

**Molekulares Biopatterning technischer Oberflächen und
neue Drucktechnologien für innovative
Biotransformationsprozesse**

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.-Biol. (t.o.) Franziska Kazenwadel
aus Ebersbach an der Fils

Referent: Prof. Dr. Matthias Franzreb

Korreferent: Prof. Dr. Christoph Syldatk

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2016

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen danken, ohne deren Unterstützung die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

An erster Stelle gilt mein Dank meinem geschätzten Betreuer Prof. Dr.-Ing. Matthias Franzreb, der mir die Durchführung dieser spannenden Aufgabenstellung ermöglicht hat, für die wertvolle fachliche Anleitung, die konstruktiven Diskussionen, die Freiheit welche ich innerhalb meines Projekts genießen durfte und das freundschaftliche und vertrauensvolle Betreuungsverhältnis.

Herrn Prof. Dr. Christoph Syldatk danke ich für die Übernahme des Korreferendariates.

Ich danke dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die Finanzierung meiner Arbeit im Rahmen des Strukturprojektes „Molecular Interaction Engineering“, Funding Code 031A095C.

Dem „Karlsruhe House of Young Scientists“ (KHYS) gilt mein Dank für die Förderung meines gastwissenschaftlichen Auslandsaufenthaltes am Massachusetts Institute of Technology (MIT) in Cambridge (MA), USA.

Der BioInterfaces International Gradschool (BIF-IGS) danke ich für die Teilnahme im Graduiertenprogramm und die zusätzlichen Betreuungs- und Weiterbildungsangebote. Herzlichen Dank hierbei an mein Thesis Advisory-Committee, bestehend aus Prof. Dr. Jonathan Sleeman, Dr. Alexander Welle und Dr. Jörg Overhage.

Besonderer Dank gilt Jonas Wohlgemuth für die Hilfe bei der Konstruktion und dem Druck meiner Reaktormodule sowie für die Bereitstellung der technischen Zeichnungen und Bilder. Besonderer Dank gilt auch Moritz Ebeler für die Hilfe am Elektronenmikroskop.

Henrike Wagner, Marie Christmann, Melanie Magang Sokamte, Sena Hande Yurddas, Yeliz Yilmas, Christian Fischer, Lukas Wenger, David Atar, Julian Prohaska und Robin Adler danke ich dafür, dass sie im Rahmen von Diplomarbeit, Praktikum und Bachelorarbeiten das Gelingen meiner Arbeit tatkräftig unterstützt haben.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Funktionelle Grenzflächen und insbesondere der Arbeitsgruppe um Prof. Franzreb, die mich während meiner Promotion stets unterstützt haben. Danke für die Hilfe, die spannenden Diskussionen, die entstandenen Freundschaften und letzten Endes den großen Spaß, den ich während meiner Zeit am Institut hatte.

Letzten Endes gilt mein Dank meiner Familie: meinen Eltern, Großeltern, meiner Schwester und Pascal, die mich durch alle Phasen der Promotion stets unterstützt und motiviert haben und immer an mich glaubten.

Zusammenfassung

Die Nutzung von Enzymen als Biokatalysatoren kann in vielen Fällen die klassische chemische Synthese ersetzen und Produktionsprozesse aufgrund milder Prozessbedingungen und erhöhter Spezifität und Effizienz nachhaltiger und wirtschaftlicher gestalten. Um eine Stabilisierung und Wiederverwendbarkeit der Katalysatoren sowie ihre simple Separation vom Produkt zu ermöglichen, kommen oft Immobilisierungsverfahren zum Einsatz. Für die Produktion komplexerer Bioprodukte werden Enzyme, die aufeinanderfolgende Reaktionen katalysieren, in Form von Kaskaden eingesetzt. Derartige Enzymkaskaden bieten den Vorteil, dass sie artifiziell aus einer Vielzahl unterschiedlicher Wirtsorganismen zusammengestellt werden können und damit eine unbegrenzte Variationsmöglichkeit bezüglich des Produktes und dessen Charakteristik bieten. Allerdings birgt der Einsatz artifiziieller Enzymkaskaden in der Produktion die Herausforderung, dass derartige Enzyme unterschiedliche Optima bezüglich der Prozessbedingungen wie Temperatur oder pH-Wert aufweisen. Daher wird eine räumliche Trennung der Katalysatoren im Immobilisierungsprozess notwendig. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Entwicklung eines modularen Reaktorsystems, dessen Untereinheiten separat pH- und Temperatur-reguliert werden können, um optimale Prozessparameter für die Immobilisierung von Enzymkaskaden einstellen zu können.

Dafür wurde zunächst als Modellenzymssystem die Kaskade zur Glucose-Detektion bestehend aus Glucose Oxidase (GOx) und Meerrettichperoxidase (HRP) gewählt und entsprechende Konzentrations- und Aktivitätsassays für Enzyme in freier und immobilisierter Form etabliert. Da der Reaktor mittels 3D-Druck gefertigt werden sollte, wurde das 3D-Druckmaterial eingehend charakterisiert und ein Immobilisierungsverfahren zur kovalenten Anbindung der Enzyme an die Oberfläche des Materials entwickelt und optimiert. Im Anschluss daran erfolgte das Design eines gedruckten Durchflussreaktors zur Immobilisierung von Enzymen. Das Herzstück des Reaktors bildet eine würfelförmige Gitterstruktur, an die die Enzyme gebunden werden. Diese wird in ein Gehäuse mit entsprechender Strömungsführung zur idealen Benetzung der Gitterstruktur eingebettet und mit Deckel und Flachdichtung verschraubt. Mehrere derartiger Module können mit Hilfe eines Schlauch- und Pumpensystems in Reihe geschaltet werden.

Um eine entsprechende Kontrolle der Prozessparameter Temperatur und pH-Wert für jedes Modul zu gewährleisten, wurde eine entsprechende Peripherie entwickelt. Das Modul zur

Temperaturregulation besteht aus einem Aluminium-Temperiermantel, welcher das jeweilige Reaktormodul eng umschließt. Die Beheizung des Temperiermantels erfolgt durch ein Peltier-Element, das durch einen Peltier-Regler gesteuert wird. Ein Kühlblock mit Lüftung ermöglicht durch den verbesserten Wärmeaustausch mit der Umgebung rasche Aufheiz- bzw. Abkühlvorgänge. Die eingehende Charakterisierung der Temperaturkontrolle der Reaktormodule erfolgte durch Messung der Temperaturen innerhalb des Temperiermantels sowie des Reaktors unter statischen und dynamischen Bedingungen.

Die pH-Regulation erfolgt mit Hilfe eines zwischengeschalteten, elektrochemischen Moduls. Dieses beinhaltet eine ungewöhnliche Kombination aus einer blanken Metallelektrode aus Titan und einer rein kapazitiv wirkenden, porösen Graphitelektrode mit hoher innerer Oberfläche. Dieser asymmetrische Aufbau bewirkt, dass bei Anlegen eines kontrollierten Stroms nur an der Metallelektrode eine Redoxreaktion und Wasserspaltung auftritt, wogegen es an der kapazitiven Graphitelektrode nur zu einer temporären Speicherung entsprechender Gegenionen, wie z.B. Na^+ oder Cl^- kommt. Je nach der gewählten Polarisierung und damit Stromrichtung kommt es an der Metallelektrode zur Bildung von OH^- bzw. H^+ -Ionen, verbunden mit einer entsprechenden pH-Anhebung bzw. Absenkung. Das Ausmaß des pH-Shifts lässt sich dabei über die gewählte Stromstärke einstellen. Aufgrund der kapazitiven Speicherwirkung der Graphitelektrode muss zur Aufrechterhaltung des Stromflusses die angelegte Zellspannung langsam erhöht werden und nach einer gewissen Zeit ist eine kritische Spannung erreicht, bei der auch an der kapazitiven Elektrode erste Redoxreaktionen auftreten. Zu diesem Zeitpunkt muss die im Durchfluss erfolgende pH-Regulierung gestoppt und die kapazitive Elektrode durch eine Umkehrung der Stromrichtung regeneriert werden. Das entwickelte pH-Regulationssystem besitzt einen sehr einfachen und kompakten Aufbau, der mit nur einer Durchflusskammer und ohne Membranen auskommt. Es eignet sich daher insbesondere für mikrofluidische Systeme oder zukünftige Systeme, bei denen die pH-Regulierung in das Enzymreaktionsmodul integriert werden soll.

In einem *proof-of-principle* wurde die gewählte Modellenzymkaskade in einem modularen, gedruckten Reaktorsystem implementiert. Dazu wurden die beiden Enzyme in separaten Reaktormodulen immobilisiert, in Reihe geschaltet und an ein FPLC-System mit integrierter UV/vis-, pH- und Temperaturdetektion angeschlossen. Anschließend wurde im Rahmen von Stop-Flow-Experimenten der Umsatz zweier Peroxidasesubstrate, Tetramethylbenzidin

(TMB) und 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) in Abhängigkeit der Dauer der Inkubationsphase nachgewiesen. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Glucose Oxidase als geschwindigkeitsbestimmender Reaktionsschritt. Mit Hilfe der Temperiereinheit wurde das Enzymtransformationsmodul, in welches die GOx immobilisiert wurde, auf verschiedene Temperaturen gebracht und der resultierende Substratumsatz in Abhängigkeit der Temperierung untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass GOx ein Temperaturoptimum im Bereich von 35° C aufweist.

Schließlich konnte im Rahmen der Arbeit die erfolgreiche Implementierung der pH-Einheit gezeigt werden. Zunächst wurde eine ursprünglich zur CDI (*capacitive deionization*) verwendete Zelle verwendet, um bei einer schwach gepufferten Lösung in Abhängigkeit der gewählten Stromstärke definierte pH-Sprünge über einen Bereich von pH 3-10 zu erzeugen. Nach diesem *proof-of-concept* wurde das Modul miniaturisiert und an die Geometrien des übrigen Reaktorsystems angepasst. Nach einer verfahrenstechnischen Charakterisierung des Flusses und der axialen Dispersion konnten auch mit dem miniaturisierten pH-Modul reproduzierbare und fein abstimmbare pH-Sprünge erzielt werden, sowohl für die schwach gepufferte Modellpufferlösung als auch für die verwendete Substratlösung.

Zusammenfassend konnte das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Reaktorsystem eingehend charakterisiert und bewertet werden, wobei es sich als wertvolle Technologie zur Implementierung und spezifischen Regelung von enzymatischen Produktionskaskaden herausstellte.

Abstract

As the use of enzymes as biocatalysts is linked to milder reaction conditions combined with high selectivity and efficiency, it can replace traditional chemical synthesis and make production processes more sustainable and economical. In order to stabilize the catalysts and make them reusable, techniques for the immobilization of enzymes are used in many cases. To produce more complex bioproducts whole cascades of enzymes that catalyze consecutive reactions can be applied. This offers the opportunity of combining enzymes from different host organisms in order to obtain artificial reaction cascades that are unlimited relating to the product and its specificity. However, the implementation of artificial enzyme cascades can be challenging because of the different requirements of the enzymes concerning process parameters like temperature and pH-value. Thus a modular reactor system should be invented, in which the modules can be separately temperature and pH controlled in order to set optimal process parameters for each enzyme of the implemented cascade.

First a model enzyme cascade was chosen. The enzymatic system for glucose detection consists of Glucose Oxidase (GOx) and Horseradish Peroxidase (HRP) and suits well for this purpose. Assays to determine the concentration and the activity of the enzymes were established and adapted for the use of free and immobilized enzymes. As the reactor should be produced by 3D-printing, the printing material was thoroughly investigated and a method for the covalent attachment of enzymes to the material was invented and optimized. A 3D-printed disposable reactor module for the immobilization of enzymes was designed. A grid-like structure with large specific surface to which the catalysts are attached forms the centerpiece of the reactor device. The structure is surrounded by a housing that ideally conducts and splits the product stream that can be screwed with a flat gasket and a lid. Several modules can be connected in series by a pumping and tubing system.

A Periphery to control the process parameters temperature and pH-value for each module was invented. The module for temperature control consists of an aluminum tempering jacket that tightly surrounds the reactor module. The tempering jacket is heated by a Peltier-element which is operated by a Peltier-controller. A cooling block and a fan enhance the fast heating of the element. The characterization of the temperature curves was obtained by

measuring the temperature within the tempering jacket and the reactor device using static and dynamic flow conditions.

The pH-regulation was achieved by an interconnected electrochemical module. It includes an extraordinary combination of a blank metal electrode made from titanium and a coated capacitive porous graphite electrode with a high specific surface. If a certain current is applied, this asymmetric approach enables the appearance of redoxreaction and hydrolysis only at the metal electrode. At the capacitive graphite electrode a temporal storage of the respective counter ions like Na^+ or Cl^- can be observed. Depending on the polarization and thus the direction of the electric current, OH^- or H^+ -Ions are generated at the metal electrode, leading to a decrease or increase in pH-value. The magnitude of the pH-shift can be influenced by the chosen current. Due to the capacitive storage capability of the graphite electrode, the applied voltage has to be increased slowly to guarantee a constant current. After a certain time period, a critical voltage is reached at which first redox reaction also occur at the capacitive electrode. At that point of time, the pH-regulation in the product stream has to be stopped and the capacitive electrode has to be regenerated by a reversion of the direction of electric current. The developed pH-regulating system is designed in a very simple and compact way by using just one flow-through-chamber and without the need of any membranes. Thus it is perfectly suited for microfluidic systems or future systems in which the pH-regulation is to be integrated in the enzyme transformation module.

In a proof-of-principle, the model enzyme cascade was implemented in a modular 3D-printed reactor system. Therefore, both enzymes were immobilized in separate enzyme transformation modules, connected in series and attached to a FPLC-System with integrated UV/vis-, pH- and temperature detection. In stop-flow-experiments, the conversion of two peroxidase substrates, Tetramethylbenzidine (TMB) and 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) could be observed as a function of the duration of the incubation phase. Subsequently the temperature dependence of the Glucose Oxidase was investigated. Using the tempering jacket, the GOx enzyme transformation module was set to certain temperatures and the resulting overall substrate conversion was measured. Thus, a temperature optimum of about 35° C could be determined for GOx.

The implementation of the pH-modulating module could be shown successfully. For first experiments a cell originally used for CDI (capacitive deionization) was implemented in order

to adjust the pH-value of a weakly buffered model solution within a range of pH 3 to 10. After this proof-of-concept, the module was miniaturized and adapted to the scale of the reactor system. Flow and axial dispersion effects were characterized and the pH-modulation efficiency could be proven for the weakly buffered model solution and for the substrate solution used in the other experiments.

To sum up, the modular reactor system that was implemented within this work could be characterized and reviewed thoroughly. Thus it could be rated as a valuable technology for the implementation and specific regulation of enzymatic production cascades.

Inhalt

1.	Einleitung	1
2.	Stand der Technik	3
2.1.	3D-Druck als Fertigungsverfahren	3
2.1.1.	3D-Drucktechnologien	3
2.1.2.	PolyJet-Verfahren	6
2.2.	Einsatz und Immobilisierung von Enzymen	10
2.2.1	Immobilisierung von Enzymkaskaden.....	13
2.3.	Verwendete Enzymkaskade	15
2.3.1.	Glucose Oxidase.....	15
2.3.2.	Meerrettichperoxidase	16
2.4.	Verfahrenstechnische Charakterisierung von Reaktionsmodulen	18
2.4.1.	Die Verweilzeitverteilung (<i>residence time distribution</i>, RTD).....	19
2.4.2.	Relaxationszeit.....	24
3.	Material und Methoden	27
3.1.	Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterial	27
3.2.	Verwendete Chemikalien.....	28
3.3.1.	3D-Druckmaterial.....	28
3.3.2.	Magnetpartikel	29
3.4.	Verwendete Enzyme.....	30
3.4.1.	Glucose Oxidase.....	30
3.4.2.	Meerrettichperoxidase	31
3.5.	Protein- und Enzymassays.....	31
3.5.1.	Bicinchoninsäure-(BCA)-Assay zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration ..	31
3.5.2.	Tetramethylbenzidin-(TMB)-Assay	31
3.6.	Enzymimmobilisierung.....	34
3.6.1.	Immobilisierung an Magnetpartikel	34
3.6.2.	Immobilisierung an 3D-Druckmaterial.....	39

3.6.3.	Bestimmung der idealen Arbeitstemperatur für Meerrettichperoxidase	41
3.7.	Charakterisierung des Enzymtransformations-Moduls	42
3.7.1.	Konstruktion der Gitterstruktur und des Gehäuses des Enzymtransformationsmoduls 42	
3.7.2.	Mikroskopieverfahren	42
3.7.3.	Messung der Verweilzeit (Step-Experiment)	42
3.7.4.	<i>Proof-of-principle</i> HRP-Umsatz	43
3.8.	Charakterisierung des Temperierelements	43
3.8.1.	Pumpenkennlinie	44
3.8.2.	Konstruktion	44
3.8.3.	Aufnahme der Temperaturverläufe	44
3.9.	Charakterisierung des pH-Kontrollmoduls	45
3.9.1.	Konstruktion	45
3.9.2.	pH-Regulierung mittels einer elektrochemischen Zelle zur Kapazitiven Deionisation (CDI) 45	
3.9.3.	Miniaturisierung des pH-Moduls	46
3.9.4.	Messung der Verweilzeit des miniaturisierten pH-Moduls	47
3.9.5.	pH-Regulierung unter Einsatz des miniaturisierten pH-Moduls	47
3.10.	<i>Proof-of-principle</i> : Einsatz von Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase im Reaktorsystem	48
3.10.1.	Umsatz von D-(+)-Glucose und Tetramethylbenzidin durch Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase in einem sequentiellen Kaskadensystem	48
3.10.2.	Umsatz von D-(+)-Glucose und 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) durch Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase implementiert im entwickelten Reaktorsystem	49
3.10.3.	Temperaturabhängigkeit der Glucose Oxidase	49
3.10.4.	pH-Abhängigkeit der Glucose Oxidase	50
4.	Ergebnisse und Diskussion	51
4.1.	Immobilisierung von Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase	51
4.1.1.	Immobilisierung an Magnetpartikel	51

4.1.2.	Immobilisierung an 3D-Druckmaterial.....	67
4.1.3.	<i>Ermittlung des Temperaturoptimums immobilisierter Meerrettichperoxidase</i>	70
4.2.	Charakterisierung des Enzymtransformationsmodells	73
4.2.1.	Beschreibung der Gitterstruktur	73
4.2.2.	Mikroskopische Untersuchungen der porös gedruckten Gitterstruktur	74
4.2.4.	Mittlere Verweilzeit und Residence Time Distribution (RTD) im Enzymtransformationsmodul.....	78
4.2.5.	<i>proof-of-principle</i> : HRP-Umsatz bei unterschiedlichen Flussraten	81
4.3.	Charakterisierung der Temperiereinheit.....	87
4.3.1.	Beschreibung.....	87
4.3.2.	Aufnahme der Temperaturverläufe.....	89
4.4.	Charakterisierung des pH-Moduls	93
4.4.1.	Beschreibung der zur pH-Einstellung genutzten Zelle.....	93
4.4.2.	pH-Einstellung.....	95
4.4.3.	Miniaturisierung und Optimierung des pH-Moduls	98
4.4.4.	Verweilzeitmessungen.....	100
4.4.5.	pH-Einstellung von 1 mM Tris 10 mM NaCl durch die miniaturisierte Zelle.....	103
4.4.6.	pH-Einstellung einer ABTS-Substratlösung durch das miniaturisierte pH-Modul....	107
4.4.7.	Vergleich mit anderen Systemen zur pH-Regulation.....	111
4.5.	<i>Proof-of-Principle</i> : Implementierung einer Modellenzymkaskade aus Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase	113
4.5.1.	Arrangement des modularen Reaktorsystems bestehend aus Enzymtransformationsmodulen, Temperierelement und pH-Modul.....	113
4.5.1.	Durchführung der Enzymkaskade mit Bestimmung des gebildeten Peroxids mittels Tetramethylbenzidin (TMB)	115
4.5.2.	Durchführung der Enzymkaskade mit Bestimmung des gebildeten Peroxids mittels 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS).....	117
4.5.3.	Temperaturabhängigkeit der Glucose Oxidase (GOx).....	118
5.	Fazit und Ausblick	121

6. Anhang	125
7. Literaturverzeichnis	129

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Links: 3D-gedruckte würfelförmige Gitterstruktur mit Stützmaterial (gelblich). Rechts: dieselbe Gitterstruktur nach Entfernung des Stützmaterials. Der Druck erfolgte mit Hilfe des 3D-Druckers Objet Eden 260 VS und dem Material VeroWhite von Stratasys. Das Stützmaterial wurde durch Einlegen in 7% Natronlauge entfernt.</i>	<i>4</i>
<i>Abbildung 2: Kettenmodell mit beweglichen Teilen gedruckt mit Hilfe des Fused Deposition Modeling Verfahrens (FDM), das von der Firma Stratasys patentgeschützt wurde. Die beweglichen Teile werden in eine umgebende Schicht an Stützmaterial gedruckt. Nach Entfernung des Stützmaterials entsteht ein bewegliches miteinander verbundenes Bauteil. Diese Abbildung wurde bezogen von der Stratasys Webpage, Stratasys Mojo Drucker, Bildergalerie.</i>	<i>6</i>
<i>Abbildung 3: Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete 3D-Drucker Objet Eden 260VS der Firma Stratasys druckt nach dem patentierten PolyJet-Verfahren. Diese Abbildung stammt von der Stratasys Webpage, Bildergalerie Objet Eden 3D-Drucker.</i>	<i>7</i>
<i>Abbildung 4: Assemblierung einer Proteinkaskade bestehend aus Candida antarctica Lipase B (CalB), Glucose Oxidase (GOx) und Meerrettichperoxidase (HRP) in einem Nanocontainer. CalB wird dabei in die Membran des Polymersoms eingebettet, GOx im Lumen des Containers eingeschlossen und HRP wird mittels Cu^{1+}-catalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition an die Oberfläche des Nanocontainers immobilisiert. Aus [52], mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.</i>	<i>14</i>
<i>Abbildung 5: Reaktionsmechanismus der Modellenzymkaskade bestehend aus Glucose Oxidase (GOx) und Meerrettichperoxidase (HRP). Glucose wird unter Verwendung von Sauerstoff aus der Umgebungsluft durch die GOx zu D-Gluconolacton und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Die HRP nutzt das entstandene Wasserstoffperoxid, um einen zugegeben Farbstoff von seiner farblosen reduzierten in seine oxidierte Form zu überführen. Die oxidierte Form ist dabei farbig und fotometrisch nachweisbar.</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 6: dimensionlose Verweilzeitverteilung (Residence Time Distribution, RTD) nach [73]. Die normierte Ausgangsalterverteilung (exit age distribution (E)) wird gegen die Zeit aufgetragen. Dadurch ergibt sich ein Kurvenintegral mit dem Wert von 1.</i>	<i>19</i>
<i>Abbildung 7: Exemplarischer Kurvenverlauf des Tracersignals eines Step-Experimentes durch die sprunghafte Aufgabe eines Tracers. Die Tracerkonzentration C_{Step} steigt von 0 kontinuierlich bis zum Erreichen der maximalen Konzentration C_{max}.</i>	<i>20</i>
<i>Abbildung 8: Zusammenhang zwischen der kumulativen Verteilungsfunktion (F-Kurve) und der dimensionslosen Verweilzeitverteilung (E-Kurve). Durch Ableitung der F-Funktion kann die E-Funktion erhalten werden. Andersherum ergibt die Integration der F-Kurve die E-Funktion.</i>	<i>22</i>
<i>Abbildung 9: Exponentieller Verlauf der Relaxation eines Systems und eingezeichnete Relaxationszeitkonstanten. Bei $t=\tau$ erfolgt eine Annäherung des Systems auf -36,8% des Gleichgewichtszustandes, bei $t=2\tau$ auf -13,5% des Gleichgewichtszustandes und bei $t=3\tau$ beträgt die Abweichung vom Gleichgewichtszustand lediglich noch 5%.</i>	<i>25</i>

<i>Abbildung 10: 3D-gedruckte Plättchen zur Charakterisierung des Bindeverhaltens von Enzymen an 3D-Druckmaterial. Es handelt sich um Zylinder-förmige Plättchen mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Höhe von 0,3 mm.</i>	29
<i>Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Aufnahme der verwendeten M-PVA C22-Partikel der Firma Perkin Elmer chemagen. Der mittlere Partikeldurchmesser der verwendeten Magnetbeads beträgt zwischen 1 und 3 μm</i>	30
<i>Abbildung 12: Reaktionsschema für die Immobilisierung eines Enzyms an einem Magnetpartikel mittels des zero-length Crosslinkers 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC). Zunächst erfolgt die Aktivierung der Carboxygruppe auf der Partikeloberfläche durch EDC. Dadurch entsteht ein aktiviertes Isoourea-Zwischenprodukt. Wird in einem zweiten Schritt das Enzym zugegeben, bilden oberflächliche Aminogruppen mit der aktivierten Carboxygruppe eine Amidbindung aus, wobei Harnstoff abgespalten wird.</i>	36
<i>Abbildung 13: Adsorptionsisothermen (21° C, Raumtemperatur) für Glucose Oxidase (GOx) und Meerrettichperoxidase (HRP) auf carboxylierte Polyvinylalkohol-Mikropartikel und nicht-lineare Regression mit Hilfe der Langmuir-Gleichung zur Bestimmung von q_{max} und K_L</i>	53
<i>Abbildung 14: A: Effekt des pH-Wertes auf die spezifische Aktivität von Glucose Oxidase-Immobilisaten. B: Bindungsausbeute während des Immobilisierungsprozesses, Kopplungsparameter: 10 mg GOx g Partikel⁻¹, 2 h Inkubation bei 25° C. C: Aktivität immobilisierter GOx. D: Aktivitätsausbeute immobilisierter GOx im Vergleich zu freiem Enzym. Aus [74], mit freundlicher Genehmigung der Royal Society of Chemistry.</i>	54
<i>Abbildung 15: A: Effekt des pH-Wertes auf die spezifische Aktivität von HRP-Immobilisaten. B: Bindungsausbeute während des Immobilisierungsprozesses. C: Aktivität immobilisierter Meerrettich Peroxidase. D: Aktivitätsausbeute immobilisierter HRP verglichen mit freiem Enzym. Kopplungsparameter: 10 mg HRP pro g Partikel, 2h Inkubation bei 25° C. Aus [74], mit freundlicher Genehmigung der Royal Society of Chemistry.</i>	56
<i>Abbildung 16: Recycling von HRP-Partikel-Komplexen im Rahmen wiederholter Biotransformationsschritte. Dabei nimmt die Aktivität der kovalent gebundenen Meerrettichperoxidase (+EDC) auch zunächst auf ca- 30% der Ausgangsaktivität ab und bleibt dann konstant, während im Fall des adsorptiv gebundenen Enzyms bereits nach einem Zyklus weniger als 5% Anfangsaktivität nachzuweisen sind. Kopplungsparameter: 10 mg HRP pro g Partikel, 2h Inkubation bei 25° C. Aus [74], mit freundlicher Genehmigung der Royal Society of Chemistry.</i>	61
<i>Abbildung 17: Spezifische Aktivität der freien HRP vor Durchführung der Immobilisierungsprozedur (dunkelrot), nach Durchführung der Immobilisierungsprozedur ohne (rot) und mit nativen Magnetpartikeln (hellrot). Es konnte gezeigt werden, dass bereits die simulierte Immobilisierungsprozedur für alle untersuchten pH-Werte außer 4,0 zu einer signifikanten Aktivitätsverminderung führt. Dieser Effekt wird durch die Zugabe nativer Magnetpartikel verstärkt. Die Aktivitäten sind auf die jeweilige Proteinkonzentration normiert, um konzentrationsbedingte Änderungen durch Adsorption an Oberflächen auszuschließen. Aus[74], mit freundlicher Genehmigung der Royal Society of Chemistry.</i>	62
<i>Abbildung 18: Beladung und gemessene Gleichgewichtskonzentrationen bei Raumtempertur (21° C) im Überstand bei Adsorption von Glucose Oxidase (GOx) und Meerrettichperoxidase (HRP) an 3D-gedruckte Plättchen nach Erreichen des stationären Zustandes.</i>	68

<i>Abbildung 19: 3D-gedruckte Probeplättchen ohne (links) und mit (rechts) immobilisierter Meerrettichperoxidase nach Entwicklung in einer ELISA-Substratlösung mit Tetramethylbenzidin (TMB).</i>	70
<i>Abbildung 20: Verlauf der spezifischen Aktivität von HRP-Partikel-Komplexen über verschiedene Temperaturen während der Durchführung des Assays. Die spezifische Aktivität nimmt mit steigender Temperatur bis auf einen Wert von ca. 35°-40° C zu, anschließend vermutlich aufgrund einer temperaturbedingten Denaturierung des Enzyms wieder ab.</i>	71
<i>Abbildung 21: Technische Zeichnung der Gitterstruktur mit Maßangaben der Kanalstrukturen aus verschiedenen Perspektiven.</i>	74
<i>Abbildung 22: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der porös gedruckten Gitterstrukturen aus verschiedenen Blickrichtungen: links ist eine Aufsicht aus z-Richtung auf die oberste gedruckte Lage zu erkennen, während rechts die seitliche Ansicht aus x-Richtung dargestellt wird, wo der jeweilige Versatz zwischen den 3D-gedruckten Schichten deutlich zu erkennen ist.</i>	75
<i>Abbildung 23: Gerenderte technische Zeichnung des Enzymtransformationsmoduls in Explosionsdarstellung. Das Gitter zur Immobilisierung der Enzyme ist in weiß dargestellt. Das Gehäuse und der Deckel zur Umfassung und Durchströmung der Gitterstruktur sind in blau gezeigt. Zu sehen sind Einström- und Ausströmkanal, sowie komplexe Strukturen zur Aufspaltung des Stromes für eine gleichmäßige Verteilung auf die Gitterstruktur. Ebenfalls zu sehen ist der Temperiermantel der Temperiereinheit zur spezifischen Temperatureinstellung des Enzymtransformationsmoduls.</i>	76
<i>Abbildung 24: Technische Zeichnung des Enzymtransformationsmoduls in verschiedenen Ebenen inklusive Bemaßung.</i>	77
<i>Abbildung 25: Mittlere Verweilzeit in Minuten eines Salztracers im Enzymtransformationsmodul in Abhängigkeit des Flusses. Es zeigt sich ein hyperbolisch abnehmender Verlauf.</i>	79
<i>Abbildung 26: dimensionslose Verweilzeitverteilungen (F-Kurven) der Tracermoleküle im Enzymtransformationsmodul (oben) und kumulative Verteilungsfunktion (E-Kurven) für verschiedene Flussraten im Rahmen eines sprunghaften Anstiegs der Tracerkonzentration im Zulauf des Reaktors.</i>	80
<i>Abbildung 27: Absorptionsverlauf bei Durchströmen des HRP-Enzymtransformationsmodul mit TMB-Substratlösung bei konstanter Flussrate für einen Zeitraum von 10 min. Es konnte gezeigt werden, dass die am Reaktorausgang gemessene Absorption bei konstanten Flussraten über längere Zeiträume konstant bleibt, wenn von der Ausfällung des Farbstoffes durch zu starke Aufkonzentrierung bei langsameren Flussraten abgesehen wird.</i>	82
<i>Abbildung 28: Gitterstruktur mit immobilisierter Meerrettichperoxidase nach dem Umsatz von TMB (links). Der ausgefallene bräunliche Farbstoff ist an die Oberfläche des 3D-Druckmaterials adsorbiert. Im Vergleich dazu rechts eine Gitterstruktur mit immobilisierter GOx ohne Verfärbungen. Die Abbildung verdeutlicht die Schwierigkeiten einer konkreten Charakterisierung des Substratumsatzes im Falle der Meerrettichperoxidase durch Substrat-bedingte Effekte</i>	83
<i>Abbildung 29: Absorption in Abhängigkeit der Flussrate, mit welcher das HRP-Enzymtransformationsmodul mit Substratlösung durchströmt wird.</i>	84

<i>Abbildung 30: Aktivität des HRP-Enzymtransformationsmoduls in Abhängigkeit der Flussrate des Substrates durch den Reaktor. Zu erkennen ist, dass langsame Flussraten zu einem geringeren TMB-Umsatz durch HRP führen, als schnelle.....</i>	<i>85</i>
<i>Abbildung 31: technische Zeichnung des Aluminiumkühlmantels, welcher das Enzymtransformationsmodul umschließt mit sowie skizzierter 3D-Ansicht. Abgeschlossen wird der Aluminiummantel durch einen in dieser Abbildung nicht gezeigten passenden Aluminiumdeckel.</i>	<i>87</i>
<i>Abbildung 32: Enzymtransformationsmodul bestehend aus Gitterstruktur (weiß) zur Enzymimmobilisierung und Gehäuse (blau) eingebettet in den Aluminium-Kühlmantel der Temperiereinheit. Ein in dieser Abbildung nicht gezeigter Aluminiumdeckel schließt die Isolation ab.</i>	<i>88</i>
<i>Abbildung 33: Temperiereinheit mit eingelegtem Enzymtransformationsmodul. Gezeigt sind der Aluminium-Kühlmantel (A), das Peltier-Element (B), der Aluminiumkühlblock (C), der PC-Lüfter (D) und der Kunststoffständer (E).....</i>	<i>89</i>
<i>Abbildung 34: Temperaturverläufe des Aluminium-Temperiermantels (schwarz) und des flüssigkeitsgefüllten Reaktorvolumens (grau) unter statischen Versuchsbedingungen, d.h. ohne Durchströmung des Reaktors. Starttemperatur war 21° C, Zieltemperatur war 30° C.</i>	<i>90</i>
<i>Abbildung 35: Oben: Aufbau der modifizierten CDI-Zelle mit asymmetrischen Elektrodenaufbau aus Metallelektrode (unten) als Gegenelektrode und einer kapazitiven Elektrode aus Aktivkohle als Arbeitselektrode. Eine Referenzelektrode erlaubt die Regelung des Potentials der Arbeitselektrode. Unten: Fotografie der geöffneten ursprünglichen CDI-Zelle. In dieser ursprünglichen Form sind noch beide Elektroden mit einer Schicht aus Aktivkohle (schwarz) bedeckt. Mit freundlicher Genehmigung von Ellen Biegert und Jonas Wohlgemuth. ..</i>	<i>94</i>
<i>Abbildung 36: Stromverlauf in Abhängigkeit von der Spannung bzw. der zeitlichen Spannungsänderung für einen symmetrischen Elektrodenaufbau mit einem Paar aus Titanelektroden (links), sowie für einen asymmetrischen Aufbau aus einer Titan- und einer kapazitiven Elektrode, welche mit einer Schicht aus aktiviertem Kohlenstoff bedeckt ist (rechts).</i>	<i>95</i>
<i>Abbildung 37: pH-Verlauf gemessen am Ablauf der modifizierten CDI-Zelle bei einem konstantem Durchfluss von 1 ml min⁻¹ und unter dem Anlegen verschiedener positiver und negativer Stromstärken zwischen -11 und 11 mA. Bei der modellhaften Pufferlösung handelte es sich um 1 mM Tris-Puffer + 10 mM NaCl, pH 7,8.</i>	<i>96</i>
<i>Abbildung 38: pH-Verlauf im Durchfluss der CDI-Zelle bei konstantem Fluss und dem Anlegen positiver und negativer Ströme von 1-11 mA. Die pH-Änderungen umfassen einen weiten Bereich von pH 4 – 10 und sind fein einstellbar. Die Änderungskapazität ist dabei in Richtung saurer pH-Werte stärker ausgeprägt (ca 5 pH-Stufen) als in Richtung basischer (2 pH-Stufen), was auf die Pufferkapazität der verwendeten Pufferkomponente zurückzuführen ist, die im leicht basischen Bereich angesiedelt ist.</i>	<i>97</i>
<i>Abbildung 39: gerenderte technische Zeichnung des pH-Kontrollmoduls. Zu sehen sind das Gehäuse (klar) bestehend aus pH-Modul und Deckel, die Arbeits- und Gegenelektrode (kupferfarben), das kapazitive Graphitmaterial (schwarz), welches auf die Arbeitselektrode aufgelegt wird und einige Lagen Filterpapiere (weiß) zur Isolation der Elektroden voneinander sowie zur Erzeugung eines stabilen Anpressdruckes.</i>	<i>99</i>
<i>Abbildung 40: Technische Zeichnung und Maße des miniaturisierten pH-Moduls. Die Ansicht ist aus verschiedenen Blickrichtungen gezeigt. Die Bemaßung ist im mm-Maßstab dargestellt.</i>	<i>100</i>

<i>Abbildung 41: mittlere Verweilzeit eines Salztracers in der miniaturisierten pH-Kontrollzelle bei unterschiedlichen Flussraten. Die Kurve nimmt einen abnehmenden hyperbolischen Verlauf an.</i>	101
<i>Abbildung 42: Kumulative Verteilungsfunktion (F-Kurve) eines Salztracers im miniaturisierten pH-Kontrollmodul in Abhängigkeit verschiedener Flussraten von 1; 0,5 und 0,25 ml min⁻¹.</i>	102
<i>Abbildung 43: Dimensionslose Verweilzeitverteilung des NaCl-Salztracers im miniaturisierten pH-Modul.</i>	102
<i>Abbildung 44: pH-Verlauf bei Durchströmen des miniaturisierten pH-Modells mit 1 mM Tris 10 mM NaCl pH 7,5 und einer Flussrate von 1 ml min⁻¹ unter Anlegen konstanter Stromstärken zwischen -4 und 4 mA in 0,5 mA-Schritten.</i>	104
<i>Abbildung 45: pH-Werte, welche durch Anlegen positiver und negativer Stromstärken beim Durchströmen der Zelle mit 1 mM Tris 10 mM NaCl pH 7,5 mit einer Flussrate von 1 ml min⁻¹ eingestellt werden können.</i>	106
<i>Abbildung 46: pH-Verlauf bei Durchströmen des miniaturisierten pH-Moduls mit 2 mM Citrat 0,27 g l⁻¹ ABTS und 5 g l⁻¹ D-Glucose unter Anlegen konstanter Stromstärken zwischen -4 und 4 mA in 0,5 mA-Schritten.</i>	107
<i>Abbildung 47 pH-Werte, welche sich durch das Anlegen konstanter Stromstärken auf die Elektroden des pH-Kontrollmoduls bei Durchströmung mit verdünnter ABTS-Substratlösung und einer Flussrate von 1 ml min⁻¹ einstellen lassen.</i>	108
<i>Abbildung 48: UV/vis-Signal (blau) und pH-Signal (rot) bei pH-Modulation durch Anlegen unterschiedlicher Stromstärken an das entwickelte pH-Kontrollmodul. Die starken Ausschläge im UV/vis-Signal weisen auf eine potentialinduzierte Redoxreaktion des Farbstoffsubstrates ABTS hin.</i>	109
<i>Abbildung 49: Extraktion der Signalverläufe von UV/vis-Signal (blau) und pH-Wert (rot) nach Durchströmung des pH-Moduls bei positiven Stromflüssen.</i>	110
<i>Abbildung 50: Schema eines Reaktorsystems zur Implementierung artifiziereller Enzymkaskaden. Die Module, in welchen die Enzymkonversionen stattfinden, sind dabei in blau dargestellt. Das orangefarbene Modul stellt eine Einheit zur spezifischen Temperierung der Enzymtransformationsmodule dar. Das Modul zur Einstellung einer pH-Änderung zwischen anderen Modulen ist rot dargestellt. Das gesamte Reaktorsystem soll mittels eines Pumpensystems durchströmt werden.</i>	114
<i>Abbildung 51: Integrierte Absorptionsspeaks nach einem Stop-Flow-Experiment mit TMB in Abhängigkeit mit der jeweiligen Inkubationsdauer bei einer Flussrate zwischen den Stop-Phasen von 0,5 ml min⁻¹ bei pH 4.0 und Raumtemperatur. Anhand des linearen Verlaufes wird eine konstante Reaktionskinetik angenommen, die Menge des entstandenen Produktes ist lediglich von der Umsatzrate der Glucose Oxidase abhängig.</i>	116
<i>Abbildung 52: Integrierte Absorptionsspeaks nach einem Stop-Flow-Experiment mit ABTS in Abhängigkeit mit der jeweiligen Inkubationsdauer.</i>	118
<i>Abbildung 53: Absorptionsverlauf von ABTS bei unterschiedlicher Temperierung des Enzymtransformationsmodul der Glucose Oxidase zwischen 15° und 35° C.</i>	119
<i>Abbildung 54: Relative Aktivität, gemessen als Absorbanz des Ablaufs, der Modellenzymkaskade aus Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase in Abhängigkeit der Temperatur, auf welche das Enzymtransformationsmodul der GOx erhitzt wurde.</i>	120

1. Einleitung

Der industrielle Einsatz von kaskadenartigen Multienzymreaktionen hält in den vergangenen Jahren vermehrt Einzug in die Produktion komplexer Bioprodukte. Der Einsatz von Enzymen gegenüber dem ganzen Zellen hat den Vorteil, dass Enzyme verschiedensten Ursprungs miteinander kombiniert werden können und somit hochentwickelte artifizielle Produktionswege generiert werden können. Um eine Vermischung von Katalysator und Produkt zu vermeiden und zudem eine Wiederverwendbarkeit der Enzyme zu gewährleisten, wird oft zu Immobilisierungsverfahren gegriffen. Im Fall von Enzymkaskaden muss zudem beachtet werden, dass sich die einzelnen Komponenten sehr oft in ihren Anforderungen an optimale Prozessparameter wie Temperatur und pH-Wert stark unterscheiden. Während bestimmte Bedingungen für ein Enzym zur optimalen Aktivität benötigt werden, können sie für ein anderes bereits inaktivierend oder gar denaturierend wirken. Daher ist oftmals die Durchführung der Kaskade in einem einzigen Reaktor nicht möglich und eine räumliche Trennung der Biokatalysatoren unumgänglich. Daher werden flexible Reaktorsysteme mit modularem Aufbau benötigt, die eine Realisierung komplexer Enzymkaskaden für Produktionsreaktionen zulassen. Um eine maximale Flexibilität bezüglich der Geometrie, sowie eine unkomplizierte Skalierung der Bestandteile zu gewährleisten, bietet sich hierfür in der Entwicklungsphase die Generierung von Bauteilkomponenten mittels moderner 3D-Druckverfahren an. Diese vereinen die Vorteile des CAD-basierten *rapid prototyping*, das heißt die rasche Realisierung komplexer Geometrien mit einem unkomplizierten und kostengünstigen Fertigungsweg, der auch eine nachträgliche Optimierung der Konstruktion folgender Prototypen auf einfache Weise zulässt. Innovationen im Bereich druckbarer Biotechnologien sollen zukünftig nicht nur den Druck komplexer Reaktionsräume, sondern auch direkt den Druck der genutzten Biokatalysatoren auf die entsprechenden Oberflächen ermöglichen. Es gibt bereits einige Anwendungen im Bereich des inkjet-Druckes von Enzymen auf flachen Unterlagen, wie z.B. Objektträgern. Im Gegensatz hierzu existieren bisher keine Berichte zum Druck von Biomolekülen im 3-dimensionalen Raum vor.

Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung eines 3D-gedruckten Reaktorsystems zur Umsetzung sequenzieller Enzymreaktionen. Dabei sollten verschiedene Aufgaben bearbeitet werden. Zunächst sollten geordnete bindungsaktive Strukturen mit hoher spezifischer

Oberfläche für die gezielte Anbindung der Enzyme untersucht und generiert werden. Anschließend sollten Verfahren entwickelt werden, um entsprechende Enzyme kovalent an die generierten Oberflächen zu koppeln. Dabei sollten Methoden generiert werden, die sich durch Einfachheit, Effizienz und Spezifität auszeichnen. Des Weiteren sollte ein Enzymtransformationsmodul entwickelt werden, welches den Transport des Substrates zum Enzymkompartiment, die Durchströmung des Kompartiments und den Abtransport des Substratstromes durch vorgegebene Strömungsführung bedingt. Zusätzlich war die Realisierung einer Temperiereinheit, welche eine Kontrolle der Temperatur innerhalb des Enzymtransformationsmoduls erlaubt, ein weiteres Ziel der Arbeit. Um eine pH-Kontrolle zu gewährleisten, sollte schließlich eine möglichst einfache pH-Regulations-Einheit, die in das System eingegliedert werden kann, auf Basis elektrochemischer Reaktionen erdacht und implementiert werden. Theoretische Überlegungen zur Implementierung einer Modellenzymkaskade bestehend aus den Enzymen Glucose Oxidase (GOx) und Meerrettichperoxidase (HRP) sowie ein *proof-of-principle* des modularen Reaktorsystems in Form deren praktischer Umsetzung sollten schließlich die Arbeit abrunden.

Die Dissertation entstand im Rahmen des HGF Verbundvorhabens „Molecular Interaction Engineering“ (MIE) im Rahmen des Strategieprozesses „Biotechnologie 2020+“ des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF), Funding Code 031A095C

2. Stand der Technik

In diesem Kapitel sind die theoretischen Grundlagen dieser Arbeit zusammengefasst. Zudem wird auf den aktuellen Stand der Forschung eingegangen. Das Kapitel umfasst die Themen 3D-Druck, Enzyme im Allgemeinen sowie deren Immobilisierung als Kaskaden.

2.1. 3D-Druck als Fertigungsverfahren

In diesem Unterkapitel werden die Grundlagen der 3D-Drucktechnologie vorgestellt, verschiedene Verfahren angesprochen und schließlich das in dieser Arbeit verwendete PolyJet-Verfahren eingehender beschrieben.

2.1.1. 3D-Drucktechnologien

3D-Druck zählt zu den Fertigungsverfahren des sogenannten „schnellen Modellbaus“, des *rapid prototyping*. Gemeint ist damit die Übersetzung von Konstruktionsdaten im Computergestützten CAD-Format (*computer-aided design*, CAD) in ein gefertigtes und direkt einsatzfähiges Musterwerkstück, einen sogenannten Prototypen. Meist handelt es sich dabei um additive Verfahren, in denen der Prototyp unter Einwirkung physikalischer und/oder chemischer Kräfte schichtweise aus formneutralem Material aufgebaut und anschließend ausgehärtet wird. Für das *rapid prototyping* exemplarische Fertigungstechniken sind neben dem 3D-Druck beispielsweise auch das selektive Lasersintern (SLS), das Laserauftragschweißen oder das *contour crafting* zur Bearbeitung von Beton. Oft wird analog auch der Begriff *direct manufacturing* (übersetzt: direkte Herstellung) verwendet. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in den meisten Fällen das Ziel des *rapid prototyping* in einsatzfertigen Bauteilen, also direkten Zielteilen liegt [1]. Das Fertigungsverfahren des 3D-Drucks hält in den letzten Jahren vermehrt Einzug in verschiedenste Sparten der Industrie und im kleineren Format sogar in den privaten Haushalt, wo innerhalb kurzer Zeit Polymerbasierte Konsumgüter wie Handyhüllen oder Espressotassen gedruckt werden können. Nach Schätzungen des US-Marktforschungsunternehmens Canalys soll der Markt um 3D-Drucker und deren Produkte bis zum Jahre 2018 jährlich um 45,7% wachsen. Während die Umsätze 2014 noch bei 2,5 Milliarden US-Dollar lagen, werden für das Jahr 2018 Umsätze von 16

Milliarden US-Dollar erwartet[2]. Damit kann zu Recht von einer wichtigen Zukunftstechnologie gesprochen werden, die im Rahmen ständiger Optimierungen für verschiedenste Bereiche unabdingbar werden wird. Derartige Optimierungen umfassen hauptsächlich die Auflösung, die Struktur der Oberfläche, die Verwendung einer großen Bandbreite an 3D-Druckmaterialien mit unterschiedlichsten physikalischen und chemischen Eigenschaften und die Möglichkeit das benötigte Stützmaterial immer schneller und einfacher zu entfernen.

Einzigartig und von großem Wert für die Fertigungstechnologie ist die Möglichkeit mittels 3D-Druck komplexe und/oder freitragende Strukturen zu generieren, die mit nicht-generativen traditionellen Fertigungsverfahren nicht hergestellt werden können. Exemplarisch hierfür sind gebogene Kanäle oder in sich bewegte Teile wie Kettenglieder oder ineinander greifende Zahnräder. Dafür kommt Stütz- oder Supportmaterial zum Einsatz. Dieses wird parallel zum eigentlichen Bauteil gedruckt und kann nach Beendigung des Druckprozesses vom Modell entfernt werden (Abbildung 1). Dadurch entsteht in vielen Fällen bereits ein bewegliches Bauteil (Abbildung 2).

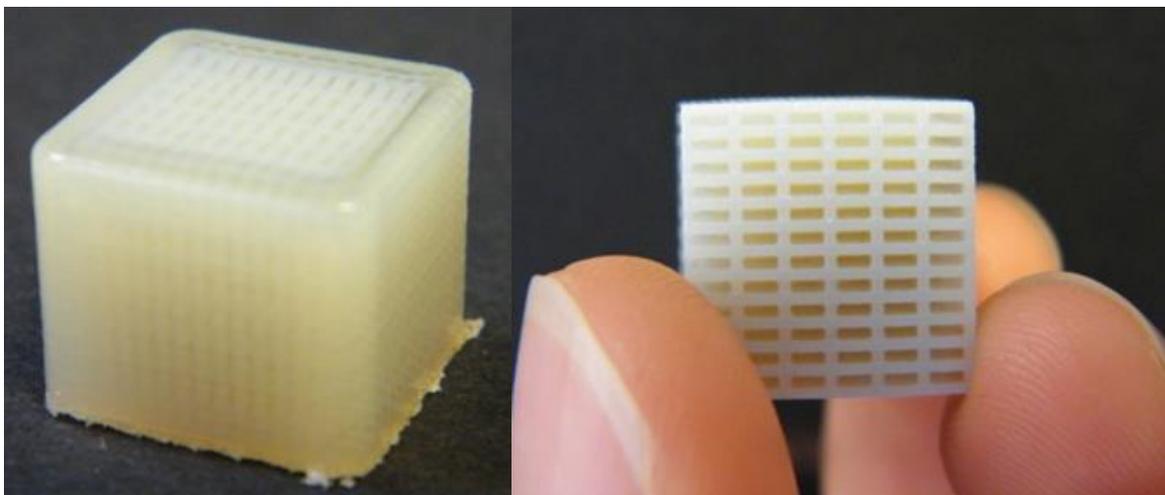


Abbildung 1: Links: 3D-gedruckte würfelförmige Gitterstruktur mit Stützmaterial (gelblich). Rechts: dieselbe Gitterstruktur nach Entfernung des Stützmaterials. Der Druck erfolgte mit Hilfe des 3D-Druckers Objet Eden 260 VS und dem Material VeroWhite von Stratasys. Das Stützmaterial wurde durch Einlegen in 7% Natronlauge entfernt.

Die aktuell überwiegend eingesetzten 3D-Druckverfahren lassen sich, neben dem im Rahmen dieser Arbeit genutzten und im nächsten Abschnitt genauer erläuterten PolyJet-Verfahren, grob in drei Gruppen von Generationsverfahren einteilen[3]:

a) das Sinter- oder Pulverdruckverfahren

Hierbei wird eine pulverförmige Materialschüttung mit definierter Korngröße entweder schichtweise mit Bindemittel verklebt und gehärtet (3D-Pulverdruck) oder durch eine Laser- oder Hitzequelle schichtweise geschmolzen oder versintert (selektives Lasersintern, selektives Laserschmelzen, selektives Hitzesintern, Elektronenstrahlschmelzen). Stützmaterial ist aufgrund der mechanischen Stabilität der Pulverschüttung nicht notwendig. Nicht-verdrucktes Material kann nach Beendigung des Druckprozesses einfach aus dem Probekörper geschüttet werden. Die Auflösung ist abhängig von der Körnergröße der Schüttung und dem Durchmesser des eingesetzten Laserstrahls.

b) das Drucken mit extrudierten Baumaterialien

Dieses Verfahren wird auch Schmelzschtichtung oder *Fused Deposition Fabrication* (FDF), bzw. *Fused Deposition Modeling* (FDM, patentgeschützt durch die Firma Stratasys) genannt. Zum Einsatz kommen in diesem Fall hauptsächlich Thermoplaste oder Duroplaste. Dabei handelt es sich um Kunststoffe, die beim Erhitzen in einem bestimmten Temperaturbereich verformbar werden und beim anschließenden Abkühlen wieder erstarren. Im Falle von Thermoplasten ist dieser Vorgang reversibel, das heißt er kann beliebig oft wiederholt werden. Im Falle von Duroplasten ist der Vorgang der hitzebedingten Verformung irreversibel. Während des Druckvorgangs wird der Kunststoff mittels einer beheizbaren Düse geschmolzen und durch einen Extruder schichtweise auf das bereits erstarrte 3D-gedruckte Material aufgebracht. Der Einsatz von Stützmaterialien für stark überhängende oder freitragende Strukturen ist dabei notwendig. Die Aufbringung des Stützmaterials erfolgt durch eine separate Düse. Eine hohe Auflösung kann durch dieses Verfahren allerdings nicht erreicht werden. Die Auflösungsgrenze sowie die Rauigkeit der entstehenden Oberfläche werden hauptsächlich durch den Durchmesser des extrudierten Materialstranges bestimmt.

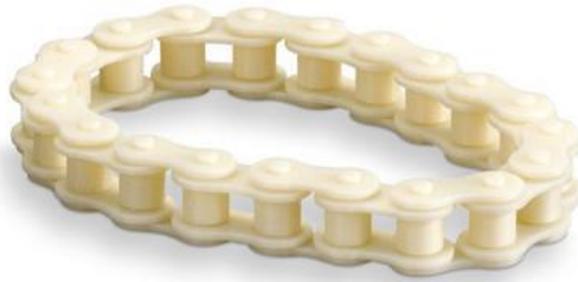


Abbildung 2: Kettenmodell mit beweglichen Teilen gedruckt mit Hilfe des *Fused Deposition Modeling* Verfahrens (FDM), das von der Firma Stratasys patentgeschützt wurde. Die beweglichen Teile werden in eine umgebende Schicht an Stützmaterial gedruckt. Nach Entfernung des Stützmaterials entsteht ein bewegliches miteinander verbundenes Bauteil. Diese Abbildung wurde bezogen von der Stratasys Webpage, Stratasys Mojo Drucker, Bildergalerie.

c) Stereolithographie

Bei den stereolithographischen Verfahren wird ein Polymer von einem Laser in dünnen Schichten ausgehärtet. Es handelt sich dabei um sogenannte Fotopolymere, die unter Laseranregung in Folge einer lichtinduzierten radikalischen Kettenreaktion ausgelöst durch einen sogenannten Fotoinitiator polymerisieren. Nach jedem Druckschritt wird das Bauteil ein Stück abgesenkt und eine neue Schicht Polymer wird mit Hilfe eines Wischers aufgetragen. Dabei können feine Strukturen in hoher Auflösung generiert werden. Schichtstärken im Rahmen der normalen Stereolithographie erreichen Schichtdicken von 0,05 – 0,25 mm, im Bereich der Mikrostereolithographie können sogar Schichtdicken von nur 1 μm realisiert werden[3]. Die erreichbare Auflösung ist dabei abhängig von Parametern wie dem Laserdurchmesser und der Schichtdicke des Materials, welche unter anderem eine Funktion dessen Viskosität ist.

2.1.2. PolyJet-Verfahren

Das PolyJet-Verfahren zählt zu den Verfahren des *Multijet-modelings* (übersetzt: des Modellierens mit Hilfe mehrerer Düsen) und wurde durch die US-Firma Stratasys entwickelt und patentiert. Das Prinzip des PolyJet-basierten 3D-Drucks basiert auf dem Prozess des InkJet- oder Tintenstrahl-Druckens. Statt Tinte auf Papier wird das fotosensitive 3D-Druckmaterial in Form kleiner Tropfen aus mehreren Düsen eines Druckkopfs auf die vorherige Schicht der Prototypen aufgetragen und parallel durch UV-Licht quervernetzt und

somit ausgehärtet. Ein weiterer Druckkopf dient dem Druck des Stützmaterials. Dieses wird für den Druck freitragender oder überhängender Strukturen benötigt und kann nach dem Druckprozess vom Modell entfernt werden. Laut Herstellerangaben liegen die Vorteile des PolyJet-Verfahrens in „Detailtreue, einer glatten Oberfläche, Geschwindigkeit und Präzision“[4]. Verschiedene Materialien stehen dem PolyJet-Verfahren zur Verfügung und können, falls mehrere Druckköpfe verwendet werden, auch innerhalb eines Modells miteinander kombiniert werden. Die Materialien variieren in ihrer Farbe, Festigkeit und Temperaturbeständigkeit. Weiche gummiartige Materialien, wie die Tango-Familie der Firma Stratasys, ermöglichen beispielsweise den Druck von Dichtungen direkt am Prototyp. Abbildung 3 zeigt den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten 3D-Drucker Objet Eden 260VS von Stratasys.



Abbildung 3: Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete 3D-Drucker Objet Eden 260VS der Firma Stratasys druckt nach dem patentierten PolyJet-Verfahren. Diese Abbildung stammt von der Stratasys Webpage, Bildergalerie Objet Eden 3D-Drucker.

2.1.3. 3D-Druck in der Biotechnologie

Seit wenigen Jahren hat sich Forschung zum Einsatz von 3D-Druck Technologien auch in den Naturwissenschaften, insbesondere in den Bereichen der Biologie sowie der Biotechnologie stark intensiviert. Der mit Abstand größte Teil der kürzlich erschienenen Publikationen befasst sich dabei mit verschiedenen Aspekten des 3D-Drucks künstlicher Körperhilfen, wie z.B. Implantate. Daneben existieren auch bereits einige Veröffentlichungen, die über die

Nutzung von 3D-Druckverfahren im Zusammenhang mit biotechnologischen Anwendungen, welche eher in den Bereich der Produktion komplexer Bioprodukte fallen, berichten. Ein prominentes Beispiel ist die Arbeit von Fee *et al.* aus dem Jahre 2014[5]. Für die Fertigung neuartiger Chromatografiesäulen mit kontrollierter Porosität wurden poröse Medien mit präzise definierten Bettmorphologien am Computer in CAD-Files übersetzt und mittels 3D-Druck gefertigt. Während der Studie wurden oktahedrale Partikel in kubischer Konfiguration in einer Säule angeordnet und Monolithen mit hexagonalen Kanälen in paralleler und fischgrätenförmiger Anordnung untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss integrierter Strömungsverteiler (radial und fraktal) evaluiert, was eine schnelle und gerichtete Untersuchung und Optimierung der Strömungsfluidik ermöglicht. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 3D-Druck sich für die Generation poröser Strukturen für biotechnologische Anwendungen eignet und ein wertvolles Werkzeug für eine schnelle und zielgerichtete Optimierung des zu untersuchenden Systems darstellt. Eine gelungene Übersicht zum Thema 3D-Druck-Anwendungen im Bereich des Bio- und Chemieingenieurwesens bietet ein Übersichtsartikel von Gross *et al.* aus dem Jahre 2014[6]. Neben einer ausführlichen Zusammenfassung der geschichtlichen Zusammenhänge des 3D-Druckes und der unterschiedlichen zur Verfügung stehenden Verfahren, wird auf aktuelle Anwendungen im Bereich der Life Science Wissenschaften eingegangen. Eine wichtige Sparte, in der 3D-Druck Anwendung findet, ist das sogenannte *biomedical engineering* oder *tissue engineering*, bei dem Druckverfahren auf die Generation von „Gewebeersatz“ angewendet werden. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf der Fertigung von Knochenersatz mit den Herausforderungen der Biokompatibilität und Bioresorbierbarkeit. Biokompatibilität bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Materialien vom Körper toleriert werden, ohne eine gefürchtete Abstoßungsreaktion zu provozieren, die im schlimmsten Fall zum Verlust des Implantates führt. Bioresorbierbarkeit bedeutet, dass die Materialien im Rahmen einer definierten Zeitdauer vom Körper abgebaut werden können. Dies ist beispielsweise beim Knochenersatz wichtig, wo das Implantat im Idealfall direkt nach Implantation stützend wird, im Laufe der Zeit aber abgebaut und durch eigenes Knochenmaterial ersetzt wird. Verschiedene Verfahren finden bei der Herstellung künstlicher Knochenstrukturen Einsatz, beispielsweise das selektive Lasersintern[7], der Inkjet-Druck[8] oder das Verbinden von pulverförmigen Stoffen mittels Lösungsmitteln zu keramischen 3D-Strukturen[9]. Auch Weichteilstrukturen können mittels 3D-Druck generiert

werden, wie beispielsweise ein künstliches bionisches Ohr[10] oder mikrovaskuläre Blutgefäßsysteme[11]. Dies ist hauptsächlich auf neuere Entwicklungen zurückzuführen, in deren Rahmen neben chemischen Polymeren auch Biopolymere, Proteine oder sogar ganze lebende Zellen gedruckt werden können.

Neben Einsätzen zu Lehr- und Übungszwecken dient 3D-Druck, wie in der hier vorliegenden Arbeit, auch der Fertigung mikro- und makrofluidischer Reaktoren oder anderer Lab-on-Chip-Anwendungen, welche zu Produktions- oder Analytizwecken durchströmt werden können. Ein sehr frühes Beispiel derartiger Anwendungen zeigt die diffusionsbasierte Rückvermischung in zylindrischen Kanälen unter einerseits turbulenten und andererseits laminaren Strömungsprofilen[11, 12]. Die Aufgabe des 3D-Druckes war in diesem Fall die Strömungsgeometrien vorzugeben. Mittels FDM-Technologie war die Cronin-Gruppe im Jahre 2013 in der Lage, mikrofluidische 3D-gedruckte Reaktoren für die flussbasierte organische Synthese zu fertigen. Eine Imin-Produktion aus Benzaldehyd und Benzylamin konnte auf diese Weise erfolgreich nachgewiesen werden[13]. Eine interessante aktuelle Anwendung aus dem Bereich der Toxizitätstests wurde von der Spencer-Gruppe veröffentlicht: Ein 3D-gedrucktes parallelisiertes Mehrkanalsystem mit integrierten Verbindungsstücken und einer eingelegten Membran, welche mit Zellen besiedelt ist, ermöglicht die Überwachung des Wirkstofftransportes durch den Reaktor sowie die Wechselwirkungen mit den Zellen bei hohem Durchsatz[14].

Der Druck von Biomaterialien dient darüber hinaus auch einer neuen Generation an Zellkultursystemen, wie letztlich in einer Studie aus dem Jahre 2015 von Srimongkon *et al.* gezeigt[15]. Die Autoren kombinierten *bioprinting* mit Papiertechnologien, indem sie mittels Tintenstrahl-Technologie Muster aus hydrophilen und hydrophoben Bereichen zu Hydrogel-Container kombinierten. Diese bestanden aus Polyvinylalkohol (PVA) und Alginat, welches mit Nährmedium versetzt war. Auch die Beimpfung mit Bakterienkulturen (*Escherichia coli*) erfolgte mittels Druck. Die Autoren sehen den Vorteil ihres Systems unter anderem darin, dass kein direktes Handling mit den Bakterien mehr erfolgen muss, was auch die kontaminationsfreie Kultivierung pathogener Mikroorganismen ermöglicht.

Auch im Bereich Biosensorik finden sich bereits Anwendungen für 3D-Druck-Verfahren. So gelang es Kadimisetty *et al.* im Jahre 2015 einen durch einen Superkondensator getriebenen Proteinimmunoarray für die Detektion dreier Krebsmarker zu generieren[16]. Die Detektion

erfolgt dabei innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne von nur 35 min. Das Gehäuse sowie die Mikrofluidik für den Assay basieren auf einem 3D-gedruckten Setup, der mittels *Fused Deposition Modeling Technology* (FDM) aus Polylaktatsäure (PLA) generiert wurde. Durch derartige Setups können zeitintensive Schritte während der Durchführung von Immunoarrays automatisiert werden. Derartige Lab-on-Chip-Anwendungen im Bereich der Diagnostik vereinen verschiedene Vorteile. Zum einen können durch einen mikrofluidischen Setup Probenmaterial und Assayreagenzien gespart werden, was die Patienten im Idealfall entlastet, wenn nur geringe Probenmengen entnommen werden müssen und die Kosten für die Durchführung des Assays mit kostspieligen Reagenzien senkt. Des Weiteren führt die Automatisierung auf Lab-on-Chip-Plattformen zu Einsparungen von Personalkosten und die Zeit bis zum Ergebnis wird in der Regel signifikant verkürzt. Die verringerte Fehleranfälligkeit durch die Ersetzung von Laborpersonal durch Automatisierung stellt einen weiteren großen Vorteil diagnostischer Lab-on-Chip-Systemen dar.

Die in diesem Abschnitt ausführlich vorgestellten und diskutierten Anwendungen zeigen, dass 3D-Druck ein wichtiges Werkzeug geworden ist, um reproduzierbare und leicht zu fertigende Werkstücke für Gewebegeneration, Zellkultur, Biosensorik und Durchflussreaktoren in der Biotechnologie zu generieren. In der Zukunft wird daher ein weiterhin steigender Einsatz von 3D-Drucktechnologien in den Bereichen biotechnologischer Produktion, Diagnostik und Sensorik sowie im Bereich des *tissue engineering*s erwartet.

2.2. Einsatz und Immobilisierung von Enzymen

Die folgenden Abschnitte wurden im Jahre 2015 im Rahmen eines Review-Artikels in der Zeitschrift *Analytical Methods* der Royal Society of Chemistry publiziert und sind daher basierend auf dem entsprechenden Fachartikel frei übersetzt[17].

Enzyme sind katalytisch aktive Biomoleküle, welche aus den 22 proteinogenen Aminosäuren aufgebaut sind. Sie kommen in allen lebenden Zellen vor und ermöglichen die große Vielfalt an ablaufenden Stoffwechselreaktionen. Enzyme werden bereits seit Menschengedenken zur Herstellung von Nahrungsmitteln und auch für medizinische Anwendungen genutzt. Der Einsatz war zu Beginn mehr experimentell und intuitiv. So wird bereits in der Bibel (Jesajah, 2. Buch der Könige) von der Heilung einer Wunde durch das Auflegen eines Feigenstreifens

berichtet. Heutzutage ist bekannt, dass der wundheilungsfördernde Effekt durch das enthaltene Enzym Ficain hervorgerufen wird[18]. Auch der Konsum fermentierter Lebensmittel kann bereits in der frühen Menschheitsgeschichte in vielen verschiedenen Bevölkerungsgruppen der Erde nachgewiesen werden. Bekannt wurden die genauen Reaktionsmechanismen der Biokatalysatoren jedoch erst sehr viel später, als Ende des 19. Jahrhunderts Nobelpreisträger Eduard Buchner nachweisen konnte, dass Enzyme auch ohne umgebende Zellen katalytisch wirken können und Leonor Michaelis und Maud Menten ihre berühmten Kinetikexperimente veröffentlichten[19]. Gezielt extrahiert und genutzt werden Enzyme seit Beginn des 20. Jahrhunderts. Vorreiter dabei war Otto Röhm, ein deutscher Chemiker. Einsatzgebiete umfassen heutzutage Nahrungsmittel-, Pharma- und Textilindustrie, die Produktion von Feinchemikalien, aber auch die Stromgeneration in Biotreibstoffzellen und diagnostische Zwecke. Der Einsatz von Enzymen bietet gegenüber der klassischen chemischen Synthese einige Vorteile[20]: Während die organische Synthese oft in umweltschädlichen und gesundheitsschädlichen organischen Lösungsmitteln durchgeführt wird, finden die meisten Enzymreaktionen in wässrigem Milieu unter milden pH- und Temperaturbedingungen statt. Daher gestaltet sich der Einsatz von Enzymen als Katalysatoren oft deutlich nachhaltiger und umweltfreundlicher. Darüber hinaus weisen Enzyme eine hohe Spezifität sowohl gegenüber ihres Substrates, als auch ihres Produktes auf, was unerwünschte Nebenreaktionen und teure Aufreinigungsschritte verhindert. Durch sogenanntes protein engineering sowohl genetisch als auch auf posttranslationaler Ebene, können Enzymeigenschaften wie Selektivität, Stabilität und physikochemische Eigenschaften heutzutage spezifisch auf die gewünschte Anwendung maßgeschneidert werden[21, 22]. Werden Enzyme jedoch in löslicher Form angewendet, müssen sie nach der Synthesereaktion vom Produkt abgetrennt werden. Dieser Prozess ist oft zeit- und kostenintensiv und die Katalysatoren verlieren dabei ihre Aktivität. Die Enzymimmobilisierung kann dieses Problem umgehen: durch Überführung in eine unlösliche Form können Enzymimmobilisate einfach von der Reaktionslösung abgetrennt werden[23]. Hierzu können Enzyme vernetzt[24], in Matrizen eingeschlossen[25, 26] oder an feste Trägerstoffe, wie Mikropartikel[27], Mikrofasern oder andere funktionalisierte Oberflächen gebunden werden. Dadurch kann in einigen Fällen die Stabilität der Enzyme erhöht werden und abhängig von der Immobilisierungsstrategie kann sogar die Spezifität beeinflusst werden[28]. Jedoch verringert sich durch die Immobilisierung in der Regel die Aktivität,

wenn die Flexibilität des Enzyms eingeschränkt wird oder die Bindestelle sich im oder nahe des aktiven Zentrums befindet. Daher ist es notwendig, für jedes Enzym ein optimales Immobilisierungsprotokoll zu entwickeln.

Der Einsatz immobilisierter Enzyme wird bereits in einigen Prozessen im großtechnischen Maßstab angewendet. Berühmtestes Beispiel ist die Herstellung von Fructose-Glucose-Sirup aus Maisstärke ($>10^7$ Tonnen pro Jahr), wobei das Enzym Glucose-Isomerase auf porösen Partikeln immobilisiert ist, welche nach dem Prozess mechanisch abgetrennt werden können[29]. Immobilisierung kann gerichtet oder ungerichtet sein. Im Fall der ungerichteten Immobilisierung werden an der Enzymoberfläche zugängliche Aminosäureseitenketten von z.B. Lysin genutzt, um das Enzym mittels chemischer Quervernetzer (Crosslinker) an einen Träger zu koppeln. Abhängig von der Anzahl entsprechender Aminosäureseitenketten auf der Enzymoberfläche ergeben sich unterschiedliche Orientierungen des Proteins. Wird hingegen eine spezifische Orientierung favorisiert, bieten sich sogenannte genetisch codierte Tags an. Deren codierende DNA-Sequenzen werden an die codierende DNA-Sequenz des Zielenzyms angehängt und im Rahmen der Transkription in Form eines Fusionsproteins gemeinsam exprimiert. Die definierte Lokalisation des Tags bedingt eine gezielte Orientierung und Immobilisierung des Proteins. Gebräuchliche Tags, ihre Bindestrukturen und exemplarische Literaturstellen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Gebräuchliche Protein-Tags zur Enzymimmobilisierung. Gelistet sind der Protein-Tag, der jeweilige Bindungspartner und ein Literaturbeispiel, welches das vorgestellte Tag-System zur Proteinimmobilisierung nutzt. Diese Tabelle wurde im Fachjournal Analytical Methods publiziert[17].

Tag Bezeichnung	Bindungspartner	Literaturbeispiel
Poly-Histidine-Tag	Übergangsmetalle (Cu(II), Co(II), Zn(II), Ni(II)) komplexiert mit Trinitriлотriessigsäure (NTA) oder Iminodiessigsäure (IDA)	[30] [31]
Poly-Arginine-Tag	Kationenaustauscher	[32]
Biotin	Avidin/ Streptavidin	[33]
Strep-Tag	Strep-Tactin	[34]
FLAG-Tag	Anti-Flag monoklonaler Antikörper	[35]
Cellulose-binding domain	Cellulose	[36] [37]
Ribosomal protein L2 ("Si-Tag")	Silica	[38]
SNAP-Tag	Benzylguanin	[39]
Halo-Tag	Halo-Tag-Ligand	[40]
Poly-Histidine-Tag	Übergangsmetalle (Cu(II), Co(II), Zn(II), Ni(II)) komplexiert mit Trinitriлотriessigsäure (NTA) oder Iminodiessigsäure (IDA)	[30] [31]

2.2.1 Immobilisierung von Enzymkaskaden

Für die Produktion komplexerer Bioproducte kann der Einsatz einer Enzymkonversion in einem Schritt nicht ausreichend sein, so dass eine Serie von aufeinanderfolgenden Enzymreaktionen benötigt wird. In diesem Fall können ganze Enzymkaskaden zu Produktionszwecken eingesetzt werden. Mit Hilfe solcher Enzymkaskaden werden bereits erfolgreich chirale Chemikalien, wie Alkohole, Amine oder Aminosäuren hergestellt[41]. Ein Vorteil im Vergleich zur Ganzzellkatalyse ist die Möglichkeit, artifizielle Produktionskaskaden aus Enzymen unterschiedlichster Herkunftsquellen zu assemblieren und damit Stoffwechselwege zu schaffen, die in dieser Form in der Natur nicht vorkommen[42]. Die Co-Immobilisierung von Enzymen, welche konsekutive Reaktionen katalysieren, birgt weitere Vorteile: eine enge räumliche Nähe der Enzyme zueinander führt zu einem Effekt namens *substrate channeling*. Dabei wird das Produkt eines Enzyms direkt zu einem co-immobilisierten Nachbarn weitergeschleust, wo es erneut als Substrat dient[43, 44]. Derartig kurze Diffusionsstrecken erhöhen erheblich die Reaktionsgeschwindigkeit und führen zu einem höheren Gesamtumsatz der immobilisierten Kaskade, verglichen mit den Bestandteilen in ihrer löslichen Form[45]. Räumliche Co-Immobilisierung ist daher ein häufig genutztes Verfahren, um Enzyme mit vergleichbaren Ansprüchen an Prozessparameter, wie Temperatur und pH-Wert zu kombinieren und die Vorteile einer Einschritt-Reaktion zu nutzen. Verschiedene Verfahren werden genutzt, um derartige Enzyme auf Trägern zu fixieren: generell wird zwischen einer zufälligen Enzymverteilung und einer geordneten Immobilisierung unterschieden. Die zufällige Enzym-co-immobilisierung mit statistischer Verteilung wird hauptsächlich dadurch erzielt, dass die Mitglieder der Zielkaskade aus einer Mischung chemisch an feste Trägermaterialien vernetzt oder in Polymerfilme eingeschlossen werden. Deng et al. zeigten beispielsweise 2012 einen eleganten Ansatz zur Co-Immobilisierung von Proteinen auf einer bi-funktionellen Oberfläche. Dabei wurde ein Copolymer mit Alkyn- und Pentafluorophenylgruppen durch chemische Gasphasenabscheidung (*chemical vapor deposition*, CVD) auf eine Oberfläche aufgebracht und die Biomoleküle durch orthogonale „Klick“-Chemie-Reaktionen an die entsprechenden funktionellen Gruppen gebunden[46]. Eine Co-Immobilisierung in Form einer Verkapselung wurde beispielsweise 2007 von Zu et al. beschrieben. Dabei wurde das Enzymsystem zur Zuckerdetektion, bestehend aus Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase, zu Sensorzwecken in einen elektropolymerisierten Pyrrolfilm eingeschlossen, welcher dann auf

einer mit Carbon Nanotubes beschichteten Elektrode abgeschieden wurde. Dabei konnte durch Bestimmung der amperometrischen Antwort der Bioelektrode ein elektrisches Signal proportional zur eingesetzten Glucosekonzentration gemessen werden[47]. Auch eine Co-Immobilisierung durch Quervernetzung zu sogenannten kombinierten vernetzten Enzymaggregaten (*combined crosslinked enzyme aggregates*, combi-CLEAs) ist möglich[47-49]. Im Gegensatz zu den statistisch zufällig verteilten Immobilisierungsmustern stehen Ansätze, in denen Enzyme gezielt anhand spezifischer Träger zu Mustern organisiert werden. Derartige Methoden sind komplizierter in der Durchführung und erfordern oft hochentwickelte Geräte oder zusätzliche Modifikationsschritte. Eine Organisation von Enzymkaskaden in definierten Mustern konnte bereits erreicht werden durch die Bindung an Proteinträger[45], an DNA-Trägermoleküle[50, 51] oder Assemblage in Nanocontainer[52] (siehe Abbildung 4). Eine weitere Methode zur Implementierung von Enzymkaskaden besteht in der Kompartimentierung in mikrofluidischen Reaktorsystemen. Derartige Systeme finden in erster Linie Einsatz sensorischen Anwendungen, der Analytik und der Produktion im kleinen Maßstab[53].

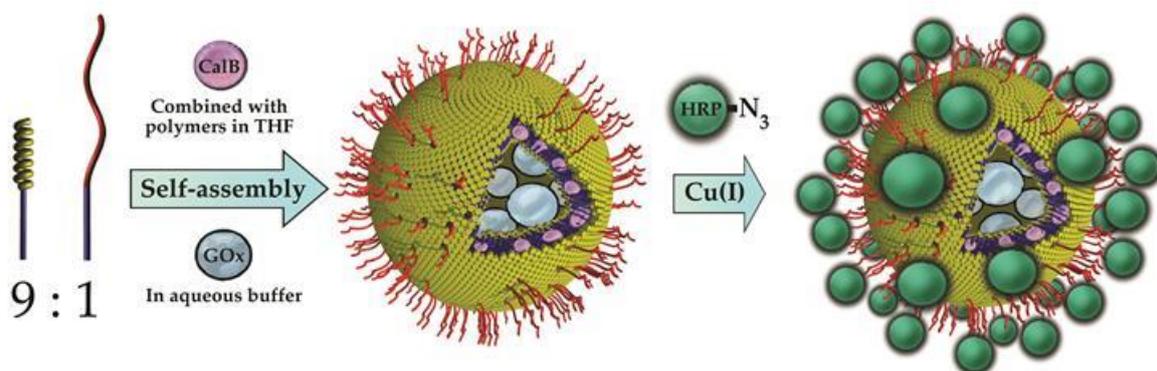


Abbildung 4: Assemblierung einer Proteinkaskade bestehend aus *Candida antarctica* Lipase B (CalB), Glucose Oxidase (GOx) und Meerrettichperoxidase (HRP) in einem Nanocontainer. CalB wird dabei in die Membran des Polymersoms eingebettet, GOx im Lumen des Containers eingeschlossen und HRP wird mittels Cu¹⁺-catalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition an die Oberfläche des Nanocontainers immobilisiert. Aus [52], mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.

Werden allerdings Enzyme von unterschiedlichen Wirtsorganismen genutzt, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass diese sich in ihren Ansprüchen an Prozessparameter deutlich unterscheiden. Dies kann dazu führen, dass Bedingungen, welche für ein Enzym dem

Optimum entsprechen, für ein anderes inhibierend oder gar denaturierend wirken können. In diesem Fall sind eine räumliche Trennung der Biokatalysatoren durch Kompartimentierung und eine spezifische Regelung der Prozessparameter nach jedem Reaktionsschritt notwendig.

Der Einsatz von Enzymkaskaden ist in verschiedenen Bereichen der Biotechnologie vonnöten. Beispiele sind neben der Produktion von komplexen Biomolekülen, beispielsweise im Rahmen sequenzieller Glykosylierungsreaktionen, vor allem die Diagnostik (s. Abschnitt zur Modellenzymkaskade) und die Produktion von Elektrizität durch Biotreibstoffzellen. Die Enzyme, welche für derartige Zwecke genutzt werden, zählen in der Regel zur Familie der Oxidoreduktasen. Die Thematik wurde sehr gut zusammengefasst durch Minter *et al.* im Jahre 2007[54]. Dabei wurden vor allem die Vor- und Nachteile enzymatischer Treibstoffzellen im direkten Vergleich mit mikrobiellen Treibstoffzellen diskutiert. Vorteile sind die hohen Energiedichten, die durch eine Immobilisierung der Biokatalysatoren erreicht werden können und ihre hohe Spezifität. Nachteilig sind hingegen die kurze Lebensdauer von 7-10 Tagen[54] und die nur teilweise Oxidation der Substrate im Biotreibstoff.

2.3. Verwendete Enzymkaskade

Im nachfolgenden Kapitel werden die Eigenschaften und Anwendungen der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase beschrieben. Dabei soll auf wichtige chemische und physikalische Parameter eingegangen sowie die katalysierten Reaktionen hervorgehoben werden und der kommerzielle Einsatz findet nähere Betrachtung.

2.3.1. Glucose Oxidase

Die Glucose 1-oxidase (GOx, EC 1.1.3.4.) katalysiert unter Sauerstoffverbrauch die Oxidation von β -D-Glucose zu D-Glucono- δ -lacton bei gleichzeitiger Produktion von Wasserstoffperoxid. Sie kann aus verschiedenen Quellen isoliert werden, als Hauptproduzent dient jedoch der schwarze Gießkannenschimmel (*Aspergillus niger*)[55].

Eine kommerzielle Nutzung des Enzyms erfolgt in verschiedenen Bereichen der Textilindustrie[56], der Lebensmitteltechnik[57] sowie im Bereich der Sensorik zur Detektion von Glucose in beispielsweise Körperflüssigkeiten[58, 59]. Die GOx zählt zu den Flavoproteinen, das heißt sie nutzt Flavinadenindinukleotid (FAD) zum Elektronentransfer. Das Molekulargewicht liegt bei 152 kDa, bei einem durch Glykosylierungen erzeugten Kohlenhydratanteil von 16%[60].

Zur Messung der Aktivität der Glucose Oxidase wurden in der Literatur zahlreiche Methoden beschrieben, u. a. die titrimetrische Bestimmung[61], der Einsatz von Redoxindikatoren[62] oder IR-Spektroskopie[63]. Eine weitere Methode ist die Kopplung der Glucose Oxidase mit der Meerrettichperoxidase für eine sekundäre Reaktion. Das von der Glucose Oxidase produzierte Wasserstoffperoxid wird dabei von der Meerrettichperoxidase als Oxidationsmittel genutzt, um einen zugegebenen Farbstoff von seiner farblosen in seine radikalische farbige Form zu oxidieren. Der Farbumschlag kann spektrometrisch verfolgt werden und ist äquivalent zur Aktivität der Glucose Oxidase.

2.3.2. Meerrettichperoxidase

Die Meerrettichperoxidase (engl. *Horseradish Peroxidase*, HRP, EC 1.11.1.7) stammt aus der Wurzel der Meerrettichpflanze (*Armoracia rusticana* P.Gaertn., B.Mey. & Scherb.), welche in den gemäßigten Zonen der Welt angebaut und als Gemüse, Heilpflanze oder Gewürz genutzt wird. Das Auftreten verschiedener Isoformen kann beobachtet werden, wobei die Isoform C (HRPC) die Häufigste ist. Ihren breitgefächerten kommerziellen Einsatz in Medizin und Industrie fand die Meerrettichperoxidase, nachdem sie erstmals erfolgreich in größeren Mengen rekombinant in *E. coli* exprimiert werden konnte[64]. Daraufhin gelang auch die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Enzyms[65]. Im lebenden Organismus erfüllt die Meerrettichperoxidase Funktionen in unterschiedlichen Stoffwechselfvorgängen, wie beispielsweise im Indol-3-essigsäure-Metabolismus, bei der Lignifizierung, bei der Vernetzung der Zellwandpolymere, bei der Suberinproduktion sowie bei der Resistenz gegen Infektionen[66].

Die HRP ist ein Glycoprotein aus 308 Aminosäuren[67]. Durch Glykosylierung gebundene Kohlenhydratkette machen 18 – 20% der Gesamtmasse aus. Die Tertiärstruktur, welche

hauptsächlich aus α -Helices und wenigen β -Faltblattstrukturen besteht, wird durch 4 interne Disulfidbrücken fixiert. Zum Holoenzym gehören darüber hinaus eine Häm-Gruppe, bestehend aus Protoporphyrin IX und einem Eisen(III)-Ion sowie 2 Calcium-Ionen, welche für die funktionelle Integrität des Enzyms essentiell sind[66].

Die primär katalysierte Reaktion der Meerrettichperoxidase ist die Reduktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser (H_2O), wobei ein reduzierendes Substrat (SH_2) durch Oxidation in seine radikalische Form ($\text{SH}\bullet$) überführt wird.



Oft handelt es sich bei dem reduzierenden Substrat um einen Farbstoff, welcher von der Peroxidase von der farblosen in eine farbige Form überführt wird, was eine spektrometrische Detektion ermöglicht. Dadurch findet das Enzym Einsatz in der medizinischen Diagnostik, beispielsweise durch Kopplung an spezifische Antikörper in Immunoassays[68]. Auch im Bereich der Abwasserbehandlung, bei der organischen Synthese, der Biosensorik und in anderen Biotransformationsprozessen wird die Meerrettichperoxidase angewendet[69].

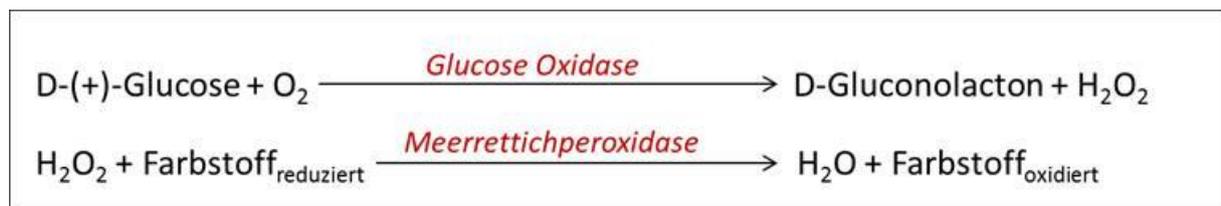


Abbildung 5: Reaktionsmechanismus der Modellenzymkaskade bestehend aus Glucose Oxidase (GOx) und Meerrettichperoxidase (HRP). Glucose wird unter Verwendung von Sauerstoff aus der Umgebungsluft durch die GOx zu D-Gluconolacton und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Die HRP nutzt das entstandene Wasserstoffperoxid, um einen zugegeben Farbstoff von seiner farblosen reduzierten in seine oxidierte Form zu überführen. Die oxidierte Form ist dabei farbige und fotometrisch nachweisbar.

Abbildung 5 zeigt die im Rahmen dieser Arbeit genutzte Modellenzymkaskade in ihrer Gesamtreaktion. D-Glucose wird zunächst unter Zuhilfenahme von Luftsauerstoff durch die Glucose Oxidase (GOx) zu D-Gluconolacton und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgesetzt. Das entstandene Wasserstoffperoxid wird von der nachgeschalteten Meerrettichperoxidase genutzt, um einen Farbstoff von seiner farblosen reduzierten Form in die farbige oxidierte

Form zu überführen. Dieser kann anschließend spektrometrisch detektiert werden und gibt Aufschluss über die entstandene Produktmenge als Maß für die Enzymaktivität.

Die Kombination von Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase ist ein Beispiel für eine analytische Enzymkaskade zur Detektion von D-Glucose. Ein prominentes Nutzungsbeispiel findet sich dabei in der Bestimmung des Blutzuckerspiegels. Bereits im Jahre 1946 wurde von Carr *et al.* eine Anwendung zur Bestimmung des Blutzuckerlevels in Patienten mit Diabetes publiziert[70]. Einen hervorragenden Überblick über die Geschichte der Nutzung der Enzymkaskade zur Zuckerdetektion, inklusive technischer Verbesserungen, standardisierter Analysemethoden und Performancetests liefert der Review-Artikel von You und Lee aus dem Jahre 2010[59]. Hierbei werden die verschiedenen Systeme und Einsatzmöglichkeiten wie *Point-of-Care* oder kontinuierliche Messmethoden beleuchtet und Neuerungen wie beispielsweise nicht-invasive Messmethoden vorgestellt.

Das Detektionsspektrum der Kaskade kann auf andere Zuckertypen erweitert werden, indem andere Enzyme zu der Kaskadenreaktion hinzugefügt werden. Beispielsweise erweiterten van Dongen *et al.* im Jahre 2000 das System durch die Vorausschaltung der *Candida antarctica* Lipase C (CalB), wodurch ein mit einer Acetat-Schutzgruppe versehenes Glucosederivat nachgewiesen werden kann[52]. Fornera *et al.* und Böhm *et al.* erweiterten das System durch die β -Galaktosidase und ermöglichten somit die Detektion von Laktose[71, 72].

2.4. Verfahrenstechnische Charakterisierung von Reaktionsmodulen

Bei der Entwicklung mehrstufiger Reaktorsysteme ist eine genaue verfahrenstechnische Charakterisierung der eingesetzten Module von hoher Bedeutung für die Optimierung des Reaktionsablaufs, aber auch für die Vergleichbarkeit mit anderen Systemen und Produktionsverfahren. Im Rahmen dieser Arbeit spielen vor allem die mittlere Verweilzeit im jeweiligen Reaktormodul und die Relaxationszeit im Temperierelement eine herausragende Rolle. Daher soll im folgenden Kapitel auf diese Kenngrößen näher eingegangen werden.

2.4.1. Die Verweilzeitverteilung (*residence time distribution, RTD*)

Die folgende theoretische Abhandlung zur Verweilzeitverteilung basiert auf dem Buch über *Chemical Reaction Engineering* von Octave Levenspiel[73].

Die Verweilzeitverteilung (*residence time distribution, RTD*) ist eine Wahrscheinlichkeitsverteilungsfunktion, die die Zeitdauer des Verbleibs eines Flüssigkeitselements im Inneren eines Reaktors beschreibt. Die Beschreibung der RTD geht zurück auf MacMullin und Weber im Jahre 1935. Es wird davon ausgegangen, dass Flüssigkeitsteilchen verschiedene Routen durch das Reaktorinnere nehmen und damit unterschiedlich lange Verweilzeiten aufweisen. Im RTD-Diagramm wird die sogenannte Ausgangsaltersverteilung (*exit age distribution*) E [Zeit⁻¹] gegen die Zeit aufgetragen, wodurch sich ein Kurvenintegral von 1 ergibt (Abbildung 6). Diese entdimensionierte Funktion wird auch die dimensionslose Verweilzeitverteilung oder kurz E-Kurve genannt.

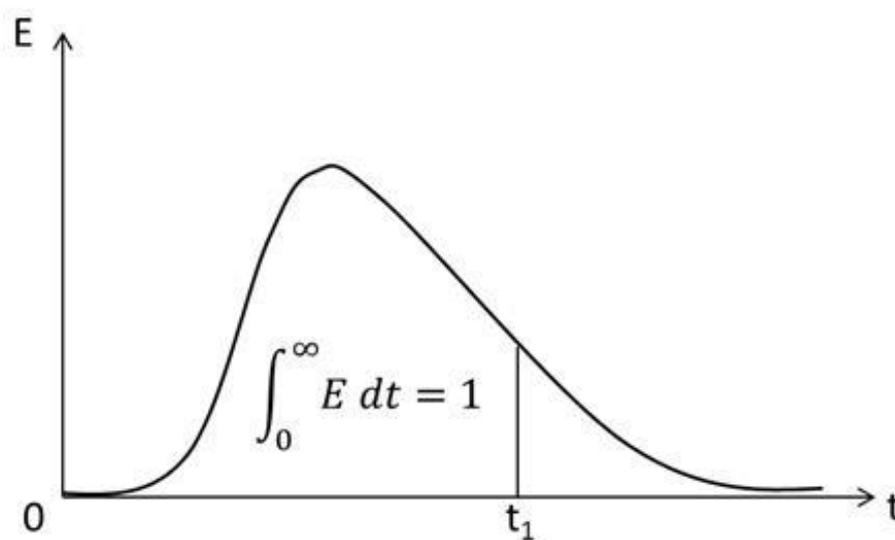


Abbildung 6: dimensionlose Verweilzeitverteilung (Residence Time Distribution, RTD) nach [73]. Die normierte Ausgangsalterverteilung (exit age distribution (E)) wird gegen die Zeit aufgetragen. Dadurch ergibt sich ein Kurvenintegral mit dem Wert von 1.

Die hier verwendete experimentelle Methode, um die RTD-Kurve zu bestimmen, ist die stufenartige Aufgabe eines physikalischen/nicht-reaktiven Tracers am Reaktoreingang und dessen Detektion am Reaktorausgang (genannt Step-Experiment). Praktisch wird dabei mittels eines Ventils von dem durchströmenden Medium auf das Tracermedium umgeschaltet. Dabei wird von einem Reaktor mit dem Volumen V [m³] ausgegangen, der mit

einem Substratfluss von v [$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$] durchströmt wird. Zu einem definierten Zeitpunkt $t=0$ wird von der Durchströmung mit Basisfluid (meist Wasser) auf die konstante Durchströmung mit einer Tracerlösung der Konzentration C_{max} [$\frac{\text{kg oder mol}}{\text{m}^3}$] umgeschaltet und der Konzentrationsverlauf C_{Step} des Tracers am Reaktorausgang gegen die Zeit t detektiert (Abbildung 7).

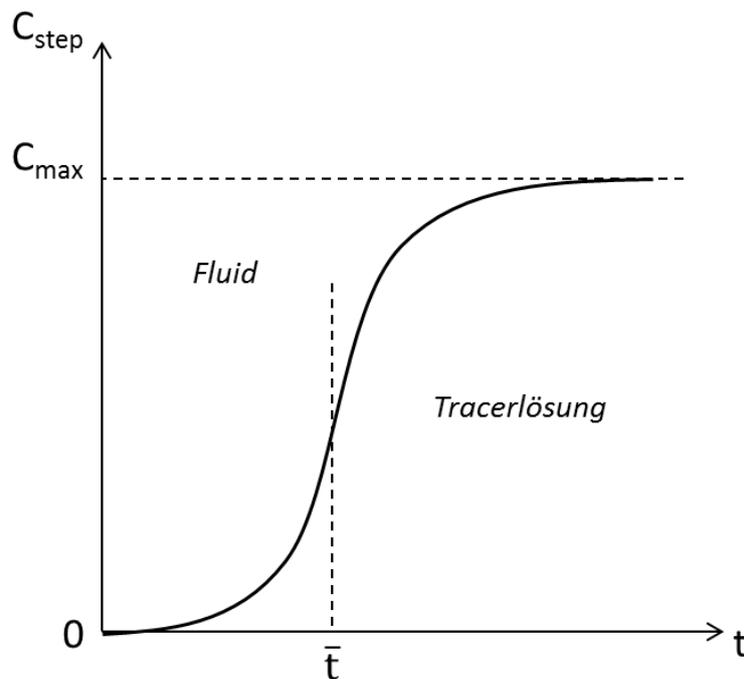


Abbildung 7: Exemplarischer Kurvenverlauf des Tracersignals eines Step-Experimentes durch die sprunghafte Aufgabe eines Tracers. Die Tracerkonzentration C_{Step} steigt von 0 kontinuierlich bis zum Erreichen der maximalen Konzentration C_{max} .

Eine Massenbilanzierung korreliert die gemessenen Werte des Konzentrationsverlaufes des Tracers am Reaktorausgang:

$$(1) \quad C_{\text{max}} = \frac{\dot{m}}{v}$$

$$(2) \quad C_{\text{max}} \bar{t} = \frac{\dot{m}V}{v^2}$$

C_{max}	maximale Tracerkonzentration am Reaktorausgang [kg m^{-3}]
\dot{m}	Flussrate des Tracers [kg s^{-1}]
v	Flussrate des Fluides [$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$]
\bar{t}	mittlere Verweilzeit [s]

Die mittlere Verweilzeit \bar{t} errechnet sich dann durch folgende Formel:

$$(3) \quad \bar{t} = \frac{\int_0^{C_{max}} t \, dC_{Step}}{\int_0^{C_{max}} dC_{Step}} = \frac{1}{C_{max}} \int_0^{C_{max}} t \, dC_{Step}$$

\bar{t}	mittlere Verweilzeit [s]
C_{max}	maximale Tracerkonzentration am Reaktorausgang [kg m^{-3}]
C_{Step}	Tracerkonzentration am Reaktorausgang [kg m^{-3}]

Die dimensionslose Form der C_{Step} -Kurve wird kumulative Verteilungsfunktion oder F-Kurve genannt. Sie ergibt sich durch die Transformation der y-Achse mit Hilfe von

$$(4) \quad F = \frac{v}{\dot{m}} C_{Step}$$

\dot{m}	Flussrate des Tracers [kg s^{-1}]
v	Flussrate des Fluides [$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$]

Unter der Annahme eines gleichförmigen laminaren Flusses ergibt sich daraufhin, wie in Abbildung 8 grafisch veranschaulicht

$$(5) \quad \frac{dF}{dt} = E$$

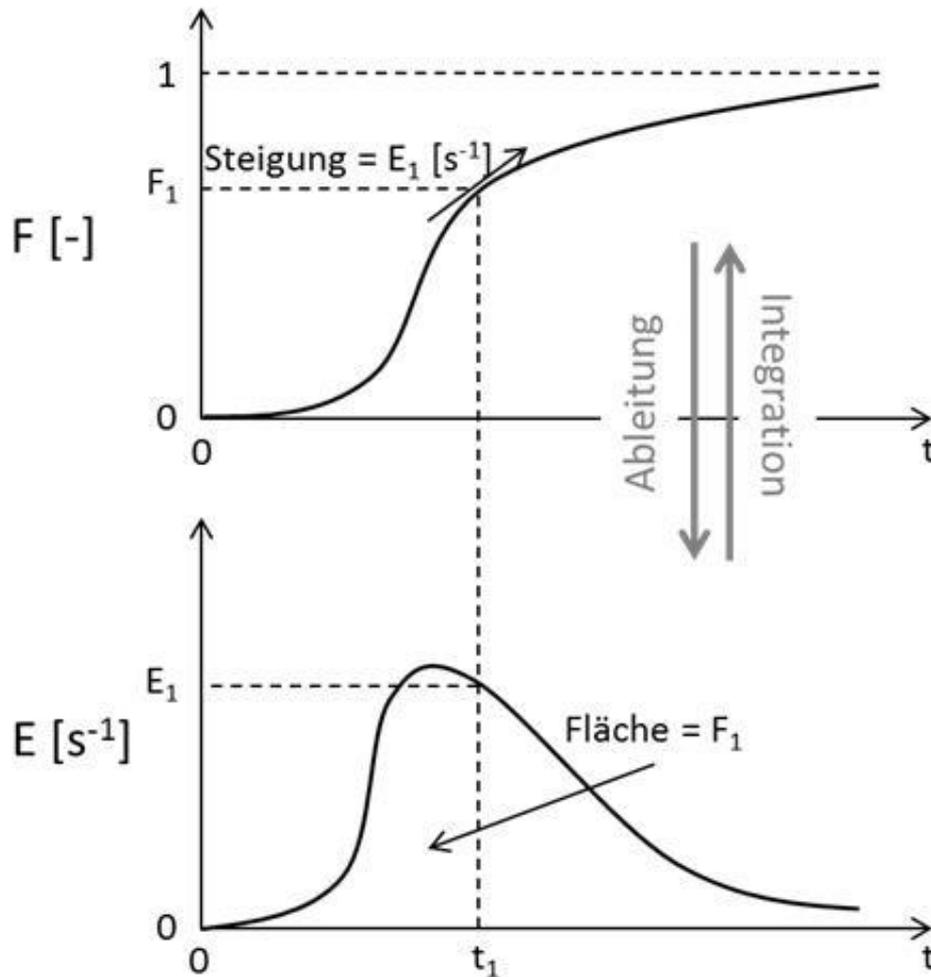


Abbildung 8: Zusammenhang zwischen der kumulativen Verteilungsfunktion (F-Kurve) und der dimensionslosen Verweilzeitverteilung (E-Kurve). Durch Ableitung der F-Funktion kann die E-Funktion erhalten werden. Andersherum ergibt die Integration der F-Kurve die E-Funktion.

Das Volumen des Reaktors kann mit Hilfe der Verweilzeit anhand folgender Formel abgeschätzt werden:

$$(6) \quad \bar{t} = \frac{V}{v}$$

\bar{t}	mittlere Verweilzeit [s]
V	Volumen des Reaktors [m^3]
v	Flussrate des Fluides [$m^3 s^{-1}$]

Ausgehend von der Kurvenform der E- und F-Funktionen kann die Strömungsform im Reaktor abgeschätzt werden. Diese befindet sich abhängig von der Reaktorgeometrie und der Flussrate zwischen idealer Strömung (*Plug Flow*) und gemischter Strömung (*Mixed Flow*).

Im Bereich kleiner Abweichungen von der idealen Strömung kommt zur Beschreibung und weiteren Charakterisierung das *Tanks-in-Series*-Modell oder das Dispersionsmodell zum Einsatz. Im Folgenden wird das Dispersionsmodell näher beschrieben.

Angenommen wird dabei, dass sich der Tracer, welcher in den Reaktor injiziert wird, durch den Plug-Flow überlagernde Diffusionsvorgänge, verteilt. Dieser Prozess wird (longitudinale) Dispersion genannt und durch den Dispersionskoeffizienten D_{ax} [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$] charakterisiert. Dies bedeutet eine schnelle Verteilung der Tracermoleküle für große D_{ax} , eine langsame Verteilung für kleine D_{ax} und keine Verteilung bzw. Plug-Flow für $D_{ax} = 0$.

D_{ax} wird durch Berechnung der Verweilzeit \bar{t} und der Varianz σ^2 beurteilt. Wird eine ideale Strömung betrachtet, die zu einem kleinen Teil von Rückvermischungsvorgängen überlagert ist und in deren Verlauf keine unbewegten Totzonen oder nennenswerte Umgehungen des Reaktors vorliegen, kann vom Dispersionsmodell oder *dispersed plug flow*-Modell ausgegangen werden. Der Mischprozess beinhaltet eine sich ständig wiederholende Materialverteilung durch Reibung und Verwirbelungen und kann daher als statistisch, ähnlich der molekularen Diffusion, betrachtet werden. Analog zum Fick'schen Gesetz zur molekularen Diffusion wird die Vermischung des Fluides in Strömungsrichtung mit Hilfe des longitudinalen oder axialen Dispersionskoeffizienten D_{ax} definiert als:

$$(7) \quad \frac{\partial C}{\partial t} = D_{ax} \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

D_{ax} charakterisiert demnach den Grad an Rückvermischung während des Flusses. Die grundlegende Differenzialgleichung in ihrer entdimensionierten Form, welche das Dispersionsmodell berücksichtigt, ergibt sich aus:

$$(8) \quad \frac{\partial C}{\partial \theta} = \left(\frac{D_{ax}}{uL} \right) \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - \frac{\partial C}{\partial z}$$

C	Konzentration des Tracers [mol l^{-1} oder kg l^{-1}]
D_{ax}	Dispersionskoeffizient [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]
u	Fließgeschwindigkeit [m s^{-1}]
L	charakteristische Länge des Reaktionsgefäßes [m]

$\frac{D_{ax}}{uL}$ ist dabei eine dimensionslose Kennzahl, genannt die Dispersionszahl (engl. *vessel dispersion number*) die das Ausmaß der axialen Dispersion angibt.

Ein weiteres Mittel zur Charakterisierung der Rückvermischung innerhalb eines Systems ist die Bodensteinzahl (Bo). Sie beschreibt das Verhältnis von konvektiv zugeführten Molen zu den durch Diffusion zugeführten Molen.

$$(9) \quad Bo = \frac{uL}{D_{ax}}$$

Bo	Bodenstein-Zahl [-]
u	Fließgeschwindigkeit [m s^{-1}]
D_{ax}	axialer Dispersionskoeffizient [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]

Je kleiner $\frac{D_{ax}}{uL}$, desto mehr nähert sich der Fluss an eine ideale Strömung an, je größer, desto mehr erfolgt eine Annäherung an eine Mischströmung. $\frac{D_{ax}}{uL}$ und die Varianz σ^2 können grafisch mit Hilfe eines Wahrscheinlichkeitsnetzes aus der kumulativen Verteilungsfunktion (F-Kurve) bestimmt werden. $\frac{D_{ax}}{uL}$ liegt bei kleinen Abweichungen vom Plug Flow bei Werten $< 0,01$, bei stärkerer Dispersion $> 0,01$. Aus der *vessel dispersion number* kann letztendlich der Dispersionskoeffizient D_{ax} errechnet werden.

2.4.2. Relaxationszeit

Unter dem Begriff „Relaxion“ wird der Übergang eines Systems durch sogenannte Relaxationsprozesse in seinen Grundzustand genannt. Im Falle von Störungen des Systems von außen wird statt des Grundzustands ein Gleichgewichtszustand oder stationärer Zustand angestrebt. Eine wichtige Rolle zur Charakterisierung des Relaxationsprozesses spielt die Relaxationszeit oder genauer die Relaxationszeitkonstante. Sie definiert die charakteristische Zeitspanne, in welcher sich ein System meist im exponentiellen Verlauf auf den e-ten Teil des Gleichgewichtszustandes annähert. Dadurch kann angenommen werden, dass der Gleichgewichtszustand im Zeitverlauf von ca. 3-6 Relaxationszeiten erreicht werden kann.

Mathematisch wird die Relaxationszeit wie folgt beschrieben: Angenommen, ein System zeigt einen exponentiellen Relaxationsverlauf, in dessen Rahmen im Laufe der Zeit t von einem Grundzustand f_0 in einen Gleichgewichtszustand f_{\max} übergegangen wird. So gilt:

$$(10) \quad f(t) = f_{max} + (f_0 - f_{max})e^{-\frac{t}{\tau}}$$

f_0	Grundzustand
f_{max}	Gleichgewichtszustand
τ	Relaxationskonstante
t	Zeit [min]

Dabei stellt τ die Relaxationszeitkonstante dar. Dies bedeutet anschaulich, dass nach $t=\tau$ eine Annäherung des Systems auf -36,8% ($=1/e$), nach $t=2\tau$ auf -13,5% und nach $t=3\tau$ auf -5% des Gleichgewichtszustands erreicht wird. Nach 3τ ist der Relaxationsprozess somit zu 95% abgeschlossen (Abbildung 9).

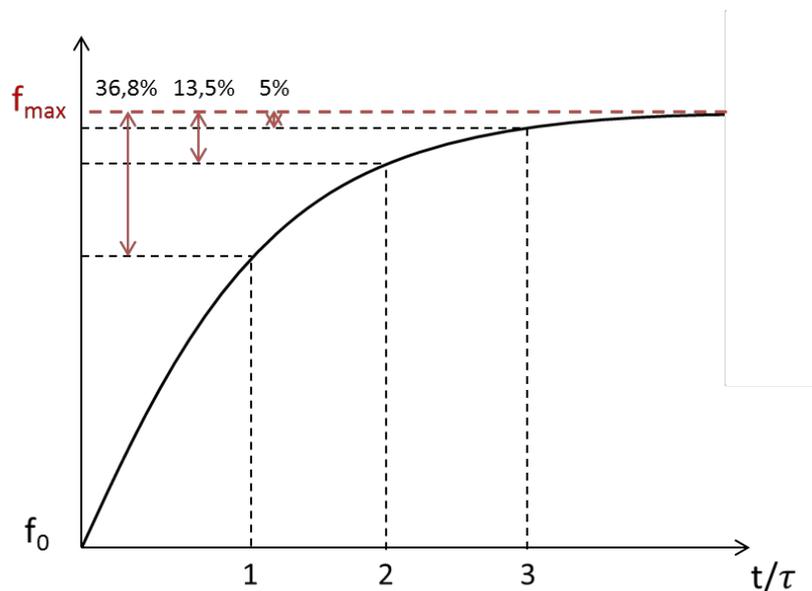


Abbildung 9: Exponentieller Verlauf der Relaxation eines Systems und eingezeichnete Relaxationszeitkonstanten. Bei $t=\tau$ erfolgt eine Annäherung des Systems auf -36,8% des Gleichgewichtszustandes, bei $t=2\tau$ auf -13,5% des Gleichgewichtszustandes und bei $t=3\tau$ beträgt die Abweichung vom Gleichgewichtszustand lediglich noch 5%.

3. Material und Methoden

Die im folgenden Kapitel aufgelisteten Geräte, Chemikalien und Methoden fanden im Verlauf der Arbeit Anwendung

3.1. Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterial

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte und Laborzubehörteile sind in der nachfolgenden Tabelle 2 gelistet.

Tabelle 2: Übersicht über alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien inklusive Ihrer Hersteller.

Geräte und Zubehör	Hersteller
3D Drucker Objet Eden 260VS	Stratasys
Adapter M6 flat bottom auf 10-32 coned, PEEK	IDEX Health and Science
Bechergläser	Schott, VWT
Fittings 10-32 coned mit Ferrule, PEEK	IDEX Health and Science
FPLC mit UV/vis- und Leitfähigkeitsdetektor ÄktaPurifier	GE Healthcare
Laborflaschen	Schott
MagRag 6	GE Healthcare
Mehrkanalpipette	VWR
Mikrotiterplatte 96 well F-Boden	Brand
Mikrotiterplatte 384 well	Brand
Mikrozentrifugenröhrchen, 1,5 ml, Safe-lock	Eppendorf
Mikrozentrifugenröhrchen 2,0 ml, Safe-lock	Eppendorf
Peristaltikpumpe	Ismatec
pH-Messgerät inoLab Level 2	WTW
Pipetten (Kolbenhub) Research	Eppendorf, VWR
Pipettenspitzen	Eppendorf
Potentiostat Gamry Reference 600	Gamry Instruments
Präzisionswischtücher	Kimberly Clark Professional
Reinstwasseranlage Milli-Q Plus	Merck Millipore
Fluorinierte Ethylenpropylen (FEP) HPLC-Kapillaren	CS Chromatographie
Tensor 27 Spektrometer	Bruker Optics
Thermomixer comfort	Eppendorf
UV-vis-Spektrometer/ Plattenleser Enspire	Perkin Elmer
Vortexmischer Lab Dancer	IKA
Waage HA-120M	A&D Company
Waage PG 5002-S	Mettler Toledo
Zentrifugenröhrchen Superclear, 15 ml	VWR
Zentrifugenröhrchen Superclear 50 ml	VWR

3.2. Verwendete Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sowie Assays zum Nachweis verschiedener Komponenten dieser Arbeit sind in der nachfolgenden Tabelle 3 inklusive ihres Herstellers gelistet.

Tabelle 3: Chemikalien, welche im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden und ihre Hersteller

Chemikalie	Hersteller
1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC)	Merck
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Feststoff	Sigma Aldrich
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Liquid Solution for ELISA)	Sigma Aldrich
2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)	Appllichem Lifescience
BCA Protein Assay Reagent Kit	Thermo Scientific Pierce
D-(+)-Glucose	Sigma Aldrich
Dinatriumphosphat Trihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumcitrat tribasisch Monohydrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{K}_3\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Sigma Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Sigma Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natronlauge (NaOH) 32%	Merck
Schwefelsäure 1 Mol L ⁻¹ (2 N)	Sigma Aldrich
Salzsäure (HCl) 32%	Merck
Tris Ultra (Tris(hydroxymethyl)aminomethane)	Sigma Aldrich

3.3. Verwendete Oberflächen

Im nachfolgenden Kapitel soll kurz auf die Oberflächen, welche als Träger zur Immobilisierung der Zielenzyme eingesetzt werden, eingegangen werden.

3.3.1. 3D-Druckmaterial

Zur Fertigung der 3D-gedruckten Teile wurden PolyJet-Materialien der Firma Stratasys Ltd. verwendet. Für die Fertigung der Prototypen sowie der Gitterstrukturen für erste Immobilisierungsversuche wurde das transparente VeroClear RGD810 genutzt. Die Materialcharakterisierung aus dem Datenblatt des Herstellers findet sich im Anhang (Anhang 1, Anhang 2.). Die Versuche zur Proteinimmobilisierung wurden mit Hilfe 3D-gedruckter

zylinderförmiger Plättchen durchgeführt, welche einen Radius von 5 mm und eine Höhe von 0,3 mm besaßen (Abbildung 10).

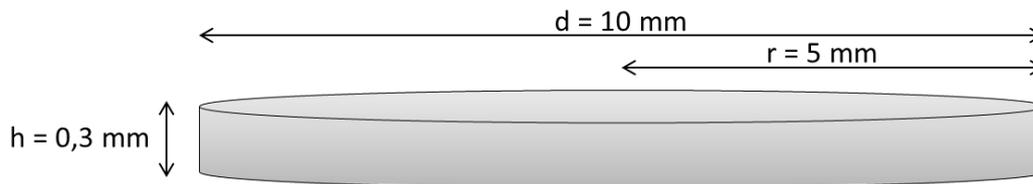


Abbildung 10: 3D-gedruckte Plättchen zur Charakterisierung des Bindeverhaltens von Enzymen an 3D-Druckmaterial. Es handelt sich um Zylinder-förmige Plättchen mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Höhe von 0,3 mm.

Später dienten die im Kapitel 4.2. beschriebenen porösen Gitterstrukturen als Träger für die Immobilisierung der Enzyme. Die Plättchen wurden aufgrund der schnelleren Verwendbarkeit durch den geringeren Druckaufwand sowie die einfachere Entfernung des Stützmaterials als Modelloberflächen genutzt.

3.3.2. Magnetpartikel

Als Modelloberfläche mit Carboxylgruppen dienten magnetische Polyvinylalkohol Mikropartikel (M-PVA) der Firma Perkin Elmer chemagen (Abbildung 11). Die Partikel M-PVA C22 sind laut Hersteller mit $950 \mu\text{mol COOH-Gruppen g Partikel}^{-1}$ funktionalisiert. Der mittlere Partikeldurchmesser beträgt $1\text{-}3 \mu\text{m}$. Verwendeten wurde die Charge Nr.: C22-0111071.

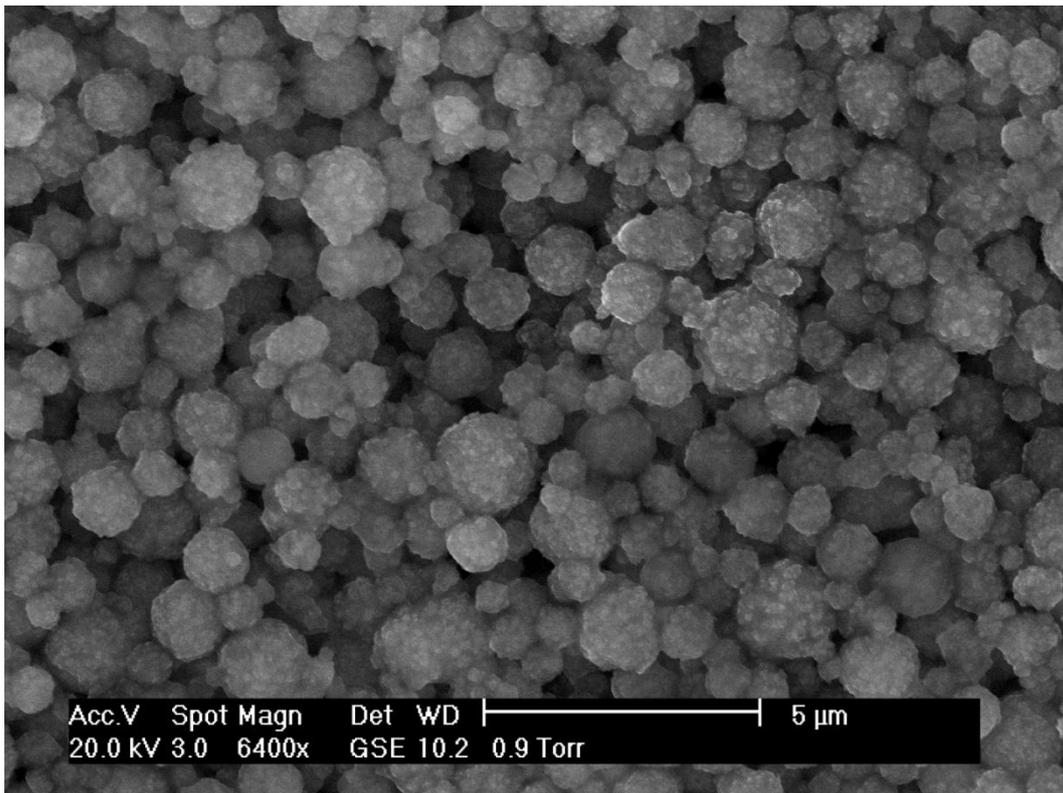


Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Aufnahme der verwendeten M-PVA C22-Partikel der Firma Perkin Elmer chemagen. Der mittlere Partikeldurchmesser der verwendeten Magnetbeads beträgt zwischen 1 und 3 μm

3.4. Verwendete Enzyme

Im folgenden Abschnitt wird auf die verwendeten kommerziell bezogenen Enzyme der Modellkaskade eingegangen und wichtige Kennparameter zur Charakterisierung genannt.

3.4.1. Glucose Oxidase

Bei der für diese Arbeit genutzten Glucose Oxidase handelt es sich um ein Grade VII Enzym aus dem Schwarzen Gießkannenschimmel, *Aspergillus niger*. Das von Sigma Aldrich bezogene (VWR Bestellnummer SAFSG2133) Pulver ist lyophilisiert und salzfrei. Der Proteingehalt beträgt laut Hersteller 60% (Biuret-Assay). Das Molekulargewicht beträgt 160 kDa, der pI-Wert 4,3. Die Aktivität des lyophilisierten Pulvers beträgt laut Herstellerangaben $>100000 \text{ U g}^{-1}$ Feststoff. (Unit Definition: 1 U oxidiert 1,0 μmol beta-D-Glucose zu D-Gluconolacton und Wasserstoffperoxid pro min bei pH 5,1 bei 35° C).

3.4.2. Meerrettichperoxidase

Bei der in dieser Arbeit genutzten Peroxidase handelt es sich um salzfreie lyophilisierte Meerrettichperoxidase Typ VI von Sigma Aldrich (VWR-Bestellnummer SAFSP8375). Die molekulare Masse der HRP beträgt 44 kDa, der pH je nach Isotyp zwischen 3 und 9. Laut Hersteller beträgt die Aktivität 230-250 U mg⁻¹ Feststoff. 1 Unit (U) ist definiert als die Umsetzung von 1,0 mg Purpurogallin aus Pyrogallol in 20 Sekunden bei pH 6,0 und 20° C.

3.5. Protein- und Enzymassays

Das folgende Kapitel beschreibt die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Verfahren zur Bestimmung der Proteinkonzentration und der Enzymaktivität.

3.5.1. Bicinchoninsäure-(BCA)-Assay zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Verwendet wurde der BCA-basierte Assay zur kolorimetrischen Proteindetektion und Quantifizierung der Firma Thermo Scientific Pierce. Dieser basiert auf der proteininduzierten Reduktion von Cu²⁺- zu Cu¹⁺-Ionen im alkalischen Milieu (Biuret-Reaktion) und der Bildung eines quantifizierbaren lilafarbenen Komplexes der Cu¹⁺-Ionen mit Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA). Die Durchführung des Assays erfolgte im 96-well-Format gemäß mitgelieferter Anleitung. Als Proteinstandard wurde das jeweils zu untersuchende Protein in definierten Konzentrationen genutzt.

3.5.2. Tetramethylbenzidin-(TMB)-Assay

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde sowohl für die Quantifizierung der Meerrettichperoxidase (HRP), als auch der Glucose Oxidase (GOx) das Farbsubstrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Bestimmung der Glucose Oxidase-Aktivität durch ein Peroxidase-Substrat ist möglich da beide Reaktionen gekoppelt sind (Abbildung 5) und in diesem Fall die Glucose Oxidase den Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt darstellt. Für die Bestimmung der Aktivität der Glucose Oxidase wird eine definierte Menge Meerrettichperoxidase beigemischt, welche das von der GOx umgesetzte

Wasserstoffperoxid vollständig nutzt, um TMB unter Abgabe eines Elektrons von seiner farblosen Form in den blauen Charge-Transfer-Komplex (Absorptionsmaximum bei 650 nm) zu transferieren. Unter stark sauren Bedingungen wird die Konkurrenzreaktion begünstigt, unter der zwei Elektronen abgegeben werden und zweifach positiv geladenes TMB entsteht, welches eine gelbe Färbung und ein Absorptionsmaximum bei 450 nm besitzt. Die volumetrische Enzymaktivität in Unit (U) pro Volumen für freies Enzym errechnet sich unter Berücksichtigung des Lambert-Beer-Gesetzes wie folgt:

$$(11) \quad \text{volumetrische Aktivität} \left[\frac{U}{ml} \right] = \frac{dc}{dt} = \frac{dA \cdot df \cdot V_{Assay}}{dt \cdot \epsilon \cdot d \cdot V_{Enzym}}$$

d	Schichtdicke der Messung [cm]
dA	Absorptionsdifferenz [dimensionslos]
dc	Konzentrationsänderung von farbigem TMB [$\mu\text{mol ml}^{-1}$]
df	Verdünnungsfaktor, ergibt sich nach Abstoppen mit äquivalentem Volumen Säure
dt	Reaktionsdauer [min]
ϵ	Extinktionskoeffizient des Substrates [$\text{ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$] $\epsilon_{450 \text{ nm}} = 59 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{650 \text{ nm}} = 39 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
V_{Assay}	Assayvolumen [ml]
V_{Enzym}	Volumen der eingesetzten Enzymlösung [ml]

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Enzym-Assays genutzt. Diese sind in den folgenden Absätzen jeweils kurz beschrieben.

Messung der Aktivität freier Meerrettichperoxidase

Dieser Assay wurde in einer 96-well-Mikrotiterplatte durchgeführt. Dabei war es wichtig, eine Mehrkanalpipette zu benutzen, um alle Reaktionen zeitgleich zu starten. Verschiedene HRP-Konzentrationen (5 – 20 $\mu\text{g/ml}$) wurden eingesetzt. Diese wurden in einem Volumen von 50 μl in die Reaktionsgefäße der Mikrotiterplatte vorgelegt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 200 μl ELISA-TMB-Lösung (slow kinetics, Sigma Aldrich) gestartet und im UV/vis-Spektrometer für Mikrotiterplatten eine kinetische Messung der Absorptionsänderung bei 653 nm durchgeführt.

Messung der Aktivität auf Magnetpartikel immobilisierter Meerrettichperoxidase

Die Ausgangspartikelsuspension mit einer Konzentration von 50 – 60 mg Partikel/ml musste zunächst verdünnt werden. Üblicherweise wurden Verdünnungen zwischen 1:100 und 1:1000 gewählt. 50 µl der verdünnten Partikelsuspension mit immobilisiertem Enzym wurden in den Reaktionsgefäßen der Mikrotiterplatte vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 200 µl ELISA-TMB-Lösung (slow kinetics, Sigma Aldrich) gestartet. Im UV/vis-Spektrometer für Mikrotiterplatten erfolgte die kinetische Messung der Absorptionsänderung bei 653 nm.

Messung der Aktivität freier Glucose Oxidase

50 µl einer GOx-Lösung (Konzentration zwischen 5 und 20 µg/ml) wurden in den Mikroreaktionsgefäßen einer 96-well-Mikrotiterplatte vorgelegt. 10 µl einer 100 µg/ml HRP-Lösung wurden zugegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass stets dieselbe Lösung verwendet wurde. 100 µl Wasserstoffperoxid-freier TMB-Lösung (Solution B, KPL) wurden zupipettiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl einer 72 g/L D-Glucoselösung in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 6,0 gestartet. Die kinetische Messung der Absorption erfolgte im UV/vis-Spektrometer für Mikrotiterplatten bei 653 nm. Die Berechnung der volumetrischen Enzymaktivität der Glucose Oxidase erfolgte analog zur Berechnung für die Meerrettichperoxidase.

Messung der Aktivität auf Magnetpartikel immobilisierter Glucose Oxidase

Zunächst wurde die Partikelsuspension mit immobilisierter GOx um Faktor 100 – 1000 verdünnt. Anschließend wurden 50 µl der Verdünnung in den Mikroreaktionsgefäßen einer 96-well-Mikrotiterplatte vorgelegt, 10 µl 0,1 g/L HRP-Lösung und 100 µl TMB-Lösung (Solution B, KPL) zugegeben. Die Reaktion wurde gestartet durch die Zugabe von 100 µl einer 72 g L⁻¹ D-Glucoselösung in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 6,0 unter Zuhilfenahme einer Mehrkanalpipette. Die kinetische Messung im UV/vis-Spektrometer für Mikrotiterplatten und die anschließende Berechnung der volumetrischen Enzymaktivität der immobilisierten

Glucose Oxidase erfolgte analog zur Berechnung für die immobilisierte Meerrettichperoxidase.

3.6. Enzymimmobilisierung

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit den Methoden zur Beladung des 3D-Druckmaterials und der magnetischen Mikropartikeln als Modelloberfläche mit den Enzymen Meerrettichperoxidase (HRP) und Glucose Oxidase. Dabei werden sowohl kovalente, als auch adsorptive Wechselwirkungen untersucht.

3.6.1. Immobilisierung an Magnetpartikel

Dieses Unterkapitel befasst sich mit der adsorptiven und kovalenten Immobilisierung der Modellenzyme Glucose Oxidase (GOx) und Meerrettichperoxidase (HRP) an carboxy-modifizierte magnetische PVA-beschichtete Mikropartikel.

3.6.1.1. Adsorptionsisothermen der Modellenzyme an Magnetpartikel

Zunächst wurden Enzymlösungen unterschiedlicher Konzentrationen (0; 0,15; 0,3; 0,6; 1,2; 2,4; 3,6; 4,8 und 6,0 mg ml⁻¹) in 0,02 M Citratpuffer pH 4,0 hergestellt. Die Partikel (12 mg in einem Volumen von 0,2 ml) wurden zur Äquilibrierung der funktionellen Gruppen 3x in 0,02 M Citratpuffer pH 4,0 gewaschen und der Überstand mittels Separation durch ein MagRag entfernt. Pro Ansatz wurden 0,2 ml Enzymlösung zu den Partikeln gegeben und bei 25° C und 1400 rpm auf dem Thermoschüttler für 30 min bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustandes geschüttelt. Anschließend wurden die Überstände und die Ausgangslösungen mittels BCA-Assay auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Die Beladung der Partikel wurde wie folgt errechnet:

$$(12) \quad q = \frac{m_{\text{Enzym}}}{m_{\text{Partikel}}} = \frac{(c_0 - c_{GG}) \cdot V}{m_{\text{Partikel}}}$$

c_0	Enzymausgangskonzentration [mg ml ⁻¹]
c_{GG}	Enzymkonzentration in Lösung nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes [mg ml ⁻¹]
m_{Enzym}	Enzymmasse [mg]
m_{Partikel}	Masse der eingesetzten Partikel [g]
q	Beladung mit Enzym [mg Enzym g Partikel ⁻¹]
V	eingesetztes Enzymvolumen [ml]

Mit Hilfe der Gleichung nach Langmuir gelang eine lineare Regression der experimentellen Isothermendaten unter Einsatz der Software Origin Pro 8.6G. Als Ergebnis liefert die Regression die Parameter der zugehörigen Langmuirisotherme, d.h. die Maximalbeladung (q_{\max}) und den Sorptionskoeffizienten K_L .

$$(13) \quad q_{GG} = \frac{q_{\max} \cdot K_L \cdot c_{GG}}{1 + K_L \cdot c_{GG}}$$

c_{GG}	Enzymkonzentration in Lösung nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes [mg ml^{-1}]
K_L	Sorptionskoeffizient [L g^{-1}]
q_{GG}	Enzymbeladung im Gleichgewicht [$\text{mg Enzym g Partikel}^{-1}$]
q_{\max}	Maximal mögliche Enzymbeladung [$\text{mg Enzym g Partikel}^{-1}$]

3.6.1.2. Kovalente Anbindung von Proteinen durch EDC an carboxy-funktionalisierte Magnetpartikel

Da die 3D-gedruckten Plättchen nur eine relativ geringe spezifische Oberfläche lieferten und das Handling und die Detektion von Enzymaktivität und -konzentration entsprechend aufwändig war, wurden carboxy-funktionalisierte magnetische Polyvinylalkohol Mikropartikel als Modelloberfläche zur Optimierung der Proteinbindung genutzt.

Zunächst wurde das Immobilisierungsprotokoll nach Morhardt et al. genutzt[27], welches am Institut etabliert war. Es basiert auf dem Einsatz des chemischen *zero-length* Crosslinkers 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) in seiner Hydrochlorid-Form, mit dessen Hilfe in einer zweistufigen Reaktion zunächst die Carboxygruppen auf dem Träger in ein Aktivester-Zwischenprodukt überführt wurden (Aktivierungsschritt). In einem zweiten Reaktionsschritt wurde das Enzym zugegeben (Kopplungsschritt), wobei die an der Oberfläche zugänglichen Lysin-Seitenketten des Proteins unter Abspaltung von Harnstoff Amidbindungen zwischen Partikel und Protein ausbildeten (Abbildung 12).

Da jedoch für jedes Enzym zunächst ideale Bedingungen während der Immobilisierung gefunden werden müssen, wurde für beide Enzyme eine Optimierung des Protokolls durchgeführt.

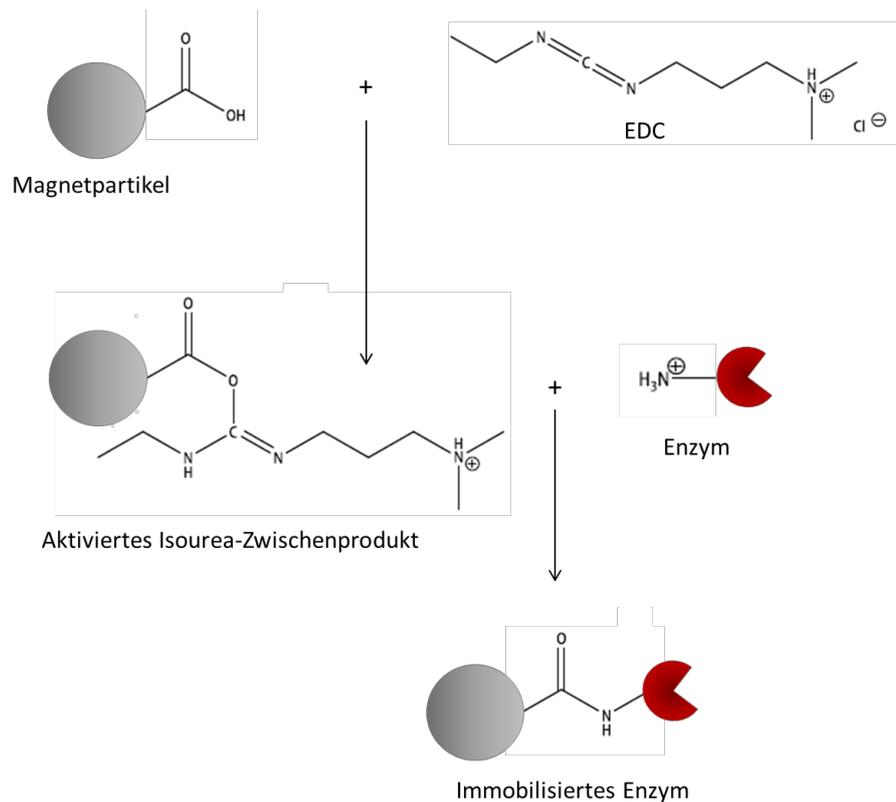


Abbildung 12: Reaktionsschema für die Immobilisierung eines Enzyms an einem Magnetpartikel mittels des *zero-length* Crosslinkers 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC). Zunächst erfolgt die Aktivierung der Carboxygruppe auf der Partikeloberfläche durch EDC. Dadurch entsteht ein aktiviertes Isourea-Zwischenprodukt. Wird in einem zweiten Schritt das Enzym zugegeben, bilden oberflächliche Aminogruppen mit der aktivierten Carboxygruppe eine Amidbindung aus, wobei Harnstoff abgespalten wird.

Aktivierungsschritt

Der Aktivierungsschritt erfolgte für alle Versuche stets identisch. 0,5 ml einer 60 g L^{-1} M-PVA C22-Partikelsuspension (entsprechend 30 mg Partikel) wurden in Mikroreaktionsgefäße überführt und dreimal in 1 ml Aktivierungspuffer ($0,1 \text{ M MES pH } 5,3$) gewaschen. Danach wurden die Partikel mit Hilfe eines MagRags separiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die EDC-Lösung in Aktivierungspuffer frisch hergestellt, indem 50 g L^{-1} EDC eingewogen wurden. 0,5 ml dieser Lösung wurden pro 30 mg Partikel eingesetzt und die Suspension für 35 min bei 11° C und 1400 rpm schüttelnd inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Partikel separiert, der Überstand verworfen und 2 Mal mit 0,5 ml Aktivierungspuffer gewaschen.

Variation der Temperatur und Dauer im Kopplungsschritt

Zunächst wurden die Kopplungstemperatur und die Dauer des Kopplungsschrittes variiert. Tabelle 4 fasst die Versuchsbedingungen bezüglich Aktivierungstemperatur und –dauer beim Aktivierungsschritt zusammen.

Tabelle 4: Zusammenfassung der variierten Temperatur- und Zeitwerten während des Kopplungsschrittes.

Versuchsansatz	1	2	3	4
Bedingungen	11° C, 2h	25° C, 2h	11° C, 20 h	25° C, 2h + 11° C, 18h

0,5 ml einer 0,9 g L⁻¹ Enzymlösung in Kopplungspuffer (0,1 M MES pH 7,1) wurden zugegeben, entsprechend einer Enzymbeladung von 15 mg Enzym pro eingesetztem Gramm Mikropartikel. Die Inkubation erfolgte gemäß den definierten Temperatur- und Zeitwerten.

Variation des pH-Wertes im Kopplungsschritt

Während weiterer Versuche wurde der pH-Wert während des Kopplungsschrittes variiert (Tabelle 5). Analog zum ersten Optimierungsschritt wurden 0,5 ml Puffervolumen und eine Enzymkonzentration von 0,9 g L⁻¹ entsprechend einer Enzymbeladung von 15 mg Enzym g Partikel⁻¹ eingesetzt. Die Kopplung erfolgte bei 25° C für eine Dauer von 2,5 h schüttelnd bei 1400 rpm.

Tabelle 5: Zusammenfassung der variierten pH-Werte während des Kopplungsschrittes und Auflistung der dabei verwendeten Pufferlösungen.

pH-Wert	4	5,3	6	7
Puffersystem	20 mM Citrat	0,1 M MES	0,1 M NaPO ₄	0,1 M NaPO ₄

Variation der Enzymbeladung im Kopplungsschritt

Um den Einfluss der Enzymbeladung zu untersuchen, wurden verschiedene Enzym-Partikel-Verhältnisse eingesetzt (Tabelle 6). Die Kopplung erfolgte bei 25° C für eine Dauer von 2,5 h schüttelnd bei 1400 rpm bei pH 4,0.

Tabelle 6: Zusammenfassung der variierten Enzymbeladungen während des Kopplungsschrittes und Enzymkonzentration, welche bei einem Einsatz von 0,5 ml Enzymlösung auf 30 mg Partikel eingesetzt werden muss.

Beladung [mg Enzym g Partikel ⁻¹]	5	10	15	20	30
Enzymkonzentration bei 0,5 ml Einsatz [g L ⁻¹]	0,3	0,6	0,9	0,12	1,8

Prozessierung nach Kopplungsschritt

Die Handhabung nach dem Kopplungsschritt war, wie der Aktivierungsschritt, für alle Proben identisch. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Partikel separiert und der Proteingehalt des Überstandes mittels BCA-Assay bestimmt. Anschließend wurden die Partikel 5 Mal in 0,25 ml Waschlösung (0,8 M NaCl) gewaschen und der Überstand jeweils ebenfalls mittels BCA-Assay auf seinen Proteingehalt hin untersucht. Anschließend wurden die Partikel 2 Mal in 0,5 ml Lagerpuffer (0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,0, sterilfiltriert) gewaschen und auf ihre Aktivität hin untersucht. Die Lagerung der Proben erfolgte im Kühlschrank bei 4° C. Mit Hilfe der gemessenen und aufsummierten Proteinkonzentrationen im Überstand konnte die Immobilisierungsausbeute bestimmt werden. Diese berechnet sich wie folgt:

$$(14) \quad \text{Enzymbindungsausbeute [\%]} = \frac{m_{\text{eingesetztes Protein}} - m_{\text{abgewaschenes Protein}}}{m_{\text{eingesetztes Protein}}} \cdot 100\%$$

Durch die Bestimmung der Aktivität des freien Enzyms vor Immobilisierung und der Aktivität nach Immobilisierung unter Berücksichtigung des Enzymeinsatzes, der Partikelkonzentration und der Enzymbindungsausbeute kann die Aktivitätsausbeute berechnet werden:

$$(15) \quad \text{Enzymaktivitätsausbeute [\%]} = \frac{\text{Enzymaktivität}_{\text{gebundenes Enzym}}}{\text{Enzymaktivität}_{\text{freies eingesetztes Enzym}}} \cdot 100\%$$

Die spezifische Aktivität beschreibt die gemessene Aktivität je Partikelmasse, die volumetrische Aktivität die Aktivität pro entnommenem Volumen an Partikelsuspension. Die Gesamtaktivität ist die gesamte gemessene Aktivität in einem bestimmten Volumen bzw. von einer bestimmten Partikelmasse mit immobilisiertem Enzym.

3.6.2. Immobilisierung an 3D-Druckmaterial

Dieses Unterkapitel befasst sich mit den eingesetzten Methoden zur Untersuchung der adsorptiven und kovalenten Immobilisierung der Modellenzyme Glucose Oxidase (GOx) und Meerrettichperoxidase (HRP) an die Oberfläche 3D-gedruckter Probekörper.

3.6.2.1. Adsorptionsisothermen der Modellenzyme an 3D-Druckmaterial

Zur Ermittlung der maximalen Beladung des 3D-Druckmaterials mit Meerrettichperoxidase und Glucose Oxidase wurden Adsorptionsisothermen aufgenommen. Dafür wurden zunächst theoretische Überlegungen angestellt, die die Querschnittsfläche eines Proteinmoleküls im Verhältnis zur bereitgestellten Oberfläche des Druckmaterials berücksichtigten. Dafür wurden folgende Größen zur Berechnung eingesetzt:

Tabelle 7: Übersicht über die zur Berechnung eingesetzten Größen zur Adsorption und kovalenten Bindung von Enzymen auf 3D-Druckmaterial.

Komponente	Größe	Einheit	Wert
3D-Druckmaterial (Plättchen)	h (Höhe)	mm	0,3
	r (Radius)	mm	2,5
	ρ (Dichte)	g cm^{-3}	1,185
Meerrettichperoxidase (HRP)	ρ_{HRP} (Dichte)	g cm^{-3}	1,41
	M (Molare Masse)	g mol^{-1}	44000
Glucose Oxidase (GOx)	ρ_{HRP} (Dichte)	g cm^{-3}	1,41
	M (Molare Masse)	g mol^{-1}	160000

Im praktischen Experiment wurde zunächst eine Verdünnungsreihe an Protein bestehend aus den Konzentrationen 0; 0,1; 0,3; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0; 5,0 g L^{-1} (+ 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 und 10,0 g L^{-1} für GOx) in Puffer (0,02 M Kaliumcitratpuffer pH 4,0) hergestellt. Die 3D-gedruckten Plättchen wurden einige Male im Puffer gewaschen, um eine Äquilibrierung der an der Oberflächliche vorliegenden funktionellen Gruppen zu erreichen. Anschließend wurden fünf Plättchen mit Hilfe einer Pinzette in ein 2ml-Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 250 μl der jeweiligen Proteinverdünnung bedeckt. Bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustands aus Ad- und Desorption wurden die Plättchen im Thermoschüttler bei 25° C und 1400 rpm für 1 h geschüttelt. Die Überstände wurden vor und nach dem Adsorptionsprozess mittels BCA-Assay auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Die Beladung

der Plättchen bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen konnte wie folgt berechnet und gegen die Gleichgewichtskonzentration c_{GG} aufgetragen werden:

$$(16) \quad q = \frac{m_{Enzym}}{m_{3D-Druckmaterial}} = \frac{(c_0 - c_{GG}) \cdot V}{m_{3D-Druckmaterial}}$$

c_0	Enzymausgangskonzentration [mg ml ⁻¹]
c_{GG}	Enzymkonzentration in Lösung nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes [mg ml ⁻¹]
m_{Enzym}	Enzymmasse [mg]
$m_{3D-Druckmaterial}$	Masse des 3D-Druckmaterials [g]
q	Beladung mit Enzym [mg Enzym g 3D-Druckmaterial ⁻¹]
V	eingesetztes Enzymvolumen [ml]

Mit Hilfe der Gleichung nach Langmuir gelang eine Regression (Origin Pro 8.6G), mit deren Hilfe Werte für die Maximalbeladung (q_{max}) und den Sorptionskoeffizienten K_L errechnet werden konnten:

$$(17) \quad q_{GG} = \frac{q_{max} \cdot K_L \cdot c_{GG}}{1 + K_L \cdot c_{GG}}$$

c_{GG}	Enzymkonzentration in Lösung nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes [mg ml ⁻¹]
K_L	Sorptionskoeffizient [L g ⁻¹]
q_{GG}	Enzymbeladung im Gleichgewicht [mg Enzym g 3D-Druckmaterial ⁻¹]
q_{max}	Maximal mögliche Enzymbeladung [mg Enzym g 3D-Druckmaterial ⁻¹]

3.6.2.2. Kovalente Anbindung von Proteinen durch EDC ans 3D-Druckmaterial

Im Rahmen der Diplomarbeit von Dipl.-Ing. Henrike Wagner (2014) wurde ein Anbindungsprotokoll der Enzyme an die Oberfläche des 3D-Druckmaterials entwickelt. Dabei wurden verschiedene Funktionalisierungen und Immobilisierungstechniken getestet. Am effektivsten stellte sich die Anbindung mittels EDC an oberflächliche Carboxy-gruppen des 3D-Druckmaterials heraus. Die Optimierung des EDC-Protokolls erfolgte am Modell carboxylierter Partikel, wie unter 3.2.6. beschrieben. Zur Enzymimmobilisierung an das 3D-Druckmaterial wurde das optimierte Protokoll verwendet. Dieses ist ebenfalls aufgeteilt in Aktivierungsschritt und Kopplungsschritt, bei dem die Enzyme angebunden werden. Zunächst wird das zu modifizierende 3D-gedruckte Objekt in ein Reaktionsgefäß überführt und mit Aktivierungspuffer (0,02 M Citratpuffer pH 4,9) bedeckt. Der Puffer wird 3 Mal getauscht, um eine entsprechende Äquilibrierung der funktionellen Gruppen an der Oberfläche zu erreichen. Dann erfolgt die Aktivierung der funktionellen Gruppen durch die

Zugabe einer Pufferlösung, in welche 50-100 mg ml⁻¹ EDC frisch eingewogen sind, und die schüttelnde Inkubation für 35 min bei 11° C. Dabei ist darauf zu achten, dass das 3D-gedruckte Objekt komplett mit Flüssigkeit bedeckt ist. Anschließend wird die Oberfläche 3 Mal kurz mit Aktivierungspuffer gewaschen. Anschließend erfolgt die Zugabe von Enzym in Kopplungspuffer (0,2 M Citratpuffer, pH 4,0). Dieses wird in einem Verhältnis von 1 bis maximal 15 mg Enzym pro g 3D-Druckmaterial zugegeben und für 2,5 h bei 25° C inkubiert. Danach wird das Material zunächst mit Kopplungs-, dann mit Waschpuffer (0,8 M NaCl) gewaschen und schließlich bis zur Bestimmung der Aktivität in Lagerpuffer im Kühlschrank bei 4° C gelagert. Die Charakterisierung der gebundenen Enzymmenge erfolgt durch Untersuchung der Kopplungs- und Waschüberstände mittels BCA-Assay. Die Untersuchung der Enzymaktivität erfolgt mittels eines Aktivitätsassays, wie unter Kapitel 3.5. beschrieben.

3.6.3. Bestimmung der idealen Arbeitstemperatur für Meerrettichperoxidase

Zum vereinfachten Handling der Proben wurde für die Bestimmung der Optimaltemperatur für immobilisierte Meerrettichperoxidase mit Hilfe von Magnetpartikeln als Trägermaterial durchgeführt. Dafür wurden 15 mg HRP pro g Magnetpartikel mit Hilfe des Standard-Protokolls immobilisiert und die Partikelsuspension mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 6,0 200-fach verdünnt. Anschließend wurden 500 µl ELISA-TMB-Substratlösung in ein Eppendorf-Tube vorgelegt und im Thermoschüttler auf die entsprechende Temperatur (15°, 20°, 25°, 30°, 35°, 40°, 45° C) vortemperiert. In separaten Eppendorf-Tubes wurden 40 µl 1 M Schwefelsäure vorgelegt. Die Reaktion wurde gestartet, indem 10 µl der verdünnten Partikelsuspension in die vortemperierte Substratlösung pipettiert wurden. Die Durchmischung erfolgte im Thermoschüttler bei 1400 rpm. Für 2,5 min wurden alle 30 sec 40 µl Probe entnommen und zum Abstoppen der Enzymreaktion direkt in die vorgelegte Schwefelsäure pipettiert. Anschließend wurden die Partikel im MagRag vom Überstand separiert und 70 µl des Überstandes in einen 384-well-Mikrotiterplatte überführt. Die Vermessung erfolgte bei 450 nm im UV/vis-Spektrometer für Mikrotiterplatten. Mittels des Lambert-Beer'schen Gesetzes wurde die volumetrische und spezifische Aktivität der immobilisierten HRP berechnet und die Aktivitätswerte der unterschiedlichen Temperaturen miteinander verglichen.

3.7. Charakterisierung des Enzymtransformations-Moduls

Das nachfolgende Kapitel beschreibt die physikalischen und analytischen Verfahren, die zur Charakterisierung des gedruckten Enzymtransformationsmoduls eingesetzt wurden. Da es sich bei dem Design und der Fertigung der gedruckten Module um Neuentwicklungen dieser Dissertation handelt, werden diese Inhalte im Ergebnis- und Diskussionsteil der Arbeit vorgestellt.

3.7.1. Konstruktion der Gitterstruktur und des Gehäuses des Enzymtransformationsmoduls

Die Konstruktion der 3D-gedruckten Reaktorteile erfolgte mit Hilfe des CAD-Programms Autodesk Inventor Professional 2015.

3.7.2. Mikroskopieverfahren

Zur optischen Charakterisierung der Oberflächen der 3D-gedruckten Probenkörper wurde die Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM) genutzt. Die ESEM ist eine Unterart der Rasterelektronenmikroskopie, bei der die Probe unter einem geringen Vakuum von einem Elektronenstrahl abgerastert wird, der niederenergetische Sekundärelektronen entstehen lässt, welche auf dem Weg zum Detektor durch eine angelegte Spannung ionisiert werden und ein Topographiekontrastbild der Probe abbilden.

3.7.3. Messung der Verweilzeit (Step-Experiment)

Um die Rückvermischung im Reaktor zu messen, wurde das Enzymtransformationsmodul an eine FPLC-Anlage (ÄktaPurifier, GE) angeschlossen und zunächst mit destilliertem Wasser durchströmt, bis alle detektierten Signale (Leitfähigkeit, pH-Wert, UV-Detektion bei 280 nm) konstant blieben. Anschließend erfolgte bei unterschiedlichen Flussraten (1; 0,5; 0,25 und 0,1 ml min⁻¹) eine Durchströmung mit 1 M NaCl-Lösung und die Detektion der Konzentration der Salzlösung nach Durchströmung des Reaktors mit Hilfe des angeschlossenen Leitfähigkeitsdetektors. Aus dem Verlauf der C_{Step} -Kurve wurden die dimensionslose Verweilzeitverteilung (E-Kurve) und kumulative Verteilungsfunktion (F-Kurve) berechnet

sowie der Wert der Bodensteinzahl bestimmt. Daraus konnte der Dispersionskoeffizient abgeschätzt werden.

3.7.4. *Proof-of-principle* HRP-Umsatz

Für das *proof-of-principle* der Eignung des Enzymtransformationsmoduls für biokatalytische Umsetzungen wurde eine Gitterstruktur (VeroClear-Druckmaterial) mit 15 mg g⁻¹ Meerrettichperoxidase modifiziert (s. Kapitel 3.6.4.) und im Modulgehäuse platziert. Da es sich bei diesem Versuch noch um einen Prototypen des Enzymtransformationsmoduls handelte, wurden Deckel und oberflächliche Kanten des Moduls mit Schmirgelpapier angeraut und mittels Zweikomponenten-Klebstoff (Uhu) verklebt. Anschließend wurde das Reaktormodul im senkrechten Zustand von unten nach oben mit Pufferlösung (phosphatgepufferte Salinelösung, PBS) durchspült und vorsichtig beklopft, bis alle Luftblasen aus dem System entfernt waren. Dann wurde TMB-Substratlösung bei unterschiedlichen Flussraten (2,5 ml min⁻¹, 1,63 ml min⁻¹, 0,65 ml min⁻¹ und 0,29 ml min⁻¹) durch das Enzymtransformationsmodul gepumpt und über 10 min pro Minute ein Volumen von etwa 200 µl gesammelt, davon wurden 100 µl verdünnt und die Reaktion von eventuell desorbierten, geringen Mengen an Enzym mit Hilfe von 35 µl 1 M Schwefelsäure abgestoppt. Anschließend wurde die Absorption bei 450 nm gemessen und mit den entsprechenden Verdünnungsfaktoren von Verdünnung und Abstopplösung multipliziert. Anhand der Ergebnisse aus den Verweilzeitmessungen wurde die mittlere Verweilzeit eines Substratmoleküls bei der jeweiligen Flussrate bestimmt. Anschließend wurde der Absorptionswert unter Zuhilfenahme der Kanalbreite der Absorptionsmesszelle (0,47 cm), der Zeit und des molaren Extinktionskoeffizienten von TMB bei 450 nm ($3,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in einen Umsatzgrad [mol ml⁻¹ min⁻¹] umgerechnet.

3.8. Charakterisierung des Temperierelements

Dieses Unterkapitel befasst sich mit der Charakterisierung des Verhaltens des Temperierelements und umfasst hauptsächlich die Aufnahme der Pumpenkennlinie sowie der Temperaturkurven in Temperiermantel und Reaktorinnerem.

3.8.1. Pumpenkennlinie

Vor Durchströmung des Reaktormoduls wurde die Pumpencharakterisierung der verwendeten Peristaltikpumpe vorgenommen. Dabei wurde eine Pumpenkennlinie für den Vor- und Rücklauf bestimmt. In 10%-Schritten wurde die Förderrate dreifach ermittelt, indem die Pumpdauer für ein Volumen von 2,0 ml bestimmt wurde und die Durchflüsse gemittelt wurden. Das Totvolumen war aufgrund des kleinen Innendurchmessers und der kurzen Länge der Schläuche nur sehr gering und wurde daher vernachlässigt.

3.8.2. Konstruktion

Die Konstruktion der 3D-gedruckten Reaktorteile erfolgte mit Hilfe des CAD-Programms Autodesk Inventor Professional 2015.

3.8.3. Aufnahme der Temperaturverläufe

Die Temperaturverläufe wurden unter statischen und dynamischen Bedingungen gemessen. Statische Bedingungen bedeutet, dass kein Durchfluss des Mediums im Reaktor stattfand. Bei den dynamischen Bedingungen wurden die Temperaturverläufe in doppelter Wiederholung unter drei verschiedenen Durchflussraten (99%, 66%, 33% und 5% Pumpleistung) aufgenommen. Die Messung der Temperatur erfolgte jeweils im hinteren Teil des Enzymtransformationsmoduls nach der Durchströmung der Gitterstruktur und der Zusammenführung des Substratstromes. Die Aufnahme des Temperaturverlaufes erfolgte für 30 min. Ausgangstemperatur war jeweils Raumtemperatur (21° C). Die gewählten Regeltemperaturen sind in Tabelle 8 aufgelistet. Um einen optimalen Wärmedurchgang vom Temperierelement auf das Enzymtransformationsmodul zu gewährleisten, wurden alle eventuell entstandenen Lufträume mit Silikonfett aufgefüllt. Die Aufnahme der Temperaturkurven ohne Durchströmung des Reaktors erfolgte in der Senkrechten, um ein Auslaufen des Reaktors bei Einführung der Temperatursonde in den oben gelegenen Ausgang zu verhindern. Im Gegensatz hierzu erfolgte die Messung der Temperatur im Durchfluss bei waagrechtlicher Reaktorposition und beinahe vollständigem Verschluss des Ausganges, um das Auftreten von Luftblasen im Reaktor nach Einführen der Temperatursonde zu verhindern. Verwendet wurden Temperatursensoren, welche mit Hilfe

eines 12 bit Allround-Messlabors (REDLAB-1208LS, Meilhaus) mit einem Laptop verbunden wurden. Die Aufnahme der Temperaturkurven erfolgte durch das Programm Tracer DAQ für eine Dauer von 30 min. Anschließend wurden die Dateien als Excel-Files exportiert. Zur Charakterisierung des Systems wurde die Relaxationszeit errechnet, das heißt die Zeitspanne, in der die Temperaturdifferenz zwischen Ist- und Zieltemperatur den e-ten Teil der Startdifferenz reduziert ist. Dafür wurde die Temperatur auf die Maximaltemperatur normiert und die Zeitspanne (x-Wert) bei $1-1/e$ ($y = 0,632$) abgelesen. Eine Übersicht über die untersuchten Versuchsbedingungen gibt Tabelle 8.

Tabelle 8: Untersuchte Regeltemperaturen für das Temperierelement des modularen Reaktorsystems unter statischen und dynamischen Bedingungen.

Starttemperatur [° C]	Zieltemperatur [° C]	Temperaturdifferenz [° C]
21	25	4
21	30	9
21	35	14

3.9. Charakterisierung des pH-Kontrollmoduls

Dieser Abschnitt befasst sich mit den Methoden zur Charakterisierung des pH-Kontrollmoduls. Dabei wird insbesondere auf die Durchführung der pH-Modulationsvorgänge und die verwendeten Einstellungen am Potentiostaten eingegangen.

3.9.1. Konstruktion

Die Konstruktion der 3D-gedruckten Reaktorteile erfolgte mit Hilfe des CAD-Programms Autodesk Inventor Professional 2015.

3.9.2. pH-Regulierung mittels einer elektrochemischen Zelle zur Kapazitiven Deionisation (CDI)

Die CDI-Zelle wurde an ein FPLC-System (*Fast Protein Liquid Chromatography*, Äkta, GE) angeschlossen und unter Fluss ($1 \text{ ml min}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) befüllt. Dann wurde die Zelle durchströmt, bis zur Anzeige eines konstanten Signals der angeschlossenen Leitfähigkeits-, pH- und

UV/vis-Detektoren. Anschließend wurde der Fluss auf den entsprechenden Arbeitspuffer, 1 mM Tris-HCl 10 mM NaCl, pH 7,8, umgestellt und erneut bis zur Signalkonstanz abgewartet. Mit Hilfe des Programmes Gamry Framework wurde ein programmierter Ablauf zum Anlegen konstanter Stromstärken zwischen 0 und 20 mA sowie ein geeignetes Ablaufprogramm der Durchströmung durch das Äkta-System inklusive einer Markierung bei Änderungen des Stromflusses erstellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass in den einzelnen Parametereinstellungen stets gegen Ende ein stationärer Zustand erreicht wurde, das heißt keine weitere Änderung des pH-Wertes stattfand. Des Weiteren folgte auf jede Phase mit aktivem Stromfluss für die Dauer von 15-20 min eine Phase der Regeneration, in der die Zelle bei einem vorgegeben Stromfluss von 0 mA durchströmt wurde. Bei der Programmierung der Stromstärken wurde abwechselnd eine positive gefolgt von einer negativen Stromrichtung gewählt. Durch die Umkehr der Stromrichtung wird das kapazitive Elektrodenmaterial während einer Phase zunächst immer entladen und dann mit Ladungsträgern mit umgekehrten Vorzeichen wieder aufgeladen. Hierdurch wird die nutzbare Kapazität des Elektrodenmaterials maximiert.

Um einen möglichst großen pH-Bereich abzudecken, wurden die folgenden Stromstärken für jeweils 20 min auf das System geschaltet und dabei die entstehenden Spannungsverläufe durch den Potentiostat aufgezeichnet. Zuvor wurde ein Vorlauf von 20 min bei 1 ml min⁻¹ und 0 mA eingehalten. Danach wurden folgende konstante Stromstärken für jeweils 20 min angelegt (alle Stromstärken in mA): 1, -1, 2, -2, 3, -3, 4, -4, 5, -5, 6, -6, 7, -7, 8, -8, 9, -9, 10, -10, 11, -11. Dazwischen wurden das System ohne Strom anzulegen für 20 min mit Wasser gespült. Während eines konstanten Flusses von 1 ml min⁻¹ wurden zusätzlich durch das FPLC-System die Leitfähigkeit, UV^{280nm} und der pH-Wert erfasst und aufgezeichnet.

3.9.3. Miniaturisierung des pH-Moduls

Da der zunächst zur Generierung der pH-Änderung verwendete Elektrodenaufbau im Vergleich zum Enzymtransformationsmodul überdimensioniert war, wurde eine miniaturisierte Form der Zelle konstruiert, welche sich von den Dimensionen her in das Reaktorsystem einfügt und somit zwischen die einzelnen Enzymtransformationsmodule geschaltet werden kann.

3.9.4. Messung der Verweilzeit des miniaturisierten pH-Moduls

Zur Messung der Verweilzeit des miniaturisierten pH-Moduls wurde dieses an eine FPLC-Anlage angeschlossen (ÄktaPurifier, GE) und zunächst mit destilliertem Wasser durchspült, bis sämtliche Output-Signale konstant waren. Der Tracer wurde in Form eines Step-Experiments aufgegeben, das heißt nach einem definierten Zeitpunkt t wurde der Fluss vom destillierten Wasser auf 1 M NaCl-Lösung umgestellt und die Änderungen im Leitfähigkeitssignal bis zum Erreichen eines konstanten Maximalwertes nachverfolgt. Anschließend wurde das Modul mit destilliertem Wasser gespült, bis alles Salz aus dem Reaktor entfernt war. Das Step-Experiment wurde mit den Flussraten 1 ml min^{-1} , $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, $0,25 \text{ ml min}^{-1}$ und $0,1 \text{ ml min}^{-1}$ durchgeführt.

3.9.5. pH-Regulierung unter Einsatz des miniaturisierten pH-Moduls

Um die pH-Änderungen, welche das miniaturisierte pH-Modul erzeugen kann zu charakterisieren, wurde es bei einer Flussrate von 1 ml min^{-1} mit 1 mM Tris-HCl 10 mM NaCl pH 7,5 durchströmt. Es wurden analog zum Versuch mit der CDI-Zelle verschiedene positive und negative Ströme angelegt. Da die Elektrodenfläche im Vergleich zur CDI-Zelle kleiner ist, wurden kleinere Stromstärken zwischen -4 und 4 mA gewählt. Zunächst wurde ein Vorlauf von 20 min bei 1 ml min^{-1} und 0 mA eingehalten. Danach wurden folgende konstante Stromstärken für jeweils 20 min angelegt (alle Stromstärken in mA): 0,5; -0,5; 1,0; -1,0; 1,5; -1,5; 2,0; -2,0; 2,5; -2,5; 3,0; -3,0; 3,5; -3,5; 4,0; -4,0. Dazwischen wurden das System ohne Strom anzulegen für 20 min mit Wasser gespült. Der pH-Wert wurde vom Äkta-System erfasst und aufgezeichnet.

Um zu untersuchen, welche pH-Einstellungen möglich sind, wenn das Modul mit Substratlösung durchströmt wird, wurde diese ($1,35 \text{ g l}^{-1}$ ABTS und 25 g l^{-1} D-Glucose in 20 mM Kaliumcitratpuffer pH 4,0, 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt) mit einer Flussrate von 1 ml min^{-1} durch das Modul geleitet und verschiedene konstante Spannungen auf die Elektroden geschaltet. Zuvor wurde ein Vorlauf von 20 min bei 1 ml min^{-1} und 0 mA eingehalten. Danach wurden folgende konstante Stromstärken für jeweils 20 min angelegt (alle Stromstärken in mA): 0,5; -0,5; 1,0; -1,0; 1,5; -1,5; 2,0; -2,0; 2,5; -2,5; 3,0; -3,0; 3,5; -3,5;

4,0; -4,0; 6,0; -6,0; 8,0; -8,0. Dazwischen wurden das System ohne Strom anzulegen für 20 min mit Wasser gespült. Der pH-Wert wurde vom Äkta-System erfasst und aufgezeichnet.

3.10. *Proof-of-principle*: Einsatz von Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase im Reaktorsystem

Zum Nachweis der Durchführbarkeit sequentieller Bioreaktionen mittels des entwickelten modularen Systems, wurde die Modellenzymkaskade, bestehend aus Glucose Oxidase (GOx) und Meerrettichperoxidase (HRP) durch Immobilisierung der entsprechenden Enzyme in zwei Enzymtransformationsmodule und deren Verschaltung zu einem Gesamtsystem umgesetzt.

3.10.1. Umsatz von D-(+)-Glucose und Tetramethylbenzidin durch Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase in einem sequentiellen Kaskadensystem

Als Reaktionslösung wurde eine Wasserstoffperoxid-freie Tetramethylbenzidin-Substratlösung verwendet. Dafür wurde die TMB-Substratlösung (KPL) 1:4 mit destilliertem Wasser verdünnt und mit 72 mg ml^{-1} D-(+)-Glucose versetzt.

Anschließend wurde folgendes Programm in Form eines Stop-Flow-Experimentes durchgeführt: Die in Reihe geschalteten Enzymtransformationsmodule wurden mit jeweils 20 ml Substratlösung bei $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ durchströmt. Anschließend wurde der Fluss für einige Zeit gestoppt und nach Ablauf der Inkubation wieder auf $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ geschaltet. Nach weiteren 20 ml Substratlösung erfolgte das nächste Abstoppen des Flusses. Die Unterbrechungszeiten betragen dabei 5; 10; 20; 40 und 60 min. Anschließend wurde das System mit Puffer gespült.

Zur Auswertung wurden die Flächen des Signals ab der Basislinie integriert und gegen die Inkubationszeit aufgetragen.

3.10.2. Umsatz von D-(+)-Glucose und 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) durch Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase implementiert im entwickelten Reaktorsystem

Beim 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) handelt es sich um einen Redoxindikator und ein Peroxidasesubstrat von hellgrüner Farbe, welches zu einem dunkelgrünen bis tiefblauen Farbstoff umgesetzt wird, der in oxidativem wässrigen Millieu stabil ist.

Für die Reaktionslösung wurde 0,02 M Natriumcitrat-Puffer mit HCl auf pH 4,0 eingestellt und mit 1,35 mg ml⁻¹ ABTS und 25 mg ml⁻¹ D-(+)-Glucose versetzt. Die hellgrüne Reaktionslösung wurde mit Alufolie vor Licht geschützt. Die Absorptionsmessung des sich bildenden blauen Farbstoffes erfolgte bei 450 nm.

Das Stop-Flow-Experiment wurde analog zum Experiment mit TMB bei Raumtemperatur durchgeführt. Die in Reihe geschalteten Enzymtransformationsmodule wurden mit jeweils 20 ml Substratlösung bei 0,5 ml min⁻¹ durchströmt. Anschließend wurde der Fluss für einige Zeit gestoppt und nach Ablauf der Inkubation wieder auf 0,5 ml min⁻¹ geschaltet. Nach weiteren 20 ml Substratlösung erfolgte das nächste Abstoppen des Flusses. Die Unterbrechungszeiten betragen dabei 5; 10; 20; 40 und 60 min. Zum Schluss wurde das System mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 6,0 gespült, bis aller Farbstoff aus dem System gespült war.

3.10.3. Temperaturabhängigkeit der Glucose Oxidase

Um die Temperaturabhängigkeit der Aktivität des Enzyms Glucose Oxidase zu untersuchen, wurde das entsprechende Enzymtransformationsmodul in die Temperiereinheit platziert und bei einer Flussrate von 2 ml min⁻¹ auf Temperaturen zwischen 15 und 40° C temperiert, bis zur Ausbildung eines konstanten Absorptionssignals. Für die Auswertung wurde die maximale gemessene Absorbanz als Maximalwert angenommen (100%) und die gemessenen Signale hierauf normiert. Zur Übersicht wurden die prozentualen Absorbanzen gegen die eingesetzte Temperatur aufgetragen. Dabei wurde der Basisextinktionswert bei Durchströmen der Substratlösung über den Bypass der Äkta-Anlage von allen Messwerten abgezogen.

3.10.4. pH-Abhängigkeit der Glucose Oxidase

Um die Abhängigkeit der Glucose Oxidase auf unterschiedliche pH-Werte zu untersuchen, wurde das pH-Kontrollmodul vor die in Reihe geschalteten Module der Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase geschaltet und mit einer 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnten Substratlösung bei einer konstanten Flussrate von 1 ml min^{-1} durchströmt. Zuvor wurde ein Vorlauf von 20 min bei 1 ml min^{-1} und 0 mA eingehalten. Danach wurden folgende konstante Stromstärken für jeweils 20 min angelegt (alle Stromstärken in mA): 0,5; -0,5; 1,0; -1,0; 1,5; -1,5; 2,5; -2,5; 3,0; -3,0; 4,0; -4,0. Dazwischen wurden das System ohne Strom anzulegen für 20 min mit Wasser gespült.

Der pH-Wert sowie die Absorptionen bei 400, 500 und 600 nm wurden am Ausfluss des HRP-Enzymtransformationsmoduls gemessen.

4. Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel sind die wichtigsten Ergebnisse, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielt wurden, dargestellt und erläutert. Die Diskussion der Ergebnisse sowie die Einordnung in den aktuellen Stand der Technik schließen sich ebenso an wie der Vergleich mit weiteren aktuellen Systemen. Teile der Ergebnisse wurden bereits in der Fachzeitschrift *Analytical Methods* der Royal Society of Chemistry veröffentlicht und sind daher basierend auf diesem Artikel frei übersetzt.

4.1. Immobilisierung von Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase

Der folgende Abschnitt erläutert die Ergebnisse der untersuchten Immobilisierungsverfahren von Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase an funktionalisierte magnetische Polyvinylalkohol-Mikropartikel sowie an die Oberflächen des 3D-Druckmaterials.

4.1.1. Immobilisierung an Magnetpartikel

Aufgrund ihres einfacheren Handlings dienten die Magnetpartikel als Modelloberfläche für das 3D-Druckmaterial, welches ebenfalls Carboxylgruppen an der Oberfläche aufweist. Die 3D-gedruckten Plättchen weisen eine verhältnismäßig geringe spezifische Oberfläche auf, weshalb verglichen mit Magnetpartikeln mit hoher spezifischer Oberfläche, nur eine geringe Menge an Protein gebunden werden kann. Da die Quantifizierung des gebundenen Proteins indirekt, das heißt über die nicht gebundene Proteinmasse im Überstand erfolgt, wirkt eine hohe spezifischer Oberfläche auf die Generation valider Ergebnisse vereinfachend. Daher wurde die Optimierung der Enzymimmobilisierung an carboxy-funktionalisierten Magnetpartikeln durchgeführt. Ein Teil der Ergebnisse wurde 2015 in der Fachzeitschrift *Analytical Methods* veröffentlicht[74].

4.1.1.1. Adsorptionsisothermen der Modellenzyme an carboxy-funktionalisierte Magnetpartikel

Um die physikalisch maximal mögliche Enzymbindung für Glucose Oxidase (GOx) und die Meerrettichperoxidase (HRP) an die carboxylierten M-PVA-Partikel zu bestimmen, wurden zunächst Adsorptionsisothermen bei 21° C (Raumtemperatur) gemessen und eine Anpassung der Langmuirparameter maximale Beladung (q_{\max}) und Sorptionskoeffizient (K_L) mittels nicht-linearer Regression durchgeführt (Abbildung 13).

Der q_{\max} -Wert für Glucose Oxidase ist dabei mit ca. 38 mg GOx pro g Partikel um den Faktor 1,6 größer, als der Wert von 24 mg HRP pro g Partikel für die Meerrettichperoxidase. Dies kann auf verschiedene Faktoren zurückgeführt werden. Zu allererst zu nennen ist die unterschiedliche Größe der beiden Enzyme. Während die HRP eine molare Masse von 44 kDa (= 44 000 g mol⁻¹) aufweist, ist die GOx mit 160 kDa (=160 000 g mol⁻¹) und einer tetrameren Struktur fast um Faktor 4 schwerer. Dies wirkt sich zum einen auch auf die Größe des Enzyms und damit auf den Platzbedarf bei Bindung an eine Oberfläche aus, zum anderen aber in noch stärkerem Maße auf das Volumen und damit die Masse des gebundenen Enzyms. Ein höhere Maximalbeladung des Enzyms GOx ist daher bereits aufgrund seines größeren Molekulargewichts zu erwarten. Des Weiteren können sich Enzyme in ihrer Form stark unterscheiden. Ovale oder langgezogene Formen können eine dichtere oder weniger dichte Packung an der Oberfläche erzeugen, als beispielsweise Kugeln. Da bei der komplexen Tertiär- und Quartärstruktur von Enzymen komplexe irreguläre Formen erzeugt werden, spielt dieser Faktor gegenüber der vereinfachten Betrachtung mit sphärischer Geometrie eine bedeutende Rolle. Ebenfalls einen wichtigen Einfluss hat die Oberflächenladung der Enzyme, welche von der Aminosäuresequenz und den funktionellen Seitenketten der Aminosäuren als Grundbausteine abhängen.

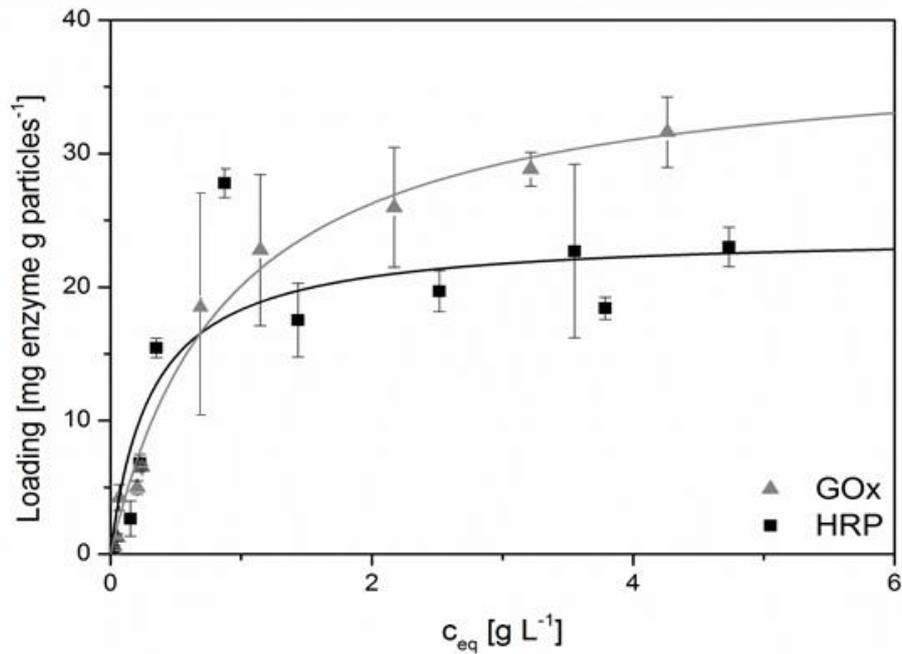


Abbildung 13: Adsorptionsisothermen (21° C, Raumtemperatur) für Glucose Oxidase (GOx) und Meerrettichperoxidase (HRP) auf carboxylierte Polyvinylalkohol-Mikropartikel und nicht-lineare Regression mit Hilfe der Langmuir-Gleichung zur Bestimmung von q_{\max} und K_L .

Die Werte für die maximale Beladung und die Sorptionskoeffizienten sowie deren Standardabweichungen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Maximale Beladung (q_{\max}) und Sorptionskoeffizienten (K_L) bestimmt durch Anpassung der Adsorptionswerte der Enzyme GOx und HRP auf carboxylierten M-PVA-Mikropartikeln an eine Langmuirisotherme mittels nicht-linearer Regression.

Enzym	q_{\max} [mg Enzym g Partikel ⁻¹]	K_L [L g ⁻¹]
Glucose Oxidase	$37,9 \pm 6,6$	$1,1 \pm 0,1$
Meerrettichperoxidase	$24,0 \pm 3,2$	$3,2 \pm 1,9$

4.1.1.2. Kovalente Immobilisierung der Modellenzyme mittels EDC an Magnetpartikel

Da sowohl M-PVA C22-Partikel als auch die Oberfläche des 3D-Druckmaterials Carboxylgruppen an ihrer Oberfläche enthalten, wurden die Partikel als leicht handhabbares Trägermaterial eingesetzt, um das Protokoll zur Immobilisierung von HRP und GOx mittels EDC zu etablieren und zu optimieren.

Optimierung des pH-Wertes im Kopplungsschritt

Der Aktivierungsschritt des zweistufigen Kopplungsprotokolls wurde bereits 2014 von Morhardt *et al.* mit Hilfe eines Design-of-Experiments (DoE)-Ansatzes optimiert[27]. Da dieser Schritt unabhängig vom verwendeten Enzym stattfindet, wurde er unverändert übernommen und lediglich der Enzym-Kopplungsschritt optimiert. Erste Experimente zeigten, dass die Dauer (untersucht zwischen 2 und 25 h) und die Temperatur des Kopplungsschrittes (untersucht zwischen 11° und 25° C) keinen Einfluss auf die Aktivität und Bindungsausbeute haben (Daten siehe Anhang).

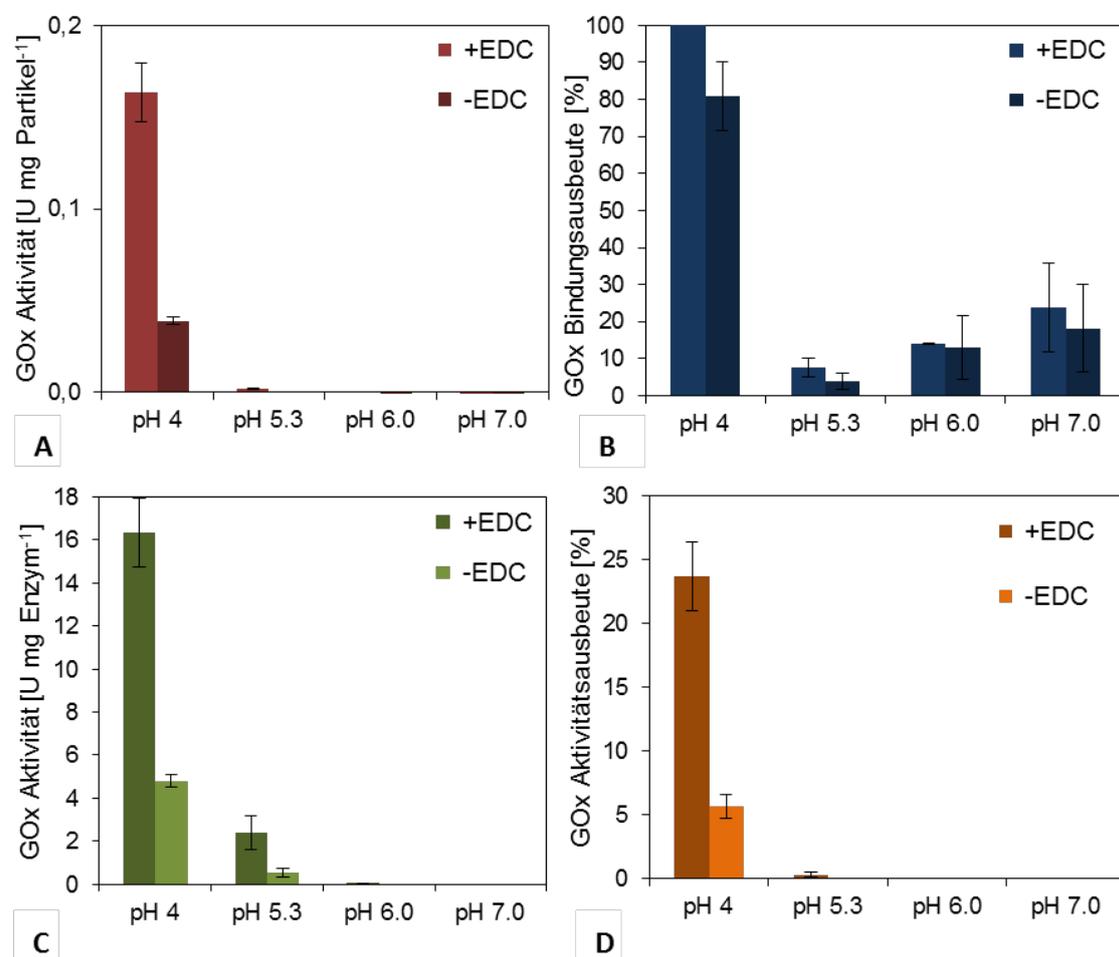


Abbildung 14: A: Effekt des pH-Wertes auf die spezifische Aktivität von Glucose Oxidase-Immobilisaten. B: Bindungsausbeute während des Immobilisierungsprozesses, Kopplungsparameter: 10 mg GOx g Partikel⁻¹, 2 h Inkubation bei 25° C. C: Aktivität immobilisierter GOx. D: Aktivitätsausbeute immobilisierter GOx im Vergleich zu freiem Enzym. Aus [74], mit freundlicher Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

Der pH-Wert während der Enzymanbindung wurde variiert und die resultierende Aktivität der Partikelsuspension wurde gemessen. Für GOx konnte klar gezeigt werden, dass eine Verringerung des pH-Wertes von 7,1 auf 4,0 zu einer signifikanten Erhöhung der spezifischen Aktivität der Immobilisate führt (Abbildung 14A). Eine Erniedrigung des pH-Wertes resultierte auch in einer erhöhten Aktivität der Kontrollpartikel, an welche das Enzym rein physikalisch adsorbiert wurde. Jedoch zeigten Partikel mit chemisch gebundenem Enzym (+EDC) eine mehr als 3,2-fache Aktivität gegenüber den Kontrollpartikeln (-EDC). Um die Ursache dieses Verhaltens näher zu untersuchen, wurde die Masse des gebundenem Enzym bestimmt, indem die Überstände von Kopplungs- und Waschschritten mittels BCA-Assay auf ihren Proteingehalt untersucht wurden. Dadurch konnte die Bindungsausbeute berechnet werden (Abbildung 14B). Bei einem pH-Wert von 7,0 banden lediglich 23% der zugegebenen Enzyme an die Partikel, während bei einem pH-Wert von 4,0 kein Enzym im Überstand detektiert werden konnte (100% Bindungsausbeute). Interessanterweise steigt die Bindungsausbeute im Laufe der pH-Senkung nicht stetig an, sondern zeigt Werte von ca. 14% (pH 6,0) und 8% (pH 5,3). Der Unterschied in der Bindungsausbeute zwischen kovalent gebundenen Proben (+EDC) und Kontrollproben (-EDC) war nicht signifikant. Zusammen mit der Erkenntnis, dass die Enzymaktivität der Kontrollproben um Faktor 3,2 geringer ist, deutet dies darauf hin, dass die kovalent gebundenen Enzyme während des Immobilisierungsprozesses stabilisiert werden und die Aktivität den Prozess besser überdauern. Dieser Effekt kann weiter hervorgehoben werden, indem die GOx-Aktivität [U mg enzyme⁻¹] für adsorptiv und kovalent gebundene Proben verglichen wird. Während für die pH-Werte 5,3; 6,0 und 7,0 wenig oder praktisch keine Aktivität detektiertbar ist, kann für die chemisch gebundene GOx bei pH 4,0 ein 4-fach höherer Aktivitätswert als für die Kontrollprobe detektiert werden (Abbildung 14C). Dies betont erneut die Wichtigkeit der kovalenten Bindung für die Aktivität der Glucose Oxidase. Für die Immobilisierung von 10 mg GOx pro g funktionalisierter M-PVA C22-Partikel konnte für pH 4 eine maximale Aktivitätsausbeute von ca. 24% erreicht werden, während bei Beginn der Experimente unter Nutzung des publizierten Protokolls quasi keine Aktivität nachweisbar war.

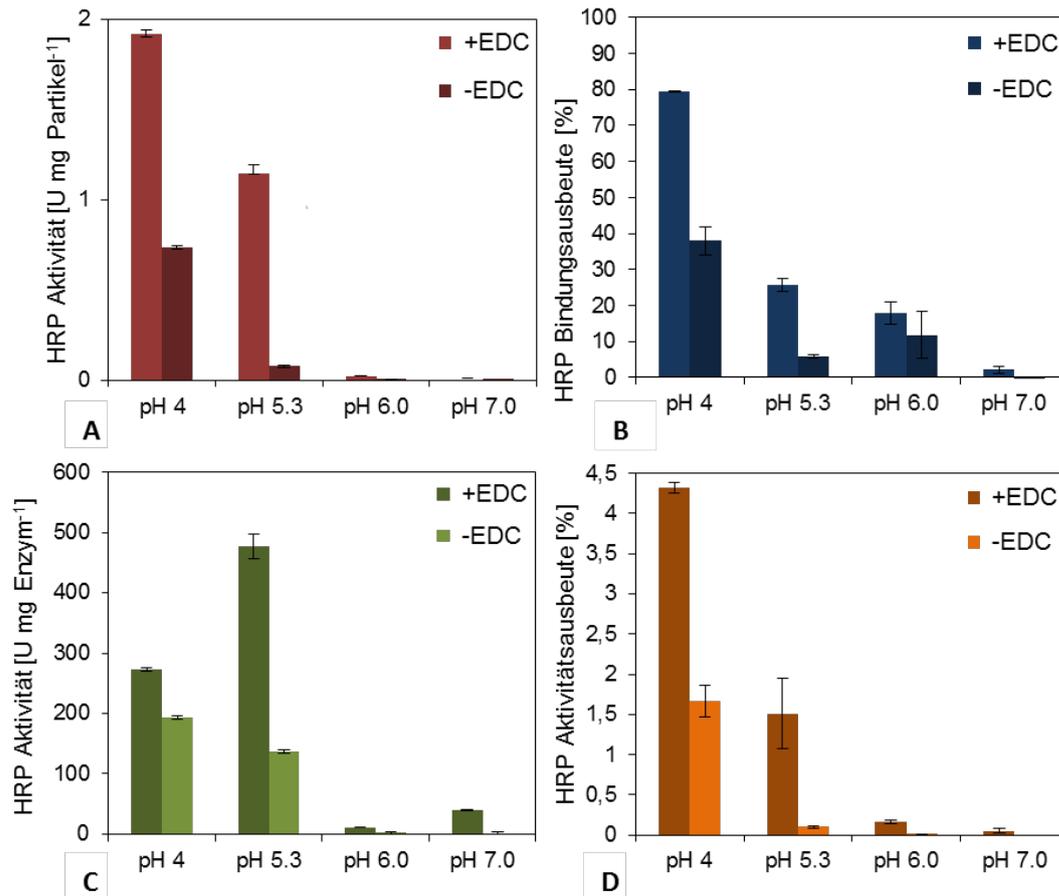


Abbildung 15: A: Effekt des pH-Wertes auf die spezifische Aktivität von HRP-Immobilisaten. B: Bindungsausbeute während des Immobilisierungsprozesses. C: Aktivität immobilisierter Meerrettich Peroxidase. D: Aktivitätsausbeute immobilisierter HRP verglichen mit freiem Enzym. Kopplungsparameter: 10 mg HRP pro g Partikel, 2h Inkubation bei 25° C. Aus [74], mit freundlicher Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

Das zweite Modellenzym, Meerrettichperoxidase, zeigte in vielen Aspekten ein vergleichbares Verhalten (Abbildung 15). Bei einem pH-Wert von 7,0 konnte eine spezifische Aktivität von ungefähr 0,09 U mg Partikel⁻¹ für kovalente Bindung mittels EDC gemessen werden. Nachdem der pH-Wert auf 4,0 abgesenkt wurde, konnte die spezifische Aktivität auf einen Wert von 1,9 U mg Partikel⁻¹ erhöht werden. Die Bindungsausbeute bei pH 7,0 lag bei lediglich 2,5% und konnte bei pH 4,0 auf über 80% erhöht werden. Eine Einstellung des pH-Wertes auf 6,0 führte zu einer Bindungsausbeute von 18%, eine Einstellung auf pH 5,3 zu 58%. Adsorptive Enzymbindung (-EDC) konnte für alle pH-Werte beobachtet werden und betrug ca. 30-50% verglichen zu kovalenter Bindung (+EDC). Jedoch war die Aktivität von physikalisch gebundenem Enzym nicht so hoch, wie die von chemisch gebundener HRP, was auch im Falle der HRP die Wichtigkeit einer chemischen Bindung zur Stabilisierung der Enzyme während des Immobilisierungsprozesses betont. Abbildung 15C zeigt die Aktivität

der immobilisierten Enzyme bezogen auf ihre Masse. Obwohl das Enzym bei pH 5.3 die höchste Aktivität zeigt, ist die Aktivitätsausbeute (Abbildung 15D) für pH 4,0 am höchsten. Dies ist darauf zurück zu führen, dass bei diesem pH-Wert die größte prozentuale Menge an Enzym an die Partikeloberfläche gebunden werden kann. Die maximale Aktivitätsausbeute beträgt damit 4,5% für kovalent gebundene und 1,5% für adsorbierte HRP.

Diese Ergebnisse zeigen, dass für beide Enzyme die allgemein empfohlenen Konditionen nicht optimal sind und dass die Ausbeuten an gebundener Masse und Aktivität rein durch die Anpassung des pH-Wertes während des Kopplungsschrittes deutlich erhöht werden konnten. Wie aus dem Verlaufstrend der Bindungsausbeute erkannt werden kann, beeinflusst der pH-Wert die Bindungseffizienz und damit die spezifische Aktivität der Enzym-Immobilisate. Das kann auf Ladungsphänomene an der Partikeloberfläche zurückzuführen sein. Diese hängen vom isoelektrischen Punkt (pI) des jeweiligen Enzyms ab und führen zu unterschiedlicher physikalischer Adsorption auf der Zieloberfläche bei unterschiedlichen Umgebungs-pH-Werten. In der Literatur wird oft empfohlen den pH-Wert während der Kopplung an den isoelektrischen Punkt des Proteins anzunähern, um das Auftreten geladener Gruppen an der Proteinoberfläche und damit mögliche abstoßende Effekte von gleichsinnig geladenen Oberflächen des Trägers zu vermeiden. Dies bestätigt sich für die GOx, welche eine maximale Bindungsausbeute bei pH 4,0 und laut Hersteller einen isoelektrischen Punkt von 4,2 ([75], Sigma Aldrich, Materialdatenblatt, Anhang 3) besitzt. Für HRP jedoch konnte kein derart eindeutiges Ergebnis erzielt werden. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die HRP, welche für diese Arbeit verwendet wurde, aus der Meerrettichwurzel extrahiert wurde und mindestens 7 verschiedene Isoformen beinhaltet. Laut Herstellerangaben variiert deren pI-Wert von 3,0 – 9,0 (Sigma Aldrich, Materialdatenblatt, Anhang 3).

Einfluss des Enzym/Partikel-Verhältnisses während der Immobilisierung

Da die Dichte immobilisierter Enzyme auf einer Oberfläche eine wichtige Rolle für die erreichbare spezifische Enzymaktivität spielt, wurden verschiedene Enzym/Partikel-Verhältnisse für HRP und GOx untersucht (Tabelle 10).

Tabelle 10: Einfluss der untersuchten Enzym/Partikel-Verhältnisse während der kovalenten Immobilisierung von Glucose Oxidase mittels EDC. Gelistet sind die spezifische Aktivität sowie die Ausbeute an gebundener Masse und Aktivität

Eingesetztes Enzym/Partikelverhältnis [mg GOx g Partikel ⁻¹]	Spezifische Aktivität [U mg Partikel ⁻¹]	Aktivitätsausbeute [%]	Bindungsausbeute [%]
5	0,08	14,0	100,0
10	0,16	17,2	100,0
15	0,49	34,1	67,0
20	0,5	33,1	51,8
30	0,53	25,3	32,1

Für die Glucose Oxidase bleibt die spezifische Aktivität für die kleinsten Enzym/Partikel-Verhältnisse verhältnismäßig klein. Nachdem das Verhältnis auf 15 mg GOx g Partikel⁻¹ erhöht wurde, steigt die Aktivität 3-fach im Vergleich zu 10 mg GOx g Partikel⁻¹. Bei einer weiteren Veränderung des Verhältnisses bleibt sie gleich. Jedoch beträgt die Bindungsausbeute für 15 mg GOx g Partikel⁻¹ nur 67%. Bei einer weiteren Erhöhung des Verhältnisses sinkt die Bindungsausbeute auf ca. 52% für 20 mg GOx g Partikel⁻¹ und 32% für 30 mg GOx g Partikel⁻¹. Daher ergibt sich bei Betrachtung der Relation zwischen spezifischer Aktivität und Bindungsausbeute ein Enzym/Partikel-Verhältnis von 15 mg GOx g Partikel⁻¹ als optimal, nachdem die Aktivitätsausbeute optimal ist, während mit 33% nur relativ geringe Enzymmengen während der Immobilisierung im Überstand verbleiben. Das beobachtete Maximum der Aktivitätsausbeute ist ein Indiz dafür, dass für GOx lediglich eine bestimmte maximale Menge an Enzym an die Partikel binden kann, was zu einer konstanten spezifischen Aktivität der Partikel führt, während der Rest des vorgelegten Enzyms ungebunden bleibt. Daher werden höhere Enzymeinsätze aufgrund des hohen Enzymverlustes während des Immobilisierungsschrittes nicht als ökonomisch betrachtet. Für die adsorbierte Glucose Oxidase konnten für alle Enzymeinsätze hohe Bindungsausbeuten, die mindestens 80% im Vergleich zu den kovalent gebundenen Proben betragen, beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch war die Enzymaktivität [U mg Enzym⁻¹] und die spezifische Enzymaktivität [U mg Partikel⁻¹] jeweils signifikant geringer, was wiederum die Wichtigkeit der kovalenten Bindung bei der Immobilisierung von GOx betont.

Tabelle 11: Einfluss der untersuchten Enzym/Partikel-Verhältnisse während der kovalenten Immobilisierung von Meerrettichperoxidase mittels EDC. Gelistet sind die spezifische Aktivität sowie die Ausbeuten an gebundener Masse und Aktivität

Eingesetztes Enzym/Partikelverhältnis [mg GOx g Partikel ⁻¹]	Spezifische Aktivität [U mg Partikel ⁻¹]	Aktivitätsausbeute [%]	Bindungsausbeute [%]
5	1,26	6,5	100,0
10	1,91	4,3	79,4
15	2,31	4,0	41,0
20	2,60	3,4	32,2
30	1,89	1,5	21,9

Für die Meerrettichperoxidase konnte ein Maximum an spezifischer Aktivität (2,6 U mg Partikel⁻¹) für 20 mg HRP g Partikel⁻¹ nachgewiesen werden (Tabelle 11). Nachdem das Beladungsverhältnis weiter erhöht wurde, verminderte sich die spezifische Aktivität auf 1,89 U mg Partikel⁻¹ für 30 mg HRP g Partikel⁻¹. Dieser Effekt könnte darauf zurück zu führen sein, dass die Enzymdichte bei 30 mg HRP g Partikel⁻¹ zu hoch für eine gute Substratzugänglichkeit und Enzymflexibilität während des Konversionsprozesses ist. Eine optimale Aktivitätsausbeute im Vergleich zu freiem Enzym von 6,5% konnte für die geringste Enzymbeladung von 5 mg Enzym g Partikel⁻¹ detektiert werden. Wurde das anfängliche Beladungsverhältnis erhöht, senkte sich die Ausbeute auf bis zu 1,5%. Um weiterhin die Ausbeute an gebundenem Enzym zu untersuchen, wurden die Überstände auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass lediglich für die geringste Beladung (5 mg HRP g Partikel⁻¹) eine Bindungsausbeute von 100% zu verzeichnen ist. Die Bindungsausbeute sank, wenn das Beladungsverhältnis weiter erhöht wurde (79% für 10 mg HRP g Partikel⁻¹, 41% für 15 mg HRP g Partikel⁻¹, 32% für 20 mg HRP g Partikel⁻¹ und 21% für 30 mg HRP g Partikel⁻¹). Die Bindungsausbeuten für adsorptiv gebundenes Enzym waren jeweils signifikant geringer, als für kovalent gebundenes Enzym. Darüber hinaus resultierte eine physikalische Adsorption in weitaus geringeren Aktivitätswerten.

Obwohl die Beladung von 5 mg HRP g Partikel⁻¹ in der höchsten Aktivitätsausbeute resultierte, war die allgemeine spezifische Aktivität vergleichsweise gering. Daher wurde für weitere Experimente eine Beladung von 10-15 mg HRP g Partikel⁻¹ als ideal betrachtet.

4.1.1.3. *Recycling Experimente*

Um die Wichtigkeit einer kovalenten Bindung während der Immobilisierung von HRP zu verdeutlichen, wurden Recycling Experimente durchgeführt.

Dabei zeigten die chemisch gebundenen Proben eine weitaus bessere Wiederverwendbarkeit als Proben, in welchen die HRP nur physikalisch adsorbiert wurde. Im letzteren Fall war die Aktivität bereits nach dem ersten Wiederverwendungszyklus nahezu vollständig verloren (Abbildung 16). Im Gegensatz dazu konnte die Aktivität der chemisch gebundenen Enzyme für mindestens 6 Zyklen mit mehr als 30% der Ausgangsaktivität erhalten werden. Der Verlust von 70% kann zumindest teilweise auf einen Anteil physikalisch adsorbierten Enzyms zurückzuführen sein, welcher während der Wiederverwendungszyklen desorbierte. Obwohl Beispiele einer stabilen adsorptiven Bindung an Magnetpartikel in der Literatur existieren[76], zeigen diese Ergebnisse zumindest für HRP die Wichtigkeit einer stabilen kovalenten Bindung bei der Immobilisierung. Die teilweise höheren Standardabweichungen der Recycling-Experimente können auf die kleinen Mengen an Enzymimmobilisat während der Versuchsdurchführung zurückgeführt werden. Weil Partikel während des Recyclingprozesses leicht irreversibel an die Pipettenspitze adsorbieren können, nimmt die Partikelmasse im Laufe der Zyklen ab. Jedoch konnte durch andere Arbeiten mit größeren Volumina und höheren Partikelkonzentrationen bereits gezeigt werden, dass die Wiederverwendung von magnetischen Enzym-Partikel-Immobilisaten in einer Reihe konsistenter Werte über mehr als 20 Zyklen resultiert[27].

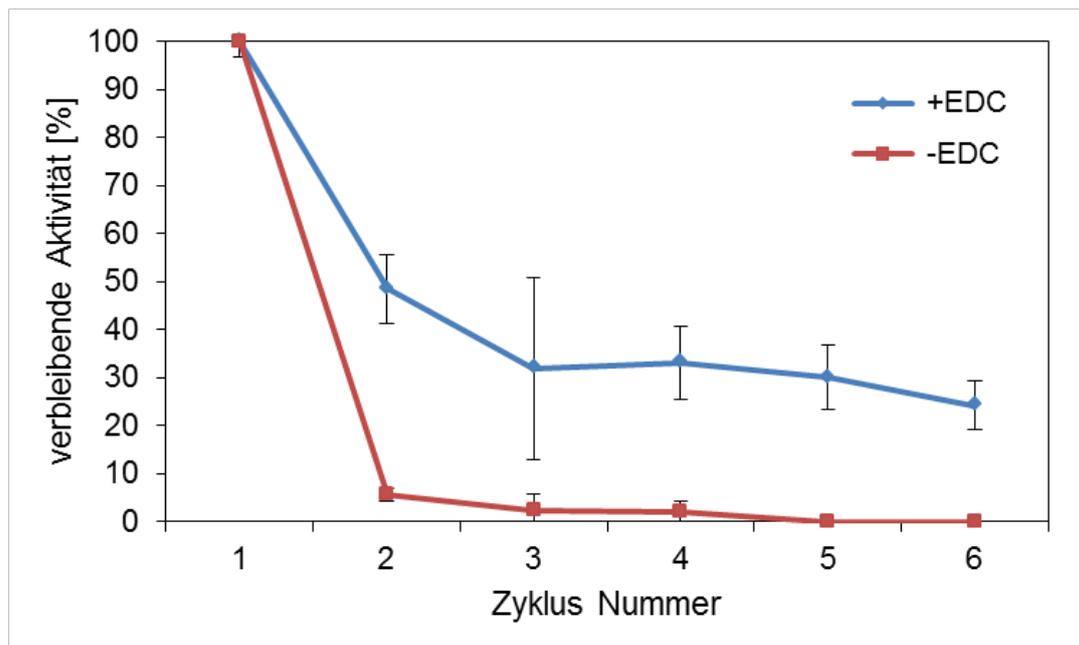


Abbildung 16: Recycling von HRP-Partikel-Komplexen im Rahmen wiederholter Biotransformationsschritte. Dabei nimmt die Aktivität der kovalent gebundenen Meerrettichperoxidase (+EDC) auch zunächst auf ca-30% der Ausgangsaktivität ab und bleibt dann konstant, während im Fall des adsorptiv gebundenen Enzyms bereits nach einem Zyklus weniger als 5% Anfangsaktivität nachzuweisen sind. Kopplungsparameter: 10 mg HRP pro g Partikel, 2h Inkubation bei 25° C. Aus [74], mit freundlicher Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

4.1.1.4. *Untersuchung der Gründe für den Aktivitätsverlust bei der Immobilisierung*

Verglichen mit der Aktivität von freiem Enzym konnten während der Enzymimmobilisierung Aktivitätsausbeuten bis zu 6,5% für Meerrettichperoxidase (5 mg g Partikel⁻¹ bei pH 4,0) und bis zu 35% für Glucose Oxidase (15 mg g Partikel⁻¹ bei pH 4,0) erreicht werden. Um die Gründe für die teilweise Inaktivierung besser nachvollziehen zu können, wurde der Einfluss des Immobilisierungsprozesses selbst untersucht, indem die Prozedur ohne Partikel bzw. unter Zugabe carboxy-funktionalisierter aber nicht aktivierter Partikel durchgeführt wurde. Die Aktivitätswerte wurden vor und nach dem Prozess gemessen und die Aktivität der freien Enzyme bezogen auf ihre Masse [U mg Enzym⁻¹] wurde berechnet. Um die Menge an Enzym, welche während des Prozesses an die Partikel adsorbiert zu berücksichtigen, wurde die Enzymkonzentration vor und nach dem Prozess mittels BCA-Assay bestimmt und die Aktivität auf die tatsächliche Enzymkonzentration bezogen. Für GOx konnten keine inaktivierenden Effekte durch die Partikel oder den pH-Wert während des Prozesses detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass die geringere Aktivität für adsorbierte GOx nicht auf den kurzzeitigen Kontakt mit der Partikeloberfläche oder die verschiedenen eingesetzten pH-Werte zurückzuführen ist. Die beobachtete partielle

Inaktivierung adsorbierter GOx scheint daher ihren Ursprung in sterischen Behinderungen sowie eventuellen Änderungen in der Enzymstruktur nach einer langanhaltenden Anhaftung an die Oberfläche zu haben.

Für die Meerrettichperoxidase konnte gezeigt werden, dass ausgenommen von pH 4,0, selbst ohne Kontakt mit Magnetpartikeln eine Inaktivierung durch die Versuchsbedingungen des Immobilisierungsprozesses stattfindet (Abbildung 17). Dies deutet auf eine Anfälligkeit des Enzyms gegenüber höheren pH-Werten während des Kopplungsprozesses hin. Der Grad der Inaktivierung wird weiter erhöht, wenn Partikel der Lösung zugegeben werden. Dies kann auf den reversiblen Adsorptions-/Desorptionsprozess an den Partikeln, welcher die Enzymstabilität negativ beeinflusst, zurückzuführen sein. Auch in den Experimenten mit variierenden pH-Werten und Enzym/Partikel-Verhältnissen konnte gezeigt werden, dass adsorptiv gebundenes Protein keine vergleichbar hohe Aktivität wie kovalent gebundenes Enzym zeigt.

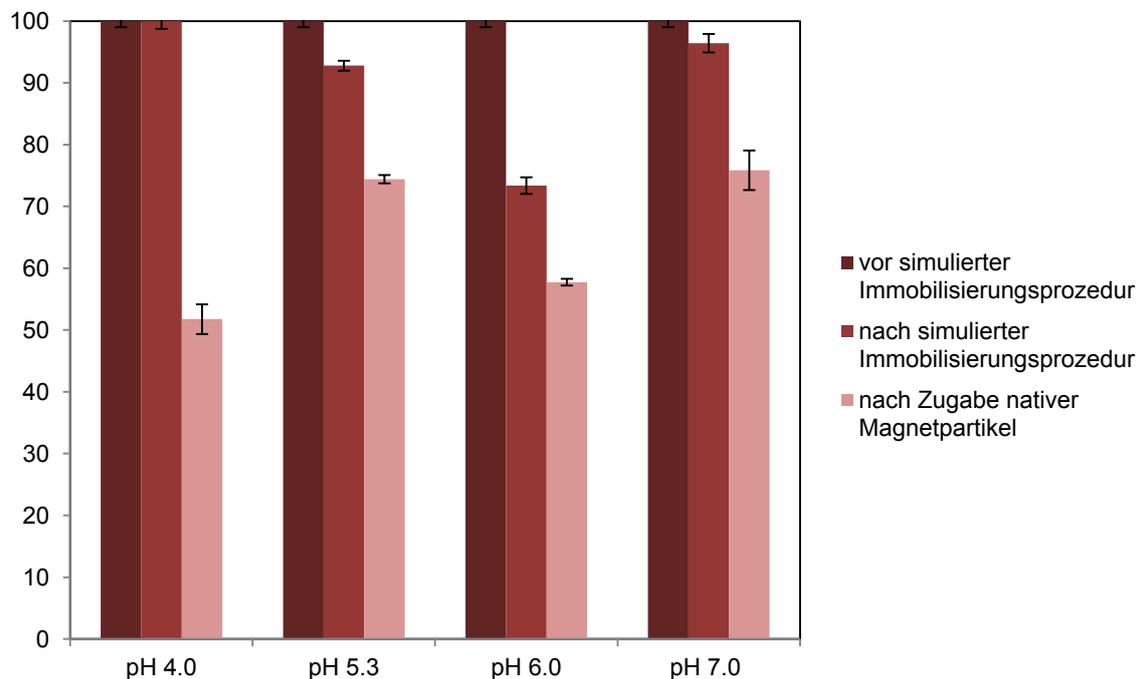


Abbildung 17: Spezifische Aktivität der freien HRP vor Durchführung der Immobilisierungsprozedur (dunkelrot), nach Durchführung der Immobilisierungsprozedur ohne (rot) und mit nativen Magnetpartikeln (hellrot). Es konnte gezeigt werden, dass bereits die simulierte Immobilisierungsprozedur für alle untersuchten pH-Werte außer 4,0 zu einer signifikanten Aktivitätsverminderung führt. Dieser Effekt wird durch die Zugabe nativer Magnetpartikel verstärkt. Die Aktivitäten sind auf die jeweilige Proteinkonzentration normiert, um konzentrationsbedingte Änderungen durch Adsorption an Oberflächen auszuschließen. Aus[74], mit freundlicher Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

4.1.1.5. Diskussion der Ergebnisse zur Enzymimmobilisierung im Kontext der Literatur

Die Immobilisierung von Proteinen an funktionalisierte Magnetpartikel wurde von vielen anderen Forschungsgruppen zu unterschiedlichen Zwecken, beispielsweise in der Grundlagenforschung oder als diagnostische Hilfsmittel eingesetzt. In der Literatur sind Veröffentlichungen zu finden, die eine Enzymimmobilisierung direkt an Magnetit oder an Polymer-beschichtete Magnetitpartikel mit speziellen Funktionalitäten beschreiben. Um die Bedeutung der chemischen Vernetzung von Enzymen an magnetische Träger zu beleuchten, wurde eine Literaturrecherche durchgeführt und die Ergebnisse mit eigenen Befunden verglichen. Tabelle 12 zeigt einen Überblick über ausgesuchte Arbeiten und spezifiziert die jeweilige Immobilisierungsmethode sowie den pH-Wert, welcher im Kopplungsschritt genutzt wurde. Darüber hinaus werden der isoelektrische Punkt (pI) und das Molekulargewicht der Zielproteine sowie die Ausbeuten in Aktivität und gebundener Masse, sofern verfügbar, aufgelistet. Das Publikationsdatum reicht von den frühen 1970ern bis zum aktuellen Stand der Forschung, was die lange Geschichte der Enzymimmobilisierung an magnetische Träger betont. Bei den meisten verwendeten Enzymen handelt es sich um technische Enzyme, beispielsweise Invertase[77, 78] und Lipase[76, 79, 80], welche in industriellen Prozessen ihren Einsatz finden sollen. Andere Enzyme, wie zum Beispiel die Cholesterol Esterase[81] dienen sensorischen Zwecken. Unter den vernetzenden Chemikalien finden sich hauptsächlich Carbodiimide[77, 80-85], aber auch Glutaraldehyd zum Crosslinking von Aminogruppen[78, 86] und physikalische Bindekräfte[76] werden zur Ausbildung der Enzym-Träger-Komplexe genutzt. Der pH-Wert während der Enzymkopplung reicht von 4,0 bis 8,0. Der isoelektrische Punkt der verwendeten Proteine variiert ebenfalls deutlich und reicht von 3,8 (Hefe-Invertase) bis zu 10,8 (Bovines Serumalbumin (BSA)). Oft wird in Protokollen empfohlen, den pH-Wert während des Kopplungsvorganges an den isoelektrischen Punkt des Zielproteins anzugleichen, um die Proteinladung und damit die elektrostatische Wechselwirkung mit der Zieloberfläche zu minimieren. In vier der zitierten Publikationen ist der pH-Wert an den pI-Wert angepasst ($\Delta\text{pH} \leq 1$)[83, 86-88], in den anderen weicht er um mehr als eine pH-Stufe ab. Allerdings variiert die Bindungsausbeute zwischen diesen beiden Gruppen nicht signifikant. Tatsächlich sind alle beschriebenen Bindungsausbeuten vergleichsweise hoch und belegen die Effizienz der Nutzung chemischer Quervernetzer bei der Immobilisierung von Enzymen an magnetische Trägerstoffe. Die

Aktivitätsausbeuten rangieren in einem Bereich von <10%[27] bis hin zu mehr als 100%[80, 81]. Unter der Annahme, dass alle Protokolle bezüglich ihres Kopplungs-pH-Wertes optimiert wurden, weist dies darauf hin, dass nicht alle Enzyme gleich gut für die Immobilisierung durch chemische Crosslinker geeignet sind. Dies deckt sich auch mit eigenen Beobachtungen während der Arbeiten mit Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase sowie mit beta-Galactosidase (Daten nicht gezeigt) im Rahmen dieser Arbeit. Während einige der in Tabelle 12 gezeigten Enzyme und Proteine eine Stabilisierung ihrer Aktivität und eine Erhöhung ihrer Widerstandsfähigkeit gegen harsche Prozessbedingungen erfahren, verlieren andere ihre Aktivität oder Spezifität für bestimmte Zielsubstrate. In einem Fall führte die Zugabe von Substratmolekülen während des Immobilisierungsprozesses zu einem Aktivitätserhalt[78]. Hier wurde vermutlich das aktive Zentrum des Enzyms durch die Zugabe seines Substrates geschützt. Während das aktive Zentrum durch die spezifische Anlagerung eines komplementären Moleküls von der umgebenden Lösung abgeschirmt ist und die funktionellen Gruppen in die Bindung und den chemischen Umsatz des Substrates involviert sind, können diese nicht durch ein quervernetzendes Molekül gebunden und damit für den Substratumsatz inaktiviert werden. Dies könnte zu einem erhöhten Aktivitätserhalt führen.

Zwischen dem Molekulargewicht des Proteins und der Bindungsausbeute konnten keine aussagekräftigen Korrelationen gefunden werden, zumal auch die Träger in ihrer Größe, spezifischen Oberfläche und chemischen Zusammensetzung variierten. Die spezifische Oberfläche definiert die Größenordnung, welcher für die Anbindung von Proteinen zur Verfügung steht. Die chemische Zusammensetzung definiert unter anderem die Anzahl der zur Immobilisierung zur Verfügung stehenden funktionellen Gruppen und ist daher von vergleichbarer Wichtigkeit. Ist der Funktionalisierungsgrad zu gering, kann auch bei steigender spezifischer Oberfläche keine steigende Anzahl an Zielmolekülen gebunden werden. Ist im Gegensatz hierzu die Funktionalisierung zu dicht, kann dies theoretisch zu unterschiedlichen Zuständen führen: zum einen kann es zu einer Mehrfachbindung von Enzymen kommen, was deren Stabilität erhöhen kann. Jedoch kann auch das Gegenteil der Fall sein und die Mehrfachbindung kann zu einer sehr engen Immobilisierung und somit zu einer sterischen Hinderung der Enzyme untereinander führen.

Auch spielen vermutlich nicht nur die Enzymmasse eine Rolle in der maximalen Bindekapazität, sondern auch Form, Ladung, Hydrophobizität von Protein und Träger und die

Immobilisierungsmethode selbst. Jedoch konnte in einigen Fällen sowie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es ein Beladungsoptimum gibt, oberhalb dessen die spezifische Aktivitätsausbeute, vermutlich aufgrund sterischer Hinderung bei zu dichter Beladung, abnimmt[76].

Obwohl also bekannt ist, dass Enzyme sich sehr deutlich in ihren Immobilisierungseigenschaften unterscheiden, werden Standardprotokolle zur Immobilisierung empfohlen. Dies kann für eine schnelle Immobilisierung und ein erstes *proof-of-principle* sinnvoll und zielgerichtet sein. Jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Optimierung notwendig ist, um optimale Parameter für jedes Enzym zu finden. Spitzenaktivitäten sind daher beim ersten *proof-of-principle* eher nicht zu erwarten. Normalerweise wird für kovalente Kopplung mittels EDC ein neutraler pH-Wert empfohlen[89]. Für die hier verwendeten Enzyme Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase konnten mit Hilfe von Standardprotokollen, die einen neutralen Kopplungs-pH-Wert beinhalten, allerdings nur Aktivitätsausbeuten <0,1% erreicht werden. Erst durch eine Anpassung des Kopplungs-pH-Wertes konnten zufriedenstellendere Aktivitäten erreicht werden. Dies bedeutet, dass sich auch bei theoretisch gut untersuchten Methoden die Zeitinvestition ausgiebiger Optimierungsuntersuchungen lohnt. Die wichtigsten Parameter stellen dabei für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Enzyme Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase der pH-Wert und die Enzymbeladung dar. Aber auch andere Prozessbedingungen wie Ionenstärke, Temperatur, die Konzentration des Crosslinkers oder die Zugabe protektiver Substanzen wie Komplexbildner, Proteine oder Polyethylenglykole (PEGs) sollten in zukünftigen Studien untersucht werden.

Da es sich bei der Glucose Oxidase und der Meerrettichperoxidase in diesem Falle lediglich um Modellenzyme handelt, wurden die Optimierungsmaßnahmen an dieser Stelle beendet. Im Falle der Implementierung einer anderen Enzymkaskade müssen die Immobilisierungsprotokolle erneut hinsichtlich ihrer Effizienz untersucht und gegebenenfalls optimiert werden.

Tabelle 12: Übersicht über veröffentlichte Arbeiten, in denen Proteine mittels chemischem Crosslinking an magnetische Träger gebunden wurden und Darstellung der jeweiligen Versuchsbedingungen und – ergebnisse. Aus [74], mit freundlicher Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

Literaturstelle	Träger	Protein	Crosslinker	pH	pI	Beladung	Masse	Ausbeute Bindung	Ausbeute Aktivität		
van Leemputten & Horisberger (1974) [78]	Magnetit (Fe ₃ O ₄)	Trypsin	Glutaraldehyd	8.0	10.8	50 mg Enzym g Partikel ⁻¹	23.3 kDa	36 mg g Partikel ⁻¹	64%		
		Invertase				40 mg Enzyme g Partikel ⁻¹			270 kDa	4.4 mg g Partikel ⁻¹	79% (+ 1% Sucrose)
Koneracká et al. (1999) [82]	Magnetische Partikel	BSA	Carbodiimid	6.3	8.75	1:1, (w/w)	66.5 kDa	90%	-		
		Dispase					36 kDa	90%	80%		
		Chymotrypsine					25 kDa	90%	50%		
		Streptokinase					47 kDa	90%	55%		
Bahar & Celebi (1999) [87]	Magnetische Poly(styren) Partikel	Glucoamylase	Aldehyde	4.0	4.2	8 mg Enzym g Partikel ⁻¹	72 kDa	70%	70%		
Liao & Chen (2001) [83]	Magnetische Partikel	Hefe Alkohol dehydrogenase	Carbodiimid	6.0	5.4 – 5.8	0.05:1, (w/w)	141 – 151 kDa	100%	62%		
Akgöl et al. (2001) [77]	Magnetische PVA-Partikel	Invertase	1,1'-Carbonyldiimidazol	7.0	3.8	N/A	270 kDa	7.18 mg g Partikel ⁻¹	74%		
Zheng et al. (2003) [76]	Magnetische poly(VAc–DVB)-Partikel	<i>Candida cylindracea</i> Lipase	adsorptiv	7.0	4.5	N/A	43 kDa	8 - 35 mg g Partikel ⁻¹	6750 IU g Partikel ⁻¹		
Wang & Lee (2003) [85]	Magnetische Partikel	Trypsin	Carbodiimid Cyanamid	-	10.8	17 mg Enzym g Partikel ⁻¹	23.3 kDa	86%	N/A		
		Avidin				10.5	66 kDa	100%	N/A		
Bozhinova et al. (2004) [86]	Magnetische Polymerpartikel	<i>E.coli</i> Penicillin Amidase	Epoxygruppen Glutaraldehyd	7.5	4.3 – 7.0	30 mg Enzym g Partikel ⁻¹	70 kDa	3 – 28 mg g Partikel ⁻¹	N/A		
Kouassi et al. (2005) [81]	Magnetische Partikel	Cholesterol Oxidase	Carbodiimid	7.4	5.1 – 5.4	7 – 10 mg Enzyme g Partikel ⁻¹	34 kDa	98 – 100%	>100%		
Bruno et al. (2005) [79]	Magnetische POS-PVA Partikel	<i>Mucor miehei</i> lipase	Glutaraldehyd	7.0	3.8	N/A	32 kDa	N/A	65%		
Huang et al. (2008) [80]	Magnetische Partikel	<i>Candida rugosa</i> Lipase	Carbodiimid	6.0	4.5	<33 mg Enzym g Partikel ⁻¹	43 kDa	100%	141%		
Magario et al. (2008) [84]	Magnetische PVA-Partikel	Naringinase	Carbodiimid	7.0	~ 5	3.7 mg Enzym g Partikel ⁻¹	90 kDa	82%	36%		
Ricco et al. (2014) [88]	Magnetische Partikel	Madel Beta-Glucosidase	Carbodiimid	4.6	7.3	400 - 1000 mg Enzym g Partikel ⁻¹	110 kDa	70 – 238 mg Enzym g Partikel ⁻¹	N/A		
			SMCC	7.2							
Morhardt et al. (2014)	Magnetische Partikel	Chymotrypsine	adsorptiv Carbodiimid	5.5 5.3	8.75	2.9 – 95.5 mg Enzym g Partikel ⁻¹	25 kDa	75-100% 75-100%	9 – 45%		

4.1.2. Immobilisierung an 3D-Druckmaterial

Ziel der in diesem Kapitel vorgestellten und diskutierten Arbeiten war es, die Immobilisierung der Modellenzyme Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase an das 3D-gedruckte Material zu untersuchen und zu optimieren. Dafür wurden zunächst theoretische Überlegungen vorgenommen, um die Masse an Enzym, welches an die 3D-gedruckten Träger gebunden werden kann, abzuschätzen. Anschließend wurde die tatsächliche Bindekapazität im adsorptiven und kovalenten Modus experimentell bestimmt und die Ergebnisse mit den theoretischen verglichen und diskutiert.

4.1.2.1. Theoretische Überlegungen

Basierend auf dem Werten aus

Tabelle 7 wurden zunächst die Oberfläche $A_{\text{Plättchen}}$, die Masse $m_{\text{Plättchen}}$ und das Volumen $V_{\text{Plättchen}}$ errechnet.

$$(18) \quad A_{\text{Plättchen}} = 2\pi \cdot (r^2 + rh) = 44,0 \text{ mm}^2$$

$$(19) \quad V_{\text{Plättchen}} = \pi \cdot r^2 \cdot h = 6,0 \text{ mm}^3$$

$$(20) \quad m_{\text{Plättchen}} = \rho_{\text{3D-Druckmaterial}} \cdot V_{\text{Plättchen}} = 6,98 \text{ mg}$$

A	Fläche [m ²]
r	Radius [m]
V	Volumen [m ³]
m	Masse [g]

Anschließend wurden die Querschnittsflächen A_{BSA} , A_{GOx} und A_{HRP} von Bovinem Serumalbumin, Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase berechnet.

$$(21) \quad A_{\text{Protein}} = \pi \cdot \left(\sqrt[3]{\frac{3}{4\pi} \cdot \frac{M_{\text{Protein}}}{N_A \cdot \rho_{\text{Protein}}}} \right)^2$$

$$A_{\text{HRP}} = 1,89 \cdot 10^{-17} \text{ m}^2; \quad A_{\text{GOx}} = 4,46 \cdot 10^{-17} \text{ m}^2$$

A	Fläche [m ²]
N_A	Avogadro-Konstante ($6,02 \times 10^{23}$) [mol ⁻¹]

Die theoretische maximale Beladung q_{\max} kann anhand folgender Gleichung aus dem Verhältnis von Protein- und Trägermasse berechnet werden:

$$(22) \quad q_{\max} = \frac{m_{\text{Protein}}}{m_{\text{Plättchen}}} = \frac{\frac{A_{\text{Plättchen}} \cdot M_{\text{Protein}}}{A_{\text{Protein}} \cdot N_A}}{m_{\text{Plättchen}}}$$

$$q_{\max, \text{HRP}} = 0,024 \text{ mg g}^{-1}$$

$$q_{\max, \text{GOx}} = 0,037 \text{ mg g}^{-1}$$

m	Masse [g]
A	Fläche [m ²]
q_{\max}	Maximalbeladung des Carriers [g g ⁻¹]

4.1.2.2. Adsorptionsisothermen

Um die theoretischen Überlegungen auf ihre Genauigkeit hin zu überprüfen, wurden Adsorptionsisothermen der Modellenzyme Glucose Oxidase (GOx) und Meerrettichperoxidase (HRP) an 3D-Druckmaterial aufgenommen. Abbildung 18 zeigt die ermittelten Beladungen [mg Enzym g⁻¹ 3D-Druckmaterial] aufgetragen gegen die gemessene Gleichgewichtskonzentration c_{GG} [mg ml⁻¹] im Überstand.

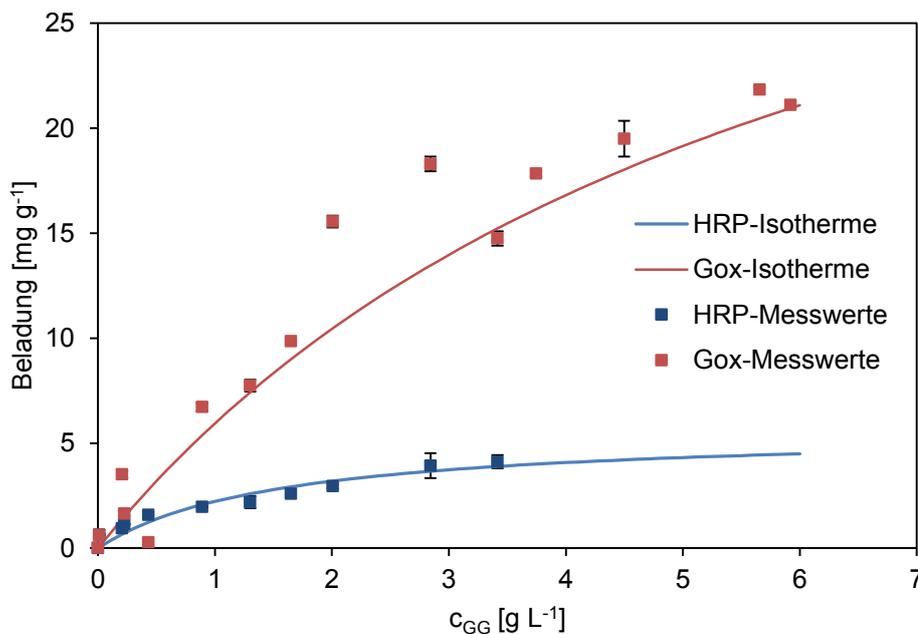


Abbildung 18: Beladung und gemessene Gleichgewichtskonzentrationen bei Raumtemperatur (21° C) im Überstand bei Adsorption von Glucose Oxidase (GOx) und Meerrettichperoxidase (HRP) an 3D-gedruckte Plättchen nach Erreichen des stationären Zustandes.

Mittels der Software Origin Pro 8.6G erfolgte eine nichtlineare Anpassung der Langmuir-Gleichung an die Messdaten, um die Parameter q_{\max} und K_L für die beiden Enzyme zu bestimmen. Tabelle 13 fasst die bestimmten Parameter maximale Beladung (q_{\max}) und Sorptionskoeffizient (K_L) zusammen.

Tabelle 13: Durch nichtlineare Kurvenanpassung an eine Langmuir-Isotherme ermittelte q_{\max} , K_L -Werte und σ_{\max} für die Enzyme Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase bei Adsorption an 3D-Druckmaterial.

Enzym	q_{\max} [mg Enzym g 3D-Druckmaterial ⁻¹]	K_L [L g ⁻¹]	σ_{\max} [mg m ⁻²]
Glucose Oxidase	43,08 ± 7,21	0,16 ± 0,04	6850 ± 1144
Meerrettich Peroxidase	5,64 ± 0,95	0,65 ± 0,24	897 ± 150

Ein Vergleich der theoretisch errechneten und der experimentell bestimmten Werte zeigt, dass die experimentellen Beladungswerte für Meerrettichperoxidase ungefähr um einen Faktor 200 und für Glucose Oxidase sogar um mehr als den Faktor 1000 zu hoch liegen. Diese starke Abweichung kann auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. Zum einen ist die Oberfläche des 3D-Druckmaterials nicht glatt sondern mikroskopisch rau. Dies führt zu einer starken Oberflächenvergrößerung und somit zu weitaus mehr Bindestellen als berechnet. Zum anderen wurde zur Berechnung des Enzymradius ein für Proteine durchschnittlicher Dichtewert verwendet. Der für Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase spezifische Dichtewert kann sich vom durchschnittlichen Dichtewert deutlich unterscheiden und damit zu einer Verfälschung der berechneten Enzymquerschnittsfläche führen, was wiederum zu einer abweichenden Zahl an Enzymbindestellen führt. Zuletzt wird im Rahmen der theoretischen Berechnungen von einer kugelförmigen Enzymform ausgegangen. Da es sich bei Enzymen jedoch um komplexe Geometrien handelt, kann auch dies zu einer Verfälschung der theoretischen Ergebnisse führen. Abbildung 19 zeigt ein Plättchen mit adsorbierten Farbstoffmolekülen (Tetramethylbenzidin) nach der Farbstoffproduktion durch die Meerrettichperoxidase. Die dunklere Verfärbung der Randbereiche deutet auch auf eine gewisse Eindringtiefe der Enzyme in das Druckmaterial hin, was wiederum die zugängliche Oberfläche stark vergrößert.

Abbildung 19 zeigt ein Plättchen mit adsorbierten Farbstoffmolekülen (Tetramethylbenzidin) nach der Farbstoffproduktion durch die Meerrettichperoxidase.



Abbildung 19: 3D-gedruckte Probenplättchen ohne (links) und mit (rechts) immobilisierter Meerrettichperoxidase nach Entwicklung in einer ELISA-Substratlösung mit Tetramethylbenzidin (TMB).

In Anbetracht einer Dicke der einzelnen Druckschichten in z-Richtung von ca. $17\ \mu\text{m}$ und einer Höhe der Plättchen von $300\ \mu\text{m}$ ergibt sich, dass diese aus 18 Druckebenen aufgebaut sind. Selbst eine Annahme, dass alle Ebenen zugänglich sind erklärt daher noch nicht den hohen Faktor zwischen experimenteller und theoretischer Beladung. Die durch das Polyjet-Verfahren erzeugten Tröpfchen resultieren in Polymerbereichen von ca. $40 \times 40 \times 17\ \mu\text{m}^3$. Stellt man sich die Plättchen als porösen Körper vor, dessen kompakte Grundeinheiten die Dimension dieser Polymerbereiche besitzen, ergibt sich eine um ca. den Faktor 30 größere Oberfläche als im Falle der Annahme kompakter Plättchen. Unter der zusätzlichen Berücksichtigung der Oberflächenrauigkeit erscheinen damit Enzymbeladungen im Bereich der Messwerte möglich, wobei der Wert für GOx nach wie vor sehr hoch erscheint. Die auch bei hohen Gleichgewichtsenzymkonzentrationen noch stetig steigende GOx-Beladung, weist in diesem Fall jedoch auf eine mögliche Mehrschichtadsorption hin.

4.1.3. Ermittlung des Temperaturoptimums immobilisierter Meerrettichperoxidase

Um den temperaturbedingten Arbeitsbereich der immobilisierten Meerrettichperoxidase (HRP) zu ermitteln, wurden Aktivitätsassays mit HRP, die an Magnetpartikel immobilisiert wurde bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt und die spezifischen Aktivitäten der Enzym-Partikel-Komplexe verglichen. Die folgende Tabelle 14 zeigt die spezifischen Aktivitäten in Abhängigkeit der Temperatur, bei welcher der Aktivitätsassay durchgeführt wurde.

Tabelle 14: Übersicht über die spezifischen Aktivitäten der HRP-Partikel-Komplexe bei Durchführung des Assays bei unterschiedlichen Temperaturen. Zusätzlich ist der Q-Wert gelistet, der den Faktor angibt, in welchem Maß sich die Enzymaktivität bei einer Temperaturerhöhung verändert.

Temperatur [°C]	Spezifische Aktivität der Immobilisate [U mg Partikel ⁻¹]	Q-Wert
15	0,1177	
20	0,1275	1,17
25	0,1385	1,18
30	0,1533	1,23
35	0,1680	1,20
40	0,1692	1,01
45	0,1459	0,74

Werden die Aktivitätswerte grafisch gegen die Temperatur aufgetragen (Abbildung 20), so ist erkennbar, dass die Aktivität zwischen 15° und 35° C linear ansteigt, um im Bereich 35° C bis 40° C ein Maximum zu erreichen. Bei einer weiteren Erhöhung der Temperatur auf 45° C nimmt die Aktivität wiederum ab.

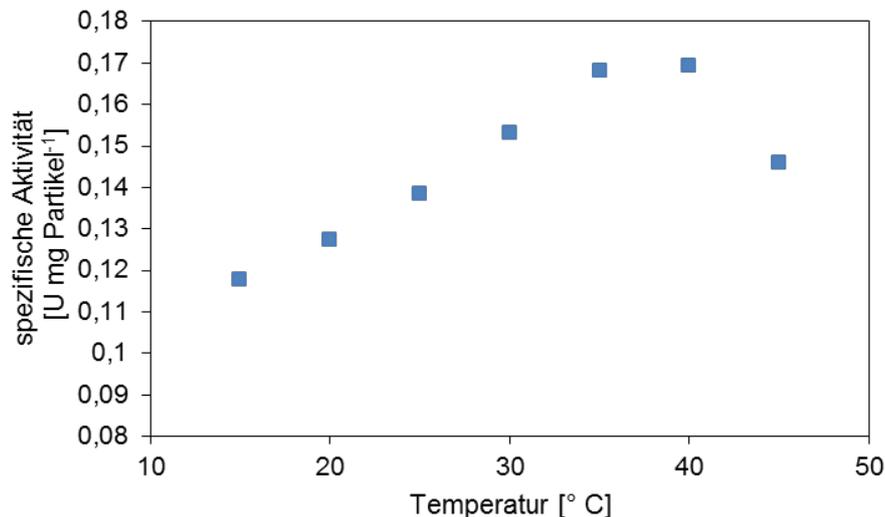


Abbildung 20: Verlauf der spezifischen Aktivität von HRP-Partikel-Komplexen über verschiedene Temperaturen während der Durchführung des Assays. Die spezifische Aktivität nimmt mit steigender Temperatur bis auf einen Wert von ca. 35°-40° C zu, anschließend vermutlich aufgrund einer temperaturbedingten Denaturierung des Enzyms wieder ab.

Dies bedeutet, dass das Temperaturoptimum der verwendeten Mischung aus HRP-Isoformen zwischen 35° und 40° C liegt. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur wird oft von der RGT- (=Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur) oder van't Hoff'schen Regel bestimmt, welche besagt, dass sich die Reaktionsgeschwindigkeit verdoppelt bis vervierfacht, sobald die Umgebungstemperatur um 10° K erhöht wird. Bei größeren Temperaturdifferenzen wird die RGT-Regel zunehmend ungenau.

Genauer ausgeführt gilt:

$$(23) \quad Q_{10} = \left(\frac{R_1}{R_2} \right)^{\frac{10K}{T_2 - T_1}}$$

Q₁₀ Q-Wert, Faktor um den die Reaktionsgeschwindigkeit bei Erhöhung um 10 K steigt
 R_{1,2} Reaktionsgeschwindigkeiten
 T_{1,2} Absoluttemperaturen

Wie aus Tabelle 14 zu erkennen, folgen die ermittelten Q-Werte für den Temperaturverlauf der HRP der RGT-Regel nicht. Dies bedeutet, dass es im System der auf magnetischen Mikropartikeln immobilisierten HRP zu einer zusätzlichen Geschwindigkeitslimitierung kommen muss. Diese könnte auf Diffusions- oder Umlagerungsvorgänge zurückzuführen sein, da die Enzyme auf porösen Trägern immobilisiert sind und zum Teil noch in Mikroporen lokalisiert sein könnten. Daher kommt es durch die weiteren Diffusionsstrecken des Substrates in die Poren zu einer zeitlichen Verzögerung, die sich limitierend auf die Gesamtgeschwindigkeit des HRP-Umsatzes auswirkt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass höhere Temperaturen (>40° C) zu einer deutlichen Verminderung der Enzymaktivität führen, wobei sich diese Tendenz vermutlich bei weiterer Temperaturerhöhung fortsetzen wird. Dies ist auf temperaturinduzierte Veränderungen in der Tertiärstruktur der Enzyme zurückzuführen. Vorhandene Wasserstoffbrückenbindungen und andere nichtkovalente Bindungen verändern sich im Laufe sich erhöhender Temperaturen und führen letztendlich zu einer Denaturierung und irreversiblen Zerstörung des Enzyms.

4.2. Charakterisierung des Enzymtransformationsmodells

Dieses Unterkapitel stellt die Konstruktion sowie die Ergebnisse die im Rahmen der Charakterisierung des Enzymtransformationsmoduls erzielt wurden zusammen. Das Enzymtransformationsmodul ist das Herzstück des modularen Reaktorsystems und beinhaltet die Biokatalysatoren, welche das Ausgangssubstrat zum gewünschten Produkt umsetzen (Abbildung 23). Zur Immobilisierung wurden 3D-gedruckte poröse Körper, im Folgenden als Gitterstruktur bezeichnet, mit möglichst hoher spezifischer Oberfläche entwickelt (Abbildung 21).

4.2.1. Beschreibung der Gitterstruktur

Die praktischen Überlegungen zur Konstruktion der Gitter- und Gehäusestruktur sahen vor, dass eine möglichst große spezifische Oberfläche generiert werden sollte, um eine maximale Beladung mit Biokatalysatoren zu ermöglichen. Daher sollten die Porenstrukturen so klein wie möglich sein, gleichzeitig allerdings jedoch noch grob genug, um ein Herauslösen des gedruckten Stützmaterials mittels Natriumhydroxid zu ermöglichen. Die Umsetzung der technischen Zeichnung sowie der 3D-Druck der Gitterstrukturen erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Jonas Wohlgemuth (Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Funktionelle Grenzflächen) und seinen Mitarbeitern. Das Enzymtransformationsmodul ist das Herzstück des modularen Reaktorsystems und beinhaltet die Biokatalysatoren, welche das Ausgangssubstrat zum gewünschten Produkt umsetzen (Abbildung 29). Zur Immobilisierung wurden 3D-gedruckte poröse Körper mit möglichst hoher spezifischer Oberfläche erdacht (Abbildung 21). Eine einfache Geometrie aus quadratischen Kanälen ermöglichte eine problemlose Umsetzung der an Poren angelehnten Strukturen im technischen Zeichenprogramm. Es wurde eine gitterartige Würfelstruktur entwickelt, welche bei einer Kanalgröße von 0,3 mm ohne großen Strömungswiderstand von allen Seiten durchströmbar ist, gleichzeitig aber eine hohe spezifische Oberfläche bildet. Die seitlichen Kanten der Würfelstruktur wurden mit glatten Versätzen ausgestattet, welche ein einfaches Gleiten auf Führungsschienen in das Gehäuse und einen Wechsel der Gitterstrukturen nach Beendigung der Enzymtransformation ermöglichen.

Durch die Gitterstruktur konnte eine Gesamtoberfläche pro Würfel von $0,004 \text{ m}^2$ erzielt werden. Umgerechnet auf Volumen (4 cm^3) und Gewicht (2 g) des 3D-gedruckten Würfels ergibt sich eine spezifische Fläche von $1000 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$ bzw. $2 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$. Eine Halbierung der Strukturgröße, d.h. die Generation feinerer Gitterstrukturen würde bei einer Beibehaltung der Außenmaße zu einer Verdopplung der Oberfläche führen.

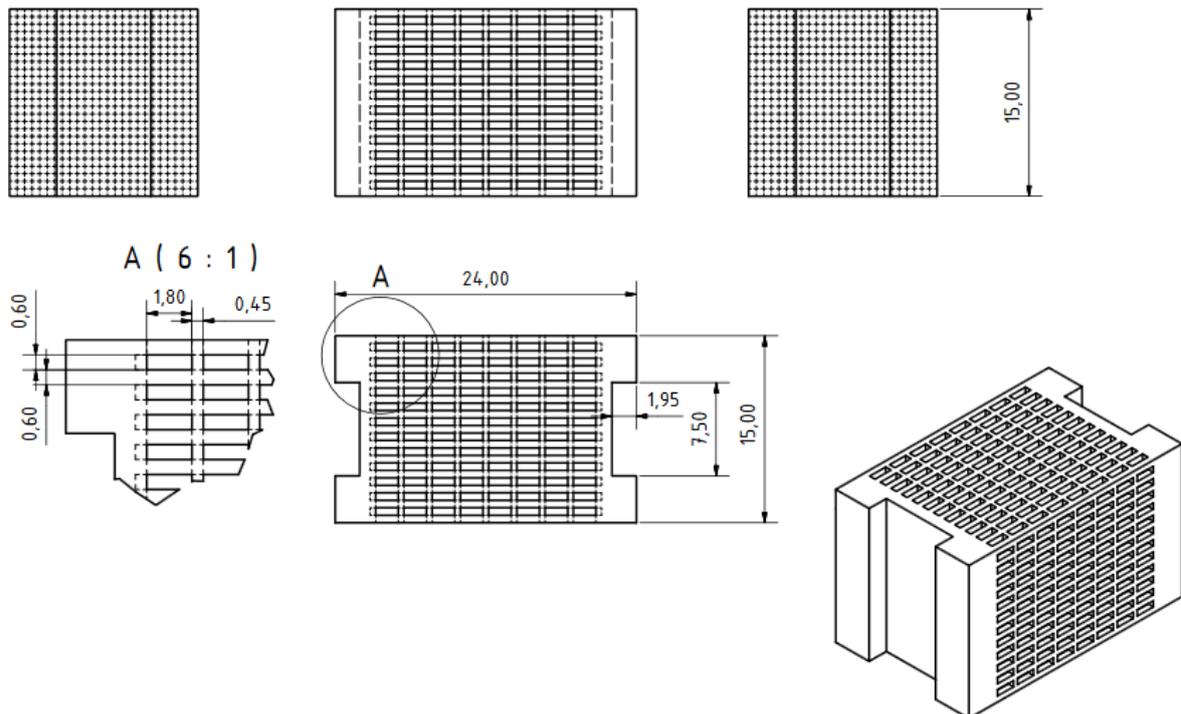


Abbildung 21: Technische Zeichnung der Gitterstruktur mit Maßangaben der Kanalstrukturen aus verschiedenen Perspektiven.

4.2.2. Mikroskopische Untersuchungen der porös gedruckten Gitterstruktur

Um die Oberflächenstruktur der gedruckten Probekörper besser beurteilen zu können, wurden ESEM-Bilder von 3D-gedruckten Gitterstrukturen zur Enzymimmobilisierung aufgenommen. Die einzelnen Lagen des Probekörpers wurden jeweils „2-dimensional“ in x-,y-Richtung gedruckt. Danach wurde der Probekörper in z-Richtung abgesenkt und weitere Lagen gedruckt, bis der gesamte 3-dimensionale Probekörper fertiggestellt war. Abbildung 23 zeigt die gedruckte Gitterstruktur aus verschiedenen Richtungen. Links ist eine Aufsicht auf die obersten Layer des Probekörpers zu sehen. Dabei ist erkennbar, dass die Oberfläche relativ glatt ist. Die Struktur links unten ist ein Verbindungssteg zu einer ursprünglich darüber liegenden Gitterebene, die jedoch durch die Schnittführung beim

Zerteilen des Probekörpers abgetrennt wurde. Rechts zu sehen ist eine Seitenansicht aus der x-Richtung während des Druckvorgangs, wodurch die verschiedenen gedruckten Lagen von der Seite aus betrachtet werden. Dabei ist erkennbar, dass sich eine raue Seitenfläche bildet und der Versatz bei der Absenkung der Struktur nach jedem gedruckten Layer deutlich erkennbar ist. Dies zeigt, dass die tatsächliche Oberfläche, welche zur Enzymimmobilisierung zur Verfügung steht deutlich größer ist, als eine idealisierte glatte Oberfläche.

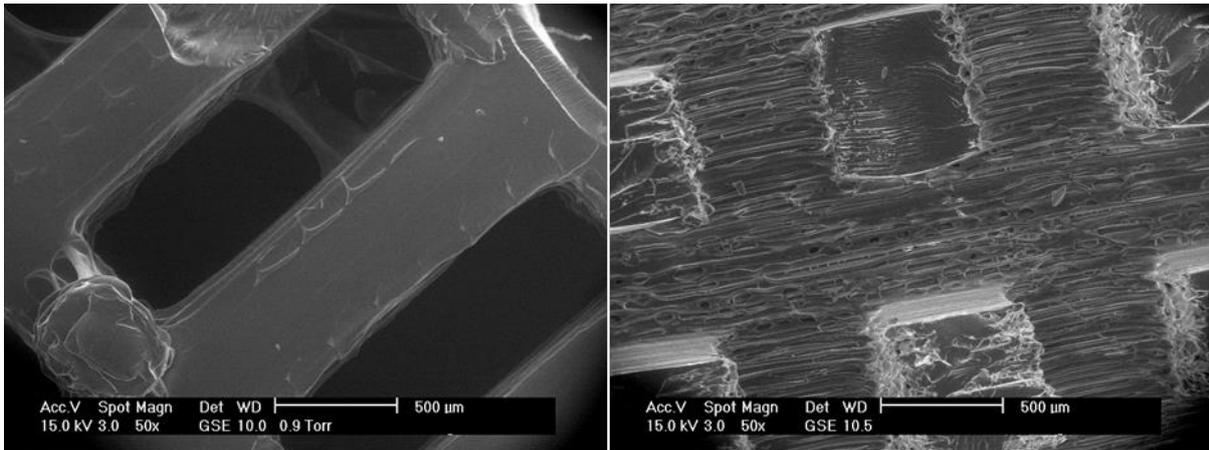


Abbildung 22: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der porös gedruckten Gitterstrukturen aus verschiedenen Blickrichtungen: links ist eine Aufsicht aus z-Richtung auf die oberste gedruckte Lage zu erkennen, während rechts die seitliche Ansicht aus x-Richtung dargestellt wird, wo der jeweilige Versatz zwischen den 3D-gedruckten Schichten deutlich zu erkennen ist.

4.2.3. Beschreibung der Gehäusestruktur für das Gitter

Wie auch die Gitterstruktur zur Immobilisierung der Enzymkaskade wurde das Gehäuse mit Hilfe von Autodesk Inventor Professional 2015 entworfen und konstruiert. Praktische Überlegungen in diesem Fall sahen vor, einen Einlass für den Substratstrom zu integrieren, welcher dann mit Hilfe geeigneter Einbauten zur Strömungsführung gleichmäßig auf die Oberfläche der innen liegenden Gitterstruktur verteilt werden sollte. Eine Spiegelung der Geometrie und des Strömungskanals auf der anderen Seite der querliegenden Gitterstruktur sollten eine Bündelung des Produktstromes und eine Ausleitung aus dem Transformationsmodul ermöglichen. Zunächst wurde angestrebt, Gitterstruktur und Gehäuse in Form einer zusammenhängenden Struktur zu entwerfen. Dies offenbarte jedoch den Nachteil, dass das verdruckte Stützmaterial in diesem Fall nur sehr schwer zu entfernen war. Außerdem entstand der Gedanke, die Gittermodule separat zu drucken, um einen einfachen Austausch zu gewährleisten und das Gehäuse nach Beendigung der

Enzymtransformation zu recyceln. Während erste Prototypen zum Verschluss verklebt wurden (2 Komponentenkleber, Uhu), wurden nachfolgende Modelle mit Hilfe von 6 Schrauben- und Mutterpaaren und unter Zuhilfenahme einer Flachdichtung verschraubt.

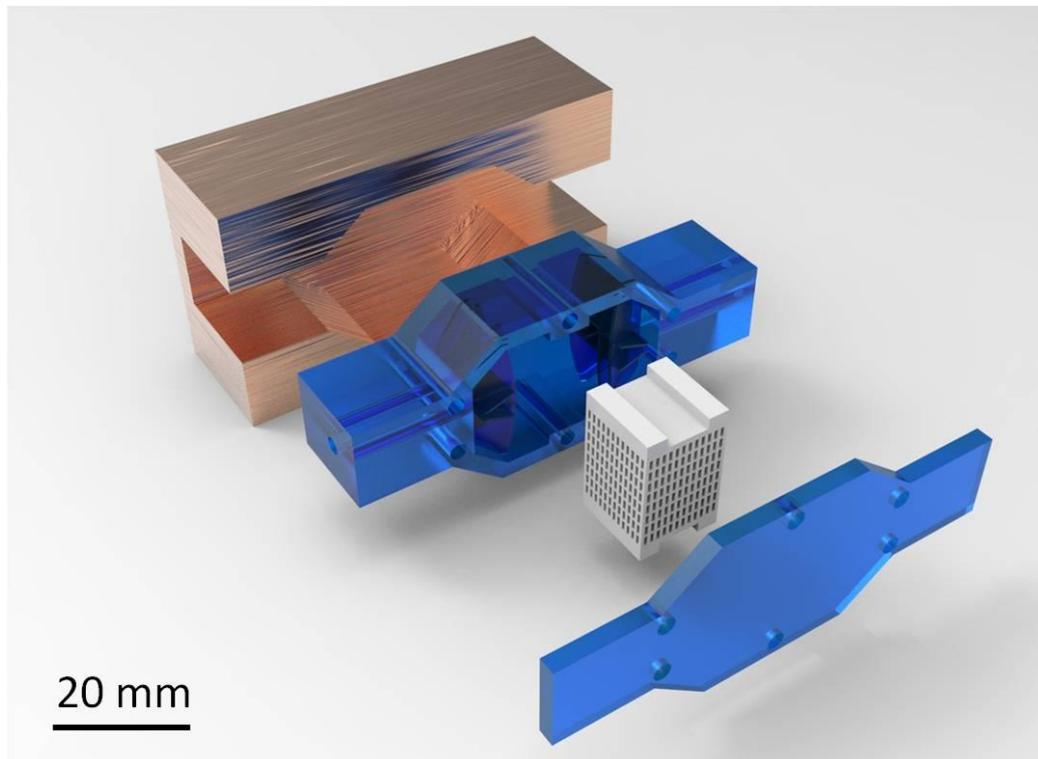


Abbildung 23: Gerenderte technische Zeichnung des Enzymtransformationsmoduls in Explosionsdarstellung. Das Gitter zur Immobilisierung der Enzyme ist in weiß dargestellt. Das Gehäuse und der Deckel zur Umfassung und Durchströmung der Gitterstruktur sind in blau gezeigt. Zu sehen sind Einström- und Ausströmkanal, sowie komplexe Strukturen zur Aufspaltung des Stromes für eine gleichmäßige Verteilung auf die Gitterstruktur. Ebenfalls zu sehen ist der Temperiermantel der Temperatureinheit zur spezifischen Temperatureinstellung des Enzymtransformationsmoduls.

Das Gehäuse (blau) besteht aus einem Gehäusekörper und einem Deckel, welcher ebenfalls 3D-gedruckt ist, falls das Enzymtransformationsmodul bei niedrigeren Temperaturen im Bereich der Raumtemperatur arbeitet. Sollen höhere Temperaturen $>25^{\circ}\text{C}$ eingestellt werden, so wird ein aus Aluminium gefertigter Deckel verwendet, um einer Verformung des dünn gedruckten Materials vorzubeugen. Der Deckel schließt das Modul unter Zuhilfenahme zweier Flachdichtungen und 6 Gewindeschrauben mit passenden Unterlegscheiben und Muttern. Die Gewinde (Standard-HPLC-10/32-Gewinde) zum Anschluss der Schlauchfittings werden nach dem Druckprozess in die Zu- und Abstromkanäle geschnitten. Der Einlass wird durch eine strömungsführende Struktur aufgefächert, um eine ideale Benetzung und Durchströmung der innenliegenden Gitterstruktur zu gewährleisten. Eine Spiegelung der

Strukturen zur Auslass-Seite bedingt ein Sammeln der Flüssigkeit und die Zusammenführung in den Auslasskanal. Abbildung 22 zeigt zudem kupferfarbenen Temperiermantel für das Enzymtransformationsmodul. Die technischen Daten des Gehäuses des Enzymtransformationsmoduls inklusive aller Abmessungen sind in Abbildung 24 gezeigt. Die Maßangaben sind in Millimeter.

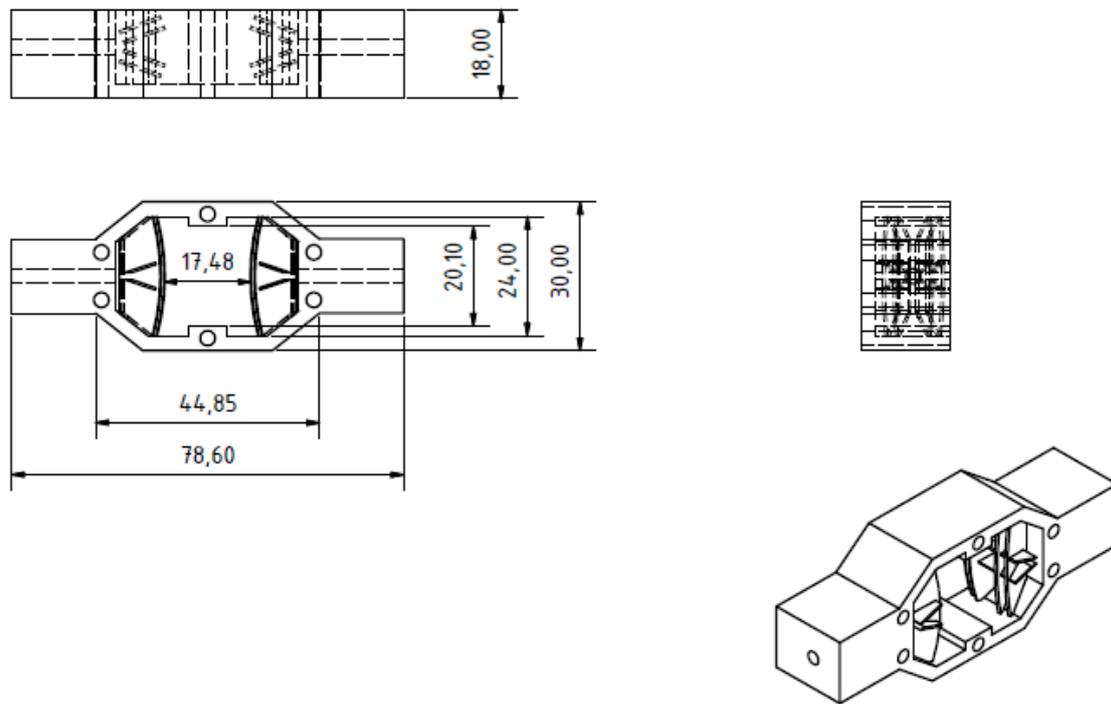


Abbildung 24: Technische Zeichnung des Enzymtransformationsmoduls in verschiedenen Ebenen inklusive Bemaßung.

Im Verlauf der praktischen Experimente hat sich das Design des Enzymtransformationsmoduls weitestgehend bewährt. Insbesondere die austauschbare Gitterstruktur ermöglichte einen problemlosen Wechsel mit frisch immobilisierten Enzymen. Durch die Führungsschiene wurde ein einfaches Heraus- und Hereingleiten der Gitterstrukturen in die Gehäusestruktur gewährleistet sowie während des Betriebs ein fester Sitz erreicht. Auch nach mehrtägigem Quellen in wässriger Lösung verzogen sich die Strukturen nicht und konnten problemlos entfernt und ersetzt werden. Auch die geschnittenen Gewinde konnten durch das passende Fitting unter Zuhilfenahme einer Schicht Teflonband flüssigkeitsdicht verschraubt werden. Probleme ergaben sich jedoch durch den dünnen Deckel, welcher in Zusammenhang mit nur einer Flachdichtung immer

wieder zu Leckagen führte. Durch Zuhilfenahme einer zweiten Flachdichtung konnte dieses Problem für die Arbeiten bei Raumtemperatur behoben werden. Jedoch kam es bei der Erwärmung des Enzymtransformationsmoduls mit Hilfe der Temperiereinheit erneut zu Undichtigkeiten. Dies war darauf zurückzuführen, dass das verwendete 3D-Druckmaterial lediglich Temperaturen bis zu 40° C toleriert. Da während der Temperaturexperimente jedoch auf 35° - 40° C erhitzt wurde, kam es zu einer Verformung der dünnen Deckelstruktur, welche die Leckagen auslöste. Da die Gehäusestruktur nicht betroffen war, konnte dieses Problem behoben werden, indem ein Deckel aus Aluminium gefertigt wurde. Dies ist jedoch auf längere Sicht ebenfalls nicht optimal, da der Deckel im Rahmen der Befüllung immer wieder mit Flüssigkeit in Kontakt kommt, was zu Korrosionen führen kann. Da auch bei der Verwendung des Aluminiumdeckels und unter Zuhilfenahme zweier Flachdichtungen eine komplette Abdichtung des Reaktors herausfordernd blieb, sollte zukünftig über ein anderes Design der Deckelstruktur nachgedacht werden. Dabei können verschiedene Optionen in Betracht gezogen werden: Zum einen könnte ein Edelstahldeckel in Verbindung mit einer dickeren und weicheren Flachdichtung verwendet werden, um eine zuverlässigere Abdichtung zu gewährleisten, während durch die Verwendung von Edelstahl Korrosionserscheinungen bei Kontakt mit Flüssigkeiten eingedämmt werden könnten. Zum anderen könnte die gesamte Struktur erneuert werden. Im Falle des in Abschnitt 4.4. vorgestellten pH-Kontrollmodul zeigte sich, dass ein versenkbarer, dickerer Deckel in Kombination mit einem Dichtungsring zu einer problemlosen Abdichtung des Moduls selbst unter hohen Flussraten führt. Daher könnte auch für das Enzymtransformationsmodul ein ähnliches Design verwendet werden. Damit könnte von anderen Fertigungsverfahren abgesehen werden und die Fabrikation lediglich durch 3D-Druck erfolgen.

4.2.4. Mittlere Verweilzeit und Residence Time Distribution (RTD) im Enzymtransformationsmodul

Um die Strömungsfluidik im Enzymtransformationsmodul beurteilen zu können, wurde die mittlere Verweilzeit sowie die Verweilzeitverteilung gemessen. Dabei wurde das Modul mit verschiedenen Flussraten durchströmt und der Konzentrationsanstieg eines als Stufenfunktion zugesetzten Salztracers gemessen. Abbildung 25 zeigt die Abhängigkeit der mittleren Verweilzeit im Enzymtransformationsmodul von der eingestellten Flussrate.

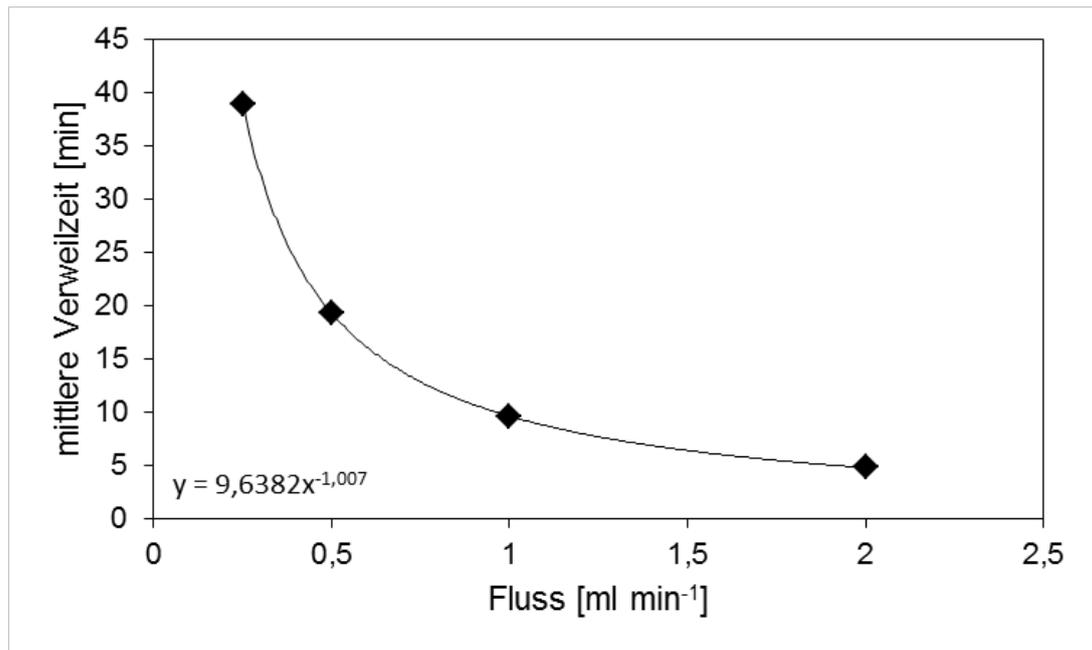


Abbildung 25: Mittlere Verweilzeit in Minuten eines Salztracers im Enzymtransformationsmodul in Abhängigkeit des Flusses. Es zeigt sich ein hyperbolisch abnehmender Verlauf.

Wie erwartet zeigt die mittlere Verweilzeit mit steigender Flussrate einen hyperbolisch abnehmenden Verlauf. Ein Fitting einer Potenzfunktion an die Messwerte ergibt die Beschreibung der Messwerte mittels der Funktion:

$$(24) \quad \text{mittlere Verweilzeit} = 9,64 \text{ ml} \cdot \text{Flussrate}^{-1,007}$$

d.h. die gemessene Abhängigkeit zwischen der mittleren Verweilzeit und der Flussrate liegt sehr nahe an dem theoretischen Wert von „Flussrate⁻¹“. Aus den Verweilzeitmessungen resultiert ein mittleres durchströmtes Volumen des Enzymtransformationsmoduls von 10,4 ml, das weitgehend mit dem durch Wägung ermittelten Wert des freien Volumens von 10,5 ml übereinstimmt. Die Abweichung zwischen den beiden Werten ist vermutlich auf nicht durchströmte Totzonen zurückzuführen, die beispielsweise durch einen Lufteinschluss verursacht werden können. Mit Hilfe von Gleichung (24) können die mittleren Verweilzeiten anderer Flussraten vorausgesagt werden. Neben der mittleren Verweilzeit ist für die Effizienz eines Reaktionsmoduls auch die Verweilzeitverteilung von Bedeutung. Zu deren Ermittlung zeigt Abbildung 26 im oberen Diagramm die aus den gemessenen Konzentrationsprungantworten errechneten dimensionslosen Verweilzeitverteilungen (F-Kurven) des Konzentrationsverlaufes an Tracer-Molekülen.

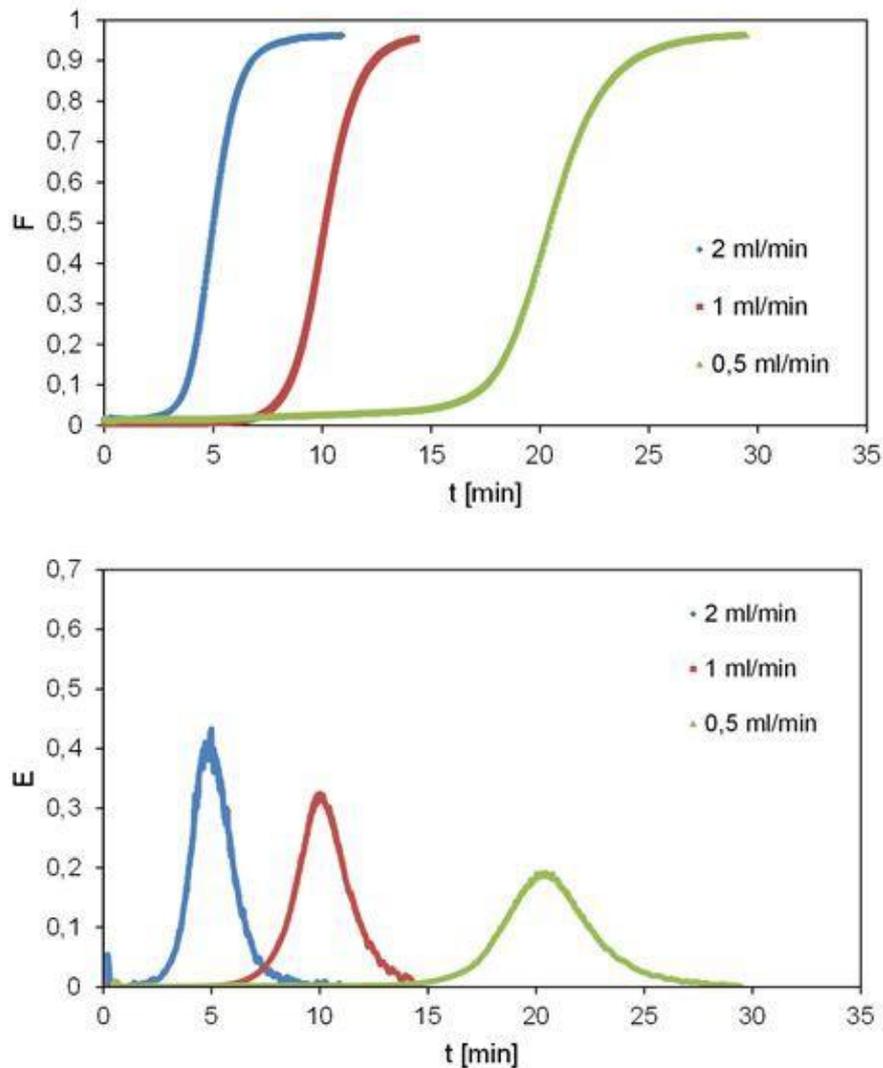


Abbildung 26: dimensionslose Verweilzeitverteilungen (F-Kurven) der Tracermoleküle im Enzymtransformationsmodul (oben) und kumulative Verteilungsfunktion (E-Kurven) für verschiedene Flussraten im Rahmen eines sprunghaften Anstiegs der Tracerkonzentration im Zulauf des Reaktors.

Durch die Ableitung der F-Kurven lassen sich die Verweilzeitverteilungen der Tracermoleküle im Enzymtransformationsmodul nach den Step-Experimenten berechnen. Die kumulativen Verteilungsfunktionen (E-Kurven) für verschiedene Flussraten sind in Abbildung 26 unten dargestellt. Unter Annahme des Dispersionsmodells konnte ein $\frac{D}{uL}$ -Wert von 0,03 bzw. eine Bodensteinzahl von ca. 30 für die kumulative Verteilungsfunktion bestimmt werden. Dies bedeutet, dass im Enzymtransformationsmodul *plug flow* mit einem moderaten Grad an axialer Dispersion stattfindet. Das macht das System geeignet für katalytische Reaktionen mit genau definierten Reaktionszeiten.

4.2.5. *proof-of-principle*: HRP-Umsatz bei unterschiedlichen Flussraten

Im Rahmen eines ersten *proof-of-principle* der Eignung des Enzymtransformationsmoduls zur einfachen Durchführung von Parametervariationen für biokatalytische Reaktionen wurde der Umsatz von TMB durch Meerrettichperoxidase für verschiedene mittlere Verweilzeiten untersucht. Dabei wurde zunächst Meerrettichperoxidase gemäß des zuvor optimierten Protokolls in einem Verhältnis von 15 mg Enzym g 3D-Druckmaterial⁻¹ eingesetzt. Das bedeutet bei 2 g Masse der Gitterstruktur einen Enzymeinsatz von 30 mg Glucose Oxidase bzw. Meerrettichperoxidase. Obwohl die Proteinkonzentration vor und nach dem Immobilisierungsvorgang mittels BCA-Assay bestimmt wurde, konnten keine aussagekräftigen Differenzen vor und nach Immobilisierung bezüglich der Beladung mit HRP errechnet werden. Die folgenden Annahmen stützen sich damit auf die Werte, welche vorab anhand der Adsorption von HRP an 3D-gedruckte Plättchen (Kapitel 4.1.2.2.) generiert wurden. Dabei wurde für die HRP ein Wert von ca. $\sigma = 900 \text{ mg m}^{-2}$ 3D-Druckmaterial bestimmt. Ausgehend von einer Oberfläche des 3D-gedruckten Würfels von $0,004 \text{ m}^2$ ergibt sich damit eine Enzymbeladung von 3,6 mg Enzym pro Gitterstruktur. Dabei bleibt jedoch zur berücksichtigen, dass dies auf der Annahme der physikalischen Adsorption beruht. Bei der kovalenten Bindung von Enzymen können weitaus höhere Beladungen erreicht werden. Der hohe Einsatz an Enzymmasse entspringt den empfohlenen Werten nach Optimierung des Bindungsprotokolls, welche allerdings an Magnetpartikeln durchgeführt wurden, die bedingt durch ihre Größe und Form eine weitaus höhere spezifische Oberfläche bezogen auf das Gewicht zeigen. Daher wird für die folgende Betrachtung eine gebundene Enzymmasse von 4 mg pro Gitterstruktur angenommen.

Nach der Enzymimmobilisierung wurden die Gitter in ein gedrucktes Modulgehäuse eingebaut und durchströmt. Dabei wurden zunächst während eines konstant eingestellten Flusses pro Minute 35 μl des ausströmenden Fluids spektrometrisch untersucht und die Gesamtabsorption durch Multiplikation mit den Verdünnungsfaktoren berechnet. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 27 dargestellt.

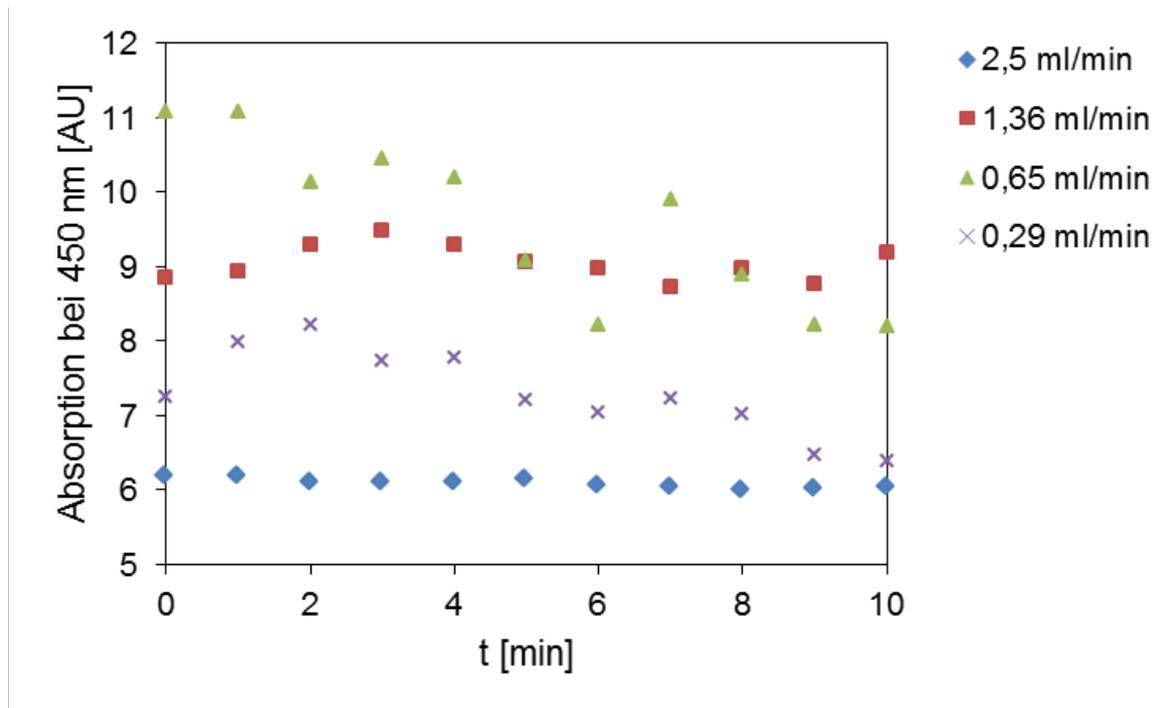


Abbildung 27: Absorptionsverlauf bei Durchströmen des HRP-Enzymtransformationsmodul mit TMB-Substratlösung bei konstanter Flussrate für einen Zeitraum von 10 min. Es konnte gezeigt werden, dass die am Reaktorausgang gemessene Absorption bei konstanten Flussraten über längere Zeiträume konstant bleibt, wenn von der Ausfällung des Farbstoffes durch zu starke Aufkonzentrierung bei langsameren Flussraten abgesehen wird.

Es ist klar erkennbar, dass bei höheren Flussraten, d.h. kurzen Verweilzeiten, die Gesamtabsorption während der Laufzeit von 10 min beinahe konstant bleibt. Bei Flussraten von 0,65 und 0,29 ml min⁻¹ kommt es dagegen zu einer merklichen Abnahme der Absorption über die Zeit. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der umgesetzte Farbstoff in sehr hohen Konzentrationen aggregiert und zu einem bräunlichen Feststoff ausfällt. Im Falle niedriger Flussraten, d.h. hoher Verweilzeiten, wird durch die fortlaufende enzymkatalysierte Bildung des Farbstoffs anscheinend dieser Wert überüberschritten. Abbildung 28 zeigt eine Gitterstruktur mit immobilisierter Meerrettichperoxidase nach der TMB-Transformation mit adsorbierten ausgefällten TMB-Aggregaten.

Im Falle der Flussrate von 0,29 ml min⁻¹, d.h. bei einer mittleren Verweilzeit von über 30 min, kommt es von Beginn an zu diesem Aggregationseffekt, so dass die beobachteten Absorptionswerte unter denen von einer Flussrate von 0,65 ml min⁻¹ liegen.

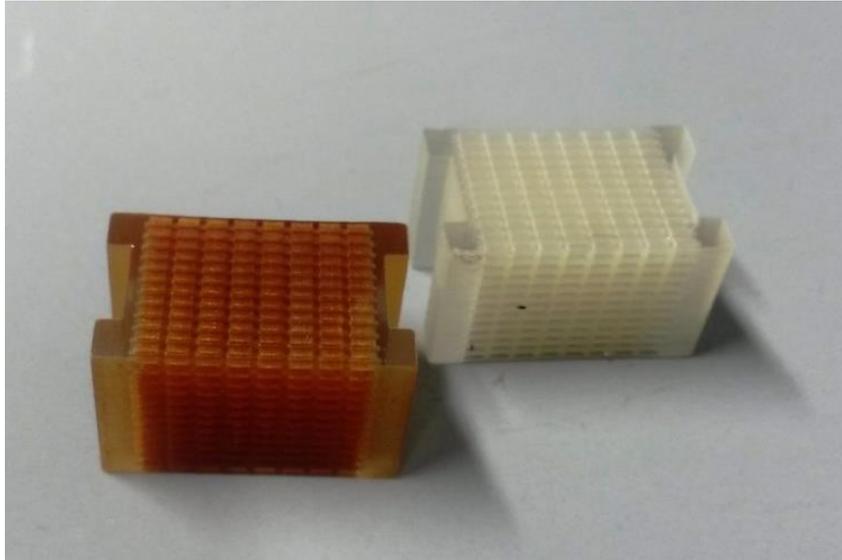


Abbildung 28: Gitterstruktur mit immobilisierter Meerrettichperoxidase nach dem Umsatz von TMB (links). Der ausgefallene bräunliche Farbstoff ist an die Oberfläche des 3D-Druckmaterials adsorbiert. Im Vergleich dazu rechts eine Gitterstruktur mit immobilisierter GOx ohne Verfärbungen. Die Abbildung verdeutlicht die Schwierigkeiten einer konkreten Charakterisierung des Substratumsatzes im Falle der Meerrettichperoxidase durch Substrat-bedingte Effekte

Aus dem zeitlichen Verlauf der Probennahme wurde ein Durchschnittswert der unverdünnten Absorbanz für die jeweilige Flussrate gebildet. Dieser Mittelwert wurde gegen die mittlere Verweilzeit aufgetragen (Abbildung 29).

Aus den Absorptionswerten wurde die Menge des umgesetzten Substrates pro Volumen und pro Zeiteinheit mit Hilfe des Extinktionsfaktors von TMB berechnet. Dabei wurde zunächst mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Konzentration des gebildeten Produktes im Produktstrom unter Zuhilfenahme des Extinktionskoeffizientens von oxidiertem TMB ($5.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und der Schichtdicke der Lösung in der Mikrotiterplatte von 0,476 cm berechnet. Durch Einbeziehen des geförderten Volumens pro Minute konnte eine absolute Menge an umgesetztem Substrat definiert werden. Die errechneten Werte für die unterschiedlichen Flussraten sind in Tabelle 15 gezeigt.

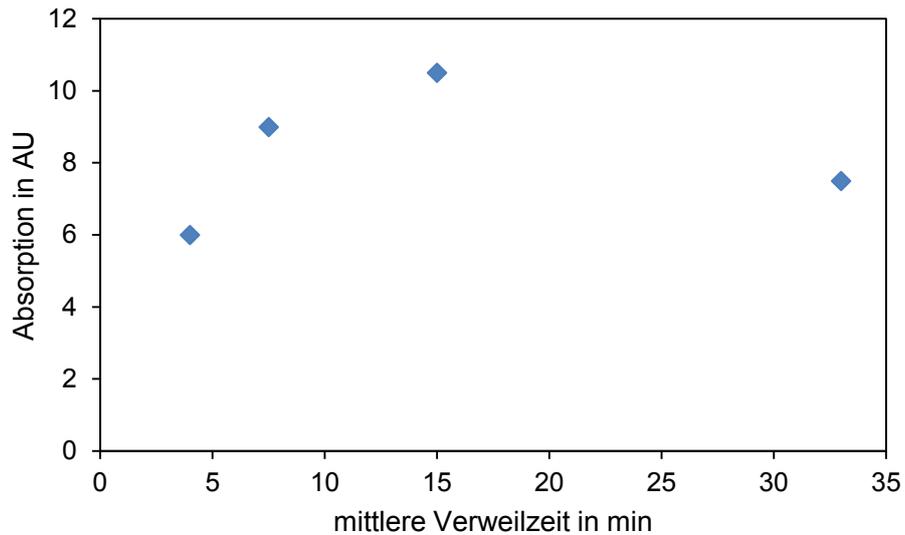


Abbildung 29: Absorption in Abhängigkeit der Flussrate, mit welcher das HRP-Enzymtransformationsmodul mit Substratlösung durchströmt wird.

In Abhängigkeit von der Zeit konnte durch die Unit-Definition der Enzyme (1 Unit = 1 μmol umgesetztes Substrat pro min) eine Gesamtaktivität des Systems in Abhängigkeit von der Durchflussgeschwindigkeit errechnet werden. Anschließend wurde die Aktivität gegen Flussrate aufgetragen (Abb. 30).

Tabelle 15: umgesetzte Menge an oxidiertem TMB durch immobilisierte HRP in einem Enzymtransformationsmodul pro Minute bei unterschiedlichen Flussraten.

Flussrate [ml min ⁻¹]	TMB-Umsatz pro Minute [mol]
2,50	$5,22 \times 10^{-5}$
1,36	$4,21 \times 10^{-5}$
0,65	$2,13 \times 10^{-5}$
0,29	$7,24 \times 10^{-6}$

Dabei ist zu sehen, dass die Gesamtaktivität des Systems mit sinkender Flussrate, d.h. steigender mittlerer Verweilzeit stark absinkt. Dies kann auf verschiedene Gründe zurückzuführen sein. Zum einen ist es möglich, dass die maximal erreichbare Absorption, welche durch die Konzentration von TMB in der Substratlösung bestimmt ist, bereits erreicht ist und daher eine weitere Verlangsamung der Strömungsgeschwindigkeit nicht zu einem

weiteren Substratumsatz führt, da keine weiteren Moleküle zum Umsatz vorhanden sind. Ohne Substratlimitierung sollte die Produktivität des gesamten Systems unabhängig von der Flussrate sein, da das Enzym stets die gleiche Menge an Substratmolekülen umsetzt, unabhängig davon, wie schnell die Lösung vorbei strömt. Dies ist bei den kürzeren Verweilzeiten im hier untersuchten System auch annähernd der Fall. Eine genauere Aussage hinsichtlich einer möglichen Substratlimitierung wäre bei Kenntnis des prozentualen Umsatzes des im Zulauf befindlichen Substrates möglich. Dies ist hier aber leider nicht der Fall, da es sich um ein käufliches ELISA-Substrat handelt, dessen genaue Zusammensetzung vom Hersteller unter Verschluss gehalten wird und daher nicht bekannt ist.

Ein anderer möglicher Grund für den beobachteten Rückgang der Enzymaktivität mit zunehmender Verweilzeit wäre eine Produktinhibition, bei der es bei einer hohen Konzentration an Produkt in Enzymnähe zu einer Inhibition kommt. Bei langsamen Flussraten sammelt sich aufgrund des langsameren Abtransportes mehr Produkt im Enzymtransformationsmodul an, weswegen sich die Kinetik im Falle des Vorliegens einer Produktinhibition signifikant verringern würde. Diese Annahme wird durch die Beobachtung untermauert, dass es bei langsamen Flussraten zu einer Ausfällung des Farbstoffes und einer Änderung der Farbqualität von blau nach orangebraun kommt.

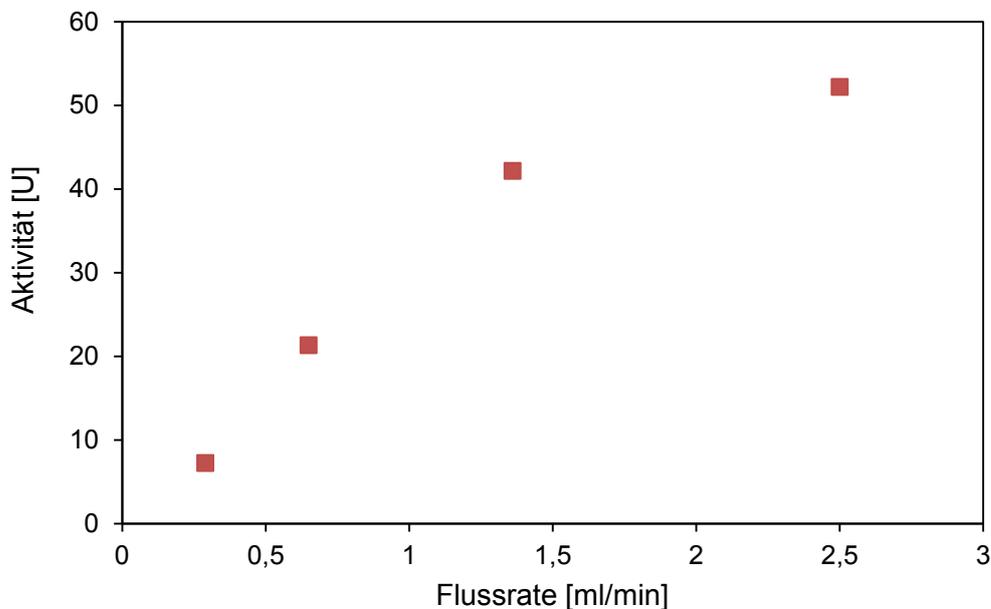


Abbildung 30: Aktivität des HRP-Enzymtransformationsmoduls in Abhängigkeit der Flussrate des Substrates durch den Reaktor. Zu erkennen ist, dass langsame Flussraten zu einer geringeren Menge an durch HRP umgesetzten TMB führen, als schnelle.

Würde im Falle der HRP-Immobilisierung auf 3D-Druckmaterial die gleiche spezifische Aktivität des gebundenen Enzyms erreicht wie im Falle der HRP-Immobilisierung an M-PVA C22 Mikropartikel sollten die angenommenen 3,6 mg Enzym auf der Oberfläche des gedruckten Trägers eine Gesamtaktivität von ca. 1000 U erreichen. Wie zu erkennen, erreicht das Enzymtransformationsmodul aber nur ein Zwanzigstel dieses Werts. Als Ursachen für diese Diskrepanz kommen entweder eine geringere Aktivitätsausbeute des Enzyms bei der Immobilisierung auf 3D-Druckmaterial oder eine real geringere Enzymbeladung als die angenommenen 3,6 mg in Frage. Für die erste Hypothese spricht der Umstand, dass das 3D-Druckmaterial eine komplexe Mischung aus verschiedenen Acrylaten ist, die zudem weitere reaktive Stoffe wie z.B. Fotoinitiatoren enthält. Für die zweite Hypothese spricht die Abschätzung der bei einer monomolekularen Bedeckung theoretisch erreichbaren Enzymbeladung (siehe Abschnitt 4.1.2).

4.3. Charakterisierung der Temperiereinheit

Im folgenden Kapitel wird die Temperiereinheit, welche das Enzymtransformationsmodul umschließt, charakterisiert.

4.3.1. Beschreibung

Der Temperiermantel wurde aus einem Aluminiumblock gefräst. Konstruktionsvorgaben waren eine passgenaue Umschließung des Enzymtransformationsmoduls durch den Temperiermantel sowie ein abnehmbarer Deckel (gezeigt in Abbildung 33), der auch eine Temperierung der Moduloberseite ermöglicht. Die technische Zeichnung inklusive Bemaßung ist in Abbildung 31 bereitgestellt.

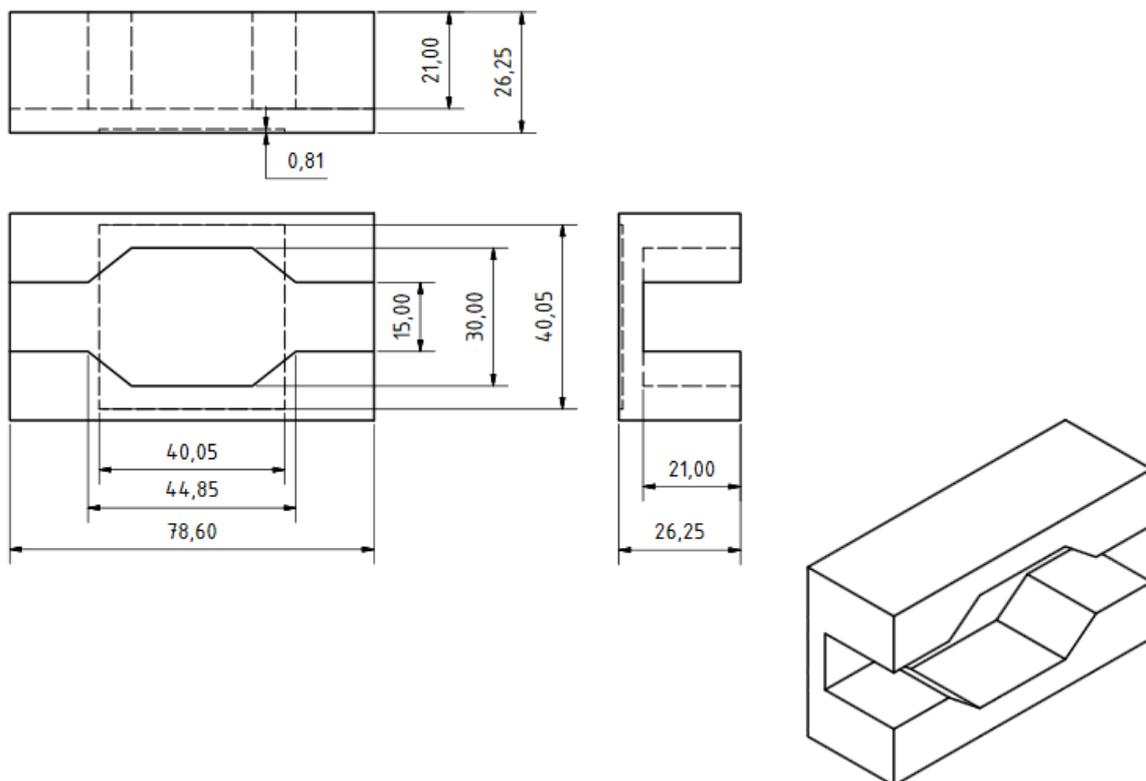


Abbildung 31: technische Zeichnung des Aluminiumkühlmantels, welcher das Enzymtransformationsmodul umschließt mit sowie skizzierter 3D-Ansicht. Abgeschlossen wird der Aluminiummantel durch einen in dieser Abbildung nicht gezeigten passenden Aluminiumdeckel.

Das Peltier-Element inklusive Kühlblock, welcher durch einen PC-Lüfter temperiert wird, sollte unterhalb des Reaktors angebracht werden und die ganze Apparatur in eine Aufstellvorrichtung eingebettet werden. Diese wurde aus Kunststoffmaterial gefertigt und verklebt. Der zur Temperierung genutzte Aluminiummantel umschließt das Enzymtransformationsmodul eng, um eine ideale Wärmeübertragung zu gewährleisten (Abbildung 32). Allerdings lässt sich nicht vermeiden, dass es aufgrund der Fertigungsmethode des Moduls an einigen Stellen zu luftgefüllten Zwischenräumen von einigen zehntel Millimeter zwischen Reaktor und Aluminiummantel kommt. Hierdurch kam es bei wiederholten Versuchen zu starken Abweichungen im Wärmeverlauf der Temperierung. Je nach Positionierung des Reaktors im Temperiermantel können die Lufträume unterschiedlich ausfallen und daher zu nicht vorhersehbarem Temperierverhalten führen (Daten nicht gezeigt). Die Standardabweichungen bei derartigem Versuchsaufbau lagen im Bereich mehrerer Minuten. Dieses Problem konnte durch Aufbringung einer wärmeleitenden Silikonfett-Paste behoben werden, welche die isolierenden Lufträume zwischen Enzymtransformationsmodul und Temperiermantel ersetzt.

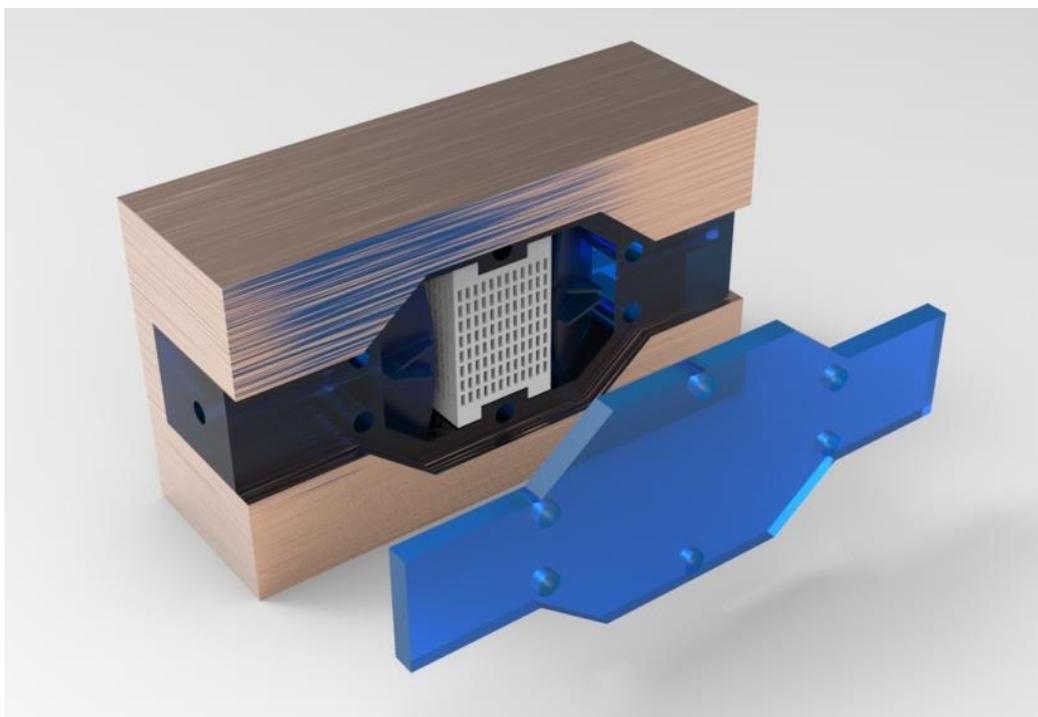


Abbildung 32: Enzymtransformationsmodul bestehend aus Gitterstruktur (weiß) zur Enzymimmobilisierung und Gehäuse (blau) eingebettet in den Aluminium-Kühlmantel der Temperatureinheit. Ein in dieser Abbildung nicht gezeigter Aluminiumdeckel schließt die Isolation ab.

Der Temperiermantel wurde auf ein Peltier-Element montiert, welches seinerseits auf einem Aluminium-gefrästen Kühlblock mit Lüftungsschlitzen positioniert ist. Um die Wärmezu- bzw. abfuhr aus der Umgebungsluft an den Kühlblock zu verstärken, wurde unter dem Kühlblock ein PC-Lüfter montiert. Im Rahmen erster Versuche wurde die Temperiereinheit auf einem Kunststoffständer montiert, im Rahmen späterer Versuche wurde sie zusammen mit den anderen Modulen auf ein Lochblechgitter fixiert. Abbildung 33 zeigt den Temperiermantel mit eingelegtem Enzymtransformationsmodul und Deckel, sowie das Peltier-Element, den Kühlblock, den PC-Lüfter und den Kunststoffständer.

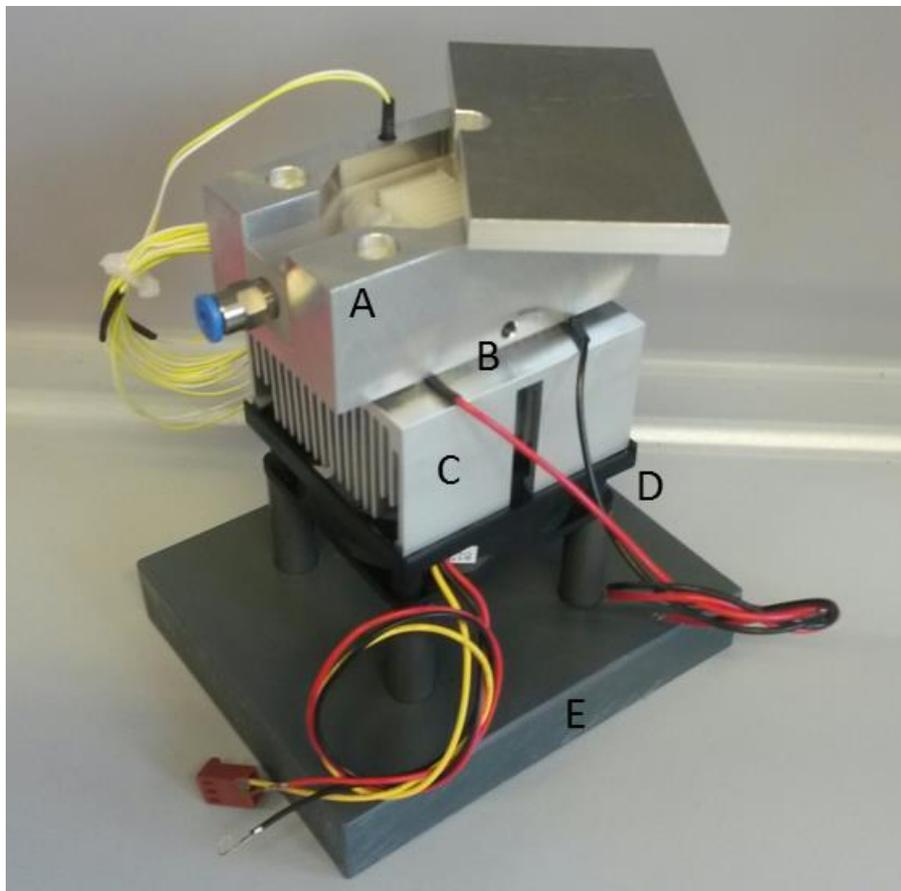


Abbildung 33: Temperiereinheit mit eingelegtem Enzymtransformationsmodul. Gezeigt sind der Aluminium-Kühlmantel (A), das Peltier-Element (B), der Aluminiumkühlblock (C), der PC-Lüfter (D) und der Kunststoffständer (E).

4.3.2. Aufnahme der Temperaturverläufe

Die Charakterisierung der Temperiereinheit erfolgte unter statischen (kein Durchfluss) und dynamischen Bedingungen (Durchfluss) durch Aufnahme der zeitlichen Temperaturverläufe

im Temperiermantel sowie im Reaktorinneren. Abbildung 34 zeigt eine typische Temperaturkurve unter statischen Bedingungen, bei der die Einheit aus Temperier- und Enzymtransformationsmodul von Raumtemperatur auf 30° C erwärmt wurde. Die schwarze Kurve zeigt den Temperaturverlauf des Mantels, welcher direkt auf das Peltier-Element aufgesetzt ist. Die Zieltemperatur von 30° C wird hier bereits nach ca. 3 min erreicht und pendelt sich dann konstant bei ca. 30,5° C ein. Zeitlich versetzt hierzu erfolgt die Temperierung des Enzymtransformationsmoduls, welche aufgrund der verschiedenen Wärmedurchgänge zwischen Aluminium und 3D-Druckmaterial sowie 3D-Druckmaterial und Flüssigkeit verzögert ist. Gezeigt ist eine Messung ohne die Nutzung von Silikonfett zur verbesserten Wärmeleitfähigkeit. In diesem Fall wird die Zieltemperatur im Reaktor erst bei ca. 1200 sec = 20 min erreicht. Durch Einsatz von Silikonfett als wärmeleitendes Mittel konnte die Standardabweichungen der Relaxationszeit deutlich verringert werden.

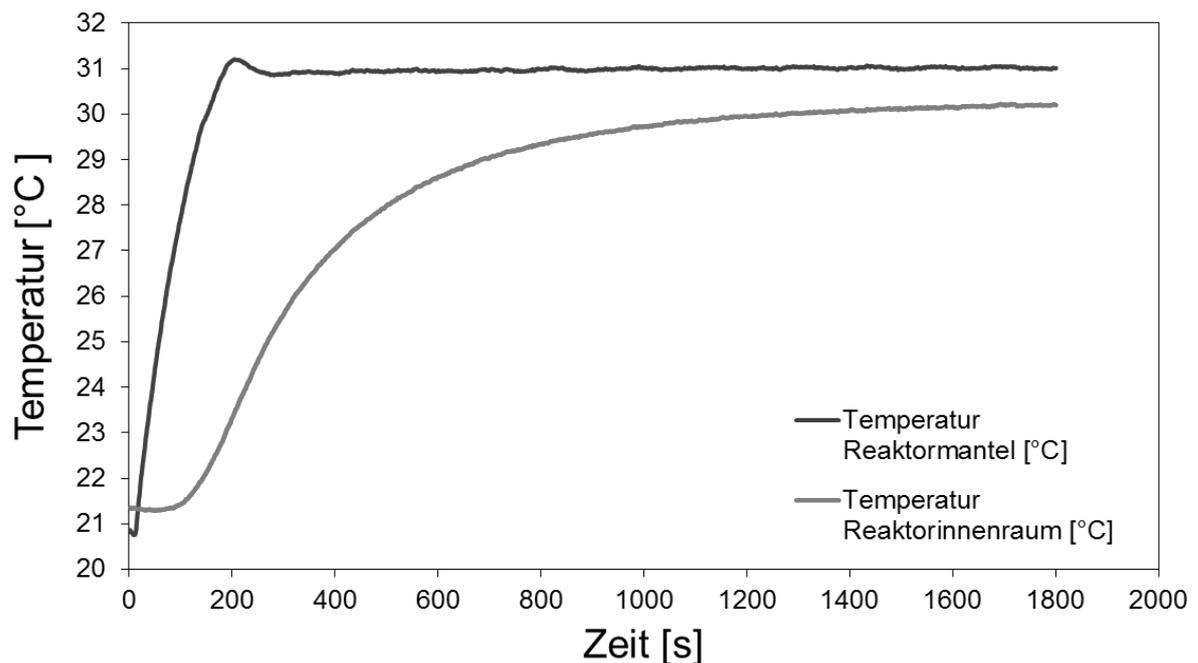


Abbildung 34: Temperaturverläufe des Aluminium-Temperiermantels (schwarz) und des flüssigkeitsgefüllten Reaktorvolumens (grau) unter statischen Versuchsbedingungen, d.h. ohne Durchströmung des Reaktors. Starttemperatur war 21° C, Zieltemperatur war 30° C.

In den Spalten sind die gemessenen Relaxationszeiten des Reaktorsystems unter statischen und dynamischen Bedingungen für drei verschiedene Temperatursprünge aufgetragen.

Die Relaxationszeit ist abhängig von der Zieltemperatur und von der Flussrate des Reaktors. Je kleiner die Flussrate, desto kürzer die Relaxationszeit, da sich die Moleküle länger im Reaktorinneren aufhalten und der Wärmeübergang an ein Fluidelement länger andauern kann. Vergleichend hierzu ist auch die mittlere Verweilzeit von ca. 5 min bei einem Fluss von 2 ml min^{-1} und ca. 40 min bei einem Fluss von $0,25 \text{ ml min}^{-1}$ zu betrachten. Da jedoch bei Enzymreaktionen tendenziell eher von langsamen Flussraten, bzw. statischen Bedingungen bei Stop-Flow-Verfahren mit Minuten- bis stundenlangen Inkubationszeiten ausgegangen werden kann, sind Relaxationszeiten von 5 - 10 min als tragbar zu erachten. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn davon ausgegangen wird, dass der Reaktor nach Erreichen der Zieltemperatur beliebig lang im kontinuierlichen Betrieb gefahren werden kann. In diesem Fall ist die Lebensdauer des Systems von anderen Faktoren, wie der zeitlichen Inaktivierung der Enzymkomponenten abhängig.

Jedoch weicht die Temperatur im Reaktorinneren um bis zu $4,5^\circ \text{ C}$, verglichen mit der Zieltemperatur, ab, wenn hohe Flussraten gefahren werden. Dies kann auf den Temperatursensor des Peltier-Controllers zur *closed-loop feedback*-Kontrolle zurück zu führen sein. Dieser ist während des momentanen Standes der Arbeit im Aluminiumtemperiermantel des Reaktors lokalisiert. Für eine exakte Temperatureinstellung des Reaktorinneren und somit des Produktstroms gibt es damit zwei Möglichkeiten: Zum einen müsste die Temperatur demnach entweder entsprechend manuell hochreguliert werden, um den Wärmeverlust beim Durchqueren des Temperiermantels und des Enzymtransformationsmoduls auszugleichen. Für einen direkten *closed-loop feedback* müsste zum anderen eine Bohrung ins Reaktorinnere für die exakte Platzierung der Referenzmesssonde getätigt werden.

Tabelle 16: Relaxationszeiten des Reaktorsystems für verschiedene Temperatursprünge unter statischen (Flussrate = 0) und dynamischen Bedingungen. Gelistet sind Start- und Zieltemperatur, die eingestellte Flussrate durchs Reaktorinnere, die gemessene Relaxationszeit inklusive Standardabweichungen und die erreichte Maximaltemperatur.

Starttemperatur [° C]	Zieltemperatur [° C]	Flussrate [ml min ⁻¹]	Relaxationszeit [min]	Erreichte T _{max} [° C]
21	25	0	5,89 ± 0,05	25,37
21	30	0	6,19 ± 0,19	30,35
21	35	0	8,53 ± 0,28	34,43
21	25	0,10	6,71 ± 0,43	25,43
21	25	0,55	7,72 ± 0,26	25,07
21	25	1,20	7,80 ± 0,33	24,99
21	25	1,75	7,19 ± 0,67	24,45
21	30	0,10	8,23 ± 0,14	30,55
21	30	0,55	9,85 ± 0,16	28,76
21	30	1,20	8,38 ± 0,03	28,53
21	30	1,75	8,98 ± 0,17	27,95
21	35	0,10	10,04 ± 0,04	34,51
21	35	0,55	9,93 ± 0,19	33,41
21	35	1,22	10,45 ± 0,42	31,97
21	35	1,75	13,83 ± 0,87	30,40

4.4. Charakterisierung des pH-Moduls

Den Ausgangspunkt für die Entwicklung eines Moduls zur pH-Regulierung bildete eine elektrochemische Zelle zur Kapazitiven Deionisation, wie sie von Frau Dipl.-Ing. Ellen Biegert (Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Funktionelle Grenzflächen, Arbeitsgruppe von Prof. Matthias Franzreb) zur Aufkonzentrierung organischer Säuren genutzt wird. Unter kapazitiver Deionisierung wird die Entsalzung von Abwässern mit Hilfe poröser Kohlenstoffelektroden verstanden. Durch Anlegen einer Spannungsdifferenz zwischen den Elektroden werden Ionen temporär an die Elektroden immobilisiert und so aus dem Wasserstrom entfernt. Für eine genaue Zusammenfassung der physikalischen Grundlagen, sowie bekannter Einsatzbeispiele der kapazitiven Deionisierung kann das exzellente Review von Porada *et al.* aus dem Jahre 2013 herangezogen werden[90].

4.4.1. Beschreibung der zur pH-Einstellung genutzten Zelle

Wie in Abbildung 35 gezeigt, wird das Elektrodenpaar der modifizierten CDI-Zelle von einem zweiteiligen 3D-gedruckten Gehäuse umfasst, welches zum einen die Verschraubung des Moduls und zum anderen den Ein- und Ausfluss des Produktstromes ermöglicht. Als Arbeitselektrode (*working electrode*, WE) dient ein Titanblech, welches mit einer dünnen kapazitiven Elektrode (Zusammensetzung Aktivkohle (YP50, Kuraray CO, Ltd.) und Polyvinylidenfluorid (PVDF) im Verhältnis 5:1) bedeckt wird. Als Gegenelektrode (*counter electrode*, CE) dient ebenfalls ein Titanblech. Eine Schicht aus 4 Lagen Filterpapier isoliert die Elektroden elektrisch gegeneinander und bildet einen porösen von der Lösung durchströmten Kanal, der in engem Kontakt zu den angrenzenden Elektrodenoberflächen steht. Die seitliche Begrenzung des Kanals bildet eine 1mm starke Dichtung zwischen den Gehäusehälften. Des Weiteren befindet sich in der Mitte einer der Gehäusehälften eine Bohrung, durch die eine Referenzelektrode in die Zelle eingeführt werden kann. Dadurch ergibt sich ein 3-Elektrodenaufbau (Arbeits-, Gegen- und Referenzelektrode), der eine genaue Kontrolle des an die Arbeitselektrode angelegten Potentials erlaubt. Hierzu wird der Aufbau mit den entsprechenden Anschlüssen eines Potentiostaten (Gamry Potentiostat Reference 3000) verbunden.

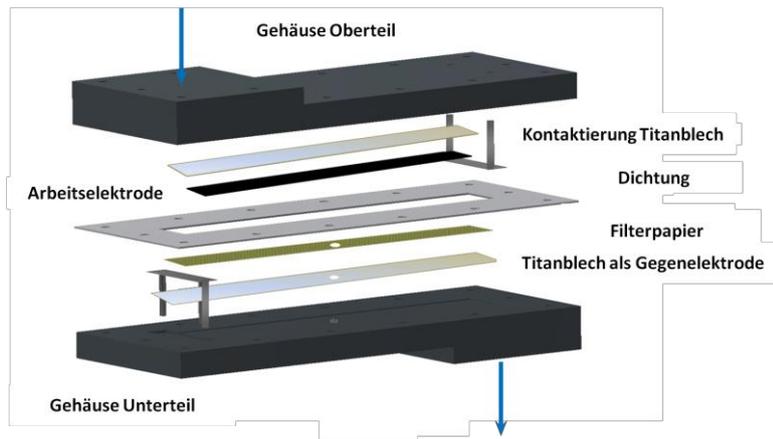
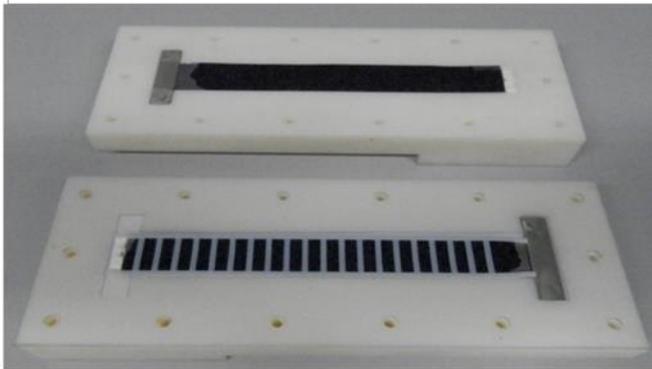


Abbildung 35: Oben: Aufbau der modifizierten CDI-Zelle mit asymmetrischen Elektrodenaufbau aus Metallelektrode (unten) als Gegenelektrode und einer kapazitiven Elektrode aus Aktivkohle als Arbeitselektrode. Eine Referenzelektrode erlaubt die Regelung des Potentials der Arbeitselektrode.

Unten: Fotografie der geöffneten ursprünglichen CDI-Zelle. In dieser ursprünglichen Form sind noch beide Elektroden mit einer Schicht aus Aktivkohle (schwarz) bedeckt. Mit freundlicher Genehmigung von Ellen Biegert und Jonas Wohlgemuth.



Die verwendete Zelle ist ein Aufbau aus 3 Elektroden: einer kapazitiven mit Graphitschicht bedeckten Titanelektrode als Arbeitselektrode, einer reinen Titanelektrode als Gegenelektrode und einer Referenzelektrode. Der asymmetrische Aufbau wird gewählt, da die sich einstellende Stromstärke bei einem symmetrischen Aufbau mit zwei Metallelektroden bei zunehmender Spannung sehr schwer zu regulieren ist und sich der pH-Effekt der an beiden Elektroden auftretenden Redoxreaktionen sich weitgehend neutralisiert. Bei geringeren Spannungen kommt es in einem symmetrischen System nur zu einem sehr leichten Anstieg der Stromstärke, während diese ab einem Schwellenwert sprunghaft ansteigt. Wird hingegen ein asymmetrischer Aufbau aus Metallelektrode und kapazitiver Elektrode gewählt, ist der Stromverlauf bei Spannungsänderung nach kurzer Anlaufphase weitestgehend linear und daher sehr gut regelbar (Abbildung 36).

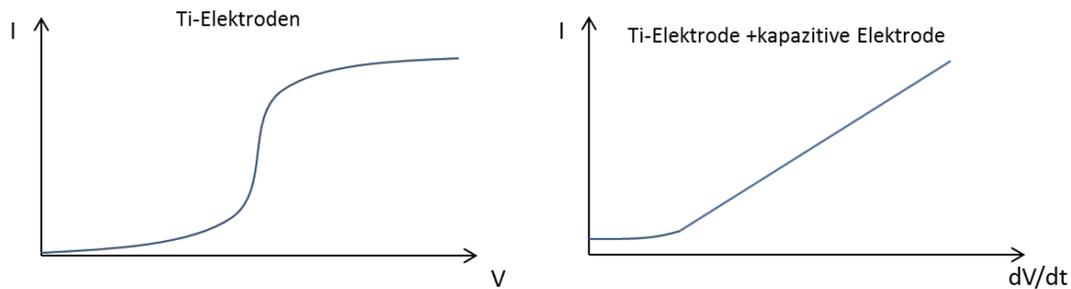


Abbildung 36: Stromverlauf in Abhängigkeit von der Spannung bzw. der zeitlichen Spannungsänderung für einen symmetrischen Elektrodenaufbau mit einem Paar aus Titanelektroden (links), sowie für einen asymmetrischen Aufbau aus einer Titan- und einer kapazitiven Elektrode, welche mit einer Schicht aus aktiviertem Kohlenstoff bedeckt ist (rechts).

Ein während der CDI beobachteter Nebeneffekt ist die Veränderung des pH-Wertes des ausströmenden Fluides nach Durchströmen der Zelle. Daher wurde der Einsatz dieser CDI-Zelle im Rahmen dieser Arbeit als pH-Regulationsmodul im modularen Reaktoraufbau geprüft. Der Aufbau sowie die zur pH-Änderung benötigten physikalischen und chemischen Grundlagen sind in Abbildung 37 dargestellt. Bei einer angelegten Spannung kommt es zu zwei gleichzeitig auftretenden Effekten: Zum einen kommt es an der kapazitiven Arbeitselektrode zur Adsorption entgegengesetzt geladener Pufferionen (P^+ , P^-). Zum anderen wird Wasser (H_2O) an der Gegenelektrode durch Elektrolyse gespalten, wobei je nach Polung OH^- - oder H^+ -Ionen generiert werden, welche einen direkten Einfluss auf den pH-Wert der ausströmenden Lösung ausüben.

4.4.2. pH-Einstellung

Ziel der Entwicklung des pH-Moduls war es, den pH-Wert einer das Modul durchströmenden Lösung allein durch eine Änderung der eingestellten Stromstärke über den gesamten physiologischen pH-Bereich einstellen zu können. Zur Erprobung des pH-Moduls wurden bei konstanter Flussrate von 1 ml/min in einer Lösung aus 1 mM Tris-Puffer + 10 mM NaCl, pH 7,8 Stromstärken zwischen -11 und 11 mA für jeweils 20 min eingestellt und der pH-Wert im Ausfluss der Zelle ermittelt. Abbildung 37 zeigt den pH-Verlauf des Experimentes. Dabei wurde mit der niedrigsten Stromstärke (1 mA) gestartet und abwechselnd erst ein positiver, dann ein negativer Strom eingestellt. Zwischendurch den Phasen mit Stromfluss wurde die Zelle jeweils für 20 min ohne Stromfluss durchströmt. Aus dem Diagramm ist zu erkennen,

dass ein positiver Stromfluss zur einer pH-Anhebung führt. Wie in Kapitel 4.4.1 erläutert, ist dies darauf zurückzuführen, dass negativ geladene Pufferionen an die positiv geladene kapazitive Elektrode binden. Zur Wahrung der Elektroneutralität kommt es parallel an der negativ geladenen Gegenelektrode zu einer elektrochemischen Spaltung von Wassermolekülen zu Wasserstoff (H_2) und OH^- -Ionen, welche den pH-Wert erhöhen. Im untersuchten Fall, kann der pH-Wert durch das Anlegen positiver Stromstärken von einem Ausgangswert von 7,8 auf Werte bis zu 10,2 erhöht werden. Durch die Wahl der geeigneten Stromstärke ist eine feine Abstimmung des gewünschten pH-Wertes möglich.

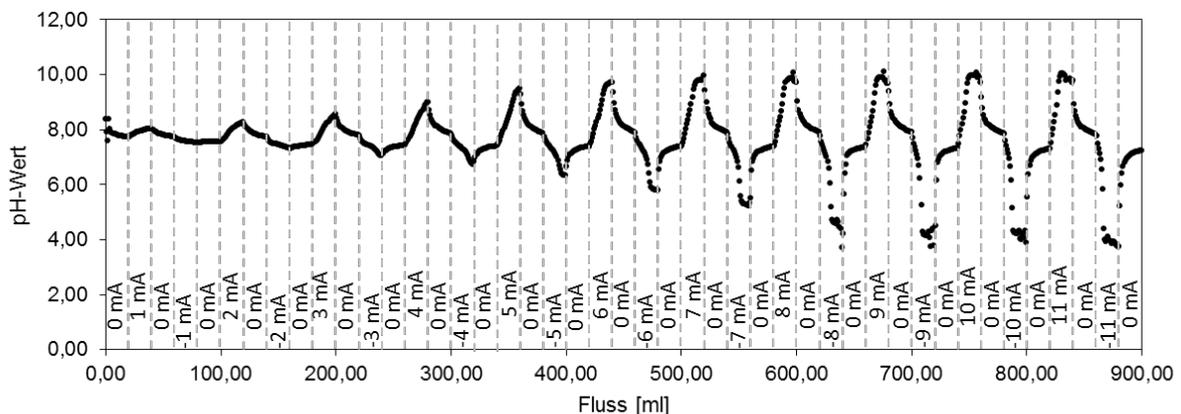


Abbildung 37: pH-Verlauf gemessen am Ablauf der modifizierten CDI-Zelle bei einem konstantem Durchfluss von 1 ml min^{-1} und unter dem Anlegen verschiedener positiver und negativer Stromstärken zwischen -11 und 11 mA. Bei der modellhaften Pufferlösung handelte es sich um 1 mM Tris-Puffer + 10 mM NaCl, pH 7,8.

Ab einer Stromstärke von ca. 10 mA kommt es zu keiner weiteren Erhöhung des pH-Wertes. Des Weiteren können am Reaktorausgang in diesem Fall starke Schwankungen der detektierten Signale für pH-Wert, Leitfähigkeit und UV/vis-Absorption festgestellt werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es bei zu hohen Stromstärken in Verbindung mit langsamen Flussraten zu einer Gasblasenbildung an der Gegenelektrode kommt.

Bei einem negativen Stromfluss und damit einer negativen Polarisierung der Arbeitselektrode wird der Effekt umgekehrt. Es kommt zu einer kapazitiven Bindung positiv geladener Pufferionen und zu einer elektrochemischen Wasserspaltung an der Gegenelektrode zu O_2 und H^+ -Ionen, welche zu einer Absenkung des pH-Wertes führen. Auch hier kann bei langsamen Flussraten und hohen Spannungen Luftblasenbildung im

System beobachtet werden. Wie in Abbildung 38 gezeigt, kann der pH-Wert durch das Anlegen negativer Stromflüsse von einem Ausgangswert von 7,8 auf bis 3 abgesenkt werden. Auch hier ist durch die Einstellung einer entsprechenden Stromstärke eine feine Einstellung des Ziel-pH-Wertes möglich.

Außerdem ist erkennbar, dass bei einer negativen Polarisierung der Elektrode eine pH-Änderung ins Saure über ca. 5 pH-Stufen erfolgt, während bei positiver Polarisierung lediglich eine pH-Änderung über 2 pH-Stufen ins Alkalische erzielt werden kann. Dies ist auf den pKs-Wert der verwendeten Pufferlösung zurückzuführen, der den für die verwendete Pufferkomponente leicht im Alkalischen liegt ($pK_s(\text{Tris-HCl}) = 8,2$) und dort seinen optimalen Pufferbereich besitzt.

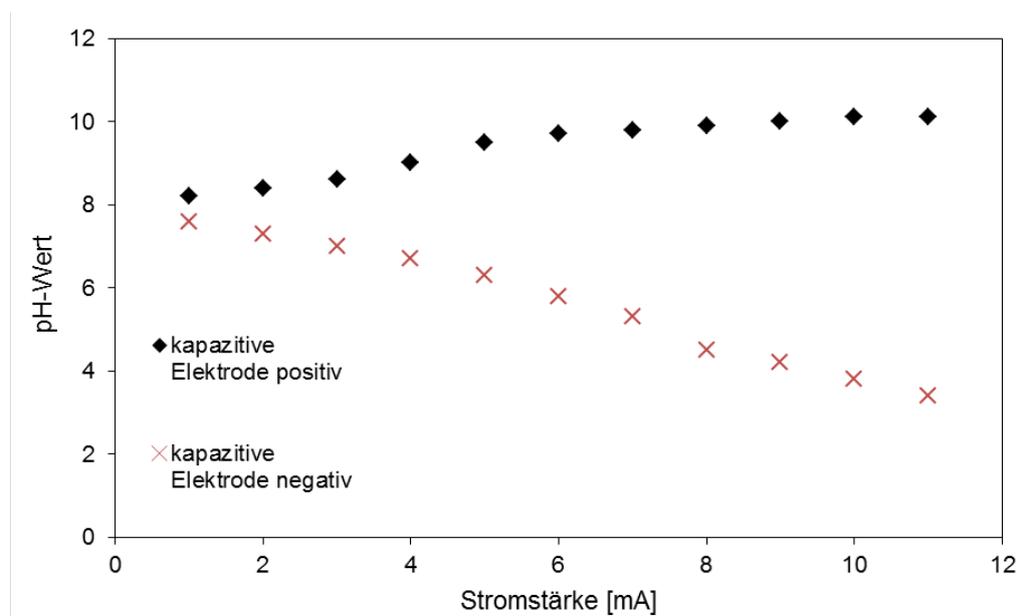


Abbildung 38: pH-Verlauf im Durchfluss der CDI-Zelle bei konstantem Fluss und dem Anlegen positiver und negativer Ströme von 1-11 mA. Die pH-Änderungen umfassen einen weiten Bereich von pH 4 – 10 und sind fein einstellbar. Die Änderungskapazität ist dabei in Richtung saurer pH-Werte stärker ausgeprägt (ca 5 pH-Stufen) als in Richtung basischer (2 pH-Stufen), was auf die Pufferkapazität der verwendeten Pufferkomponente zurückzuführen ist, die im leicht basischen Bereich angesiedelt ist.

Generell bewegen sich die pH-Optima verschiedener Enzyme aus gängigen Wirtsorganismen im Bereich zwischen 3 und maximal 11. Das entwickelte pH-Modul ist damit in der Lage die pH-Optima gängiger Enzyme und von Enzymen aus moderat Extremophilen abdecken zu können. Die pH-Wert Einstellung erfolgt dabei rein elektrochemisch, d.h. ohne die

Notwendigkeit der Zudosierung von Säuren oder Basen die zu einer Verdünnung oder Verunreinigung des Produktstromes führen könnten. Zudem erfolgt sie innerhalb der kurzen mittleren Verweilzeit der Lösung im pH-Modul von nur 2,3 Minuten im Falle einer Flussrate von 1 ml/min.

Ein Nachteil des entwickelten pH-Moduls ist, dass die pH-Regelung nicht beliebig lange eingestellt werden kann. Zur Aufrechterhaltung des notwendigen Stromflusses muss der Betrag der an der kapazitiven Arbeitselektrode angelegten Spannung mit einer konstanten Rate langsam erhöht werden. Nach einer Zeit von Minuten bis zu, in günstigen Fällen, ca. einer Stunde überschreitet die angelegte Spannung einen Wert, ab dem es auch an der Arbeitselektrode zu einer Redoxreaktion, in der Regel einer Wasserspaltung, kommt. Ab diesem Zeitpunkt wird das Regelverhalten schlecht vorhersehbar und es kommt zu einer vermehrten Gasblasenbildung. Daher muss die pH-Regelung temporär gestoppt werden, bevor diese Spannung erreicht ist. Durch eine kurze Regenerationsphase mit erhöhtem Stromfluss in entgegengesetzter Richtung wird die als Kondensator wirkende kapazitive Arbeitselektrode wieder entladen und steht danach für eine erneute pH-Regelung bereit.

4.4.3. Miniaturisierung und Optimierung des pH-Moduls

Da die ursprünglich zur pH-Regelung genutzte modifizierte CDI-Zelle im Vergleich zu den Enzymtransformationsmodulen zu groß und überdimensioniert war, wurde eine miniaturisierte und verbesserte Version davon entwickelt. Abbildung 39 zeigt die gerenderte technische Zeichnung des neu designten und an die Dimensionen des übrigen Reaktorsystems angepassten pH-Moduls. Wie bei der ursprünglich verwendeten CDI-Zelle wurden Titanbleche (in der Abbildung kupferfarben eingefärbt) als Elektroden genutzt. Aus Platzgründen und zur Vereinfachung des Modulaufbaus wurde auf die Installation einer Referenzelektrode verzichtet. Dies bedeutet, dass das System als Zweielektrodensystem verwendet wird. Die kapazitiv wirkende Schicht aus gebundener Aktivkohle wurde zugeschnitten und während des Aufbaus auf der Arbeitselektrode platziert (in der Abbildung dargestellt in schwarz). Einige Lagen Filterpapier dienten als durchströmbare Spacer- und Isolationsschicht zwischen den Elektroden und sorgten darüber hinaus für den notwendigen Anpressdruck.

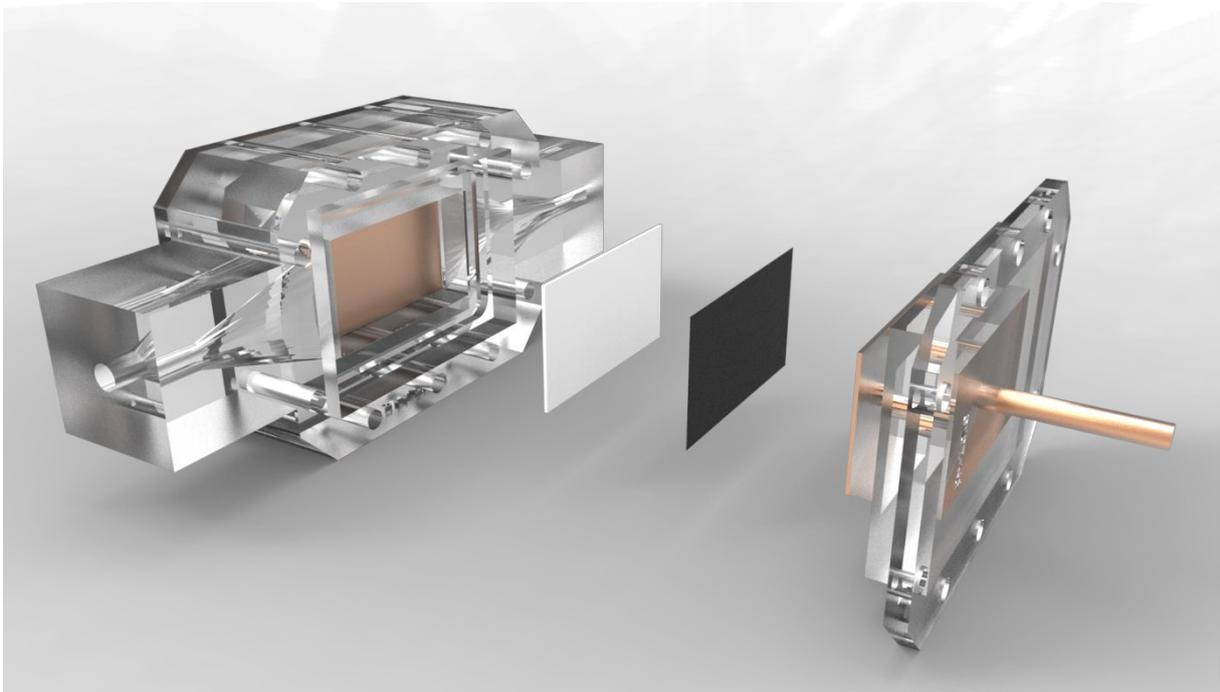


Abbildung 39: gerenderte technische Zeichnung des pH-Kontrollmoduls. Zu sehen sind das Gehäuse (klar) bestehend aus pH-Modul und Deckel, die Arbeits- und Gegenelektrode (kupferfarben), das kapazitive Graphitmaterial (schwarz), welches auf die Arbeitselektrode aufgelegt wird und einige Lagen Filterpapiere (weiß) zur Isolation der Elektroden voneinander sowie zur Erzeugung eines stabilen Anpressdruckes.

Der Deckel des pH-Moduls ist zum Teil ein Stück in das Innere der Zelle versenkt und wird mit einem o-förmigen Dichtungsring aus flexiblem Gummi abgedichtet. Dies führt im Vergleich zu den im Enzymtransformationsmodul verwendeten Flachdichtungen zu einer weitaus einfacheren Handhabung, da die Pressung von Gehäuse und Deckel durch die Schrauben und Muttern verhältnismäßig gering gehalten werden kann und dennoch eine vollständige Dichtigkeit des Moduls auch bei höheren Drücken gewährleistet ist. Erste Durchströmungsversuche der miniaturisierten Zelle zur pH-Modulation mit Flussraten bis zu 2 ml min^{-1} zeigten keinen Flüssigkeitsverlust an der Grenzfläche zwischen Zelle und Deckel. Abbildung 40 zeigt die technische Zeichnung des pH-Kontrollmoduls inklusiver aller wichtigen Abmessungen im mm-Maßstab. Das abgeschätzte theoretische Gesamtvolumen des pH-Moduls in seiner miniaturisierten Form liegt bei ca. 2,8 ml. Das Volumen an einströmender Flüssigkeit, welches direkt mit der Arbeitselektrode in Kontakt steht, beträgt abgeschätzt ungefähr 0,53 ml.

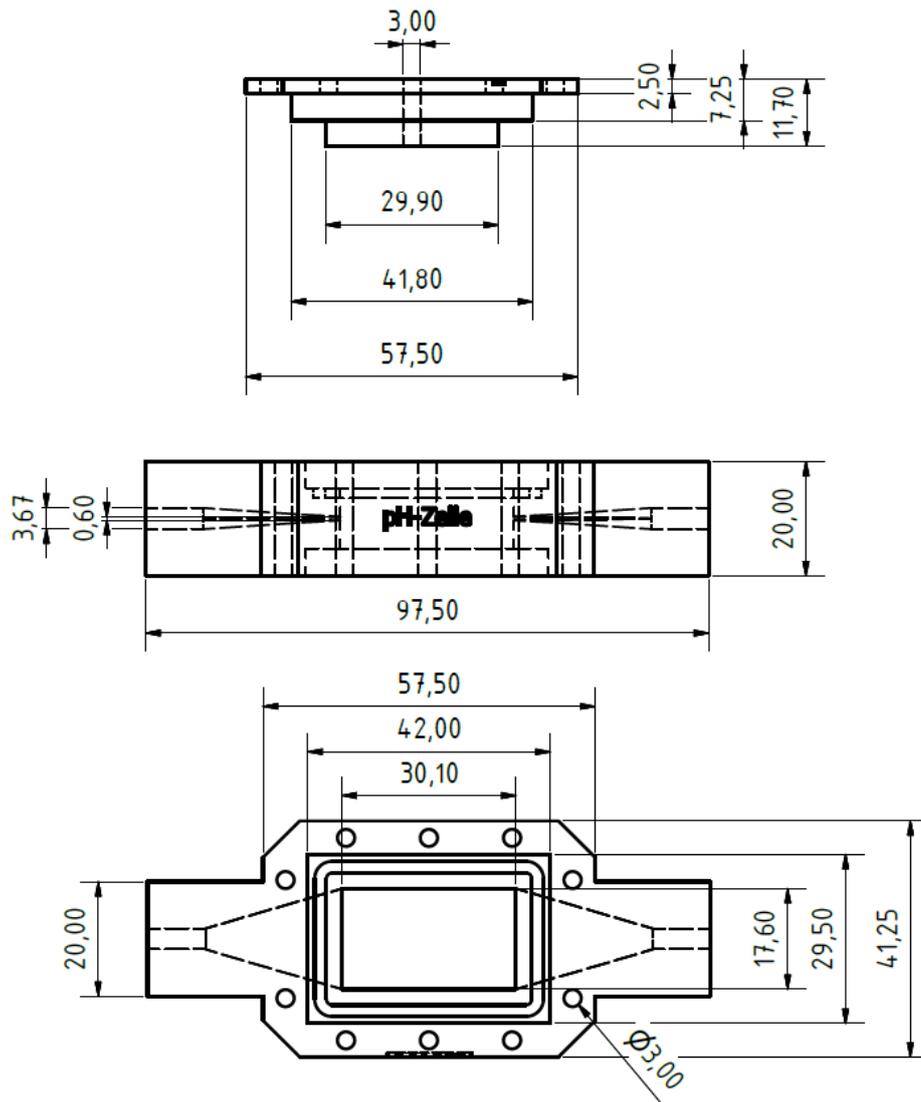


Abbildung 40: Technische Zeichnung und Maße des miniaturisierten pH-Moduls. Die Ansicht ist aus verschiedenen Blickrichtungen gezeigt. Die Bemaßung ist im mm-Maßstab dargestellt.

4.4.4. Verweilzeitmessungen

Für die verfahrenstechnische Charakterisierung des miniaturisierten pH-Moduls wurde die mittlere Verweilzeit und die Verweilzeitverteilung (*residence time distribution*, RTD) gemessen. Dafür wurde eine 1 M NaCl-Lösung als Tracer verwendet und der resultierende zeitliche Verlauf der Tracerkonzentration im Ausstrom des Reaktors mittels eines Leitfähigkeitsdetektors gemessen.

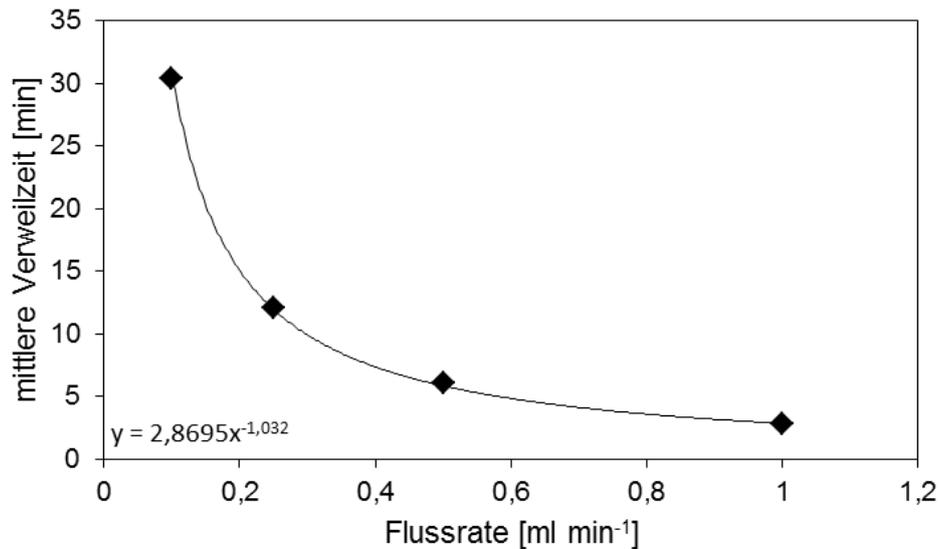


Abbildung 41: mittlere Verweilzeit eines Salztracers in der miniaturisierten pH-Kontrollzelle bei unterschiedlichen Flussraten. Die Kurve nimmt einen abnehmenden hyperbolischen Verlauf an.

Abbildung 41 zeigt die gemessene mittlere Verweilzeit des NaCl-Tracers in Abhängigkeit von der Flussrate. Zu sehen ist ein abnehmender hyperbolischer Verlauf. Die Datenpunkte lassen sich mit folgender Potenzfunktion sehr gut approximieren:

$$(25) \quad \text{mittlere Verweilzeit} = 2,87 \cdot \text{Flussrate}^{-1,032}$$

Die mittlere Verweilzeit beträgt für einen Fluss von 1 ml min⁻¹ 2,87 min, für 0,5 ml min⁻¹ 6,1 min, für 0,25 ml min⁻¹ 12,1 min und für 0,1 ml min⁻¹ 30,5 min. Insgesamt kann somit ein durchströmtes Volumen des miniaturisierten pH-Moduls von 2,87 ml errechnet werden. Die kumulativen Verteilungsfunktionen (F-Kurven) sind in Abbildung 42 dargestellt.

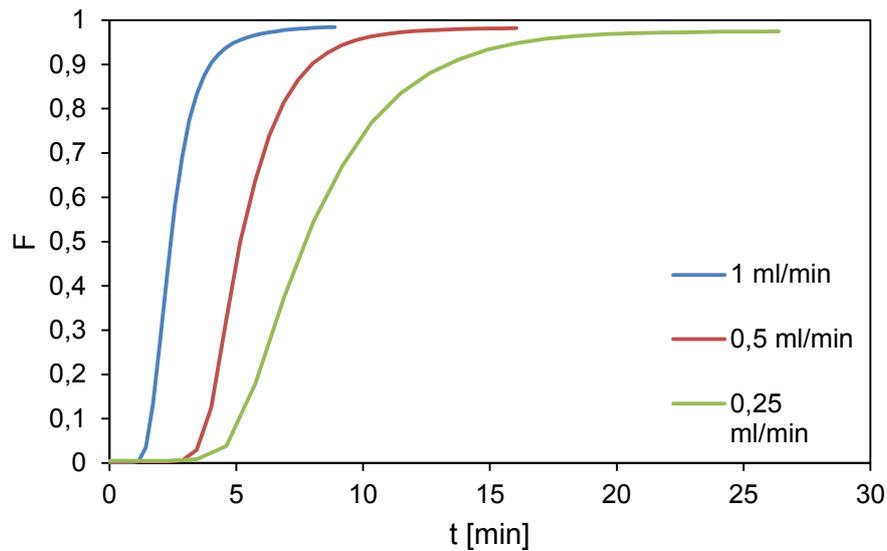


Abbildung 42: Kumulative Verteilungsfunktion (F-Kurve) eines Salztracers im miniaturisierten pH-Kontrollmodul in Abhängigkeit verschiedener Flussraten von 1; 0,5 und 0,25 ml min⁻¹.

Durch die Ableitung der kumulativen Verteilungsfunktionen oder F-Kurven können die dimensionslose Verweilzeitverteilung (E-Kurven) für die verschiedenen Flussraten berechnet und grafisch dargestellt werden. Abbildung 43 zeigt die dimensionslose Verweilzeitverteilung des Tracermoleküls Natriumchlorid beim Durchströmen des pH-Moduls bei unterschiedlichen Flussraten.

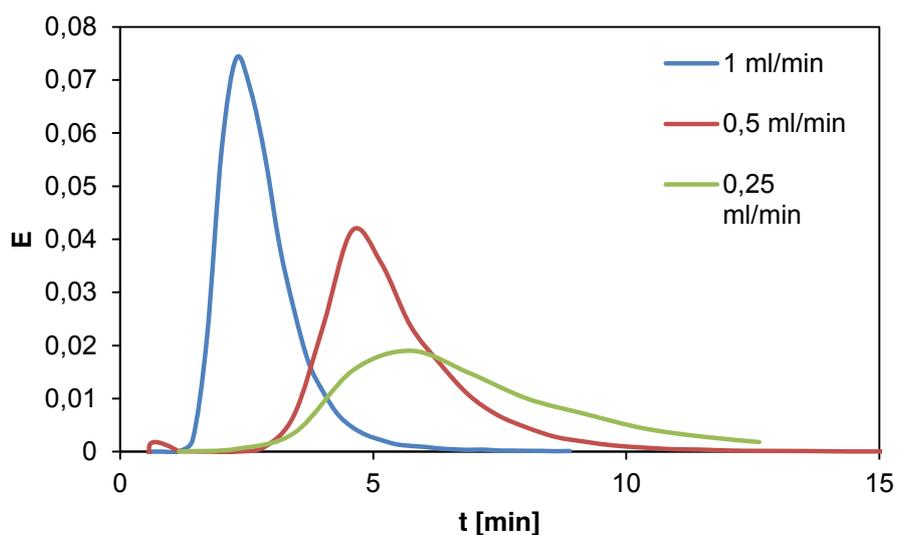


Abbildung 43: Dimensionslose Verweilzeitverteilung des NaCl-Salztracers im miniaturisierten pH-Modul.

Bei Betrachtung der Bodensteinzahl, die wie für das Enzymtransformationsmodul ca. 30 beträgt, ergibt sich auch für das pH-Modul eine *plug flow*-ähnliche Durchströmung mit einem moderaten Grad an axialer Dispersion.

Die mittleren Verweilzeiten betragen in Abhängigkeit von der Flussrate verglichen mit den mittleren Verweilzeiten des Enzymtransformationsmoduls nur ca. 25%, was auf eine deutlich schnellere Durchströmung einzelner Teilchen durch das pH-Modul hinweist. Dieses unterschiedliche Verhältnis ist allerdings erwünscht, da die Reaktionszeit im Enzymmodul der dominierende Schritt in der Reaktionskette sein und die Anpassung des pH-Wertes keinen zeitrelevanten Prozessschritt darstellen soll. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die pH-Modulation ausreichend schnell durchgeführt werden kann, was eine erhöhte Aufenthaltsdauer des Produktstromes im pH-Modul überflüssig macht. Des Weiteren sieht das Konzept des modularen Enzymreaktoransatzes vor, dass das pH-Modul zwischen mehrere Enzymtransformationsmodule geschaltet werden kann. Von daher ist es äußerst sinnvoll, wenn die Rückvermischung im pH-Modul auf ein Minimum beschränkt bleibt.

4.4.5. pH-Einstellung von 1 mM Tris 10 mM NaCl durch die miniaturisierte Zelle

Zunächst musste die Performance des miniaturisierten Moduls verglichen mit der originalen CDI-Zelle eingehend charakterisiert werden. Dafür sollten vergleichbare pH-Änderungen in einer durchströmenden Lösung erzeugt werden. Dafür wurde zunächst die Modellpufferlösung von 1 mM Tris und 10 mM NaCl bei einem Start-pH-Wert von 7,5 genutzt. Im Rahmen erster Experimente wurden pH-Einstellungen mit verschiedenen Stromstärken von -4 bis 4 mA in 0,5 mA-Schritten bei einer konstanten Flussrate von 1 ml min⁻¹ durchgeführt. Abbildung 44 zeigt den pH-Verlauf während des Experiments, wie er von der FPLC-Anlage am Reaktorausgang aufgezeichnet wurde. Die Abbildung 45 zeigt die erreichten absoluten pH-Werte in Abhängigkeit der entsprechenden Stromstärken und Polarisierung der Arbeitselektrode.

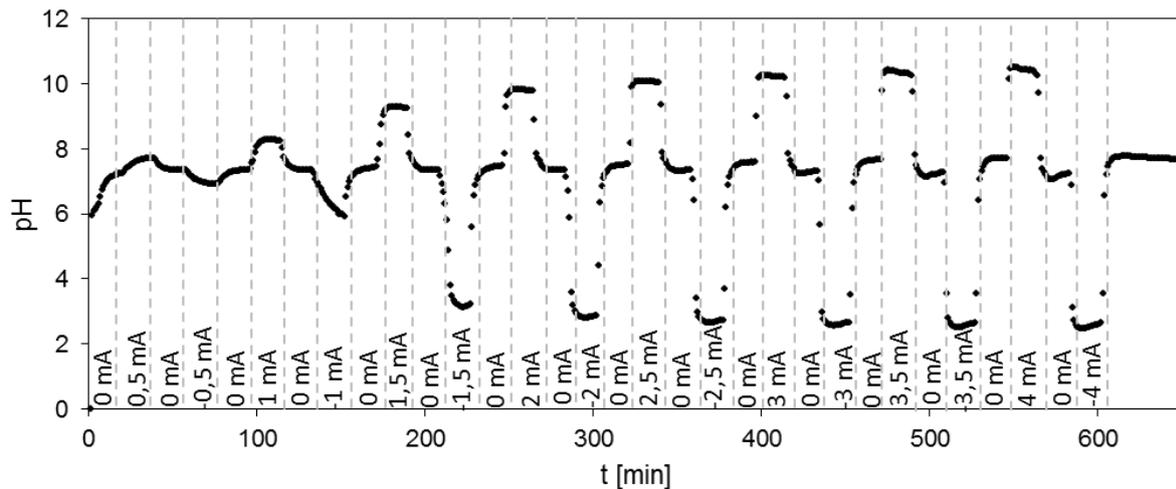


Abbildung 44: pH-Verlauf bei Durchströmen des miniaturisierten pH-Modells mit 1 mM Tris 10 mM NaCl pH 7,5 und einer Flussrate von 1 ml min^{-1} unter Anlegen konstanter Stromstärken zwischen -4 und 4 mA in 0,5 mA-Schritten.

In Abbildung 44 ist zu erkennen, dass die Einstellung des pH-Wertes im Falle des verbesserten pH-Moduls sehr viel schneller erfolgt als im Falle der modifizierten CDI-Zelle und dass sich rasch ein konstanter pH-Wert in Form eines Plateaus ausbildet. Bei höheren Stromstärken ist erkennbar, dass der pH-Wert im Verlauf der Plateauphase wieder leicht in Richtung Ausgangs-pH-Wert (7,5) zu- bzw. abnimmt. Dieser Effekt ist vermutlich auf eine beginnende Erschöpfung der Kapazität der Arbeitselektrode zurückzuführen. Die pH-Einstellung bei Anlegen von 2,5 mA erfolgt innerhalb von 3,88 min. Im Vergleich dazu beträgt die mittlere Verweilzeit des pH-Moduls bei einem Durchfluss von 1 ml min^{-1} 2,87 min. Die Zeit zur Einstellung des Ziel-pH-Wertes entspricht also ca. der 1,7-fachen mittleren Verweilzeit.

Im folgenden Abschnitt sollen einige theoretische Berechnungen zur Erzeugung der pH-Änderungen, der zugrundeliegenden molekularen Änderungen und dem theoretisch benötigten Stromfluss getätigt werden. Dabei soll die oben genannte pH-Änderung unter Anlegen von 2,5 mA Stromfluss und einem resultierenden pH-Wert von 10 betrachtet werden. Dazu soll zunächst berechnet werden, wieviele mol/s an OH^- -Ionen gebildet werden müssen, um den pH-Shift zu erzielen. Zunächst wird festgehalten, dass ein pH-Wert von 10 einer Konzentration von 0,1 mM OH^- -Ionen entspricht. Um zusätzlich die Pufferkapazität der 1 mM Tris-Pufferlösung mit zu betrachten, wird mittels der Henderson-

Hasselbalch-Gleichung ausgerechnet, wie viele Tris-Puffer-Ionen zunächst neutralisiert werden müssen.

$$(26) \quad pH = pKs + \log \frac{c_{A^-}}{c_{HA}}$$

pKs negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
 c_{A^-} Konzentration korrespondierender Base
 c_{HA} Konzentration der Säure

Für die angenommene Tris-Konzentration von 1 mM und den Start-pH-Wert von 7,5 ergibt sich unter Berücksichtigung des pKs-Wertes der Tris-Base von 8,2 eine Konzentration von protonierter Tris-Moleküle (c_{HA}) von 1 mM. Das bedeutet, dass zu Beginn des Experimentes die Gesamtheit der Tris-Moleküle protoniert vorliegt. Für den Ziel-pH-Wert von 10,0 ergibt sich eine c_{HA} -Konzentration lediglich von 0,016 mM, was bedeutet, dass bei diesem pH-Wert der Großteil der Moleküle im deprotonierten Zustand vorliegt. Die Differenz von 0,984 mM muss zu der für pH 10 benötigte OH^- -Konzentration von 0,1 mM addiert werden, um die Gesamtkonzentration der zur Erhöhung des pH-Wertes zu produzierenden OH^- -Ionen zu errechnen. Diese beträgt somit 1,084 mM OH^- -Ionen. Bei Betrachtung eines Volumens von 1 ml bei einer Flussrate von 1 ml min^{-1} ergibt sich eine für die pH-Änderung benötigte Menge an OH^- -Ionen von 1,084 $\mu mol OH^- ml^{-1}$ bzw. 1,084 $\mu mol OH^- min^{-1}$. Unter Einbeziehung der Faraday-Konstante $F = 96,485 Cb mol^{-1}$ ergibt sich im Idealfall einer 100%-igen Stromausbeute der OH^- bildenden Redoxreaktion an der Gegenelektrode ein notwendiger Stromfluss von:

$$I = 1,084 \cdot 10^{-6} \frac{mol}{min} \cdot 96485 \frac{Cb}{mol} = 1,74 \cdot 10^{-3} \frac{A \cdot s}{s} = 1,74 mA$$

Das Ergebnis zeigt, dass bereits ein Stromfluss von 1,74 mA ausreichen sollte um den pH-Wert der zuströmenden Tris-Lösung vom Start-pH 7,5 auf pH = 10 anzuheben. Aus der experimentellen Beobachtung, dass hierzu allerdings praktisch ein Stromfluss von 2,5 mA benötigt wird, errechnet sich eine Stromausbeute der Redoxreaktion von knapp 70%. Mögliche Ursachen für diese Abweichung vom Idealverhalten sind mögliche ohmsche Verlustströme sowie kapazitive Anteile des Stromflusses auch an der Metallelektrode.

Allgemein lässt sich als Faustregel ableiten, dass bei Idealverhalten zur Erzeugung von 1 $\mu\text{mol OH}^-$ oder H^+ pro Minute ein Stromfluss von 1,6 mA benötigt wird. Aufgrund der genannten Abweichungen vom Idealverhalten beträgt der reale Wert ca. 2 bis 2,5 mA. 1 μmol pro Minute entspricht dabei z.B. der Neutralisation einer Pufferstärke von 1 mM bei einem Durchsatz von 1 ml min^{-1} . Im Falle einer Lösung mit einer Pufferstärke von 10 mM werden dementsprechend bei einem Durchsatz von 1 ml/min ca. 20 mA benötigt, um die Pufferung vollständig zu überwinden.

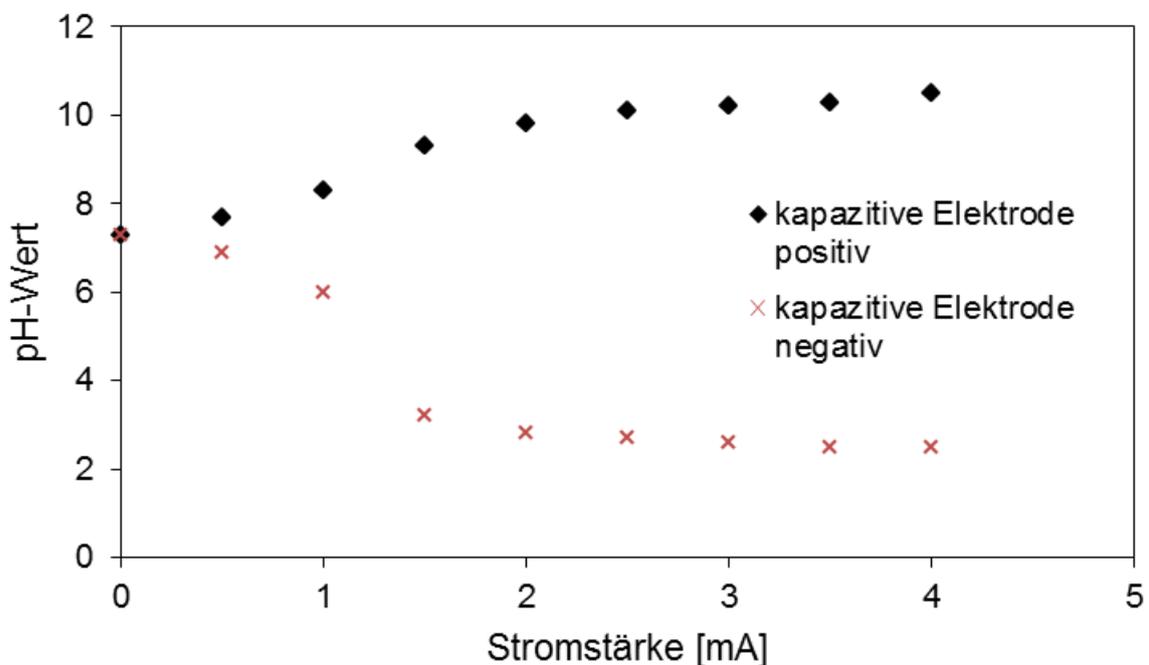


Abbildung 45: pH-Werte, welche durch Anlegen positiver und negativer Stromstärken beim Durchströmen der Zelle mit 1 mM Tris 10 mM NaCl pH 7,5 mit einer Flussrate von 1 ml min^{-1} eingestellt werden können.

Ein weiterer Effekt, der aus dem Diagramm in Abbildung 48 erkennbar ist, ist dass die Ausschläge nach unten deutlich stärker sind, als nach oben. Des Weiteren lässt sich bei dem Anlegen positiver Ströme, das mit einer pH-Erhöhung verbunden ist, eine feinere Abstufung erzielen. Dies lässt sich durch die Pufferkapazität der Tris-Base erklären. Deren pK_s -Wert beträgt 8,2 und liegt damit im basischen Bereich. Dies bedeutet, dass bereits beim Start-pH von 7,5 mehr Moleküle deprotoniert vorliegen, als protoniert. Die Pufferkapazität eines Puffers ist bei pH-Werten direkt um den pK_s -Wert am höchsten. Je größer die Abweichung davon, desto geringer die Pufferkapazität. Daher lässt sich davon ausgehen, dass die

Pufferkapazität des gewählten Tris-Puffers nach unten deutlich geringer ist, als in Richtung basischerer pH-Werte. Für eine gleichmäßigere Abstufbarkeit der pH-Änderung in beide Richtungen sollte daher ein Puffersystem verwendet werden, dessen pKs-Wert nahe dem Start-pH-Wert liegt. Im vorliegenden Fall könnte das beispielsweise ein Phosphatpuffer sein.

4.4.6. pH-Einstellung einer ABTS-Substratlösung durch das miniaturisierte pH-Modul

Nach der Demonstration der Fähigkeit des miniaturisierten pH-Moduls zur pH-Einstellung in einer einfachen Modellpufferlösung (1 mM Tris, 10 mM NaCl, pH 7,5), wurde das Experiment mit vergleichbaren Einstellungen mit einer ABTS-Substratlösung, wie sie zur Bestimmung der Aktivität von HRP genutzt wird, wiederholt. Bei der Nutzung der unverdünnten Lösung (20 mM Kaliumcitrat, 1,35 mg ml⁻¹ ABTS, 25 mg ml⁻¹ D-Glucose, pH 4,0) zeigte sich jedoch schnell, dass die Pufferung aufgrund der hohen Citratkonzentration zu stark war, um deutliche pH-Ausschläge zu generieren. Lediglich bei höheren Stromstärken (6 - 8 mA) konnte eine stabile pH-Änderung beobachtet werden. Die hohen Stromstärken resultierte jedoch zeitgleich in der Bildung von Luftblasen durch Gasbildung an der Gegenelektrode, was wiederum zu Rauschen auf den Detektoren führte. Daher wurde die ABTS-Glucose-Lösung 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. Das bedeutet die verwendete Zulauflösung enthielt 4 mM Citrat, 0,27 g l⁻¹ ABTS und 5 g l⁻¹ D-Glucose. Der resultierende pH-Verlauf nach dem Durchströmen des pH-Moduls bei unterschiedlichen Stromstärken ist in Abbildung 46 dargestellt.

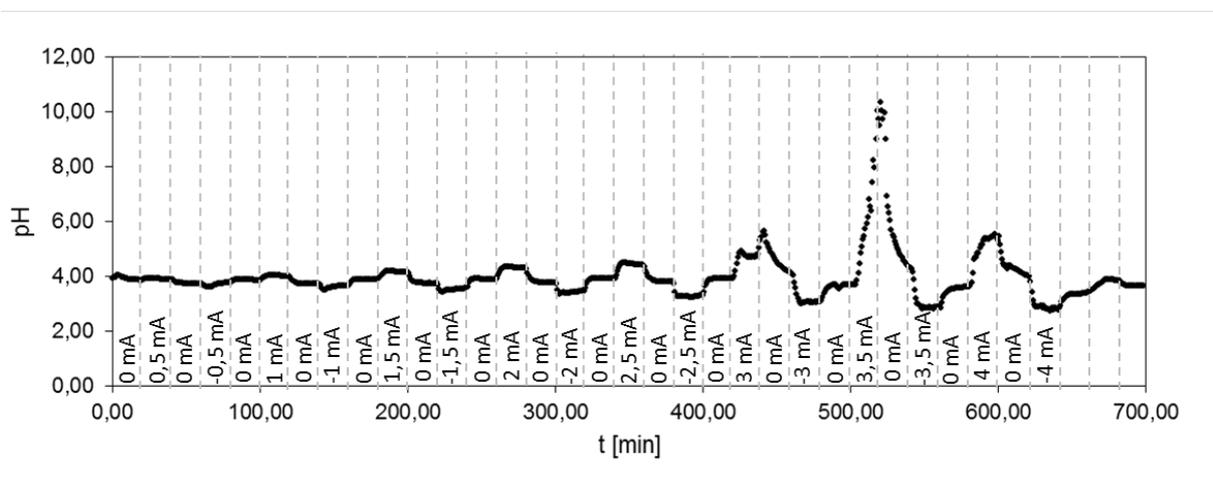


Abbildung 46: pH-Verlauf bei Durchströmen des miniaturisierten pH-Moduls mit 2 mM Citrat 0,27 g l⁻¹ ABTS und 5 g l⁻¹ D-Glucose unter Anlegen konstanter Stromstärken zwischen -4 und 4 mA in 0,5 mA-Schritten.

Abbildung 47 zeigt die pH-Werte, die beim Anlegen unterschiedlicher Stromstärken ausgehend von einem Startwert von pH 4,0 erreicht werden können. Dabei ist der Bereich zwischen 3 und 5 sehr fein einstellbar. Bei 3,5 mA kam es zu einem starken Ausschlag nach oben bis ca. pH 10, der sich aber bei einer höheren Stromstärke von 4,0 mA nicht reproduzieren ließ. Ursache für diesen starken pH Ausschlag im Alkalischen ist die Tatsache, dass Citronensäure oberhalb von pH 7 praktisch vollständig dissoziiert ist und keinerlei Pufferkapazität mehr besitzt. In Kombination mit der logarithmischen Konzentrationsabhängigkeit des pH-Werts führen daher im Bereich des Neutralpunkts (um pH 7) schon geringste Änderungen in der nach der Neutralisation der Citronensäure verblieben Menge an OH^- -Ionen zu starken pH-Schwankungen. So entspricht pH 10 einer OH^- -Konzentration von lediglich 0,1 mM. Wird diese geringe Menge in Relation zu der im Bereich von pH 4 bis pH 7 zur Neutralisation der drei Dissoziationsstufen von 4 mM Citronensäure notwendigen OH^- -Menge gesetzt, zeigt sich, dass mit dem pH-Modul ungepufferte Systeme im Neutralbereich praktisch nicht regelbar sind. Die gleiche Problematik würde sich jedoch auch bei der klassischen Titration, d.h. einer Zugabe von Säure oder Base ergeben.

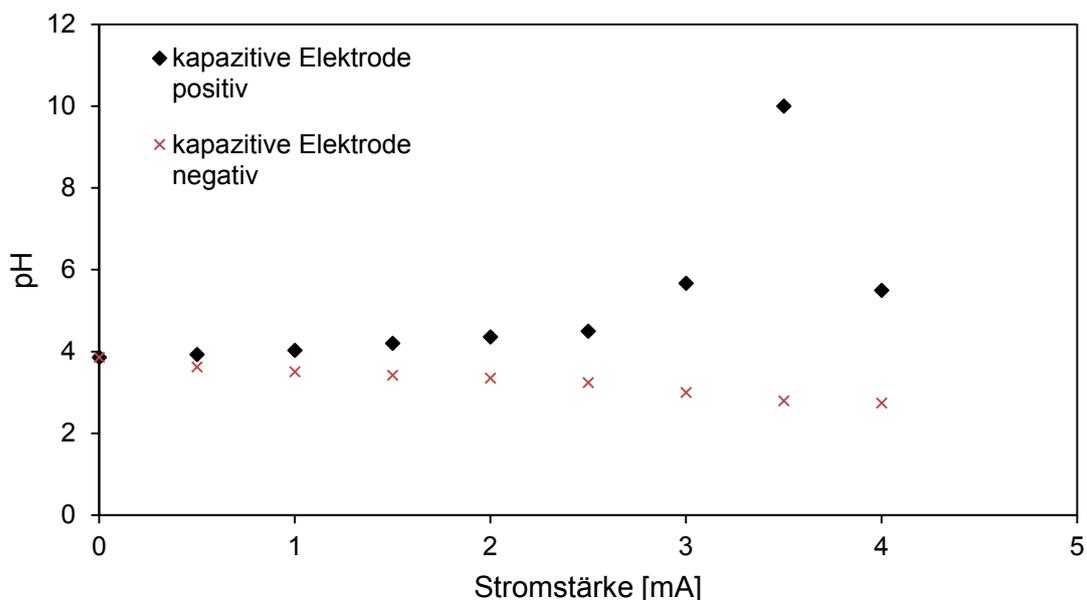


Abbildung 47 pH-Werte, welche sich durch das Anlegen konstanter Stromstärken auf die Elektroden des pH-Kontrollmoduls bei Durchströmung mit verdünnter ABTS-Substratlösung und einer Flussrate von 1 ml min^{-1} einstellen lassen.

Für eine stabile pH-Regelung benötigt das pH-Modul daher ein schwach bis moderat gepuffertes System in dem pH-Bereich von Interesse. Dies ist im gegebenen System mit Citronensäure im Bereich von pH 3 bis ca. 6 der Fall, in dem auch eine fein abgestimmte und stabile Regelung gelang. Bei der Auswertung der Daten der Experimente zur pH-Regelung einer ABTS-Lösung zeigte sich jedoch ein potentiell weiteres Problem einer elektrochemischen pH-Einstellung. Wie aus Abbildung 48 zu erkennen ist, zeigten sich im UV/vis-Signal des FPLC-Systems stromstärkenabhängige starke Ausschläge, die auf eine potentialinduzierte Redoxreaktion des ABTS schließen lassen.

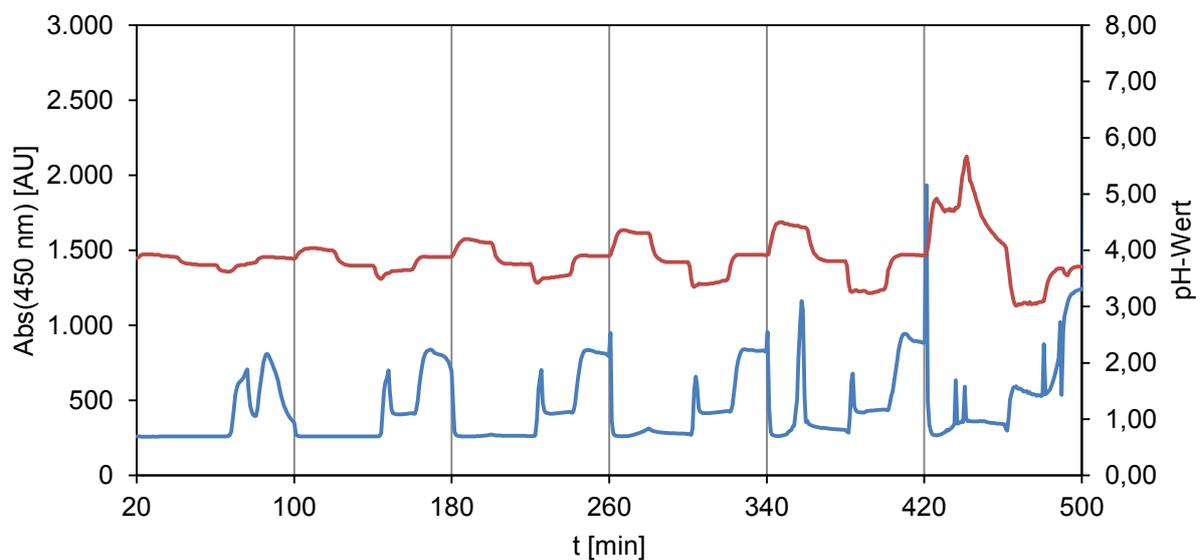


Abbildung 48: UV/vis-Signal (blau) und pH-Signal (rot) bei pH-Modulation durch Anlegen unterschiedlicher Stromstärken an das entwickelte pH-Kontrollmodul. Die starken Ausschläge im UV/vis-Signal weisen auf eine potentialinduzierte Redoxreaktion des Farbstoffsubstrates ABTS hin.

Auffällig ist, dass es zumindest bis zu Stromstärken von bis zu 1,0 mA nur während der Phasen eines negativen Stromflusses sowie in den darauffolgenden stromlosen Phasen zu einer Reaktion des ABTS kommt, während in Phasen mit positivem Stromfluss keine Reaktion an der Elektrodenoberfläche erfolgt. Als Ursache lässt sich folgender Zusammenhang vermuten: Im untersuchten pH-Bereich liegt ABTS mit vollständig deprotonierten Sulfongruppen als ABTS^{2-} vor und fungiert, katalysiert durch Enzyme wie Meerrettichperoxidase als Elektronendonator an beispielsweise Peroxide. Das pH-Modul ist so definiert, dass ein negativer Stromfluss aus einem negativen Potential an der Arbeitselektrode resultiert. Entsprechend liegt in diesem Fall an der Gegenelektrode ein

positives Potential an. Diese positiv geladene metallene Gegenelektrode katalysiert nun aber ebenfalls die Abgabe von Elektronen durch ABTS^{2-} , wodurch es zu der unerwünschten Farbreaktion durch die Oxidation des Moleküls kommt. Auch im Falle eines Abschaltens des Stromflusses durch den Potentiostaten behält das System aufgrund der kapazitiven Wirkung der Arbeitselektrode zumindest temporär seine Polarisierung bei. Das bedeutet die Reaktion von ABTS^{2-} kann für eine gewisse Zeit weiter ablaufen.

Diese unerwünschte Redoxreaktion des Farbreagenz verhindert zumindest für das betrachtete System einen sinnvollen Einsatz bei negativem Stromfluss. Dies bedeutet, dass eine pH-Regulierung nach unten mit anschließender Messung der Enzymreaktion aufgrund einer nicht enzymatisch katalysierten Farbreaktion nicht möglich ist. Eine pH-Regulierung nach oben ist jedoch bei nicht zu hohen Stromflüssen durchaus erreichbar und führt zu keinen störenden Effekten im UV-Signal, wie eine Extraktion der zugehörigen Signalverläufe aus dem Gesamtexperiment zeigt (Abbildung 49). Lediglich bei höheren positiven Stromstärken und längeren Laufzeiten kann das positive Potential an der Arbeitselektrode auch soweit ansteigen, dass es auch hier zu der unerwünschten Reaktion von ABTS^{2-} kommt.

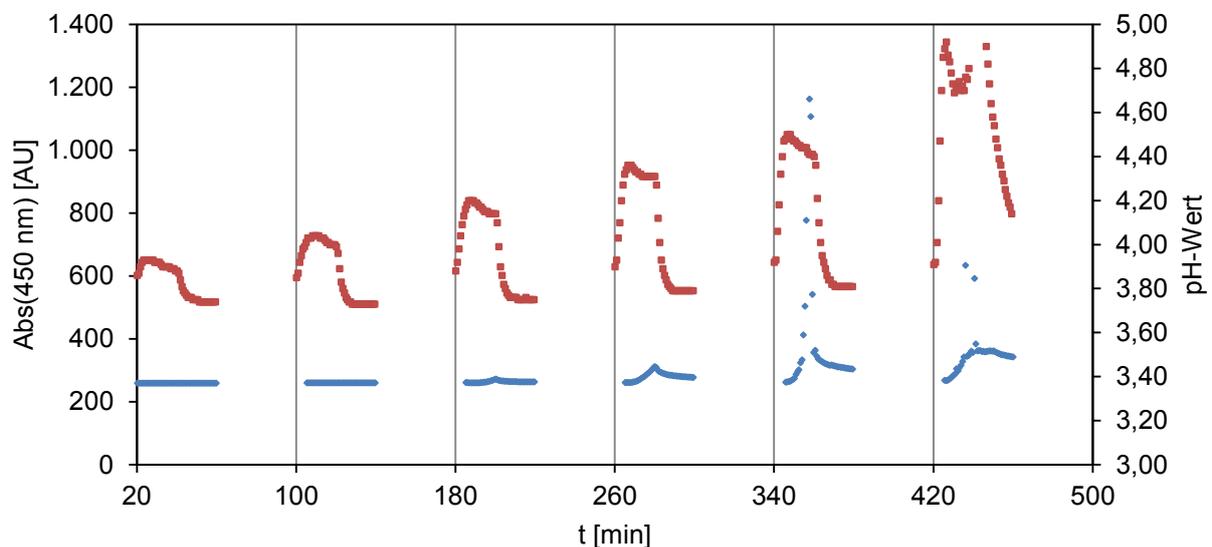


Abbildung 49: Extraktion der Signalverläufe von UV/vis-Signal (blau) und pH-Wert (rot) nach Durchströmung des pH-Moduls bei positiven Stromflüssen.

Für eine Nutzung des pH-Moduls sollte in diesem Fall also mit einem niedrigen pH-Wert im zugeführten Substrat gearbeitet werden. Zur Abdeckung des interessierenden pH-Bereichs sind während der Messung dann nur positive Stromflüsse mit pH-Anhebung erforderlich.

4.4.7. Vergleich mit anderen Systemen zur pH-Regulation

Um die Neuartigkeit einer derartigen pH-Regulation zu betonen, wurde ein Vergleich mit bisher entwickelten und publizierten Verfahren zur pH-Regulation in mikrofluidischen Reaktoren vorgenommen. Hauptsächlich wird dabei auf Titrationsapparaturen zurückgegriffen, welche durch Zudosierung definierter Volumina an sauren oder basischen Lösungen Einfluss auf den pH-Wert nehmen. Nachteilig daran ist zum einen, dass stets Vorratsgefäße kontrolliert und gelagert werden müssen, zum anderen, dass es durch die Erhöhung des Volumens durch Zufügen von Lösungen zu einer Verdünnung des Produktstromes kommen kann. Nicht nur die Verdünnung stellt dabei ein Problem dar, sondern auch eine mögliche chemische Beeinflussung der im Produktstrom enthaltenen Moleküle von Interesse durch die zugefügten Pufferkomponenten. Des Weiteren muss eine optimale Vermischung der zudosierten Säure/Base mit dem Produktstrom gewährleistet sein, da es ansonsten lokal zu hohen Konzentrationen an alkalischer oder saurer Lösung kommen kann, welche auf Produkt, Katalysatoren oder mikrofluidische Strukturen inhibierend oder gar zerstörend wirken kann. Im Folgenden werden einige Systeme vorgestellt und diskutiert, welche zur pH-Regulation in mikrofluidischen Systemen genutzt werden.

Eddington *et al.* publizierten im Jahre 2001 ein mikrofluidisches System, das zwar pH-Werte nicht gezielt regulieren, aber pH-Schwankungen zugunsten eines konstanten Ausfluss-pH-Wertes beeinflussen kann[91]. Dabei werden die Vorteile von Mikrofluidik mit responsiven Materialien kombiniert. Ein pH-responsives Hydrogel übernimmt demnach die Feedback-Kontrolle des pH-Wertes und hält diesen bei unterschiedlichen Konditionen konstant bei einem Wert von 7,0. Derartige Systeme sind von großem Wert, wenn es darum geht, pH-Schwankungen aktiv abzuf puffern und pH-Bedingungen konstant zu halten. Zum Erzeugung von pH-Änderungen sind sie allerdings nicht geeignet.

Laritz und Mitarbeiter publizierten im Jahre 2000 eine kostgünstige integrierte Plattform, die mikrofluidische und elektronische Komponenten kombiniert und auf der *printed circuit board* Technik (PCB) basiert[92]. Hauptbestandteile des Regulationssystems sind ein optischer pH-Sensor und ein CO₂-Diffusor. Der Chip soll hauptsächlich Anwendung in der Kultivierung von Zellen finden. Dabei wird der pH-Wert der durchströmenden NaHCO₃-Lösung mittels des Sensors gemessen. Da der pH-Wert in diesem Fall von der Konzentration

gelösten CO_2 -Gases abhängt, führt eine Zudosierung mittels des Gasdiffusors zu einer Beeinflussung des pH-Wertes. Dies ist ein elegantes System zur pH-Regulation und kann beispielsweise in der Zellkultivierung, die ja ohnehin von gewissen Konzentrationen an CO_2 abhängig ist, genutzt werden. Allerdings ist diese Methode durch die Wahl des Puffers limitiert. Lediglich der eingesetzte Carbonatpuffer kann zur pH-Einstellung genutzt werden, andere Puffersysteme sind von der Nutzung aufgrund fehlender CO_2 -Abhängigkeit ausgeschlossen.

Chen und Chang publizierten im Jahre 2011 einen Ansatz zur pH-Kontrolle in mikrofluidischen Reaktoren basierend auf einer Anordnung aus bipolaren Membranen zur kontrollierten Wasserspaltung[93]. Dabei werde durch Anlegung eines elektrischen Feldes an dem bipolaren Membranaufbau gasblasenfrei gezielt OH^- und H^+ -Ionen generiert, um den pH-Wert der durchströmenden Lösung spezifisch alkalischer oder saurer zu machen. Auch mit dieser Methode, können ähnlich zur vorgestellten Methode Produktströme mit Ionen angereichert werden, ohne externe Lösungen zuzuführen und den Produktstrom zu verdünnen. Ein Vorteil gegenüber des im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Systems ist, dass kein kapazitiver Effekt auftritt, was bedeutet, dass der pH-Verlauf über längere Zeit konstant beeinflusst werden kann, ohne dass die Elektroden zwischendurch regeneriert werden muss. Nachteilig ist jedoch der vergleichsweise komplizierte Aufbau aus verschiedenen Membrantypen, welche schichtweise im System integriert werden müssen. Darüber hinaus kann die Bildung von Gasblasen auch durch diese Methode nicht immer verhindert werden.

Das vorgestellte System zur pH-Kontrolle bietet demnach einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung von Techniken zur pH-Regulation innerhalb von Reaktorsystemen. Die großen Vorteile bestehen in der beliebigen Skalierbarkeit der Zelle für entsprechende Produktströme sowie die Einfachheit des Aufbaus und der Methode und der Möglichkeit einer feinen pH-Abstimmung ohne die Zudosierung externer Lösungen.

4.5. Proof-of-Principle: Implementierung einer Modellenzymkaskade aus Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase

Dieser Abschnitt befasst sich mit den Ergebnissen, die eine erste Umsetzung der Modellenzymkaskade durch das zuvor beschriebene Reaktorsystem erbrachte. Dabei wurden die zu veränderten Parameter und ihr Einfluss auf die Performance der Modellenzyme im Rahmen einer ganzheitlichen Betrachtung im Reaktorsystem untersucht.

4.5.1. Arrangement des modularen Reaktorsystems bestehend aus Enzymtransformationsmodulen, Temperierelement und pH-Modul

Um die verschiedenen Reaktorbestandteile in räumliche Nähe zueinander zu bringen, wurden diese auf einem aufstellbaren Lochblech angeordnet und in Gesamtheit in räumliche Nähe zur FPLC-Anlage zur Betrieb des Reaktorsystems gebracht. Dabei wurden die Enzymtransformationsmodule ohne Temperiereinheit mit Hilfe von Metallklammern nebeneinander fixiert, während die Temperiereinheit fest mit dem Lochblech verschraubt wurde. Die nahe Fixierung diente auch dazu, FPLC-Schläuche zu sparen und das Totvolumen zwischen den Enzymtransformationsmodulen gering zu halten. Der Peltier-Controller wurde strategisch günstig hinter dem Aufsteller platziert, damit einerseits Einstellungen einfach vorgenommen werden können, andererseits die Temperiereinheit einfach zugänglich bleibt. Das pH-Modul wurde ebenfalls fest verschraubt und mit leitfähigen Schrauben versehen, sodass die Kontaktierung durch den Potentiostaten ebenfalls strategisch günstig von der Rückseite her erfolgen kann. Das gesamte System wurde zwischen Computer zur Kontrolle der FPLC-Anlage und des Potentiostaten und der FPLC-Anlage selbst angeordnet.

Abbildung 50 zeigt einen schematischen Aufbau des arrangierten modularen Reaktorsystems, wobei die beiden grauen Kästen links und rechts die Pump- und die Detektionseinheit des FPLC-Systems darstellen, welche in Realität in einem Gerät vereint waren. Im exemplarisch dargestellten Fall handelt es sich um einer sequenziellen Enzymkaskade aus 3 Enzymen. Die Enzymtransformationsmodule, an welche die Enzyme immobilisiert werden, sind in blau dargestellt. Dabei zeigt das erste Enzym (links) eine Temperatursensitivität und bedarf daher einer entsprechenden Temperierung in der Temperiereinheit (gelb). Der Produktstrom mit dem umgesetzten Substrat wird daraufhin in

das pH-Kontrollmodul (rot) geleitet, wo eine entsprechende Anpassung des pH-Wertes des Fluids auf das pH-Optimum der folgenden beiden Enzyme (blaue Module mittig und rechts) stattfindet. Nach dem Umsatz der entsprechenden Edukte zu den Produkten wird das der Produktstrom in eine Einheit zur Analyse und Fraktionierung geleitet.

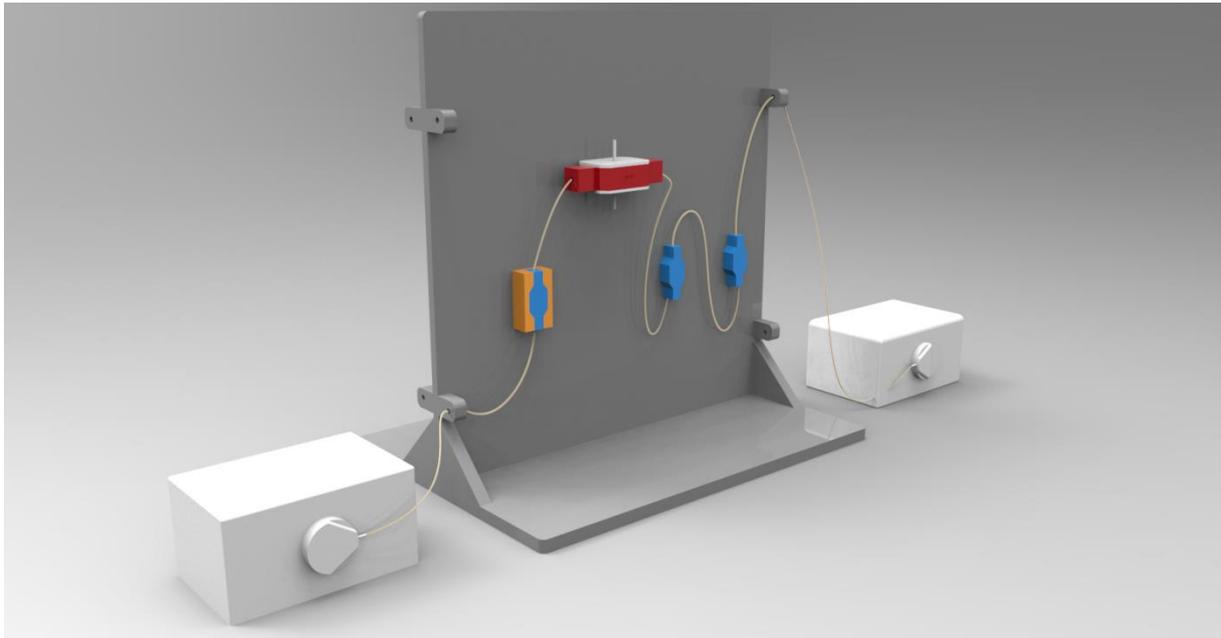


Abbildung 50: Schema eines Reaktorsystems zur Implementierung artifizieller Enzymkaskaden. Die Module, in welchen die Enzymkonversionen stattfinden, sind dabei in blau dargestellt. Das orangefarbene Modul stellt eine Einheit zur spezifischen Temperierung der Enzymtransformationsmodule dar. Das Modul zur Einstellung einer pH-Änderung zwischen anderen Modulen ist rot dargestellt. Das gesamte Reaktorsystem soll mittels eines Pumpensystems durchströmt werden.

Im Falle des implementierten Systems aus Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase handelt es sich um ein Enzymsystem, welches auch im Zuge einer *one-pot*-Reaktion, das heißt unmittelbar miteinander verwendet werden kann. Für den folgenden *proof-of-concept* einer modularen Enzymkaskade wurden die Enzyme jedoch separat in getrennten Modulen eingesetzt.

Dafür wurden 2 Gitterstrukturen mit Hilfe des Protokolls zur Immobilisierung von Enzymen durch EDC an 3D-gedrucktes Material (S. 40) mit GOx und HRP bestückt. Konkret bedeutete dies, dass an 2 g schweren Gitter ca. 3,6 mg HRP bzw. ca. 12 mg GOx gebunden wurden. Die Gitter wurden anschließend in ein Gehäuse platziert und diese unter Wasser zur luftblasenfreien Befüllung unter Zuhilfenahme zweier Flachdichtungen zum

Enzymtransformationsmodul verschraubt. Anschließend wurden die Enzymtransformationsmodule mit GOx und HRP in Reihe an das ÄktaPurifier-System angeschlossen und mit Puffer (0,1 M Natriumphosphat pH 6,0) durchströmt.

Im Rahmen der in den folgenden Abschnitten beschriebenen Experimente sollten verschiedene Parameter untersucht werden. Zunächst wurden lediglich die beiden Enzymtransformationsmodule in Reihe geschaltet und die Umsetzung zweier verschiedener Peroxidasesubstrate, Tetramethylbenzidin (TMB) und 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) in Abhängigkeit der Inkubationsdauer im Rahmen von Stop-Flow-Experimenten untersucht werden.

Nachdem die Temperaturabhängigkeit der immobilisierten Meerrettichperoxidase zum einen bereits im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde und zum anderen die Reaktion der Glucose Oxidase in diesem Enzymsystem der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, wurde das Enzymtransformationsmodul der Glucose Oxidase in die Temperiereinheit platziert und die Temperaturabhängigkeit der GOx untersucht.

4.5.1. Durchführung der Enzymkaskade mit Bestimmung des gebildeten Peroxids mittels Tetramethylbenzidin (TMB)

Der Umsatz von TMB erfolgte in stark verdünnter Form im Rahmen eines *Stop-Flow*-Experiments. Das bedeutet, dass der Fluss immer wieder für definierte Zeiträume gestoppt wurde, um eine Anreicherung des Produktes im Reaktorinneren durch Umsatz des Substrates durch die immobilisierten Enzyme zu ermöglichen. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Kaskadenreaktion ist dabei der Umsatz von D-Glucose zu D-Gluconolacton und Wasserstoffperoxid durch die Glucose Oxidase. Die Meerrettichperoxidase zeigt verglichen dazu eine sehr viel höhere Aktivität und die Umsetzungszeit kann als unendlich schnell, also 0 angesehen werden. Daher wurde mittels der folgenden Experimente letztendlich die Kinetik der Glucose Oxidase untersucht. Die nach erneutem Starten des Produktflusses gemessenen Absorptionspeaks wurden integriert und in Abhängigkeit von der Dauer der Unterbrechung des konstanten Flusses an Substratlösung aufgetragen.

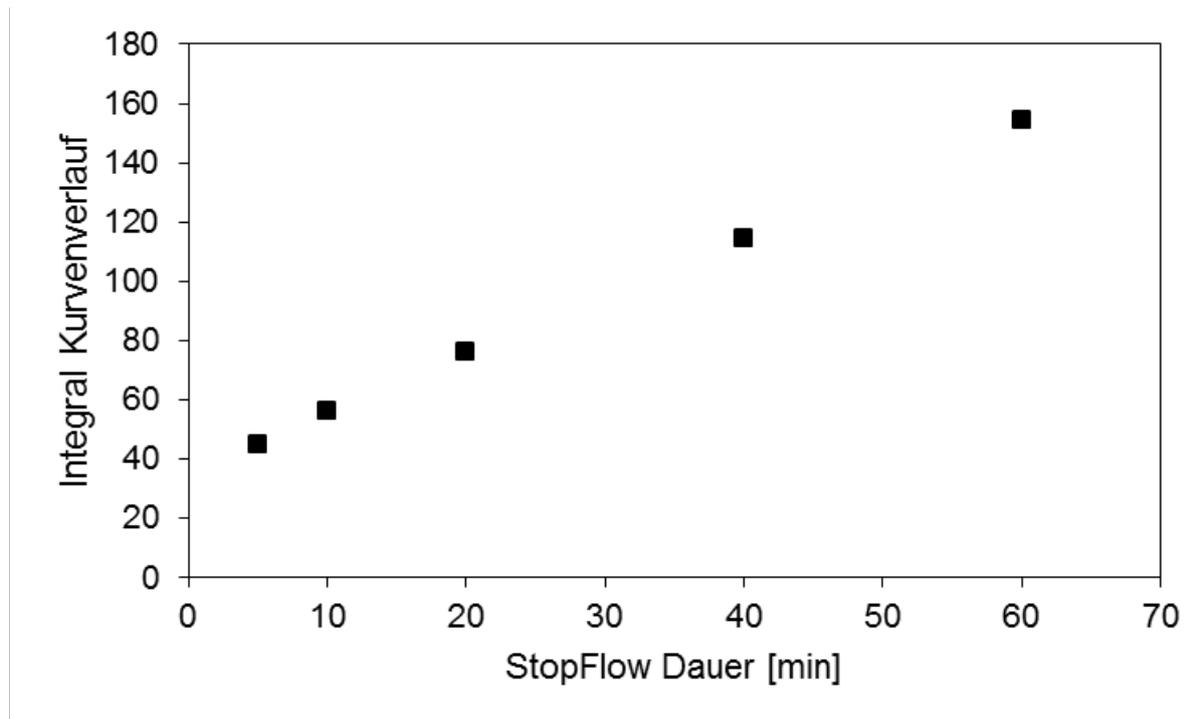


Abbildung 51: Integrierte Absorptionspeaks nach einem *Stop-Flow*-Experiment mit TMB in Abhängigkeit mit der jeweiligen Inkubationsdauer bei einer Flussrate zwischen den Stop-Phasen von $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ bei pH 4.0 und Raumtemperatur. Anhand des linearen Verlaufes wird eine konstante Reaktionskinetik angenommen, die Menge des entstandenen Produktes ist lediglich von der Umsatzrate der Glucose Oxidase abhängig.

Abbildung 51 zeigt die Integrale der Absorptionspeaks in Abhängigkeit der Inkubationsdauer. Nach der Inkubationsdauer und nach erneutem Umschalten in den Flussmodus ergibt sich ein Peak. Dieser ist darauf zurückzuführen, dass sich in der Zeit der Flussunterbrechung im Enzymtransformationsmodul eine Produktkonzentration entsprechend der Inkubationsdauer angereichert hat, welche dann im wieder gestarteten Fluss aus dem Modul transportiert wird. Der Peak-förmige Verlauf ergibt sich durch Rückvermischungsvorgänge mit dem umgebenden, mit weniger umgesetzten Farbsubstrat angereicherten, Fluid und nimmt nach einer gewissen Zeit wieder einen konstanten Wert an. Dieser ist höher als die reine Absorption des Ausgangssubstrates, da auch während des konstanten Flusses ohne Unterbrechung im Enzymtransformationsmodul ein Grundumsatz stattfindet. Es konnte gezeigt werden, dass die Korrelation zwischen Inkubationszeit und dem Peakintegral linear ist. Das bedeutet, dass die Substratkonzentration kein limitierender Faktor ist und der Gesamtumsatz in den untersuchten Zeitperioden keinen Maximalwert erreicht. Eine Elongation der Kurve in Richtung einer Stoppdauer von 0 min ergibt einen y-Achsen-Abschnitt von ungefähr 40. Dies ist, wie bereits beschrieben, darauf zurückzuführen, dass selbst ohne Inkubationszeit eine Verweilzeit von ca. 20 min im Enzymtransformationsmodul

mit der immobilisierten GOx vorliegt. Interessanterweise beträgt der Integralwert 80 für einen Stopp von 20 min und damit einer durchschnittlichen Aufenthaltsdauer von 40 min. Dies zeigt, dass die Linearität der Reaktionskinetik auch dann gilt, wenn von einem Stop-Flow- in einen Durchflussmodus geschaltet wird. Nach einer Kalibrierung würde die Steigung der Kurve die Berechnung der Enzymsaktivität unter den gegebenen Bedingungen ermöglichen. Selbst ohne Kalibrierung wird der Versuchsaufbau zukünftig eine schnelle Optimierung der Reaktionsparameter wie Reaktionszeit, Substratkonzentration, Temperatur oder pH-Wert ermöglichen, während der ausgelöste Effekt einfach im UV/vis-Signal nachverfolgbar ist.

4.5.2. Durchführung der Enzymkaskade mit Bestimmung des gebildeten Peroxids mittels 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)

Um in einem nächsten Schritt wurde die implementierte Modellenzymkaskade mit ABTS-Glucose-Lösung durchströmt und die Absorption im ausströmenden Produktstrom gemessen. Analog zu dem Stop-Flow-Experiment mit TMB (s. Kapitel 4.5.1.) wurde der Durchfluss von $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ immer wieder unterbrochen und das Integral des nach erneuter Durchströmung entstehenden Absorptionspeaks gegen die Inkubationsdauer aufgetragen.

Abbildung 52 zeigt die Integralfläche des gemessenen Absorptionspeaks aufgetragen gegen die Dauer der Inkubationsphase unter Anhalten des Produktstromes. Dabei ist erkennbar, dass die Integralfläche zunächst linear mit der Inkubationsdauer zunimmt. Dann ist im Gegensatz zum Umsatz von TMB der Übergang in eine konstante Plateauphase zu beobachten und bei zunehmender Inkubationsdauer sogar eine leichte Abnahme zu verzeichnen.

Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass ab einer gewissen Inkubationsdauer alles vorhandene Substrat zu dem farbigen Produkt umgesetzt wurde und keine weiteren Ausgangsmoleküle in der Lösung zum Umsatz zur Verfügung stehen. Die leichte Abnahme lässt sich durch den Fakt erklären, dass eine hohe Konzentration an umgesetztem Substratfarbstoff im Laufe der Zeit zu einer Aggregation und einer Adsorption der Farbstoffmoleküle an die Reaktoroberfläche führt und damit zu einer Abnahme der Moleküle in Lösung

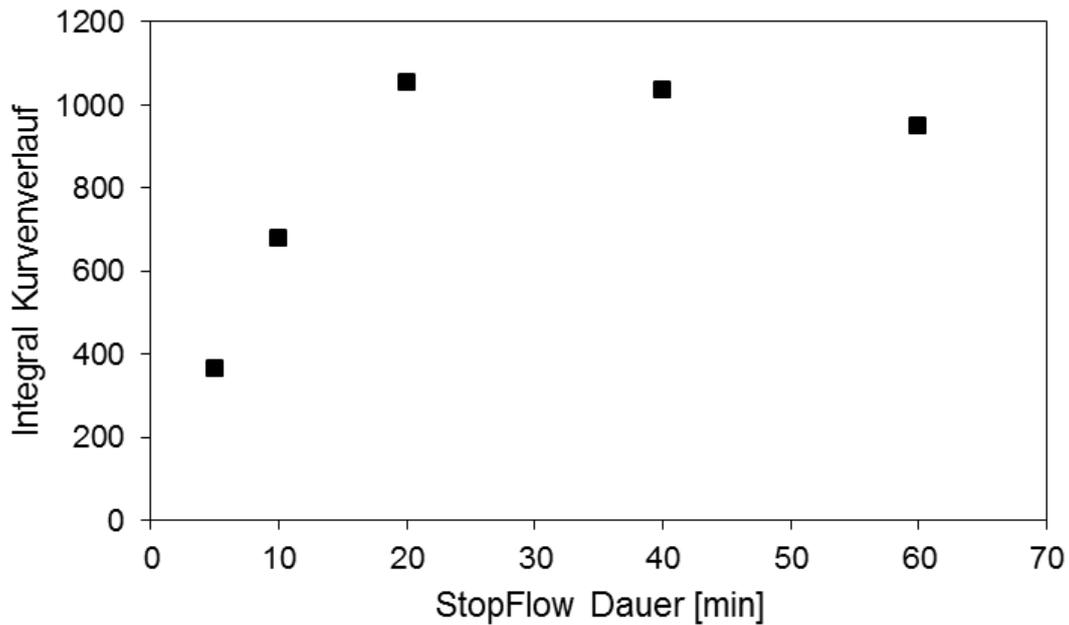


Abbildung 52: Integrierte Absorptionspeaks nach einem Stop-Flow-Experiment mit ABTS in Abhängigkeit mit der jeweiligen Inkubationsdauer.

4.5.3. Temperaturabhängigkeit der Glucose Oxidase (GOx)

Um die Temperaturabhängigkeit der Glucose Oxidase zu charakterisieren, wurde das Enzymtransformationsmodul der GOx durch die Temperiereinheit auf verschiedene Zieltemperaturen erhitzt und die gemessene Absorption durch den ABTS-Umsatz des GOx-HRP-Modellenzymystems bei einem konstanten Fluss gemessen. Während einer Laufgeschwindigkeit von 2 ml min^{-1} wurde das Enzymtransformationsmodul der Glucose Oxidase mit verschiedenen Temperaturen von 15° bis 35° C abgestuft in Schritten von 5° C beheizt, bis im Ausfluss ein konstant bleibendes Absorbanzsignal ausgelöst durch oxidiertes ABTS nachweisbar war. Abbildung 53 zeigt den Verlauf eines solchen Signals bei Temperierung des GOx-Enzymtransformationsmoduls. Dabei ist zu erkennen, dass es bei jeder schrittweisen Erhöhung der Temperatur im Enzymtransformationsmodul zu einer entsprechenden Erhöhung der Absorbanz kommt. Das Optimum sowie die Temperatur, bei der eine irreversible Denaturierung des Enzyms auftritt konnten aufgrund des Temperierungsmaximums von ca. 37° C im Versuch nicht bestimmt werden.

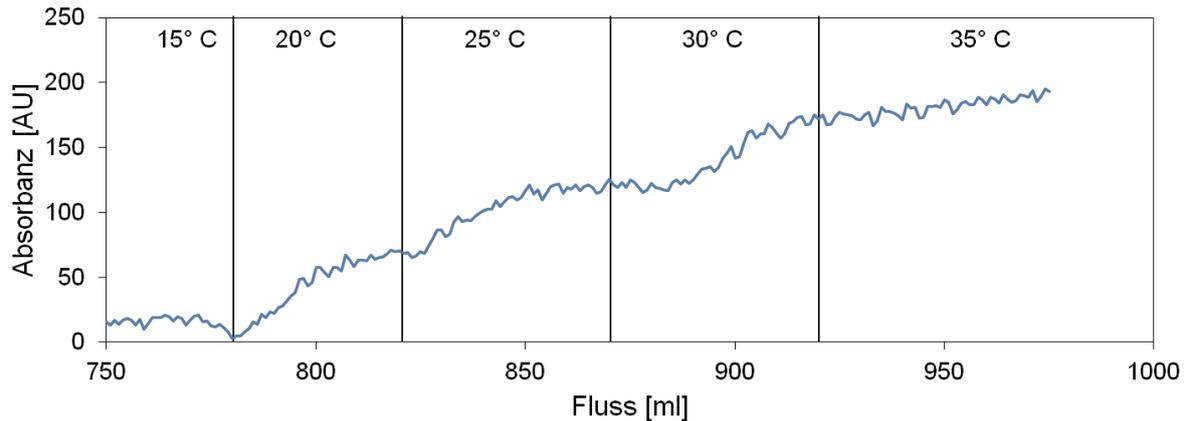


Abbildung 53: Absorptionsverlauf von ABTS bei unterschiedlicher Temperierung des Enzymtransformationsmodul der Glucose Oxidase zwischen 15° und 35° C.

Es konnte gezeigt werden, dass die Performance der Glucose Oxidase zwischen 15° und 30° C zunächst linear zunimmt und sich dann zwischen 30° und 40° C einem Maximum annähert. Dies deckt sich mit Literaturdaten, nach welchen die Glucose Oxidase aus dem Gießkannenschimmelpilz *Aspergillus niger* ein Temperaturoptimum zwischen 35° und 40° C besitzt[94, 95]. Speziell nach einer Immobilisierung des Enzyms wird oft von einem Temperaturoptimum von 40° C berichtet[96]. Die Aktivitätssteigerungen um über 90% verglichen mit dem Wert bei 15° C und um ca. 65% verglichen mit Raumtemperatur verdeutlicht zudem die Wichtigkeit einer Temperaturregulation (Abbildung 54).

Im Falle einer implementierten artifiziellen Enzymkaskade müsste auf diese Weise jedes einzelne Enzym auf seine Temperaturabhängigkeit hin untersucht werden, um die Gesamtaktivität der Enzymkaskade sukzessiv zu steigern und zu optimieren. Dabei sollt besonderes Augenmerk auf das umsatzschwächste Enzym der Kaskade gelegt werden, da dies den geschwindigkeitsbestimmenden Faktor darstellt und die gründlichste Optimierung benötigt. Bei extrem umsatzstarken Enzymen kann im Gegensatz dazu auf eine Optimierung und einen Energieeinsatz durch Temperierung verzichtet werden, wenn der Umsatz bei Raumtemperatur dennoch genügt, um die maximal produzierte Produktmenge des umsatzschwächsten Enzyms zeitnah umzusetzen.

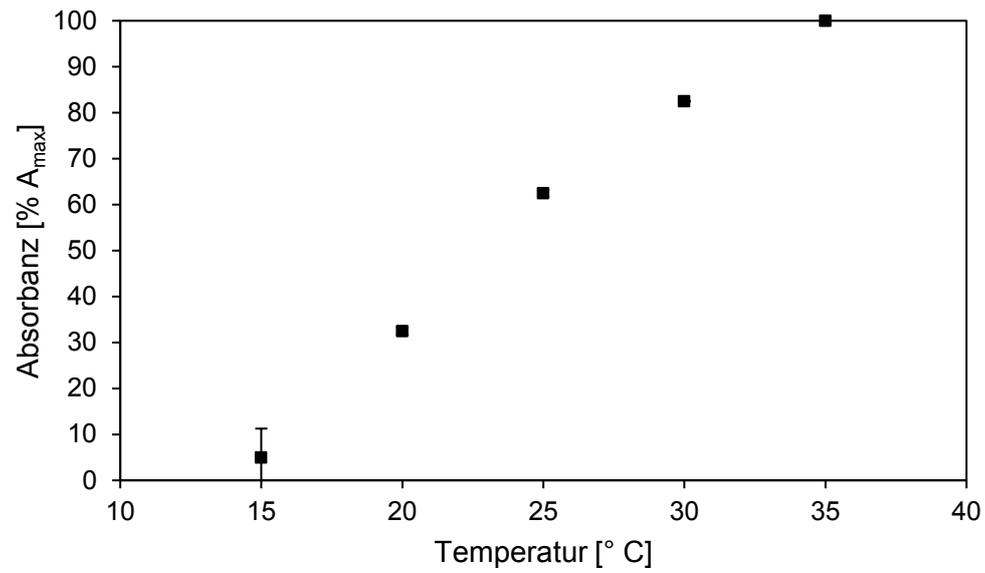


Abbildung 54: Relative Aktivität, gemessen als Absorbanz des Ablaufs, der Modellenzymkaskade aus Glucose Oxidase und Meerrettichperoxidase in Abhängigkeit der Temperatur, auf welche das Enzymtransformationsmodul der GOx erhitzt wurde.

5. Fazit und Ausblick

Der vermehrte Einsatz von natürlichen und artifiziellen Enzymkaskaden zu Zwecken der Produktion komplexer Biomoleküle könnte eine deutliche Entlastung der Umwelt durch den Verzicht auf umweltbelastende organische Synthesereaktionen bedeuten. Für die Umsetzung derartiger Produktionskaskaden und die optimale Ausnutzung der damit verbundenen Vorteile sind jedoch individuelle Reaktorlösungen vonnöten, die die besonderen Bedürfnisse der jeweiligen Biokatalysatoren berücksichtigen. Die hier vorgestellte Arbeit liefert einen Beitrag zu der Entwicklung derartiger individueller Reaktorsysteme, indem verschiedene Enzymtransformationsmodule per 3D-Druck und einstufigen Immobilisierungsverfahren rasch realisiert und zu Enzymkaskaden kombiniert werden können. Vorrichtungen zur individuellen Temperierung sowie Module zur pH-Kontrolle ermöglichen dabei eine Berücksichtigung variierender Temperatur- und pH-Optima der genutzten Biokatalysatoren.

Die Nutzung des 3D-Druckes als Fertigungsverfahren bietet verschiedene Vorteile. Zum einen können komplexe Geometrien und Strukturen, welche durch andere Fertigungsverfahren nicht oder nur schwer umsetzbar sind, schnell und einfach realisiert werden. Durch das Design am Computer können die Strukturen durch einen erfahrenen Konstrukteur schnell abgeändert und innerhalb kurzer Zeit erneut gedruckt und untersucht werden. Dadurch ist eine zielgerichtete und wenig aufwendige Optimierung des Reaktordesigns inklusive der integrierten Strömungsführung möglich. Zum anderen besteht der Vorteil, dass die gezeichneten Strukturen einfach skaliert und damit unkompliziert vergrößert oder verkleinert werden können. Eine genaue Anpassung der Module an die Aktivitäten und Raum-Zeit-Ausbeuten der jeweiligen Enzyme kann dadurch erfolgen und auf unkompliziertem Wege zu optimierten Ergebnissen durch ideal auf einander abgestimmte Kaskaden führen.

Im Rahmen der Arbeit stand eine Entwicklung der Module im kleinen Maßstab im Vordergrund, um durch an die Module angepasste Screening-Verfahren gezielt Optimierungen im kleinskaligen Reaktormaßstab vornehmen zu können. Zu einem späteren Zeitpunkt sind aber auch gedruckte Module im größeren Maßstab sowie parallelisierte Module denkbar, die durch ein ausgeklügeltes Ventil- und Pumpensystem in der Lage sind, komplizierte konsekutive Enzymreaktionen im Produktionsmaßstab durchzuführen. In

diesem Fall ist auch eine Erweiterung des Reaktorsystems durch weitere Module denkbar. Neben einem parallelisierten Einsatz mehrerer Enzymtransformationsmodule könnten Module zur Analytik oder zur Downstream-Prozessierung des Produktstromes ihren Einsatz finden. Einen wichtigen Dienst könnten beispielsweise Durchflussmodule mit Online-Analyse-Methoden zur qualitativen und quantitativen Beurteilung der entstehenden Produkte erweisen. Denkbar wären hier insbesondere spektroskopische Methoden wie UV/vis- / Raman- oder Infrarot-Analyseverfahren, um in Echtzeit auf die Performance der implementierten Enzymkaskade rückschließen zu können. Im Rahmen einer weiteren Prozessierung des Produktstromes bereits im Rahmen des Reaktorsystems, oder zur Entfernung ungewollter Nebenprodukte, wären auch Module zur gezielten Separation bestimmter Moleküle aus dem Produktstrom wertvoll. Ausgehend von der Idee, *rapid prototyping*, insbesondere 3D-Drucktechnologien für Enzymreaktoren und deren Analytik und Aufreinigung zu nutzen, besteht die Idee kompletter druckbarer Anlagen für komplexe Enzymtransformationsreaktionen. Derartige Anlagen würden maßgeschneiderte, kompakte Aufbauten ermöglichen, die bei Bedarf modular erweitert werden könnten.

Einige limitierende Faktoren dieser Grundidee konnten im Rahmen dieser Arbeit bereits adressiert und ausgeräumt werden, jedoch sind noch viele weitere Optimierungen notwendig, um das Ziel der 3D-gedruckten Biotechnologie im Rahmen eines gedruckten Reaktorsystems weiter voran zu treiben. In erster Linie zu nennen ist die spezifische Oberfläche des 3D-Druckmaterials. Verglichen mit anderen Enzymträgern, insbesondere Nanomaterialien wie Partikel oder Fasern, weisen gedruckte Trägerstrukturen trotz der unebenen Oberfläche eine nur geringe spezifische Oberfläche auf. Dies hat zur Folge, dass nur eine begrenzte Anzahl an Bindungsstellen für Biokatalysatoren zur Verfügung steht. Dieses Problem könnte beispielsweise durch spezifische Beschichtungen gelöst werden. Würde eine poröse dünne Schicht aus funktionalisierten polymeren Materialien auf die Oberfläche des 3D-Trägers aufgebracht oder direkt mit ihm verdruckt, so könnte die Gitterstruktur immer noch durchströmt werden, zugleich jedoch eine wesentlich vergrößerte spezifische Oberfläche für die Anbindung von Enzymen zur Verfügung stellen. Des Weiteren könnte das Immobilisierungsverfahren selbst optimiert werden. Trotz des optimierten Protokolls kommt es bei der Anbindung von Enzymen mittels EDC an Oberflächen zu Aktivitätsverlusten von über 60% im Fall der Glucose Oxidase und zu mehr als 90% im Fall der Meerrettichperoxidase. Daher sollten je nach eingesetztem Enzym weitere

Immobilisierungsverfahren untersucht und die Protokolle optimiert werden, um eine minimale Inaktivierung der Biokatalysatoren während des Immobilisierungsprozesses zu gewährleisten. Eine gerichtete Immobilisierung, beispielsweise durch genetisch codierte Tags, ist dabei bei Immobilisierungs-empfindlichen Enzymen stets gegenüber ungerichteten Verfahren zu bevorzugen. Eine Möglichkeit wäre beispielsweise das Anhängen eines His-Tags an das Zielenzym. Würde die Oberfläche des 3D-Reaktorsystems mit einem Komplexbildner wie Nitriloessigsäure (NTA) oder Imidodiessigsäure (IDA) und einem entsprechenden komplexierten Metall-Ion modifiziert, wäre eine einstufige Aufreinigung und Immobilisierung des Zielenzym möglich.

6. Anhang

VeroClear RGD810

	ASTM	Units	Metric	Units	Imperial
Tensile strength	D-638-03	MPa	50-65	psi	7250-9450
Elongation at break	D-638-05	%	10-25	%	10-25
Modulus of elasticity	D-638-04	MPa	2000-3000	psi	290,000-435,000
Flexural Strength	D-790-03	MPa	75-110	psi	11000-16000
Flexural Modulus	D-790-04	MPa	2200-3200	psi	320,000-465,000
HDT, °C @ 0.45MPa	D-648-06	°C	45-50	°F	113-122
HDT, °C @ 1.82MPa	D-648-07	°C	45-50	°F	113-122
Izod Notched Impact	D-256-06	J/m	20-30	ft lb/inch	0.375-0.562
Water Absorption	D-570-98 24hr	%	1.1-1.5	%	1.1-1.5
Tg	DMA, E»	°C	52-54	°F	126-129
Shore Hardness (D)	Scale D	Scale D	83-86	Scale D	83-86
Rockwell Hardness	Scale M	Scale M	73-76	Scale M	73-76
Polymerized density	ASTM D792	g/cm ³	1.18-1.19		
Ash content	USP281	%	0.02-0.06	%	0.02-0.06

Anhang 1: Materialdatenblatt zum transparenten 3D-Druckmaterial VeroClear. Entnommen aus dem PolyJet™ Material Data Sheet der Firma Stratasys Ltd.

VeroGray RGD850, VeroBlackPlus RGD875, VeroWhitePlus RGD835, VeroYellow RGD836, VeroCyan RGD841, YellowMagenta RGD851

	ASTM	Units	Metric	Units	Imperial
Tensile strength	D-638-03	MPa	50-65	psi	7250-9450
Elongation at break	D-638-05	%	10-25	%	10-25
Modulus of elasticity	D-638-04	MPa	2000-3000	psi	290,000-435,000
Flexural Strength	D-790-03	MPa	75-110	psi	11000-16000
Flexural Modulus	D-790-04	MPa	2200-3200	psi	320,000-465,000
HDT, °C @ 0.45MPa	D-648-06	°C	45-50	°F	113-122
HDT, °C @ 1.82MPa	D-648-07	°C	45-50	°F	113-122
Izod Notched Impact	D-256-06	J/m	20-30	ft lb/inch	0.375-0.562
Water Absorption	D-570-98 24hr	%	1.1-1.5	%	1.1-1.5
Tg	DMA, E»	°C	52-54	°F	126-129
Shore Hardness (D)	Scale D	Scale D	83-86	Scale D	83-86
Rockwell Hardness	Scale M	Scale M	73-76	Scale M	73-76
Polymerized density	ASTM D792	g/cm ³	1.17-1.18		
Ash content VeroGray, VeroWhitePlus	USP281	%	0.23-0.26	%	0.23-0.26
Ash content VeroBlackPlus	USP281	%	0.01-0.02	%	0.01-0.02

Anhang 2: Materialdatenblatt zum weißen 3D-Druckmaterial VeroWhite zum exemplarischen Vergleich der verschiedenen 3D-Druckmaterialien. Entnommen aus dem PolyJet™ Material Data Sheet der Firma Stratasys Ltd.



3050 Spruce Street
 Saint Louis, Missouri 63103 USA
 Telephone (800) 325-5832 (314) 771-5765
 Fax (314) 286-7828
 email: techserv@sigma.com
 sigma-aidrich.com

Product Information

Glucose Oxidase Type VII from *Aspergillus Niger*

Product Number G2133

Storage Temperature -20 °C

CAS[®] 9001-37-0

EC 1.1.3.4

Synonyms: Gox; β-D-Glucose: oxygen 1-oxidoreductase

Product Description

Glucose Oxidase catalyzes the oxidation of β-D-glucose to form D-glucono-1,5-lactone and hydrogen peroxide.



Glucose oxidase can be utilized for the enzymatic determination of D-glucose in solution. As glucose oxidase oxidizes β-D-glucose to D-gluconolactone and hydrogen peroxide, horseradish peroxidase is often used as the coupling enzyme in glucose determinations. Although glucose oxidase is specific for β-D-glucose, solutions of D-glucose can be quantified, as α-D-glucose will mutarotate to β-D-glucose as the β-D-glucose is consumed by the enzymatic reaction.¹

Molecular weight: 160 kDa (gel filtration)²

Glucose Oxidase from *Aspergillus Niger* is a dimer consisting of 2 equal subunits each with a molecular weight of 80 kDa. Each subunit contains one mole of flavin adenine dinucleotide and one mole of iron. The enzyme is a glycoprotein containing approximately 16% neutral sugar and 2% amino sugar.² The enzyme also contains 3 cysteine residues and 8 potential sites for N-linked glycosylation.³

Extinction coefficient:⁴ $E^{1\%}_1 = 16.7$ (280 nm)

Isoelectric point:⁵ 4.2

Optimal pH:² 5.5 (broad activity range of pH 4-7)

Inhibitors: Ag⁺, Hg²⁺, and Cu²⁺ ions, phenylmercuric acetate and *p*-chloromercuribenzoate inhibit glucose oxidase. Nonmetallic sulfhydryl reagents, such as N-ethylmaleimide, iodoacetate, and iodoacetamide, are not inhibitors.⁶

Related Products

Sodium acetate, trihydrate (Product No. S8625)
 o-Dianisidine, dihydrochloride (Product No. F5803)
 β-D-(+)-Glucose (Product No. G5250)
 Peroxidase, Type II (Product No. P8250)

References

- Bergmeyer, H.U., in *Methods of Enzymatic Analysis*, Volume 2, 3rd ed., Academic Press (Deerfield Beach, FL: 1983) pp. 201-202.
- Tsuge, H.J., *et al.* Purification, properties, and molecular features of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J. Biochem.*, **78**, 835-843 (1975).
- Frederick, K.R., *et al.*, Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *J. Biol. Chem.*, **265**, 3793-3802 (1990).

Substrates: Glucose oxidase is relatively specific for β-D-glucose (K_M of 33-110 mM)^{7,8} It also oxidizes D-aldoheptoses, monodeoxy-D-glucoses, and methyl-D-glucoses at varying rates. The following substrates are listed in decreasing order of oxidation rate: D-glucose, 2-deoxy-D-glucose, 4-O-methyl-D-glucose, 6-deoxy-D-glucose, 4-deoxy-D-glucose, 3-deoxy-D-glucose, 3-O-methyl-D-glucose

This product is supplied as a lyophilized powder containing phosphate buffer salts and sodium chloride.

Protein content: ≥60% protein (biuret)

Specific activity: ≥100,000 units/g solid (without added oxygen) If the reaction mixture is saturated with oxygen, the activity may increase by up to 100%.

Unit definition: One unit will oxidize 1.0 μmole of β-D-glucose to D-gluconolactone and H₂O₂ per minute at pH 5.1 at 35 °C.

Other enzyme activities:

Catalase: ≤10 Sigma units/mg protein
 Amylase, maltase, glycogenase, invertase, and galactose oxidase - lot specific results reported on certificate of analysis.

Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Preparation Instructions

This enzyme is soluble (0.2 mg/ml) in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.1, yielding a clear solution.

Storage/Stability

This product is stored at -20 °C and is stable for at least 5 years.

- Fasman, G.D., in *CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, CRC Press (Boca Raton, FL: 1990), p.244 (Product No. C 3671).
- Pazar, J.H., and Kleppe, K., *The Oxidation of Glucose and Related Compounds by Glucose Oxidase from *Aspergillus niger**. *Biochemistry*, **3**, 578-583 (1964).
- Nakamura, S., and Ogura, Y., Mode of inhibition of glucose oxidase by metal ions. *J. Biochem.*, **64**, 439-447 (1968).
- Swoboda, B.E.P., and Massey V., Purification and properties of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.*, **240**, 2209-2215 (1965).
- Gibson, Q.H., *et al.*, Kinetics and Mechanism of Action of Glucose Oxidase. *J. Biol. Chem.*, **239**, 3927-3934 (1964).

VLR, RBG, MAM 09/05-1

Product Information

Peroxidase from horseradish
Sigma Type VICatalog Number **P8375**
Storage Temperature 2–8 °CEC 1.11.1.7
CAS RN 9003-99-0
Synonym: Hydrogen peroxide oxidoreductase; HRP**Product Description**

Horseradish peroxidase (HRP) is isolated from horseradish roots (*Amaracia rusticana*) and belongs to the ferroporphyrin group of peroxidases. HRP readily combines with hydrogen peroxide (H₂O₂) and the resultant [HRP-H₂O₂] complex can oxidize a wide variety of hydrogen donors.



Peroxidase will oxidize a variety of substrates (see Table 2): chromogenic, chemiluminescent (luminol and isoluminol), and fluorogenic (tyramine, homovanillic acid, and 4-hydroxyphenyl acetic acid).

HRP is a single chain polypeptide containing four disulfide bridges. It is a glycoprotein containing 18% carbohydrate. The carbohydrate composition consists of galactose, arabinose, xylose, fucose, mannose, mannosamine, and galactosamine, depending upon the specific isozyme.¹

Total molecular mass:² ~44 kDa
polypeptide chain: 33,890 Da
hemin plus Ca²⁺: ~700 Da
carbohydrate: 9,400 Da

Extinction coefficient:² E²⁸⁰ = 100 (403 nm)

Optimal pH range:³ 6.0–6.5
(activity at pH 7.5 is 84% of the maximum) The enzyme is most stable in the pH range of 5.0–9.0.

Isoelectric point:¹ isozymes range from 3.0–9.0
(At least seven isozymes)

Inhibitors:⁴ sodium azide, cyanide, L-cystine, dichromate, ethylenethiourea, hydroxylamine, sulfide, vanadate, *p*-aminobenzoic acid, and Cd²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, and Pb²⁺ ions

Preparation Instructions

Soluble in water or 0.1 M phosphate buffer, pH 6.0.

Storage/Stability

Store the product at 2–8 °C. The enzyme remains active for at least 4 years. The product may also be stored at –20 °C, if desired. The lyophilized powder will retain at least 80% of its activity after two weeks at 37 °C.

A 1 mg/ml solution in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.0, remains active for at least two weeks at room temperature.

Related Products**Table 1.**

Other Grades of HRP available

Catalog Number	RZ value	Specific Activity
P6782	~3.0	250-330 units/mg solid
P2088	~3.0	200-300 units/mg solid
P8415	>3.0	250-330 units/mg solid
P8125	~1.0	~80 units/mg solid
P8250	~2.0	150-250 units/mg solid
P6140	~3.0	~250 units/mg protein
P1014	~3.0	≥70 units/mg solid

Horseradish peroxidase is a widely used label for immunoglobulins in many different immunochemistry applications including ELISA, immunoblotting, and immunohistochemistry. HRP can be conjugated to antibodies by several different methods including glutaraldehyde, periodate oxidation, through disulfide bonds, and also via amino and thiol directed cross-linkers. HRP is the most desired label for antibodies, since it is the smallest and most stable of the three most popular enzyme labels (HRP, β-galactosidase, and alkaline phosphatase) and its glycosylation leads to lower non-specific binding.⁴ A review of glutaraldehyde and periodate conjugation methods has been published.⁵

Peroxidase is also utilized for the determination of glucose⁶ and peroxides⁹ in solution.

This product is supplied as an essentially salt free lyophilized powder.

Specific Activity: 250–330 units/mg solid
(pyrogallol as substrate)

Unit definition (purpurogallin): One unit will form 1 mg of purpurogallin from pyrogallol in 20 seconds at pH 6.0 at 20 °C. This unit is equivalent to ~18 μM units per minute at 25 °C.

RZ: ~3.0

RZ (Reinheitsszahl) is the absorbance ratio A₄₂₅/A₂₇₅ determined at 0.5–1.0 mg/ml in deionized water. It is a measure of hemin content, not enzymatic activity. Even preparations with high RZ values may have low enzymatic activity.

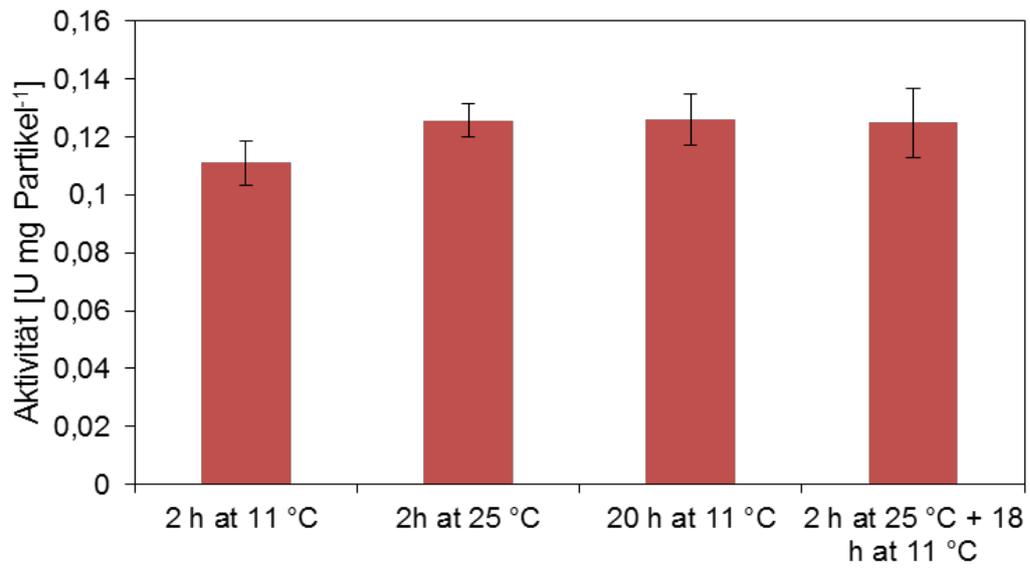
Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

References

- Shannon, L.M., et al., *J. Biol. Chem.*, **241**, 2166-2172 (1966).
- Delincee, H. and Radola, B.J., *Eur. J. Biochemistry*, **52**, 321-330 (1975).
- Welinder, K.G., *Eur. J. Biochem.*, **96**, 483-502 (1978).
- Zöllner, H., *Handbook of Enzyme Inhibitors*, 2nd Ed., Part A: 367-368 (1993).
- Schomberg, D., Salzmann, M., and Stephan, D., *Enzyme Handbook 7*, EC 1.11.1.7:1-6 (1993).
- Deshpande, S.S., *Enzyme Immunoassays, From Concept to Product Development*, Chapman and Hall, 169-171 (1996).
- Harlow, E. and Lane, D., *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 346-348 (1988).
- Bergmeyer, H.U., et al., (1974) *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.), 1205-1227.
- Bemt, E. and Bergmeyer, H.U., (1974) *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.), 2246-2248.

RBG,MAM 07/08-1



Anhang 4: spezifische Aktivität der Enzym-Partikel-Immobilisate bei unterschiedlichen Kopplungszeiträumen und Kopplungstemperaturen

7. Literaturverzeichnis

1. Gebhardt, A. *Generative Fertigungsverfahren: Additive Manufacturing und 3D Drucken für Prototyping - Tooling - Produktion*. Carl Hanser Verlag GmbH Co KG, 01.10.2013 - 672 Seiten
2. Canalys, *3D printing market to grow to US\$16.2 billion in 2018*, 2014.
3. Fastermann, P., ed. *3D Drucken: Wie die generative Fertigungstechnik funktioniert*. Technik im Focus, ed. S. Vieweg. 2014, Springer Verlag Berlin Heidelberg.
4. Stratasys. *PolyJet-Technologie*. 2015; Available from: <http://www.stratasys.com/de/3d-drucker/technologies/polyjet-technology>.
5. Fee, C., S. Nawada, and S. Dimartino, *3D printed porous media columns with fine control of column packing morphology*. J Chromatogr A, 2014. **1333**: p. 18-24.
6. Gross, B.C., et al., *Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences*. Anal Chem, 2014. **86**(7): p. 3240-53.
7. Williams, J.M., et al., *Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering*. Biomaterials, 2005. **26**(23): p. 4817-27.
8. Seitz, H., et al., *Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005. **74**(2): p. 782-8.
9. Gbureck, U., et al., *Low temperature direct 3D printed bioceramics and biocomposites as drug release matrices*. J Control Release, 2007. **122**(2): p. 173-80.
10. Mannoor, M.S., et al., *3D printed bionic ears*. Nano Lett, 2013. **13**(6): p. 2634-9.
11. Wu, W., A. DeConinck, and J.A. Lewis, *Omnidirectional printing of 3D microvascular networks*. Adv Mater, 2011. **23**(24): p. H178-83.
12. Therriault, D., S.R. White, and J.A. Lewis, *Chaotic mixing in three-dimensional microvascular networks fabricated by direct-write assembly*. Nat Mater, 2003. **2**(4): p. 265-71.
13. Mathieson, J.S., et al., *Continuous parallel ESI-MS analysis of reactions carried out in a bespoke 3D printed device*. Beilstein J Nanotechnol, 2013. **4**: p. 285-91.
14. Anderson, K.B., et al., *A 3D printed fluidic device that enables integrated features*. Anal Chem, 2013. **85**(12): p. 5622-6.
15. Srimongkon T., Mandai S., and T. Enomae, *Application of Biomaterials and Inkjet Printing to Develop Bacterial Culture System*. Advances in Materials Science and Engineering, 2015. **2015**(Article ID 290790, 9 pages, 2015.).
16. Kadimisetty, K., et al., *3D-printed supercapacitor-powered electrochemiluminescent protein immunoarray*. Biosens Bioelectron, 2016. **77**: p. 188-93.
17. Kazenwadel, F., M. Franzreb, and B.E. Rapp, *Synthetic enzyme supercomplexes: co-immobilization of enzyme cascades*. Analytical Methods, 2015. **7**(10): p. 4030-4037.
18. Gomes, M.T.R., et al., *Plant Proteinases and Inhibitors: An Overview of Biological Function and Pharmacological Activity*. Current Protein & Peptide Science, 2011. **12**(5): p. 417-436.
19. Michaelis, L. and M.L. Menten, *Die Kinetik der Invertinwirkung*. Biochem. Z., 1913. **49**: p. 36.
20. Jegannathan, K.R. and P.H. Nielsen, *Environmental assessment of enzyme use in industrial production - a literature review*. Journal of Cleaner Production, 2013. **42**: p. 228-240.
21. Bloom, J.D., et al., *Evolving strategies for enzyme engineering*. Current opinion in structural biology, 2005. **15**(4): p. 447-52.
22. Harris, J.L. and C.S. Craik, *Engineering enzyme specificity*. Current opinion in chemical biology, 1998. **2**(1): p. 127-32.
23. Sheldon, R.A., *Enzyme immobilization: The quest for optimum performance*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2007. **349**(8-9): p. 1289-1307.
24. Sheldon, R.A., R. Schoevaart, and L.M. Van Langen, *Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review)*. Biocatalysis and Biotransformation, 2005. **23**(3-4): p. 141-147.
25. Avnir, D., et al., *Enzymes and Other Proteins Entrapped in Sol-Gel Materials*. Chemistry of Materials, 1994. **6**(10): p. 1605-1614.

26. Cosnier, S., *Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review.* Biosensors & Bioelectronics, 1999. **14**(5): p. 443-456.
27. Morhardt, C., et al., *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**: p. 55-63.
28. Mateo, C., et al., *Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques.* Enzyme and Microbial Technology, 2007. **40**(6): p. 1451-1463.
29. DiCosimo, R., et al., *Industrial use of immobilized enzymes.* Chemical Society Reviews, 2013. **42**(15): p. 6437-6474.
30. Miyazaki, M., et al., *Efficient immobilization of enzymes on microchannel surface through his-tag and application for microreactor.* Protein and Peptide Letters, 2005. **12**(2): p. 207-210.
31. Agarwal, G., R.R. Naik, and M.O. Stone, *Immobilization of histidine-tagged proteins on nickel by electrochemical dip pen nanolithography.* Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(24): p. 7408-7412.
32. Jeong, J., T.H. Ha, and B.H. Chung, *Enhanced reusability of hexa-arginine-tagged esterase immobilized on gold-coated magnetic nanoparticles.* Analytica Chimica Acta, 2006. **569**(1-2): p. 203-209.
33. Waldbaur, A., et al., *Maskless Projection Lithography for the Fast and Flexible Generation of Grayscale Protein Patterns.* Small, 2012. **8**(10): p. 1570-1578.
34. Schmidt, T.G. and A. Skerra, *One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin.* Journal of chromatography. A, 1994. **676**(2): p. 337-45.
35. Kinoshita, T., et al., *TIMP-2 promotes activation of progelatinase a by membrane-type 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(26): p. 16098-16103.
36. Fishman, A., et al., *Stabilization of horseradish peroxidase in aqueous-organic media by immobilization onto cellulose using a cellulose-binding-domain.* Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2002. **18**(1-3): p. 121-131.
37. Ong, E., et al., *Enzyme Immobilization Using a Cellulose-Binding Domain - Properties of a Beta-Glucosidase Fusion Protein.* Enzyme and Microbial Technology, 1991. **13**(1): p. 59-65.
38. Taniguchi, K., et al., *The Si-Tag for immobilizing proteins on a silica surface.* Biotechnology and Bioengineering, 2007. **96**(6): p. 1023-1029.
39. Engin, S., et al., *SNAP-tag as a Tool for Surface Immobilization.* Current Pharmaceutical Design, 2013. **19**(30): p. 5443-5448.
40. Zhang, Y., et al., *HaloTag protein-mediated site-specific conjugation of bioluminescent proteins to quantum dots.* Angewandte Chemie-International Edition, 2006. **45**(30): p. 4936-4940.
41. Ricca, E., B. Brucher, and J.H. Schrittwieser, *Multi-Enzymatic Cascade Reactions: Overview and Perspectives.* Advanced Synthesis & Catalysis, 2011. **353**(13): p. 2239-2262.
42. Martin del Campo, J.S., et al., *High-Yield Production of Dihydrogen from Xylose by Using a Synthetic Enzyme Cascade in a Cell-Free System.* Angewandte Chemie-International Edition, 2013. **52**(17): p. 4587-4590.
43. Spivey, H.O. and J. Ovadi, *Substrate channeling.* Methods-a Companion to Methods in Enzymology, 1999. **19**(2): p. 306-321.
44. Zhang, Y.H.P., *Substrate channeling and enzyme complexes for biotechnological applications.* Biotechnology advances, 2011. **29**(6): p. 715-725.
45. You, C., S. Myung, and Y.H.P. Zhang, *Facilitated Substrate Channeling in a Self-Assembled Trifunctional Enzyme Complex.* Angewandte Chemie-International Edition, 2012. **51**(35): p. 8787-8790.
46. Deng, X.P., et al., *Bio-Orthogonal Polymer Coatings for Co-Presentation of Biomolecules.* Macromolecular Rapid Communications, 2012. **33**(8): p. 640-645.

47. Zhu, L.D., et al., *Bienzymatic glucose biosensor based on co-immobilization of peroxidase and glucose oxidase on a carbon nanotubes electrode*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2007. **23**(4): p. 528-535.
48. Chmura, A., et al., *The combi-CLEA approach: enzymatic cascade synthesis of enantiomerically pure (S)-mandelic acid*. *Tetrahedron-Asymmetry*, 2013. **24**(19): p. 1225-1232.
49. Mateo, C., et al., *Synthesis of enantiomerically pure (S)-mandelic acid using an oxynitrilase-nitrilase bienzymatic cascade: a nitrilase surprisingly shows nitrile hydratase activity*. *Tetrahedron-Asymmetry*, 2006. **17**(3): p. 320-323.
50. Duckworth, B.P., et al., *A universal method for the preparation of covalent protein-DNA conjugates for use in creating protein nanostructures*. *Angewandte Chemie*, 2007. **46**(46): p. 8819-22.
51. Muller, J. and C.M. Niemeyer, *DNA-directed assembly of artificial multienzyme complexes*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008. **377**(1): p. 62-67.
52. van Dongen, S.F.M., et al., *A Three-Enzyme Cascade Reaction through Positional Assembly of Enzymes in a Polymersome Nanoreactor*. *Chemistry-a European Journal*, 2009. **15**(5): p. 1107-1114.
53. Asanomi, Y., et al., *Enzyme-Immobilized Microfluidic Process Reactors*. *Molecules*, 2011. **16**(7): p. 6041-6059.
54. Minteer, S.D., B.Y. Liaw, and M.J. Cooney, *Enzyme-based biofuel cells*. *Current opinion in biotechnology*, 2007. **18**(3): p. 228-34.
55. Hatzinikolaou, D.G. and B.J. Macris, *Factors Regulating Production of Glucose-Oxidase by Aspergillus-Niger*. *Enzyme and microbial technology*, 1995. **17**(6): p. 530-534.
56. Tzanov, T., et al., *Hydrogen peroxide generation with immobilized glucose oxidase for textile bleaching*. *Journal of Biotechnology*, 2002. **93**(1): p. 87-94.
57. Rasiah, I.A., et al., *Crosslinking of wheat dough proteins by glucose oxidase and the resulting effects on bread and croissants*. *Food Chemistry*, 2005. **89**(3): p. 325-332.
58. Bankar, S.B., et al., *Glucose oxidase - An overview*. *Biotechnology advances*, 2009. **27**(4): p. 489-501.
59. Yoo, E.H. and S.Y. Lee, *Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice*. *Sensors*, 2010. **10**(5): p. 4558-4576.
60. Nakamura, S. and S. Fujiki, *Comparative studies on the glucose oxidases of Aspergillus niger and penicillium amagasakiense*. *Journal of Biochemistry*, 1968. **63**(1): p. 51-8.
61. Lu, T.B., et al., *The production of glucose oxidase using the waste myceliums of Aspergillus niger and the effects of metal ions on the activity of glucose oxidase*. *Enzyme and microbial technology*, 1996. **19**(5): p. 339-342.
62. Luong, J.H.T., et al., *Monitoring the Activity of Glucose-Oxidase during the Cultivation of Aspergillus-Niger Using Novel Amperometric Sensor with 1,1'-Dimethylferricinium as a Mediator*. *Biosensors & bioelectronics*, 1994. **9**(8): p. 577-584.
63. Karmali, K., et al., *Assay for glucose oxidase from Aspergillus niger and Penicillium amagasakiense by Fourier transform infrared spectroscopy*. *Analytical Biochemistry*, 2004. **333**(2): p. 320-327.
64. Smith, A.T., et al., *Expression of a Synthetic Gene for Horseradish Peroxidase-C in Escherichia-Coli and Folding and Activation of the Recombinant Enzyme with Ca-2+ and Heme*. *Journal of Biological Chemistry*, 1990. **265**(22): p. 13335-13343.
65. Gajhede, M., et al., *Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 angstrom resolution*. *Nature Structural Biology*, 1997. **4**(12): p. 1032-1038.
66. Veitch, N.C., *Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme*. *Phytochemistry*, 2004. **65**(3): p. 249-259.
67. Welinder, K.G., *Covalent Structure of Glycoprotein Horseradish-Peroxidase (Ec1.11.1.7)*. *Febs Letters*, 1976. **72**(1): p. 19-23.
68. Krieg, R. and K.J. Halbhuber, *Recent advances in catalytic peroxidase histochemistry*. *Cellular and Molecular Biology*, 2003. **49**(4): p. 547-563.

69. Veitch, N.C. and A.T. Smith, *Horseradish peroxidase*. *Advances in Inorganic Chemistry*, Vol 51, 2001. **51**: p. 107-162.
70. Carr, E.A., *A Rapid Bedside Test for the Detection of Hypoglycemia*. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1946. **31**(11): p. 1267-1269.
71. Boehm, C.R., P.S. Freemont, and O. Ces, *Design of a prototype flow microreactor for synthetic biology in vitro*. *Lab on a Chip*, 2013. **13**(17): p. 3426-3432.
72. Fornera, S., et al., *Sequential Immobilization of Enzymes in Microfluidic Channels for Cascade Reactions*. *Chempluschem*, 2012. **77**(2): p. 98-101.
73. O., L., ed. *Chemical Reaction Engineering - 3rd ed.* 1999.
74. Kazenwadel, F., Wagner, H., Rapp B. E. , Franzreb M., *Optimization of Enzyme Immobilization onto magnetic microparticles using 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) as Crosslinking Agent*. *Analytical Methods*, 2015. **2015**(7): p. 7.
75. Wong, C.M., K.H. Wong, and X.D. Chen, *Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008. **78**(6): p. 927-938.
76. Zheng, G., B. Shu, and S. Yan, *Preparation and characterization of immobilized lipase on magnetic hydrophobic microspheres*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003. **32**(7): p. 776-782.
77. Akgol, S., et al., *Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres*. *Food Chemistry*, 2001. **74**(3): p. 281-288.
78. Vanleemp.E and Horisber.M, *Immobilization of Enzymes on Magnetic Particles*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1974. **16**(3): p. 385-396.
79. Bruno, L.M., et al., *Characterization of Mucor miehei lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005. **21**(2): p. 189-192.
80. Huang, S.H., M.H. Liao, and D.H. Chen, *Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles*. *Biotechnology Progress*, 2003. **19**(3): p. 1095-1100.
81. Kouassi, G.K., J. Irudayaraj, and G. McCarty, *Examination of Cholesterol oxidase attachment to magnetic nanoparticles*. *Journal of nanobiotechnology*, 2005. **3**(1): p. 1.
82. Koneracka, M., et al., *Immobilization of proteins and enzymes to fine magnetic particles*. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 1999. **201**: p. 427-430.
83. Liao, M.H. and D.H. Chen, *Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles for improving its stability*. *Biotechnology Letters*, 2001. **23**(20): p. 1723-1727.
84. Magario, I., et al., *Evaluation of enzyme carriers as biocatalysts for the conversion of emulsified rhamnolipids*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2009. **27**(4): p. 237-245.
85. Wang, T.H. and W.C. Lee, *Immobilization of proteins on magnetic nanoparticles*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2003. **8**(4): p. 263-267.
86. Bozhinova, D., et al., *Evaluation of magnetic polymer micro-beads as carriers of immobilised biocatalysts for selective and stereoselective transformations*. *Biotechnology Letters*, 2004. **26**(4): p. 343-350.
87. Bahar, T. and S.S. Celebi, *Immobilization of glucoamylase on magnetic poly(styrene) particles*. *Journal of Applied Polymer Science*, 1999. **72**(1): p. 69-73.
88. Ricco, R., C.M. Doherty, and P. Falcaro, *Evaluation of Coupling Protocols to Bind Beta-Glucosidase on Magnetic Nanoparticles*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2014. **14**(9): p. 6565-6573.
89. Hermanson, G.T., ed. *Bioconjugate Techniques - 2nd Edition*. ed. A. Press. 2008, Elsevier.
90. Porada, S., et al., *Review on the science and technology of water desalination by capacitive deionization*. *Progress in Materials Science*, 2013. **58**(8): p. 1388-1442.
91. Eddington, D.T., et al., *An organic self-regulating microfluidic system*. *Lab on a Chip*, 2001. **1**(2): p. 96-99.
92. Laritz, C. and L. Pagel, *A microfluidic pH-regulation system based on printed circuit board technology*. *Sensors and Actuators a-Physical*, 2000. **84**(3): p. 230-235.

93. Cheng, L.J. and H.C. Chang, *Microscale pH regulation by splitting water*. *Biomicrofluidics*, 2011. **5**(4).
94. Ritter, D.W., J.R. Roberts, and M.J. McShane, *Glycosylation site-targeted PEGylation of glucose oxidase retains native enzymatic activity*. *Enzyme and microbial technology*, 2013. **52**(4-5): p. 279-85.
95. Bhatti, H.N., et al., *Purification and thermodynamic characterization of glucose oxidase from a newly isolated strain of Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 2006. **52**(6): p. 519-524.
96. Szajani, B., et al., *Preparation, characterization, and potential application of an immobilized glucose oxidase*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 1987. **14**(1): p. 37-47.

Lebenslauf

Franziska Kazenwadel
*19. März 1987 in Stuttgart

Ausbildung

Karlsruher Institut für Technologie, KIT *09/2012 - 12/2015*
Promotion am Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG)
Thema der Dissertation: Molekulares Biopatterning technischer Oberflächen und neue Drucktechnologien für innovative Biotransformationssysteme

Universität Stuttgart *10/2006 - 03/2012*
Studium Technische Biologie *03/2012*
Schwerpunkte: Immunologie/Antikörper-Engineering, Tierphysiologie und technische Biochemie
Gesamtnote: 1,0 (mit Auszeichnung)

Diplomarbeit am Fraunhofer Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik *2011*
Thema: Molekulare Werkzeuge zur in-vivo Integration unnatürlicher Aminosäuren in *Candida albicans*

Studienarbeit am Institut für Biochemie, Microbiolytics GmbH *2010*
Universität Stuttgart
Thema: Vorentwicklung zu einem hefebasierten Toxizitätstest sowie Untersuchung Huntingtin-tragender Hefezellen basierend auf AquaSpec® Infrarot-Technologie

allgemeine Hochschulreife (Abitur) am Raichberg Gymnasium Ebersbach (Fils) *2006*
Gesamtnote: 1,4

Berufserfahrung & Praxis

Robert Bosch GmbH, Stuttgart Schillerhöhe *seit 01/2016*
Entwicklungsingenieurin im Rahmen des Junior Managers Programms, Bereich Forschung und Entwicklung

Massachusetts Institute of Technology (MIT), Cambridge (MA), USA *03/2015 - 06/2015*
Gastwissenschaftlerin am Department of Chemical Engineering bei Prof. Dr. Alan Hatton

Tosoh Bioscience, Stuttgart *03/2012 - 09/2012*
Industriepraktikum im Bereich Entwicklung, Prozessoptimierung, technischer Support

Microbiolytics GmbH, Esslingen am Neckar *03/2010 - 06/2010*
Industriepraktikum

Publikationen

F. Kazenwadel, M. Franzreb, B. E. Rapp. Synthetic Enzyme Supercomplexes: Co-Immobilization of Enzyme Cascades; *Analytical Methods*, 2015,7, 4030-4037

F. Kazenwadel, H. Wagner, M. Franzreb. Untersuchung der Proteinbindung an 3D-Druckmaterial mittels QCM-D – Grundlagen für das rationale Design druckbarer Enzymreaktoren; *Chemie Ingenieur Technik* 09/2014; 86(9).

F. Kazenwadel, H. Wagner, B.E. Rapp, M. Franzreb. Optimization of enzyme immobilization on magnetic microparticles using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) as a crosslinking agent. *Anal. Methods*, 2015,7, 10291-10298

F. Kazenwadel, E. Biegert, J. Wohlgemuth, H. Wagner, M. Franzreb. A 3D-printed modular reactor set-up including temperature and pH-control for the compartmentalized implementation of enzyme cascades. *Engineering in Life Science*, 06/2016. DOI: 10.1002/elsc.201600007

S. Palzer, Y. Bantel, F. Kazenwadel, M. Berg, S. Rupp, K. Sohn. An Expanded Genetic Code in *Candida albicans* to study Protein-Protein Interactions in vivo. *Eukaryotic Cell* June 2013 vol. 12 no. 6 816-827

Konferenzbeiträge

F. Kazenwadel, S. Heißler, M. Franzreb. Molecular-Scale Enzyme Patterns on Technical Surfaces. *9th European Congress of Chemical Engineering* (Poster, Den Haag, Niederlande, 2013)

F. Kazenwadel, S. Heißler, M. Franzreb. Skalenübergreifende Enzymimmobilisierung auf technischen Oberflächen, *DECHEMA: Effiziente Verfahren und Anlagen in der Bioverfahrenstechnik und Lebensmittelbiotechnologie* (Poster, Bad Wildungen, 2013)

F. Kazenwadel, J. Wohlgemuth, H. Wagner, M. Franzreb. Reactor Devices for the Compartmentalized Immobilization of Enzymatic Cascades, *DECHEMA : Biomaterials – made in Bioreactors* (Poster mit Posterpreis und Vortrag, Radebeul, 2014)

F. Kazenwadel, H. Wagner, M. Franzreb. Co-Immobilization of an Enzyme Cascade onto Magnetic Particles; *10th European Symposium on Biochemical Engineering Sciences and 6th International Forum on Industrial Bioprocesses* (Poster, Lille, Frankreich, 2014)

F. Kazenwadel, H. Wagner, J. Wohlgemuth, M. Franzreb. Untersuchung der Proteinbindung an 3D-Druckmaterial – Grundlagen für das rationale Design druckbarer Enzymreaktoren; *ProcessNet-Jahrestagung und 31. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen 2014* (Poster mit Posterpreis, Aachen, 2014)