicht. 100 mg/g entsprechen einer molekularen Beladung von 200 $\mu\text{mol/g}$. Unter Verwendung der Herstellerangaben des Funktionalisierungsgrads der Partikel, $c(\text{COOH}) = 900 \mu\text{mol/g}$, bedeutet dies, dass jede 4–5 funktionelle Gruppe auch tatsächlich zur Immobilisierung verwendet wurde. Da sich die Beladung noch nicht einem gesättigten Grenzwert annähert, kann davon ausgegangen werden, dass die Partikel mit noch mehr Tyrosin-Tripeptid beladen werden können.

Von jeder der achtzehn Proben wurden je 20 FTIR ATR Spektren, wie in Kapitel 3.10.3 beschrieben, aufgenommen. In Abbildung 27b sind die Amid I und Amid II Regionen mittels eines Spektrums pro Beladung gezeigt. Neben diesen beiden deutlich steigenden Banden zeigen die Spektren zwei weitere Banden bei 1515 und 1614 cm^{-1} . Diese können spezifisch der Tyrosin-Seitenkette zugeordnet werden [93]. Die Ergebnisse der FTIR ATR Modellerstellung sind in Kapitel 4.4.2 zusammengefasst.

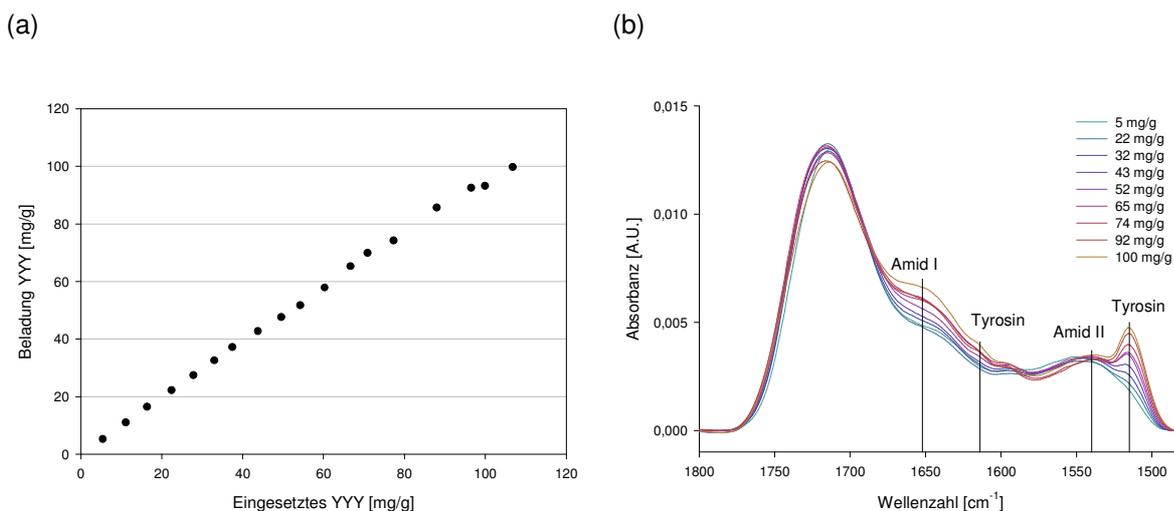


Abbildung 27: (a) Beladung von kovalent immobilisiertem Tyrosin-Tripeptid auf C22-C250 Partikeln. (b) Ein FTIR Spektrum für neun der achtzehn Beladungen im Wellenzahlbereich 1800–1450 cm^{-1} .

In Tabelle 24 sind die sechs Proben gezeigt, die zur Validierung des FTIR ATR Modells verwendet wurden, welches mit Hilfe der Beladungskurve erstellt wurde. Dargestellt sind die

Beladungen, die per UV 280 und per FTIR ATR Modell ermittelt wurden. Die Standardabweichungen der FTIR ATR Ergebnisse beziehen sich auf die zehn FTIR ATR Messungen, die pro Probe durchgeführt wurden. Alle Werte befinden sich innerhalb des doppelten RMSECV ($2 \times \text{RMSECV} = 8,4 \text{ mg/g}$) des FTIR ATR Modells und beweisen so die Gültigkeit des Modells und seines Einsatzes zur Bestimmung unbekannter Beladungen. Die größte Differenz zwischen UV 280 und FTIR ATR befindet sich bei der Probe mit einer Einsatzkonzentration von 55,9 mg/g und beträgt 5 mg/g. Das Modell lässt sich damit im Rahmen der Vorhersagegenauigkeit zur Quantifizierung unbekannter Proben einsetzen.

Tabelle 24: Auswertung der zusätzlichen sechs Tyrosin-Tripeptid-Proben mittels des FTIR ATR Modells der Beladungskurve.

Nr.	UV 280 Beladung [mg/g]	FTIR ATR Beladung [mg/g]	Δ [mg/g]
1	11,0	$11,7 \pm 1,5$	0,7
2	23,0	$23,7 \pm 1,3$	0,7
3	34,1	$34,1 \pm 3,4$	0
4	45,4	$50,0 \pm 1,0$	4,6
5	55,9	$61,0 \pm 2,6$	5,0
6	66,0	$66,2 \pm 1,0$	0,2

4.6 Rezyklierung von α -Chymotrypsin-Immobilisaten im Labormaßstab

Um die erstellten FTIR ATR Modelle für adsorptiv und kovalent immobilisiertes α -Chymotrypsin auf der C22 Partikelcharge C250 (siehe Tabelle 21 in Kapitel 4.4.2) zu validieren und weiterhin die Desorption unter den pH-Bedingungen des Aktivitätsassays (pH 7,5) zu untersuchen, wurden Rezyklierungen dieser Immobilisate durchgeführt. Die Rezyklierung der adsorptiven Immobilisate erfolgte in Tris pH 7,5 Puffer, die der kovalenten Immobilisate in Tris pH 7,5 mit 1 g/l Hämoglobin.

4.6.1 Rezyklierung adsorptiver α -Chymotrypsin-Immobilisate

Die Ergebnisse der dreimalige Rezyklierung adsorptiv immobilisierten α -Chymotrypsins zur Validierung des FTIR ATR Modells und der Untersuchung der Desorption unter den pH-Bedingungen des Aktivitätsassays (pH 7,5) sind in Abbildung 28 dargestellt. Von der α -Chymotrypsin Einsatzkonzentration von 116 mg/g wurden $110 \pm 1,1 \text{ mg/g}$ adsorptiv immobilisiert, die Beladungsausbeute entspricht 95 %. Die spezifische Aktivität des freien Enzyms betrug 110 U/mg, die Partikel nach der Immobilisierung hatten eine Aktivität von $4824 \pm 247 \text{ U/g}$, damit beträgt die Aktivitätsausbeute 38 %. Die Immobilisate dieses Ver-

suchs sind um 56 % aktiver als die Immobilisate der Beladungskurve (Kapitel 4.5.1), bei vergleichbarer Beladung.

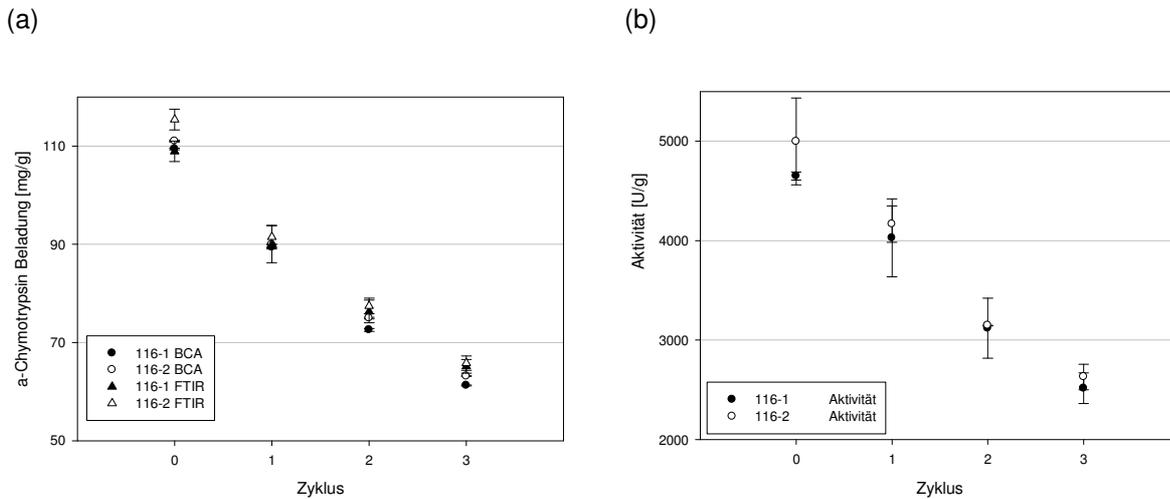


Abbildung 28: Ergebnisse der (a) Beladung und (b) Aktivität von adsorptiv immobilisiertem α -Chymotrypsin während der dreimaligen Rezyklierung. Zyklus 0 bezeichnet die Partikel nach der Immobilisierung.

Da zusätzlich zu den Überständen der Immobilisierung auch alle Überstände der Rezyklierung per BCA analysiert wurden, war es möglich die Enzymbeladung sowohl über die BCA-Ergebnisse, als auch per multivariatem FTIR ATR Modell zu bestimmen. Die Parameter des Modells sind in Tabelle 21 in Kapitel 4.4.2 gegeben. Die Standardabweichungen in Abbildung 28a berechnen sich für die FTIR ATR Bestimmung aus 20 Spektren pro Probe, bei den BCA-Ergebnissen aus einer Doppelbestimmung. Im Durchschnitt desorbierten 16–17 % des adsorptiv immobilisierten α -Chymotrypsins pro Zyklus. Zur besseren Vergleichbarkeit der Werte sind diese auch noch in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: Differenz zwischen den mittels FTIR ATR, bzw. BCA bestimmten adsorptiven α -Chymotrypsin-Beladungen der Rezyklierung. Zyklus 0 bezeichnet die Partikel nach der Immobilisierung.

Zyklus	116-1 FTIR ATR [mg/g]	116-1 BCA [mg/g]	Δ [mg/g]	116-2 FTIR ATR [mg/g]	116-2 BCA [mg/g]	Δ [mg/g]
0	108,9 \pm 2,1	109,4 \pm 0,2	0,5	115,4 \pm 2,1	111,0 \pm 0,2	4,4
I	90,0 \pm 3,8	89,4 \pm 0,0	0,6	91,5 \pm 2,4	90,0 \pm 0,0	1,5
II	76,3 \pm 2,3	72,6 \pm 0,3	3,8	77,5 \pm 1,6	75,0 \pm 0,1	2,5
III	65,2 \pm 1,4	61,3 \pm 0,1	3,9	65,8 \pm 1,5	63,2 \pm 0,1	2,7

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, stimmen alle Werte der FTIR ATR Ergebnisse mit den jeweiligen BCA-Ergebnissen, unter Berücksichtigung der doppelten Vorhersagegenauigkeit ($2 \times \text{RMSECV} = 5,8 \text{ mg/g}$) der multivariaten FTIR ATR Kalibration, überein.

Die Partikelaktivitäten (Abbildung 28b) nahmen über die drei Zyklen mit 18–19 % pro Zyklus ab und zeigen damit den gleichen Verlauf wie die Beladungen. Insgesamt zeigt die Rezyklisierung, dass die multivariate FTIR ATR Kalibration vergleichbare Ergebnisse zur BCA-Bestimmung der Überstände liefert und dass bei der Waschung mit Tris pH 7,5 Puffer deutlich Enzym desorbiert, im Gegensatz zu Waschungen im Adsorptionspuffer MES pH 5,5. Da das Enzym unter den Bedingungen des Aktivitätsassays desorbierte, erklärt sich auch die um 56 % höhere Aktivität der Immobilisate, die in der Rezyklisierung eingesetzt wurden, im Vergleich zu denen der Beladungskurve. Es wurden absolut mehr Partikel in größeren Volumina eingesetzt, durch die Unterschiede in der Handhabung (15 ml statt 1,5 ml Reaktionsgefäße, anderer Permanentmagnet zur Separation, längere Separationszeit) variiert auch die Desorption. Partikelaktivitäten und Aktivitätsausbeuten sind daher im adsorptiven Fall unter diesen Bedingungen wenig vergleichbar.

4.6.2 Rezyklisierung kovalenter α -Chymotrypsin-Immobilisate

Nach der Rezyklisierung der adsorptiven Immobilisate sollten auch kovalente α -Chymotrypsin-Immobilisate zur Validierung des FTIR ATR Modells und der Untersuchung der Desorption unter den pH-Bedingungen des Aktivitätsassays (pH 7,5) rezykliert werden. Die fünfmaligen Rezyklisierung kovalent immobilisierten α -Chymotrypsins wurde in einer Prozesslösung, bestehend aus 1 mg/ml Hämoglobin in 0,1 M Tris 0,02 M CaCl_2 pH 7,5 durchgeführt. Die Ergebnisse der Immobilisierung sind in Tabelle 26 zusammengefasst. Sowohl die Beladungsausbeute, als auch die Aktivitätsausbeute entsprechen vergleichbaren Werten der Beladungskurve (siehe Abbildung 23 in Kapitel 4.5.2.)

Tabelle 26: Immobilisate nach der kovalenten Immobilisierung, die für die fünffache Rezyklisierung in Prozesslösung eingesetzt wurden.

Eingesetzte Enzymmenge [mg/g]	Beladung der Partikel [mg/g]	Beladungsausbeute [%]	Eingesetzte Aktivität [U/g]	Aktivität der Immobilisate [U/g]	Aktivitätsausbeute [%]
51,6	41,9 ± 0,7	81	5677	1180 ± 59	21
34,7	34,0 ± 0,1	98	3814	925 ± 15	24

Die Beladungen der vier Ansätze (zwei Beladungen in Doppelansätzen) über die fünf Zyklen sind in Abbildung 29 dargestellt. Die per BCA bestimmten, „wahren“ Beladungen der Partikel direkt nach der Immobilisierung (Zyklus 0, rote Punkte) befinden sich innerhalb des 95 % Konfidenzintervalls der per FTIR ATR Modells ermittelten Werte dieser Beladungen, mit Ausnahme des 0-Werts der 52-2 Probe (Abbildung 29d). Da beim 95 % Konfidenzintervall per Definition einer von zwanzig Messwerten außerhalb des Intervalls zu finden ist und sich die BCA-Beladung innerhalb des 99 % Konfidenzintervalls ($3 \times \text{RMSECV} = 9,3 \text{ mg/g}$) dieses,

direkt mit dem BCA-Wert vergleichbaren, Wertes befindet, handelt es sich nicht zwangsläufig um einen Ausreißer.

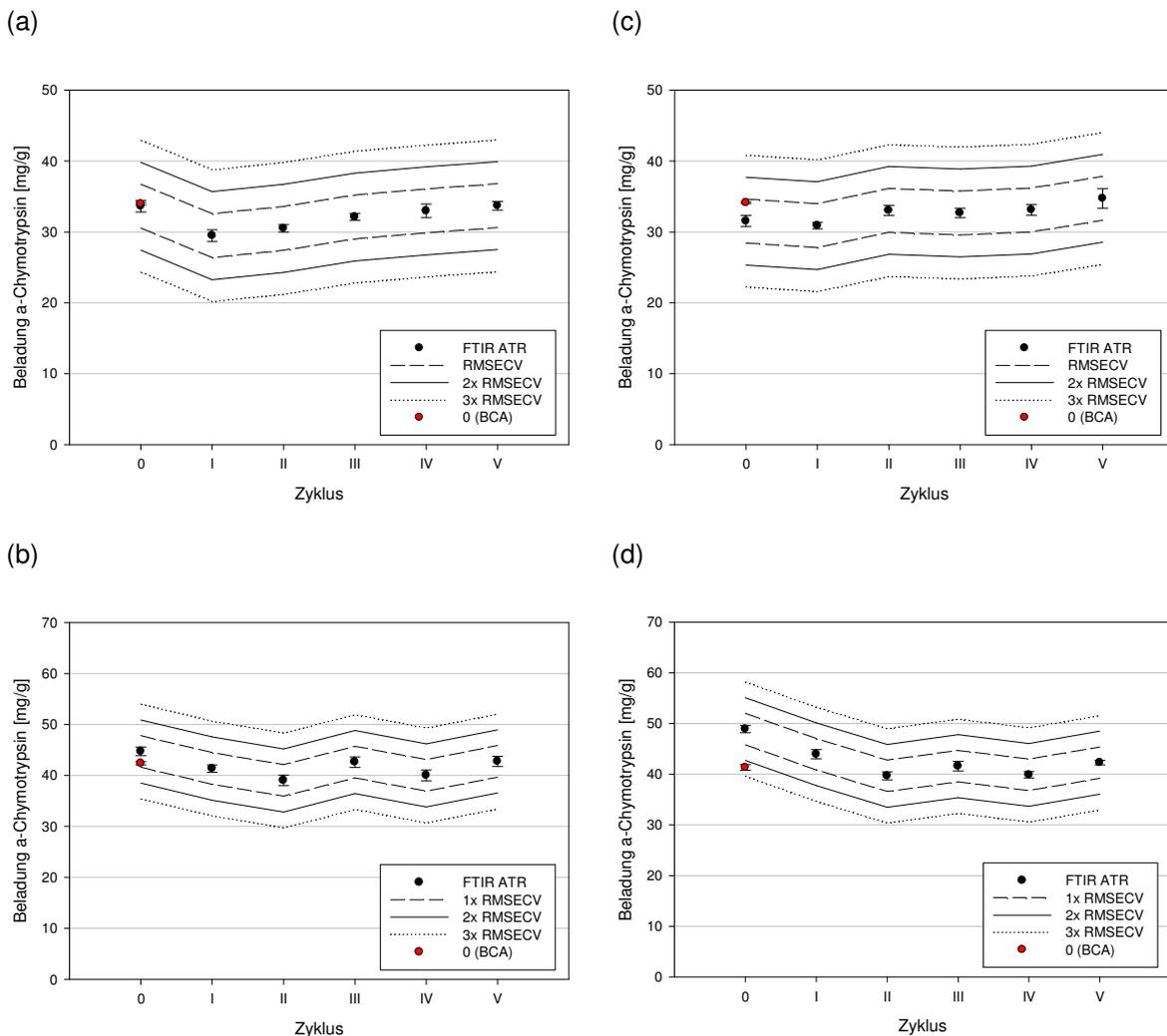


Abbildung 29: Beladung der Immobilisate, ermittelt direkt nach der Immobilisierung (0) und über den Verlauf der 5 Zyklen (I–V). Die Beladungen wurden per FTIR ATR und dem multivariaten Kalibrationsmodell ermittelt. Zum Vergleich ist die per BCA ermittelte Beladung direkt nach der Immobilisierung (0 BCA) ebenfalls dargestellt. Die Abbildungen zeigen die Verläufe für α -Chymotrypsin-Einsatzkonzentrationen von 35 mg/g (a und c), bzw. 52 mg/g (b und d).

Im Vergleich zu den meisten der anderen FTIR ATR Messungen über die fünf Zyklen liegt der BCA-Wert jedes Immobilisates innerhalb des 68 % Konfidenzintervalls ($1 \times \text{RMSECV} = 3,1 \text{ mg/g}$). Daher lässt sich aus den Beladungsbestimmungen per FTIR ATR sagen, dass die Partikel kein Enzym ins Prozessmedium oder die Waschlösungen abgaben und die Beladung innerhalb der Vorhersagegenauigkeit des FTIR ATR Modells konstant blieb. Somit demonstriert das Ergebnis die Anwendbarkeit der Beladungsbestimmung per FTIR ATR als Mittel der Prozesskontrolle.

Die wichtige Bedeutung einer solchen direkten Methode zur Bestimmung der Partikelbeladung ergibt sich in diesem Versuch aus dem Einsatz der Immobilisate zum Hämoglobin-Verdau: Im Gegensatz zur Rezyklierung der adsorptiven Immobilisate im Tris-Puffer ohne Hämoglobin (Kapitel 3.12.1) konnten bei der Rezyklierung der kovalenten Immobilisate die Prozesslösungen und dazwischen liegenden Waschungen nicht per BCA analysiert werden. Zum einen wäre eine α -Chymotrypsin-Konzentration auf Grund eines eventuellen Ausblutens der Immobilisate sehr gering gewesen, zum anderen hätte nicht zwischen der Hämoglobin-Hintergrundkonzentration (1 g/l) und eventuellen α -Chymotrypsinspuren unterschieden werden können. Weiterhin ist die genau Analyse der Überstände dem Labormaßstab vorbehalten und bei größeren Maßstäben, auf Grund größerer Volumina, veränderter Prozessführung, schwierigerer Probennahme, unvollständiger Durchmischung, etc., nicht mehr möglich.

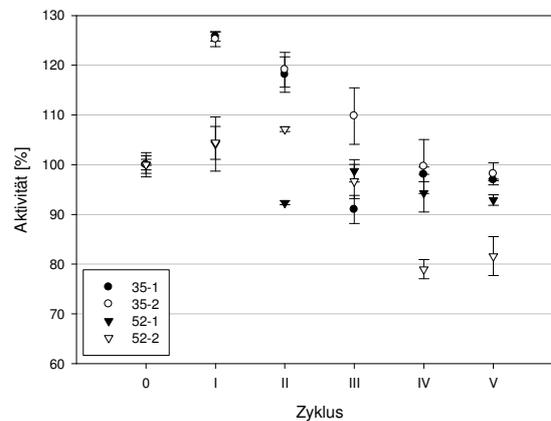


Abbildung 30: Normierter Aktivitätsverlauf der Immobilisate über den Verlauf der fünf Zyklen, jeweils normiert auf die Aktivität direkt nach der Immobilisierung (0). Diese betragen: $915 \pm 1,2$ U/g, bzw. $935 \pm 16,5$ U/g für 35-1, bzw. 35-2 und $1138 \pm 12,1$ U/g, bzw. $1222 \pm 29,8$ U/g für 52-1, bzw. 52-2.

Die normierten Aktivitäten (jeweils auf die Aktivität nach der Immobilisierung normiert) sind in Abbildung 30 gezeigt. Beide 35 mg/g Ansätze (Aktivität nach der Immobilisierung (0): $915 \pm 1,2$ U/g, bzw. $935 \pm 16,5$ U/g) zeigen eine Zunahme der Aktivität um über 20 % nach dem ersten Zyklus und nähern sich nach dem dritten Zyklus wieder dem Ausgangswert an, den sie für die restlichen beiden Zyklen konstant halten. Bei den 52 mg/g Ansätzen (Aktivität nach der Immobilisierung (0): $1138 \pm 12,1$ U/g, bzw. $1222 \pm 29,8$ U/g) hält 52-1 die Aktivität zwischen 104 und 93 % über die fünf Zyklen, während 52-2 bei den letzten beiden Zyklen um 80 % der Ausgangsaktivität zeigt. Unter Umständen zeigt 52-2 bereits eine Enzymdenaturierung, jedoch lassen sich nach diesen fünf Zyklen keine eindeutigen Aussagen in Bezug auf eine abnehmende Aktivität machen.

4.6.3 Fazit aus den Rezyklierungen

Aus den Rezyklierungen der adsorptiven und kovalenten α -Chymotrypsin-Immobilisate lässt sich festhalten, dass sich adsorptiv immobilisiertes α -Chymotrypsin unter den pH-Bedingungen des Aktivitätspuffers desorbieren lässt. Dies kann auch direkt mit einer abnehmenden Aktivität über die drei Zyklen korrelieren. Für kovalent immobilisiertes Enzym gilt dies nicht, die per FTIR ATR bestimmten Beladungen bleiben konstant und drei von vier Partikelaktivitäten entsprechen nach fünf Rezyklierungen denen direkt nach der Immobilisierung, es wurde also kein Enzym desorbiert. Das wichtigste Ergebnis dieser beiden Versuchsreihen ist jedoch die Eignung der FTIR ATR Methode zur Quantifizierung von Prozessproben, also zum Einsatz zur Prozesskontrolle.

4.7 Methodenentwicklung Aktivitätsassay Hämoglobin-Verdau

Für die Verwendung des Hämoglobin-Verdaus als zusätzlichen Aktivitätsassay neben Suc-AAPF-pNA (Kapitel 3.6.3) für freies und immobilisiertes α -Chymotrypsin wurden zunächst das Absorptionsmaximum, der lineare Absorbanzbereich und der Extinktionskoeffizient unter den gegebenen Pufferbedingungen (0,1 M Tris 0,02 M CaCl_2 pH 7,5) bestimmt. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in Abbildung 31 dargestellt. Die VIS-Spektren der mit Immobilisat erzeugten Verdauproben zeigen das Absorptionsmaximum des Hämoglobins bei 407 nm (Abbildung 31a). Die Absorbanz bei dieser Wellenlänge steigt linear mit der Hämoglobin-Konzentration bis zu einem Wert von 2 mg/ml, wie in Abbildung 31b zu sehen ist. Der im Hämoglobin-Konzentrationsbereich 0,16–2 mg/ml bestimmte Extinktionskoeffizient beträgt $414125 \pm 33115 \text{ l}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$.

Der Hämoglobin-Verdau durch freies und immobilisiertes α -Chymotrypsin folgt, wie zu erwarten, einer exponentiellen Funktion, wie in Abbildung 32 dargestellt. Für die freien Enzymkonzentrationen wurde aus den Anfangssteigungen der ersten drei Messpunkte (ersten 30 min) die Aktivität nach Formel (3.1) berechnet. Für die immobilisierten Enzymbeladungen berechnete sich die Aktivität aus den ersten sieben Messpunkten (ersten 6,5 h) nach Formel (3.20).

Die drei freien Enzymkonzentration in der Substratlösung (0,16; 0,48 und 0,63 mg/ml) entsprechen drei der Partikelbeladungen (16; 49 und 63 mg/g), da die Partikelkonzentration 10 g/l im Substrat betrug. Aus diesem Grund können die Aktivitätsausbeuten für diese drei Konzentrationen direkt berechnet werden. Für die beiden Beladungen 32 und 39 mg/g wur-

den die Aktivitäten des freien Enzyms linear aus den drei bestimmten Ausgangsaktivitäten interpoliert. Die Aktivitäten und Aktivitätsausbeuten sind in Tabelle 27 dargestellt.

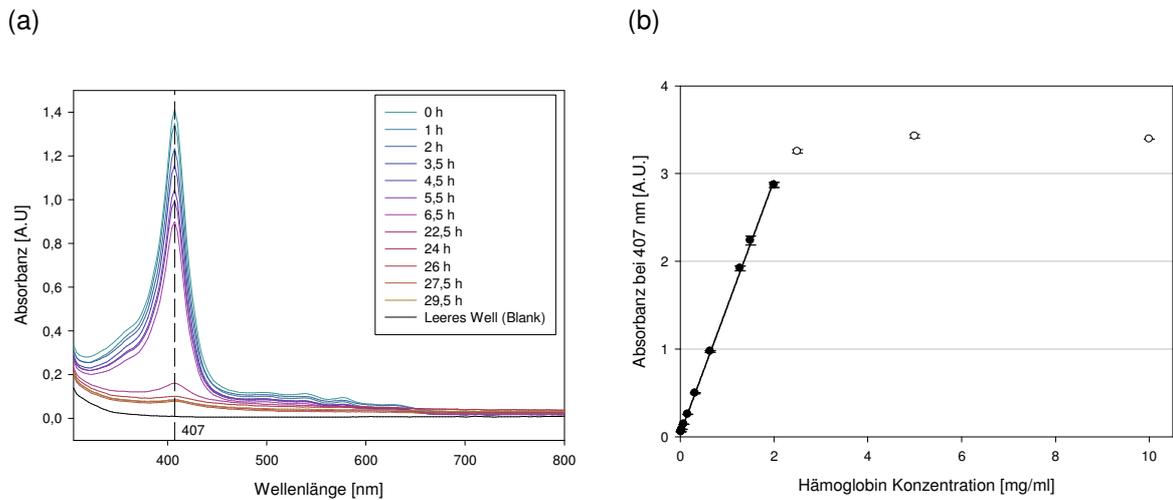


Abbildung 31: a) VIS-Spektren des Hämoglobin-Verdaus (c_0 , Hämoglobin = 1 g/l) mit immobilisiertem α -Chymotrypsin (Beladung der Partikel = 49 mg/g) im Wellenlängenbereich 305–800 nm. b) Absorbanz bei 407 nm einer Hämoglobin-Verdünnungsreihe im Konzentrationsbereich 0,02–10 mg/ml. Die Gerade zeigt den linearen Absorbanzbereich an, der bis zu einer Konzentration von 2 mg/ml reicht.

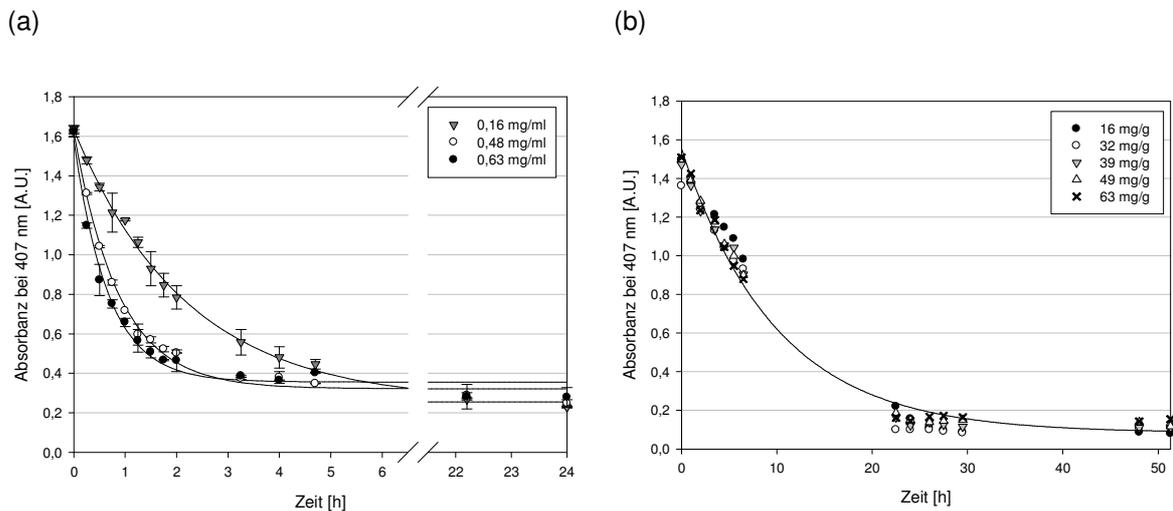


Abbildung 32: (a) Verdau von Hämoglobin ($c_0 = 1$ mg/ml) durch drei Konzentrationen von α -Chymotrypsin über 24 h und die zugehörigen Fits durch die Zerfallsfunktion $y = y_0 + a \cdot e^{-bx}$. (b) Verdau von Hämoglobin ($c_0 = 1$ mg/ml) durch fünf Immobilisate mit verschiedenen Beladungen.

Tabelle 27: Aktivitäten von freiem und Immobilisiertem α -Chymotrypsin beim Hämoglobin-Verdau.

freies / immobilisiertes Enzym	Konzentration / Beladung	Zeitraum für die Bestimmung der Anfangssteigung	Aktivität Hämoglobin-Verdau (Ausbeute)	Aktivität Suc-AAPF-pNA (Ausbeute)
frei	0,16 mg/ml	0–0,5 h	0,633 mU/mg	
frei	0,48 mg/ml	0–0,5 h	0,435 mU/mg	
frei	0,63 mg/ml	0–0,5 h	0,413 mU/mg	
immobilisiert	16 mg/g	0–6,5 h	1,30 mU/g (13 %)	330 \pm 7 U/g (21 %)
immobilisiert	32 mg/g	0–6,5 h	1,39 mU/g (8 %)	548 \pm 12 U/g (17 %)
immobilisiert	39 mg/g	0–6,5 h	1,46 mU/g (7 %)	653 \pm 47 U/g (17 %)
immobilisiert	49 mg/g	0–6,5 h	1,63 mU/g (8 %)	787 \pm 2 U/g (16 %)
immobilisiert	63 mg/g	0–6,5 h	1,75 mU/g (7 %)	905 \pm 34 U/g (15 %)

Die Proben wurden weiterhin per Suc-AAPF-pNA-Assay auf ihre Aktivität hin analysiert. Diese Ergebnisse sind in der letzten Spalte von Tabelle 27 gegeben. Die Suc-AAPF-pNA Aktivitäten liegen im Mittel 130 U/g über den Werten der Beladungskurve, bei der die Partikel nach dem gleichen Protokoll immobilisiert wurden (siehe Abbildung 25 in Kapitel 4.5.2), während die Beladungsausbeuten ebenfalls 100 % betragen. Offensichtlich verlief die Immobilisierung in diesem Fall besonders gut.

4.8 Scale-up Ergebnisse

Sowohl die Immobilisierung von α -Chymotrypsin auf C22 Partikeln (Charge 0104103), als auch der zwanzigfache Verdau von bovinem Hämoglobin mittels dieser Immobilisate wurde im halbtechnischen Maßstab durchgeführt.

4.8.1 Pumpenkennlinie und Anlagen-Totvolumen

Zur Charakterisierung der Schlauchpumpe des Durchfluss-Separators wurde nach dem Austausch aller Schläuche eine Pumpenkennlinie aufgenommen. Diese Pumpenkennlinie ist in Abbildung 33 gezeigt. Bei den beiden Leistungen, bei denen die Pumpe betrieben wurde (50 % vorwärts und 70 % rückwärts), betragen die Fördermengen $696 \pm 4,2$ ml/min, bzw. $909 \pm 19,3$ ml/min.

Die Ergebnisse der Pumpenkennlinie wurden nach den Zyklen 10, 12 und 19 bei den eingesetzten Pumpleistungen (50 % vorwärts und 70 % rückwärts) überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 28 dargestellt. Zwar liegen die beiden Fördermengen nach Zyklus 12 und 19 bei 50 % vorwärts außerhalb des 95 % Vertrauensintervalls der für die Pumpenkennlinie ermittelten Fördermenge, verglichen mit der anderen Methode der Volumenbestimmung, der

Verwendung der 1 l-Skalierung des Glasreaktors, ist diese Bestimmungsmethode trotzdem genauer. Für die Reaktion ist weiterhin die Rückpumpmenge wichtiger, da sie bestimmt, wieviel Volumen zu Beginn der Reaktion im Reaktor ist, während sich das Reaktionsvolumen durch verdunstendes Wasser über 23 h verändern kann.

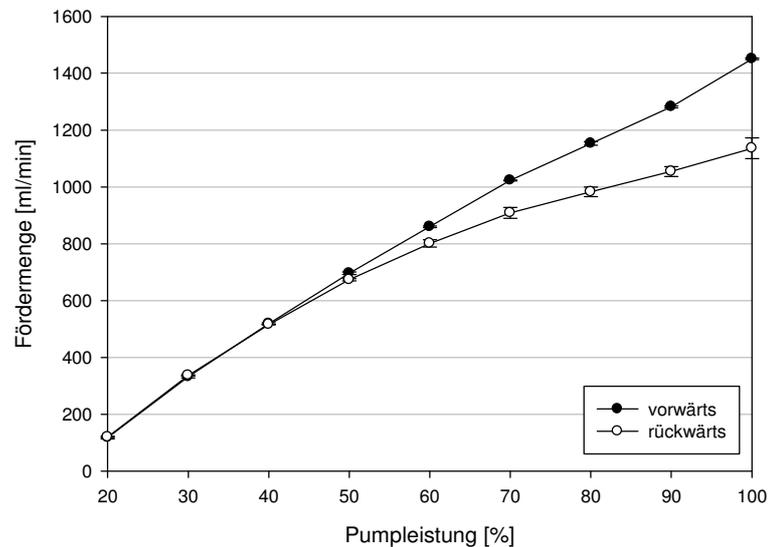


Abbildung 33: Pumpenkennlinie des Scale-up Aufbaus zur Partikelimmobilisierung und zum Hämoglobin-Verdau.

Tabelle 28: Überprüfung der Pumpenkennlinie nach den Zyklen 10, 12 und 19.

Zeitpunkt	50 % vorwärts	70 % rückwärts
nach Zyklus 10	699 ± 8,4	914 ± 5,8
nach Zyklus 12	670 ± 6,2	896 ± 6,0
nach Zyklus 19	657 ± 1,6	900 ± 4,1

4.8.2 Enzymimmobilisierung

Die Partikelkonzentration der Immobilisate in 0,1 M Tris 0,02 M CaCl₂ Lagerpuffer nach der Immobilisierung betrug 14,3 g/l. Bei einem über die Pumpenkennlinie bestimmten Lagervolumen von 3,9 l ergibt sich eine Partikelmasse von 55,8 g. Die über FTIR ATR bestimmte Enzymbeladung betrug 48 ± 1,5 mg/g (Standardabweichung über 10 FTIR ATR Messungen, RMSECV des FTIR ATR Modells: 3,7 mg/g). Die Partikelaktivität, bestimmt per Suc-AAPF-pNA, betrug 748 ± 16 U/g (Aktivitätsausbeute = 14 %). Die Aktivität liegt damit 100 U/g über dem Wert, der bei der Beladungskurve bestimmt wurde (643 ± 10 U/g bei einer Beladung von 47 mg/g, vgl. Kapitel 4.5.2). Wie auch bei der Beladungskurve, wurde bei der Scale-up Immobilisierung eine Vollbeladung erreicht, die Inkubationslösung und die nachfolgenden

Waschungen, die per BCA analysiert wurden, zeigten kein messbares Enzym mehr. Die Aktivität des Hämoglobin-Verdau, der im Labormaßstab mit der Rückstellprobe der Immobilisate direkt nach der Immobilisierung durchgeführt wurde, betrug 1,56 mU/g und liegt damit knapp unter der Aktivität von 1,63 mU/g, die bei der Methodenentwicklung des Hämoglobin-Verdau unter gleichen Bedingungen mit einer Immobilisat-Beladung von 49 mg/g erzielt wurde (vgl. Tabelle 27 in Kapitel 4.7). Die Immobilisierung wurde damit erfolgreich und vergleichbar auf den halbtechnischen Maßstab übertragen.

4.8.3 Zwanzigfacher Hämoglobin-Verdau

Der rezyklierte, zwanzigfache Einsatz von α -Chymotrypsin-Immobilisaten zum Hämoglobin-Verdau in einem halbtechnischen Maßstab wurde im Hinblick auf die Partikelkonzentration, die Partikelbeladung und die Aktivität, bestimmt über den Suc-AAPF-pNA-Assay und den Hämoglobin-Verdau analysiert.

Die Reaktionszeit eines Zyklus betrug 23 h, eine Stunde wurde für die Separation der Partikel von der Reaktionslösung und das Rückspülen in den Reaktor mit frischer Substratlösung verwendet. Bei vier Zyklen war die Reaktionszeit länger als 23 h. Dies war bei Zyklus 6 (4 Tage Reaktionszeit), Zyklus 11 (3 Tage) sowie Zyklus 16 und 18 (jeweils 2 Tage). Insgesamt waren die Partikel damit 27 Tage im Einsatz, wobei sie permanent bei 37 °C gerührt oder mit Hilfe des Durchfluss-Separators die Reaktionsvolumina getauscht wurden, was bei der Partikelresuspendierung entsprechende Scherbelastungen bedeutet.

Die per multivariater FTIR ATR Kalibration ermittelten Beladungen der Partikel sind in Abbildung 34 gezeigt. Der Vorhersagefehler RMSECV des Modells beträgt 3,7 mg/g (siehe Tabelle 21 in Kapitel 4.4.2). Sowohl das 68 % Konfidenzintervall (1 x RMSECV), als auch das 95 % Konfidenzintervall (2 x RMSECV) sind ebenfalls in der Abbildung gezeigt. Alle Messungen liegen innerhalb des 95 % Konfidenzintervalls um die Beladung der Partikel direkt nach der Immobilisierung (IM, $48 \pm 1,5$ mg/g). Damit war die Partikelbeladung konstant über die 20 Zyklen und es wurde kein Enzym in die Prozesslösung abgegeben.

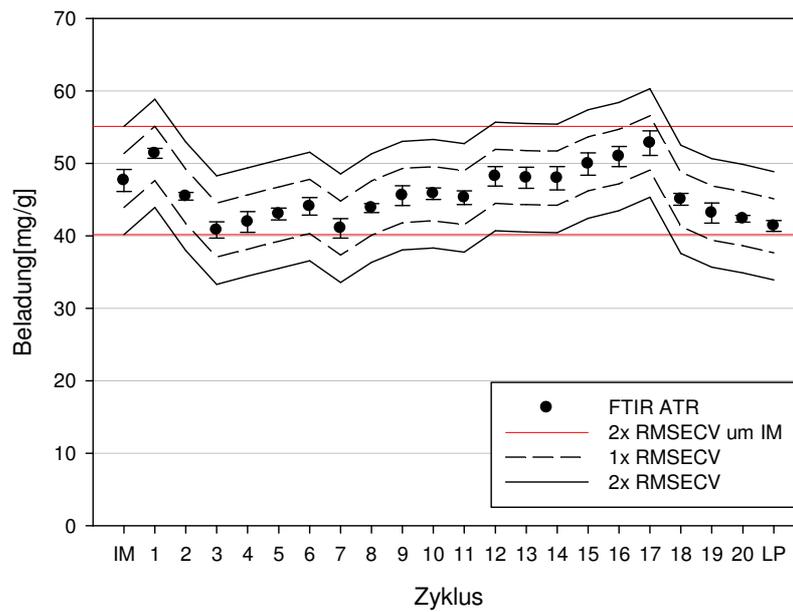


Abbildung 34: Beladung der Partikel, bestimmt per FTIR ATR. IM steht für Immobilisierung und bedeutet, dass die Partikel direkt nach der Immobilisierung und vor der Rezyklierung gemessen wurden. LP steht für Lagerpartikel und meint die Partikel nach den 20 Zyklen in Lagerpuffer. Der einfache und doppelte Vorhersagefehler des Kalibrationsmodells sind für jede Probe gezeigt, sowie (als rote Linien) um den Immobilisierungswert IM.

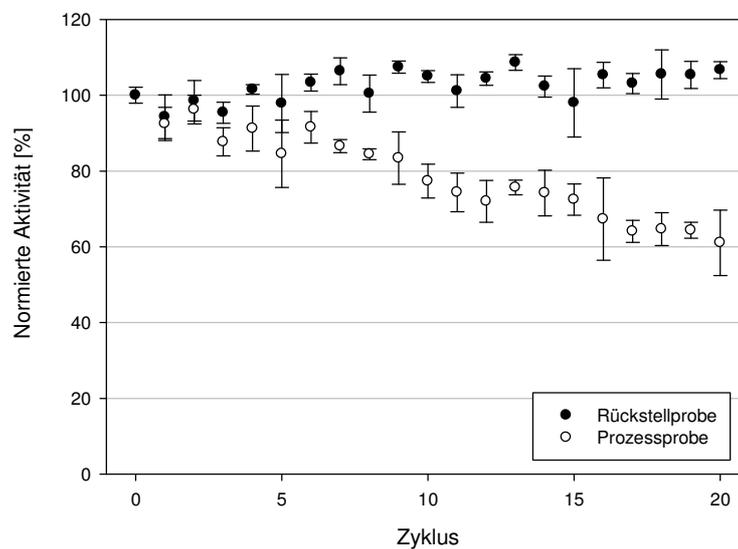


Abbildung 35: Suc-AAPF-pNA-Aktivitäten der Immobilisate. Rückstellprobe bezeichnet die nach der Immobilisierung bei 4 °C gelagerten Partikel, während die Prozessprobe die Partikel bezeichnet, die im Hämoglobin-Verdau eingesetzt wurden. Alle Aktivitäten sind auf die Partikelursprungsaktivität von 748 ± 16 U/g, bestimmt nach der Immobilisierung (Zyklus 0), normiert.

Die normierten Suc-AAPF-pNA-Aktivitäten der Immobilisate, die zum Start jedes Zyklus aus dem Reaktionsvolumen entnommen wurden, verglichen mit den Partikeln der Rückstellprobe, die bei 4 °C gelagert waren, sind in Abbildung 35 dargestellt. Die gelagerten Partikel büßten über die 27 Tage keine Aktivität ein, während die Aktivität der rezyklierten Partikel um 39 % auf einen Wert nach Zyklus 20 von 61 % der ursprünglichen Aktivität abfiel. Da die Beladung der Partikel konstant war, kann dieser Abfall nur eine Inaktivierung der immobilisierten Enzyme auf Grund der Beanspruchung im Reaktor bedeuten. Die Lagerstabilität der Partikel in 0,1 M Tris 0,02 M CaCl₂ pH 9 ist im Hinblick auf eine technische Umsetzung wichtig. Nicht jede technische Anwendung von Biokatalysereaktionen mittels immobilisierter Enzyme kann die Herstellung neuer Enzymimmobilisate beinhalten und der Einkauf fertiger Immobilisate ist daher gegebenenfalls wünschenswert.

Die Hämoglobin-Einsatzkonzentration des ersten Zyklus betrug, auf Grund eines Fehlers bei der Herstellung der Hämoglobin-Stocklösung, 1,9 statt 1,0 g/l. Im Mittel betragen die Hämoglobin-Einsatzkonzentrationen (ohne den ersten Zyklus) $1,2 \pm 0,1$ g/l. Die Partikelkonzentration über die zwanzig Zyklen betrug $10,2 \pm 0,7$ g/l. Das Reaktionsvolumen (bestimmt über die Rückpumpmenge) betrug $5,7 \pm 0,7$ l. Wie in Abbildung 36 gezeigt, lassen sich Schwankungen der Hämoglobin-Einsatzkonzentration (zwischen 1,1 und 1,4 g/l) mit der Partikelkonzentration (zwischen 9,4 und 12,0 g/l) korrelieren.

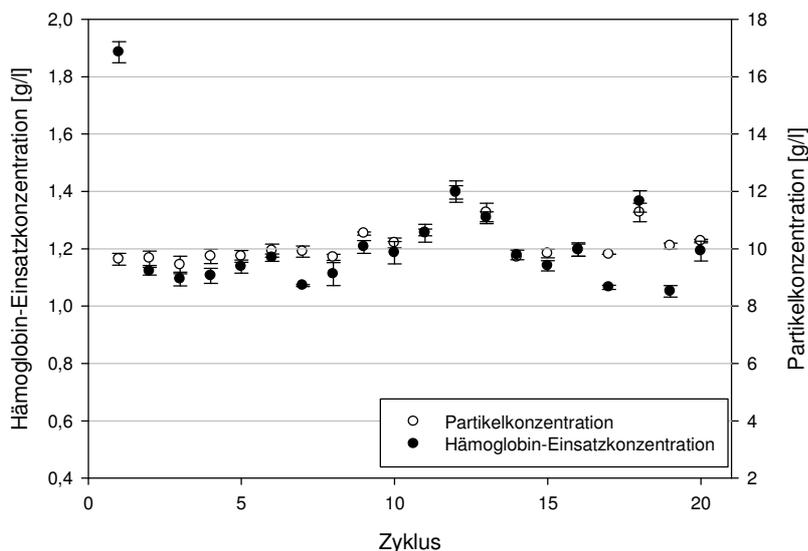


Abbildung 36: Verlauf der Hämoglobin-Einsatzkonzentration und Partikelkonzentration im Reaktionsvolumen über die 20 Zyklen. Die Hämoglobin-Einsatzkonzentration von 1,9 g/l beim ersten Zyklus erklärt sich durch den fehlerhaften Ansatz der Hämoglobin-Stocklösung.

Der Grund der Schwankungen bei den Hämoglobin-Einsatz- und Partikelkonzentrationen, die nicht konstant bei den geplanten 1 g/l, bzw. 10 g/l waren, liegt in der Prozessführung beim Rückspülen der Partikel mit frischem Substrat in den Reaktor. Beim Rückspülen wurden zunächst 2 l einer 2,5 g/l Hämoglobin-Stocklösung verwendet, um anschließend auf reinen 0,1 M Tris 0,02 M CaCl₂ pH 7,5 Puffer umzustellen und auf das Zielvolumen von 5 l und damit auf die Hämoglobin-Zielkonzentration von 1 g/l aufzufüllen. Es wurde somit mit zwei, statt einer Lösung zurückgepumpt, um den „Wertstoff“ Hämoglobin vollständig aus dem Separator zu spülen, weswegen auch durch dasselbe Ventil (durch das Umhängen des Schlauchs von der Stocklösung in den reinen Puffer) gespült wurde. Da hierzu das Programm manuell gesteuert wurde, lief der Schlauch der Stocklösung leer und über die Zyklen wurde unterschiedlich viel Luft ins System eingesaugt und führte daher zu einem veränderten Reaktionsvolumen.

Die Verläufe der Aktivität des Hämoglobin-Verdau sowie der Hämoglobin-Einsatzkonzentration sind in Abbildung 37 über die durchgeführten Zyklen aufgetragen. Die deutlich höhere Aktivität im ersten Zyklus lässt sich mit der höheren Einsatzkonzentration korrelieren. Dies deutet auf eine Substratlimitierung der Verdaureaktion in diesem Konzentrationsbereich des Hämoglobins hin. Die Aktivitäten der folgenden fünf Zyklen laufen parallel zur Einsatzkonzentration. Von Zyklus 7 bis Zyklus 15 fallen die Aktivitäten ab, obwohl die Einsatzkonzentrationen, besonders bei den Zyklen 11–13, steigen.

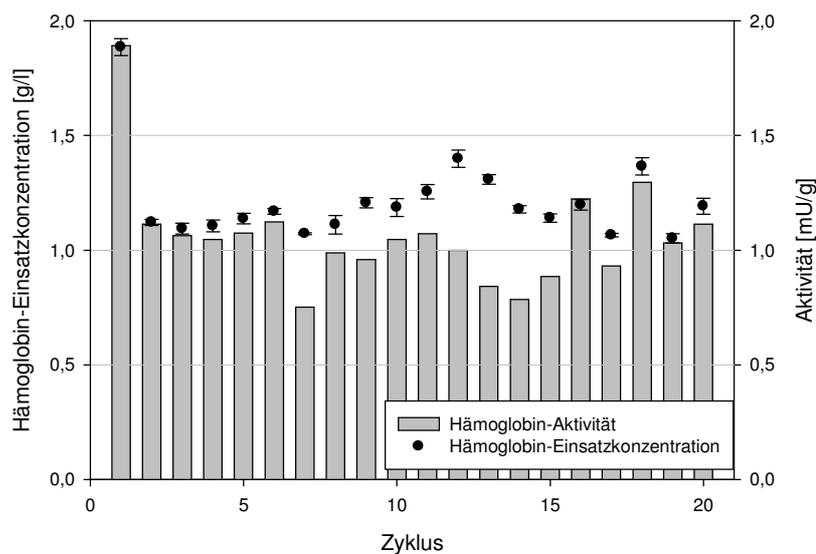


Abbildung 37: Hämoglobin-Verdau-Aktivität der Rezyklierung. Jede Aktivität wurde aus der linearen Anfangssteigung der ersten sechs Stunden Reaktionszeit jedes Zyklus berechnet. Weiterhin ist nochmals die Hämoglobin-Einsatzkonzentration dargestellt.

Ab Zyklus 16 sind die Aktivitäten wieder höher und auch wieder besser korreliert mit den Einsatzkonzentrationen. Zyklus 20 ist sogar nahezu identisch mit Zyklus 6, bezogen sowohl auf die Einsatzkonzentration, als auch die Aktivität. Somit lässt sich festhalten, dass die Aktivität des Hämoglobin-Verdau zwar schwankt, nicht aber den stetigen Abfall der Suc-AAPF-pNA-Aktivität nachvollzieht und, besonders beim Vergleich der Zyklen 2–6 mit den Zyklen 16–20, kein Aktivitätsverlust auftritt.

Das Suc-AAPF-pNA-Molekül ist bedeutend kleiner als Hämoglobin (624,6 g/mol zu 64500 g/mol). Dadurch kann es dichter an die Partikeloberfläche gelangen und von immobilisierten Enzymen verstoffwechselt werden, die für Hämoglobin nicht zugänglich sind. Weiterhin ist eine gegenseitige sterische Hinderung von Hämoglobin-Molekülen an der Partikeloberfläche viel wahrscheinlicher als bei Suc-AAPF-pNA. Möglicherweise führt beides dazu, dass die Deaktivierung des Enzyms, deren Trend bei Suc-AAPF-pNA offensichtlich ist, noch nicht im Hämoglobin-Verdau sichtbar ist, da dieser sehr viel langsamer von statten geht und insgesamt weniger Enzyme an der Partikeloberfläche verwendet, als die Suc-AAPF-pNA-Verstoffwechslung. Gleichzeitig kann auch eine mögliche Substratlimitierung (s.o.) des Hämoglobins eine Rolle spielen. Es liegen zu wenige Hämoglobin-Moleküle in Lösung vor, um alle immobilisierten Enzyme zur Verstoffwechslung notwendig zu machen. Selbst wenn einige immobilisierte Enzyme denaturieren, verbleiben genug zum Verdau. Diese Fragestellung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht und sollte Bestandteil zukünftiger Arbeiten sein.

Beim Vergleich der Aktivität des Hämoglobin-Verdau der Immobilisate im halbertechnischen Maßstab (ohne Zyklus 1) mit der Aktivität der Immobilisate der Rückstellprobe im Labormaßstab (siehe Kapitel 4.7) ist auffällig, dass die Aktivität von 1,56 mU/g bei keinem der Zyklen, trotz etwas höheren Einsatzkonzentrationen (die Einsatzkonzentration im Labormaßstab war genau 1,0 g/l), erreicht wird. Mögliche Erklärungen sind eine bessere Durchmischung der Partikel im Labormaßstab (Schütteln im Thermomixer bei 1400 rpm gegen das Rühren mit dem Schrägblattrührer bei 250–350 rpm), die Scherbelastung durch den Schrägblattrührer und eine dadurch verursachte initiale Denaturierung sowie Auswirkungen des ersten Zyklus durch die Anlagerung von Hämoglobin-Bruchstücke an die Partikel, die sich schwer desorbieren lassen und die aktiven Zentren teilweise blockieren.

Die absolute Partikelmasse zu Beginn des rezyklierten Hämoglobin-Verdau wurde zu 52,2 g Partikel bestimmt. In 5 l Lagerlösung, nach Entleerung des Durchfluss-Separators nach Abschluss der Rezyklierung, wurde eine Partikelkonzentration von 9,7 g/l gemessen, wodurch

sich eine Partikelmasse von 48,5 g ergibt. Die Separatorkammer enthielt bei der Endreinigung noch erkennbar Partikel, ebenso waren in den Schläuchen der Anlage noch einige Partikelsedimente sichtbar, besonders an Ventilpositionen, die nicht aktiv durchströmt, jedoch beim Umschalten kurzfristig geöffnet waren. Unter Berücksichtigung des zwanzigfachen Substrataustauschs ist der Partikelverlust des Hämoglobin-Verdau im halbtechnischen Maßstab somit als gering anzusehen.

4.8.4 Fazit des Scale-ups

Als Fazit aus dem Scale-up Versuch lässt sich festhalten, dass die Immobilisierung erfolgreich vom Labormaßstab auf den halbtechnischen Maßstab skaliert werden konnte. Die Immobilisate der bei 4 °C gelagerten Rückstellprobe waren über 27 Tage lagerstabil. Der Aktivitätsverlauf der Immobilisate im zwanzigmal rezyklierten Hämoglobin-Verdau ist abhängig vom untersuchten Substrat, für den Hämoglobin-Verdau entsprach die Aktivität nach zwanzig Zyklen der Anfangsaktivität, während beim Suc-AAPF-pNA-Assay noch 61 % der initialen Aktivität messbar waren. Die Beladung der Partikel konnte per FTIR ATR bestimmt werden und war im Rahmen der Modellvorhersagegenauigkeit konstant. Die Durchführung der Separation, sowohl bei der Immobilisierung, als auch bei der Rezyklierung, ist mit Hilfe des Durchfluss-Separators sehr einfach möglich und verursacht nur geringen Partikelverlust.

5 FAZIT UND AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einsatz kommerzieller, magnetischer Mikropartikel zur kovalenten Immobilisierung von α -Chymotrypsin und die Anwendung der daraus resultierenden Immobilisate in einem halbtechnischen Beispielprozess, in welchem die Immobilisate über zwanzig Zyklen zum hydrolytischen Verdau von Hämoglobin eingesetzt wurden.

Für das Erreichen dieses Ziels wurden die kommerziellen PerkinElmer chemagen M-PVA C22 Partikel auf ihre Partikelgrößenverteilung, Magnetisierbarkeit sowie, durch elektronenmikroskopische Aufnahmen, auf ihre Form hin charakterisiert. Die Extrahierbarkeit der zur Partikelsynthese eingesetzten Reagenzien Magnetit (Eisenoxid), Cer, Acrylsäure, Polyvinylalkohol und Glutaraldehyd wurde untersucht. Die größte Extrahierbarkeit von Eisen (um 1 mg/l) war in reinem Wasser gegeben, für alle anderen Lösungsmittel lag die Extrahierbarkeit deutlich darunter. Ansonsten konnte nur noch PVA (im Mittel 2,5 mg/l) mittels Ethanol extrahiert werden, alle anderen Ergebnisse waren unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Die Zweischríttimmobilisierung von α -Chymotrypsin und Tyrosin-Tripeptid wurde mittels statistischer Versuchsplanung (DoE) optimiert. Zunächst wurden nach den Einflussfaktoren der Aktivierungsbedingungen der Partikel mit EDC gescreent. In der folgenden Optimierung wurde ein sog. Onion-Design über fünf Wertevariationen pro Parameter (zwei niedrige Einstellungen, Zentralpunkt, zwei hohe Einstellungen) durchgeführt. Dieses DoE wurde anschließend um einen erhöhten EDC-Konzentrationsbereich (bis 1,3 g EDC / g Partikel) erweitert und so Optima gefunden, bzw. Wertebereiche identifiziert, die zu robusten Beladungs- und Aktivitätsausbeuten führten. Als Abschluss der DoE-Versuche wurden mit den optimierten Aktivierungsbedingungen die Kopplungsbedingungen für α -Chymotrypsin, bzw. Tyrosin-Tripeptid untersucht und Optima identifiziert. Mit den optimierten Protokollen wurden Beladungskurven sowohl für Tyrosin-Tripeptid, als auch α -Chymotrypsin erstellt.

Mittels FTIR ATR wurde eine Methode zur Quantifizierung der immobilisierten Enzymmasse auf carboxylierten M-PVA Partikeln erstellt. Mit dieser Methode können Beladungen direkt auf dem Partikel bestimmt werden, ohne auf die Analyse der Überstände zur Berechnung der Beladungen angewiesen zu sein. Dies ist besonders beim Verlassen des Labormaßstabs hilfreich, wie z.B. bei der Immobilisierung im halbtechnischen Maßstab, wo die Überstandsbestimmung nicht mehr einfach durchzuführen ist. Für zukünftige Arbeiten bietet sich die Untersuchung einer möglicherweise verfeinerten Kalibration der FTIR ATR Modelle mit ei-

nem anderen Verfahren als dem BCA-Assay an, um so gegebenenfalls die Genauigkeit der Kalibration und damit die Vorhersagegenauigkeit der Modelle zu erhöhen (ein Modell kann nicht genauer sein als die Messmethode, mit der es kalibriert wurde).

Adsorptive und kovalente Immobilisate von α -Chymotrypsin wurden im Labormaßstab in einer Hämoglobin-Lösung rezykliert, um die eventuelle Desorption des Enzyms unter Prozessbedingungen zu untersuchen, sowie um die Quantifizierung mittels FTIR ATR zu testen. Während die adsorptive Beladung über drei Zyklen deutlich desorbierte, blieb die kovalente Beladung konstant. Mit diesem wichtigen Ergebnis wurde ein Scale-up Versuch geplant, in dem die Immobilisierung der Partikel in einem halbtechnischen Maßstab ebenso gezeigt wurde, wie der zwanzigfache Einsatz der Immobilisate zum Hämoglobin-Verdau. Hierfür wurde ein weiterer Aktivitätsassay, basierend auf dem Hämoglobin-Verdau entwickelt und erfolgreich eingesetzt. Die Immobilisierung konnte erfolgreich auf den halbtechnischen Maßstab übertragen und die Eignung der FTIR ATR Methode zur Quantifizierung der Partikelbeladung zur Prozesskontrolle gezeigt werden. Mittels der FTIR ATR Methode wurde die konstante Enzymbeladung der Partikel über die zwanzig Zyklen gezeigt. Während die Immobilisate bei der Aktivitäts-Analyse mittels Suc-AAPF-pNA-Substrat 40 % Aktivität über die zwanzig Zyklen im Vergleich zur Ausgangsaktivität einbüßten, zeigte sich keine Abnahme der Aktivität bei der Verstoffwechslung des Hämoglobins. Hier sollten zukünftige Arbeiten eventuelle Diffusions- und Substratlimitierungen untersuchen. Als zusätzliches Ergebnis konnte die Lagerstabilität der Immobilisate bei 4 °C über 27 Tage gezeigt werden.

Es bleibt festzuhalten, dass der halbtechnische Hämoglobin-Verdau nur ein Beispielprozess war, eine weiterführende Untersuchung dieser Reaktion ist nur von akademischem Interesse. Die Anwendbarkeit von immobilisierten Enzymen in biokatalytischen Schritten im Vergleich zu ihrem Einsatz in freier Form ist immer vom spezifischen Enzym/Substrat-, bzw. Partikel/Enzym/Substratsystem abhängig, so dass sich Reaktionsoptimierungen nur schwer übertragen lassen und immer für den konkreten Fall durchgeführt werden müssen. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass sich die statistische Versuchsplanung für eine solche Untersuchung sehr gut eignet, und die Ergebnisse der Immobilisierungen liefern einen Hinweis darauf, dass sich das gefundene Optimum des enzym-, bzw. peptidunabhängigen Aktivierungsschritts der Carboxygruppen einfach auf andere Immobilisate, ausgehend von den gleichen Trägerpartikeln, übertragen lässt. Unabhängig hiervon stellt die entwickelte Quantifizierung der Partikelbeladung mittels FTIR ATR ein neues und universales Hilfsmittel für die Prozesskontrolle von Biotransformationen unter Einsatz von Enzymimmobilisaten dar.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. Dicosimo, J. McAuliffe, A. J. Poulou, and G. Bohlmann, "Industrial use of immobilized enzymes," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 15, pp. 6437–6474, Feb. 2013.
- [2] K. Buchholz, V. Kasche, and U. T. Bornscheuer, *Biocatalysts and Enzyme Technology*, 2. ed. Wiley-Blackwell, 2012.
- [3] A. Liese, K. Seelbach, and C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, 1. ed. Wiley, 2000.
- [4] A. J. J. Straathof, S. Panke, and A. Schmid, "The production of fine chemicals by biotransformations.," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 13, no. 6, pp. 548–56, Dec. 2002.
- [5] R. Ulber and D. Sell, *White biotechnology*, Advances i. Springer, 2007.
- [6] S. S. Dewan, "Global Markets for Enzymes in Industrial Applications, Report Overview BIO030G," Wellesley, MD, USA, 2014.
- [7] N. End and K.-U. Schöning, "Immobilized biocatalysts in industrial research and production.," *Top. Curr. Chem.*, vol. 242, pp. 273–317, Jan. 2004.
- [8] W. Tischer and F. Wedekind, "Immobilized enzymes: methods and applications," *Top. Curr. Chem.*, vol. 200, pp. 95–126, 1999.
- [9] A. Horn, S. Kumar, A. Liese, and U. Kragl, "Reactions on Immobilized Biocatalysts," in *Handbook of Heterogeneous Catalysis*, G. Ertl, H. Knözinger, F. Schüth, and J. Weitkamp, Eds. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.
- [10] L. Cao, *Carrier-bound immobilized enzymes : principles, applications and design*. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.
- [11] G. F. Bickerstaff, *Immobilization of Enzymes and Cells*. Humana Press, 1997.
- [12] S. Cantone, V. Ferrario, L. Corici, C. Ebert, D. Fattor, P. Spizzo, and L. Gardossi, "Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 15, pp. 6262–76, Aug. 2013.
- [13] R. A. Sheldon, "Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance," *Adv. Synth. Catal.*, vol. 349, no. 8–9, pp. 1289–1307, Jun. 2007.
- [14] S. Pedersen and M. W. Chrstensen, "Immobilized biocatalysts," in *Applied Biocatalysis*, 2. ed., A. J. J. Straathof and P. Adlercreutz, Eds. Harwood Academic Publishers, 2000.
- [15] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2. ed. Elsevier, 2008.

- [16] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, and R. N. Muller, "Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications.," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 6, pp. 2064–110, Jul. 2008.
- [17] S.-H. Huang and R.-S. Juang, "Biochemical and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles: a review," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 13, no. 10, pp. 4411–4430, Sep. 2011.
- [18] A.-H. Lu, E. L. Salabas, and F. Schüth, "Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application.," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 46, no. 8, pp. 1222–44, Jan. 2007.
- [19] M. Koneracka, P. Kopvcansky, M. Timko, C. N. Ramchand, Z. M. Saiyed, M. Trevan, and A. de Sequeira, "Immobilization of enzymes on magnetic particles," in *Immobilization of Enzymes and Cells*, Springer, 2006, pp. 217–228.
- [20] S.-H. Huang, M.-H. Liao, and D.-H. Chen, "Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles.," *Biotechnol. Prog.*, vol. 19, no. 3, pp. 1095–100, 2003.
- [21] I. Safarik and M. Safarikova, "Magnetic nano- and microparticles in biotechnology," *Chem. Pap.*, vol. 63, no. 5, pp. 497–505, Aug. 2009.
- [22] P. J. Halling and P. Dunnill, "Magnetic supports for immobilized enzymes and bioaffinity adsorbents," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 2, no. 1, pp. 2–10, Jan. 1980.
- [23] J. Hristov, "Magnetic field assisted fluidization – a unified approach. Part 8. Mass transfer: magnetically assisted bioprocesses," *Rev. Chem. Eng.*, vol. 26, no. 3–4, pp. 55–128, 2010.
- [24] R. C. Rodrigues, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, and R. Fernández-Lafuente, "Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 15, pp. 6290–307, Aug. 2013.
- [25] A. Liese and L. Hilterhaus, "Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 15, pp. 6236–49, Aug. 2013.
- [26] S. Akgöl, Y. Kacar, A. Denizli, and M. Arica, "Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres," *Food Chem.*, vol. 74, pp. 281–288, 2001.
- [27] J. Oster, J. Parker, and L. à Brassard, "Polyvinyl-alcohol-based magnetic beads for rapid and efficient separation of specific or unspecific nucleic acid sequences," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 225, no. 1–2, pp. 145–150, 2001.
- [28] D. F. M. Neri, V. M. Balcão, M. G. Carneiro-da-Cunha, L. B. Carvalho Jr., and J. A. Teixeira, "Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane–polyvinyl alcohol magnetic (mPOS–PVA) composite for lactose hydrolysis," *Catal. Commun.*, vol. 9, no. 14, pp. 2334–2339, Aug. 2008.

- [29] D. F. M. Neri, V. M. Balcão, R. S. Costa, I. C. A. P. Rocha, E. M. F. C. Ferreira, D. P. M. Torres, L. R. M. Rodrigues, L. B. Carvalho, and J. A. Teixeira, "Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol," *Food Chem.*, vol. 115, no. 1, pp. 92–99, Jul. 2009.
- [30] D. F. M. Neri, D. P. B. Bernardino, E. I. C. Beltrao, and L. B. Carvalho Jr., "Purines oxidation by immobilized xanthine oxidase on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol composite," *Appl. Catal., A*, vol. 401, no. Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., pp. 210–214, 2011.
- [31] L. Bruno and J. Coelho, "Characterization of *Mucor miehei* lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 189–192, 2005.
- [32] D. Müller-Schulte and H. Brunner, "Novel magnetic microspheres on the basis of poly(vinyl alcohol) as affinity medium for quantitative detection of glycosylated haemoglobin," *J. Chromatogr. A*, vol. 711, no. 1, pp. 53–60, 1995.
- [33] D. Müller-Schulte, "Preparation of polyvinyl alcohol-based magnetic particles for binding biomolecules US 6204033 B1," 1995.
- [34] D. Bozhinova, B. Galunsky, G. Yueping, M. Franzreb, R. Köster, and V. Kasche, "Evaluation of magnetic polymer micro-beads as carriers of immobilised biocatalysts for selective and stereoselective transformations," *Biotechnol. Lett.*, vol. 26, no. 4, pp. 343–350, 2004.
- [35] D. P. Bozhinova, "Synthesis, modification and characterisation of magnetic micro-matrices for covalent immobilisation of biomolecules. Model investigations with penicillin amidase from *E.coli*," Universität Regensburg, 2004.
- [36] I. Magario, "Enzyme Reaction Engineering for the Conversion of Emulsified Di-rhamnolipid by Free and Immobilized Naringinase," Universität Karlsruhe (TH), 2008.
- [37] I. Magario, X. Ma, A. Neumann, C. Syldatk, and R. Hausmann, "Non-porous magnetic micro-particles: comparison to porous enzyme carriers for a diffusion rate-controlled enzymatic conversion.," *J. Biotechnol.*, vol. 134, no. 1–2, pp. 72–8, Mar. 2007.
- [38] I. Magario, A. Neumann, O. Vielhauer, C. Syldatk, and R. Hausmann, "Evaluation of enzyme carriers as biocatalysts for the conversion of emulsified rhamnolipids," *Biocatal. Biotransformation*, vol. 27, no. 4, pp. 237–245, Jan. 2009.
- [39] N. Schultz, G. Metreveli, M. Franzreb, F. H. Frimmel, and C. Syldatk, "Zeta potential measurement as a diagnostic tool in enzyme immobilisation.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 66, no. 1, pp. 39–44, Oct. 2008.
- [40] N. Schultz, T. J. Hobley, and C. Syldatk, "Spectrophotometric assay for online measurement of the activity of lipase immobilised on micro-magnetic particles.," *Biotechnol. Lett.*, vol. 29, no. 3, pp. 365–71, Mar. 2007.
- [41] N. Schultz, C. Syldatk, M. Franzreb, and T. J. Hobley, "Integrated processing and multiple re-use of immobilised lipase by magnetic separation technology," *J. Biotechnol.*, vol. 132, no. 2, pp. 202–208, 2007.

- [42] N. Schultz, "Application of magnetic separation technology for the recovery and re-use of immobilised lipase of *Candida antarctica* A-type (CALA)," Universität Karlsruhe (TH), 2007.
- [43] J. Marín-Navarro, D. Talens-Perales, A. Oude-Vrielink, F. J. Cañada, and J. Polaina, "Immobilization of thermostable β -galactosidase on epoxy support and its use for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides biosynthesis.," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, Oct. 2013.
- [44] I. Olsson, "Experimental designs at the crossroads of drug discovery," Umeå University, 2006.
- [45] D. C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, 5. ed. Wiley, 2001.
- [46] L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, C. Wikström, and S. Wold, *Design of Experiments: Principles and Applications*, 3. ed. Umetrics, 2008.
- [47] C.-F. Mandenius and A. Brundin, "Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology.," *Biotechnol. Prog.*, vol. 24, no. 6, pp. 1191–203, 2008.
- [48] D. Baş and İ. H. Boyacı, "Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology," *J. Food Eng.*, vol. 78, no. 3, pp. 836–845, Feb. 2007.
- [49] S. Weissman, "Design of Experiments (DoE) and Process Optimization. A Review of Recent Publications.," *Org. Process Res. Dev.*, p. 140627143639007, Jun. 2014.
- [50] C. Martin and J. Cuellar, "Synthesis of poly (styrene-co-divinylbenzene)-stainless steel beads through a factorial design of experiments," *Ind. Eng. Chem. Res.*, pp. 2093–2103, 2004.
- [51] E. Biró, A. S. Németh, T. Feczko, J. Tóth, C. Sisak, and J. Gyenis, "Three-step experimental design to determine the effect of process parameters on the size of chitosan microspheres," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 48, no. 3, pp. 771–779, 2009.
- [52] G. Gofferjé, M. Gebhardt, A. Stäbler, U. Schweiggert-Weisz, and E. Flöter, "Enzyme-assisted deacidification of *Jatropha* crude oil by statistical design of experiments," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, p. n/a–n/a, Jun. 2014.
- [53] D.-F. Li, H.-C. Ding, and T. Zhou, "Covalent immobilization of mixed proteases, trypsin and chymotrypsin, onto modified polyvinyl chloride microspheres.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 44, pp. 10447–53, Nov. 2013.
- [54] H.-Y. Ju, C.-H. Kuo, J.-R. Too, H.-Y. Huang, Y.-K. Twu, C.-M. J. Chang, Y.-C. Liu, and C.-J. Shieh, "Optimal covalent immobilization of α -chymotrypsin on Fe₃O₄-chitosan nanoparticles," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 78, pp. 9–15, 2012.
- [55] C. Grüttner, K. Müller, and J. Teller, "A Rapid Assay to Measure the Shielding of Iron Oxide Cores by the Particle Shell," *IEEE Trans. Magn.*, vol. 49, no. 1, pp. 177–181, 2013.

- [56] P. Roychoudhury, L. M. Harvey, and B. McNeil, "The potential of mid infrared spectroscopy (MIRS) for real time bioprocess monitoring," *Anal. Chim. Acta*, vol. 571, no. 2, pp. 159–166, 2006.
- [57] E. L. Veale, J. Irudayaraj, and A. Demirci, "An On-Line Approach To Monitor Ethanol Fermentation Using FTIR Spectroscopy," *Biotechnol. Prog.*, vol. 23, no. 2, pp. 494–500, 2007.
- [58] H. Kornmann, M. Rhiel, C. Cannizzaro, I. Marison, and U. von Stockar, "Methodology for real-time, multianalyte monitoring of fermentations using an in-situ mid-infrared sensor," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 82, no. 6, pp. 702–709, 2003.
- [59] F. Leitermann, C. Syldatk, and R. Hausmann, "Fast quantitative determination of microbial rhamnolipids from cultivation broths by ATR-FTIR Spectroscopy," *J. Biol. Eng.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–8, 2008.
- [60] F. Capito, R. Skudas, B. Stanislawski, and H. Kolmar, "Matrix effects during monitoring of antibody and host cell proteins using attenuated total reflection spectroscopy," *Biotechnol. Prog.*, vol. 29, no. 1, pp. 265–74, 2012.
- [61] R. Pacheco, A. Karmali, M. L. M. Serralheiro, and P. I. Haris, "Application of Fourier transform infrared spectroscopy for monitoring hydrolysis and synthesis reactions catalyzed by a recombinant amidase," *Anal. Biochem.*, vol. 346, no. 1, pp. 49–58, 2005.
- [62] M. R. Dadd, D. C. A. Sharp, A. J. Pettman, and C. J. Knowles, "Real-time monitoring of nitrile biotransformations by mid-infrared spectroscopy," *J. Microbiol. Methods*, vol. 41, no. 1, pp. 69–75, 2000.
- [63] H.-U. Gremlich, "Infrared and Raman Spectroscopy," in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000.
- [64] H. Martens and T. Næs, *Multivariate Calibration*. Wiley, 1991.
- [65] W. Kessler, *Multivariate Datenanalyse: für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.
- [66] P. Gemperline, Ed., *Practical Guide To Chemometrics*, 2. ed. CRC Press, 2006.
- [67] J.-P. Conzen, *Multivariate Kalibration*, 4., neu be. Bruker Optik GmbH, 2005.
- [68] "BRENDA - EC 3.4.21.1 Chymotrypsin." [Online]. Available: [http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.4.21.1&Suchword=&organism\[\]=Bos+taurus&show_tm=0](http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.4.21.1&Suchword=&organism[]=Bos+taurus&show_tm=0). [Accessed: 26-Aug-2014].
- [69] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk, "Measurement of protein using bicinchoninic acid," *Anal. Biochem.*, vol. 150, no. 1, pp. 76–85, Oct. 1985.
- [70] E. G. DelMar, C. Largman, J. W. Brodrick, and M. C. Geokas, "A sensitive new substrate for chymotrypsin," *Anal. Biochem.*, vol. 99, no. 2, pp. 316–20, Nov. 1979.

- [71] "Produktinformation Sigma-Aldrich Suc-AAPF-pNA S7388." [Online]. Available: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/s7388pis.pdf. [Accessed: 07-Apr-2014].
- [72] M. A. Gilles, A. Q. Hudson, and C. L. Borders, "Stability of Water-Soluble Carbodiimides in Aqueous Solution," *Anal. Biochem.*, vol. 148, pp. 244–248, 1990.
- [73] N. Nakajima and Y. Ikada, "Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media," *Bioconjug. Chem.*, vol. 6, no. 1, pp. 123–130, 1995.
- [74] J. H. Finley, "Spectrophotometric determination of polyvinyl alcohol in paper coatings," *Anal. Chem.*, vol. 33, no. 13, pp. 1925–1927, Dec. 1961.
- [75] "Thermo Scientific EDC Instructions 22980 22981 77149." [Online]. Available: <https://www.piercenet.com/instructions/2160475.pdf>. [Accessed: 25-Aug-2014].
- [76] N. E. Good, G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa, and R. M. M. Singh, "Hydrogen Ion Buffers for Biological Research," *Biochemistry*, vol. 5, no. 2, pp. 467–477, Feb. 1966.
- [77] F. A. Carey, "Chapter 27: pKa and pl values," *Organic Chemistry*, 2001. [Online]. Available: <http://www.mhhe.com/physsci/chemistry/carey5e/Ch27/ch27-1-4-2.html>. [Accessed: 23-May-2014].
- [78] "Opus 7 User Manual Quant." Bruker Optik GmbH, 2011.
- [79] "Opus 7 User Manual Base Package." Bruker Optik GmbH, 2011.
- [80] "Produktinformation Sigma-Aldrich Hemoglobin H2625." [Online]. Available: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/h2625pis.pdf. [Accessed: 07-Apr-2014].
- [81] M. Franzreb and C. Reichert, "High gradient magnetic separator US 20060016732 A1," 2006.
- [82] C. Müller, "Magnetotechnologische Reinigung von Gonadotropin aus Pferdeserum," Karlsruher Institut für Technologie, 2011.
- [83] N. Ebner, "Einsatz von Magnettrenntechnologie bei der Bioproduktaufarbeitung," Universität Karlsruhe (TH), 2006.
- [84] L. J. Kirwan, P. D. Fawell, and W. van Bronswijk, "In Situ FTIR-ATR Examination of Poly(acrylic acid) Adsorbed onto Hematite at Low pH," *Langmuir*, vol. 19, no. 14, pp. 5802–5807, 2003.
- [85] A. Anis, A. K. Banthia, and S. Bandyopadhyay, "Synthesis and characterization of polyvinyl alcohol copolymer/phosphomolybdic acid-based crosslinked composite polymer electrolyte membranes," *J. Power Sources*, vol. 179, no. 1, pp. 69–80, 2008.
- [86] S. Krimm, C. Y. Liang, and G. B. B. M. Sutherland, "Infrared spectra of high polymers. V. Polyvinyl alcohol," *J. Polym. Sci.*, vol. 22, no. 101, pp. 227–247, Nov. 1956.

- [87] S. Krimm, "Interpreting Infrared Spectra of Peptides and Proteins," in *Infrared Analysis of Peptides and Proteins*, vol. 750, no. 750, American Chemical Society, 1999, pp. 38–53.
- [88] H.-U. Gremlich and B. Yan, Eds., *Infrared and raman spectroscopy in biological materials*. Dekker, 2001.
- [89] G. W. Poling, "Infrared Reflection Studies of the Oxidation of Copper and Iron," *J. Electrochem. Soc.*, vol. 116, no. 7, p. 958, Jul. 1969.
- [90] L. L. Shevchenko, "Infrared spectra of salts and complexes of carboxylic acids and some of their derivatives," *Russ. Chem. Rev.*, vol. 32, no. 4, pp. 201–207, Apr. 1963.
- [91] T. S. Anirudhan and S. R. Rejeena, "Adsorption and hydrolytic activity of trypsin on a carboxylate-functionalized cation exchanger prepared from nanocellulose.," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 381, no. 1, pp. 125–36, Sep. 2012.
- [92] N. Ui, "Isoelectric points and conformation of proteins," *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct.*, vol. 229, no. 3, pp. 582–589, Mar. 1971.
- [93] D. Naumann, "FT-Infrared and FT-Raman Spectroscopy in Biomedical Research," *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 36, no. 2–3, pp. 239–298, Jun. 2001.

7 ANHANG

7.1 Daten zur Protokolloptimierung mittels statistischer Versuchsplanung

7.1.1 Screening der Aktivierungsbedingungen mit EDC

Tabelle 29: Faktoren und Antworten des Screening-DoEs zur Partikelaktivierung; die α -Chymotrypsin-Einsatzkonzentration betrug 31 mg/g Partikel, die eingesetzte Aktivität dieser Konzentration 3436 U/g Partikel, bzw. 109 U/mg freies Enzym.

Nr.	pH Aktivierung	Aktivierungstemperatur [°C]	Aktivierungszeit [min]	EDC-Konzentration [g EDC / g Partikel]	Beladungsausbeute [%]	Aktivitätsausbeute [%]
1	5,3	11	10	0,18	97	28
2	5,7	11	10	0,18	98	21
3	5,3	37	10	0,18	65	21
4	5,7	37	10	0,18	61	19
5	5,3	11	35	0,18	95	33
6	5,7	11	35	0,18	94	31
7	5,3	37	35	0,18	38	3
8	5,7	37	35	0,18	38	3
9	5,3	11	10	0,27	97	23
10	5,7	11	10	0,27	97	22
11	5,3	37	10	0,27	92	29
12	5,7	37	10	0,27	87	30
13	5,3	11	35	0,27	97	24
14	5,7	11	35	0,27	97	23
15	5,3	37	35	0,27	39	3
16	5,7	37	35	0,27	39	3
17	5,5	24	22,5	0,22	88	30
18	5,5	24	22,5	0,22	90	29
19	5,5	24	22,5	0,22	91	31

7.1.2 Optimierung der Aktivierungsbedingungen mit EDC

Tabelle 30: Faktoren und Antworten des Onion-DoEs zur Partikelaktivierung; die Enzymkonzentration betrug $37,4 \pm 1,7$ mg/g Partikel, die eingesetzte Aktivität dieser Konzentration 3786 ± 272 U/g Partikel, bzw. 101 U/mg freies Enzym.

Nr.	pH Aktivierung	Aktivierungstemperatur [°C]	Aktivierungszeit [min]	EDC-Konzentration [g EDC / g Partikel]	Beladungsausbeute [%]	Aktivitätsausbeute [%]
1	5,7	20	26	0,34	96	24
2	6,1	20	26	0,19	25	21
3	6,1	20	26	0,34	94	25
4	5,7	20	46	0,19	14	20
5	5,7	20	46	0,34	54	26
6	6,1	20	46	0,19	8	14
7	5,7	30	26	0,19	7	12
8	5,7	30	26	0,34	19	19
9	6,1	30	26	0,19	4	10
10	5,7	30	46	0,19	3	7
11	6,1	30	46	0,34	0	6
12	5,5	15	16	0,42	100	21
13	6,3	15	16	0,12	43	23
14	5,5	15	56	0,12	23	17
15	6,3	15	56	0,12	13	12
16	6,3	15	56	0,42	87	28
17	5,5	35	16	0,12	16	12
18	6,3	35	16	0,12	4	10
19	6,3	35	16	0,42	36	20
20	5,5	35	56	0,12	7	5
21	5,5	35	56	0,42	5	5
22	6,3	35	56	0,42	3	5
23	5,3	10	6	0,49	77	18
24	6,5	10	6	0,05	55	23
25	6,5	10	6	0,49	97	19
26	6,5	10	66	0,49	97	22
27	5,3	40	6	0,05	16	14
28	5,3	40	6	0,49	95	20
29	6,5	40	6	0,05	8	11
30	6,5	40	6	0,49	96	25
31	5,3	40	66	0,49	2	3
32	6,5	40	66	0,05	5	6
33	6,5	40	66	0,49	1	4
34	6,1	10	66	0,05	21	13
35	5,3	10	66	0,34	96	19
36	5,9	25	36	0,49	93	26
37	6,5	25	36	0,27	15	9
38	5,3	30	66	0,05	5	5
39	5,3	10	26	0,05	54	21
40	5,9	25	6	0,27	90	18
41	5,9	40	36	0,27	1	5
42	5,9	25	36	0,27	41	24
43	5,9	25	36	0,27	30	22
44	5,9	25	36	0,27	20	20

7.1.3 Erweiterung des Onion-Designs um höhere EDC-Konzentrationen

Tabelle 31: Erweiterung des Onion-Designs um höhere EDC-Konzentrationen; die Enzymeinsatzkonzentration betrug $37,4 \pm 1,7$ mg/g Partikel, die eingesetzte Aktivität dieser Konzentration 3786 ± 272 U/g Partikel, bzw. 101 U/mg freies Enzym.

Nr.	Aktivierungs- temperatur [°C]	Aktivierungs- zeit [min]	EDC-Konzentration [g EDC / g Partikel]	Beladungs- ausbeute [%]	Aktivitäts- ausbeute [%]
1	10	6	0,89	97	21
2	10	66	0,89	94	19
3	10	6	1,3	97	20
4	10	26	1,3	94	20
5	10	46	1,3	94	19
6	10	66	1,3	94	19
7	30	66	1,3	93	19
8	40	6	0,89	92	19
9	40	66	0,89	18	7
10	40	6	1,3	95	21
11	40	6	1,3	91	21
12	40	46	1,3	100	28
13	40	66	1,3	22	10
14	20	6	1,3	93	19
15	20	66	1,3	81	15
16	25	36	0,68	88	21
17	25	36	0,68	89	20
18	25	36	0,68	88	20

7.1.4 Optimierung der Kopplungsbedingungen von α -Chymotrypsin

Tabelle 32: Faktoren und Antworten des zweistufigen, vollfaktoriellen DoEs zur Kopplung von α -Chymotrypsin. Die Enzymeinsatzkonzentration betrug $42 \pm 0,6$ mg/g Partikel, die eingesetzte Aktivität dieser Konzentration 4759 ± 71 U/g Partikel, bzw. 113 U/mg freies Enzym.

Nr.	pH Kopp- lung	Temperatur Kopplung [°C]	Zeit Kopp- lung [h]	Beladungsausbeute [%]	Aktivitätsausbeute [%]
1	5,3	11	1	77	20
2	7,1	11	1	87	23
3	5,3	11	4	86	21
4	7,1	11	4	82	24
5	5,3	37	1	84	19
6	7,1	37	1	88	24
7	5,3	37	4	90	19
8	7,1	37	4	90	27
9	6,2	24	2,5	77	25
10	6,2	24	2,5	89	24
11	6,2	24	2,5	84	23

7.1.5 Optimierung der Kopplungsbedingungen von Tyrosin-Tripeptids

Tabelle 33: Faktoren und Antworten des zweistufigen, vollfaktoriellen DoEs zur Kopplung des Tyrosin-Tripeptids. Die Peptideinsatzkonzentration betrug 54 ± 6 mg/g Partikel.

Nr.	pH	Zeit	Temperatur	Beladungsausbeute [%]
1	8,5	1	11	59
2	8,5	1	37	54
3	8,5	4	11	62
4	8,5	4	37	55
5	12	1	11	90
6	12	1	37	82
7	12	4	11	89
8	12	4	37	89
9	10,25	2,5	24	57
10	10,25	2,5	24	55
11	10,25	2,5	24	57

7.2 Akademischer Lebenslauf

Berufliche Praxis

- 07/2011 – 09/2014 Karlsruher Institut für Technologie
Institut für Funktionelle Grenzflächen
Doktorand
- 07/2008 – 12/2008 Novartis Pharma AG, Basel, Schweiz
Technische Forschung & Entwicklung
Praktikant

Studium

- 10/2005 – 04/2011 Karlsruher Institut für Technologie
Studium des Bioingenieurwesens
Diplom-Ingenieur
Thema der Diplomarbeit: ‚Grundlagen und Anwendung der magnetischen Extraktion von Proteinen mittels Tensiden‘
- 05/2009 – 08/2009 Universidad de Oviedo, Gijón, Spanien
Auslandsaufenthalt und Studienarbeit gefördert durch das Erasmus-Stipendium

Schulbildung

- 09/1995 – 07/2004 Gymnasium im Ellental, Bietigheim-Bissingen
Abitur

Publikationen

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

C. Morhardt, B. Ketterer, S. Heißler, M. Franzreb, ‚Direct quantification of immobilized enzymes by means of FTIR ATR spectroscopy – A process analytics tool for biotransformations applying non-porous magnetic enzyme carriers‘, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2014, 107, 55-63

C. Morhardt, M. Franzreb, ‚Optimierung der Enzymimmobilisierung auf magnetischen Partikeln durch ATR-FTIR-Analyse‘, *Chemie Ingenieur Technik*, 2012, 84 (8): 1217

J. Stolarow, B. Gerçe, C. Sylatk, I. Magario, C. Morhardt, M. Franzreb, R. Hausmann, ‚Micro-magnetic porous and non-porous biocatalyst carriers‘ in ‚Industrial Biocatalysis‘, Editor: P. Grunwald, Pan Stanford Publishing Pte., 2014

A. Paulus, C. Morhardt, N. Lehle, M. Franzreb, ‚Recovery of chymotrypsin using magnetic particles and aqueous micellar two-phase systems: Influence of non-ionic surfactants on enzyme activity‘, *Journal Molecular Catalysis B*, 2014, 110, 165-170

I. Fischer, C. Morhardt, M. Franzreb, ‚Partitioning Behavior of Silica-Coated Nanoparticles in Aqueous Micellar Two-Phase Systems: Evidence for an Adsorption-Driven Mechanism from QCM-D and ATR-FTIR Measurements‘, *Langmuir*, 2012, 28 (45): 15789–15796

Vorträge

C. Morhardt, M. Franzreb, ‚Verwendung der FTIR-ATR Spektroskopie zur quantitative Analyse eines immobilisierten Enzyms auf magnetischen Partikeln‘, GVC/DECHEMA Vortrags- und Diskussionstagung Effiziente Verfahren und Anlagen in der Bioverfahrenstechnik und Lebensmittelbiotechnologie, 06. - 08. Mai 2013, Bad Wildungen

C. Morhardt, M. Franzreb, ‚FTIR-ATR Analysis As A Fast Method To Quantify The Amount Of Covalently Bound Enzymes On Magnetic Carriers‘, ECCE & ECAB, 21.-25. April 2013, Den Haag, Niederlande

C. Morhardt, M. Franzreb, Keynote lecture: ‚Optimisation of enzyme immobilisation on magnetic particles using ATR FTIR analysis‘, ESBES & ISPPP, 23.-26. September 2012, Istanbul, Türkei

C. Morhardt, M. Franzreb, ‚Optimierung der Enzymimmobilisierung auf magnetischen Partikeln durch ATR-FTIR-Analyse‘, ProcessNet-Jahrestagung und 30. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, 10.-13. September 2012, Karlsruhe

Poster

C. Morhardt, B. Ketterer, M. Franzreb, ‚Optimization of Enzyme Immobilization onto Magnetic Particles applying DOE Approaches‘, DECHEMA Biomaterials - Made in Bioreactors, 26. – 28. Mai 2014, Radebeul

C. Morhardt, M. Franzreb, ‚Optimization of enzyme immobilization on magnetic particles using ATR FTIR analysis‘, GVC/DECHEMA Vortrags- und Diskussionstagung Biopharmazeutische Produktion, 14. – 16. Mai 2012, Freiburg

I. Fischer, C. Morhardt, M. Franzreb, ‚Einfluss der Tensidsorption an Grenzflächen auf das Verteilungsverhalten nanoskaliger Biosorbentien in wässrigen mizellaren Zweiphasensystemen‘, GVC/DECHEMA Vortrags- und Diskussionstagung Bioverfahrenstechnik an Grenzflächen, 30. Mai – 1. Juni 2011, Potsdam