

**Kompartimentierte Mikroreaktoren
für die Oligosaccharidsynthese
mittels magnetischer Enzymimmobilisate**

zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (DR.-ING.)

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

DISSERTATION

von

M. Sc. Raphael Greifenstein (geb. Heinzler)
aus Karlsruhe

Erstgutachter: Prof. Dr.-Ing. M. Franzreb
Zweitgutachter: Prof. Dr. Christoph Syldatk
Tag der mündlichen Prüfung: 25.05.2020

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem hochgeschätzten Doktorvater 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.

Bei Herrn Prof. Dr. Christoph Syldatk bedanke ich mich für die Bereitschaft, das Korreferat für diese Arbeit zu übernehmen.

Dem Karlsruhe House of Young Scientists (KHYS) danke ich für die finanzielle Unterstützung während meines Auslandsaufenthalts am Massachusetts Institute of Technology (MIT), Cambridge, USA.

Ein besonderer Dank gilt Dr.-Ing. Jonas Hübner für die freundliche Vor- und Mitarbeit an dem Reaktorsystem, Dipl.-Ing. Frank Kirschhöfer und Dipl.-Ing. Michael Nusser für die großzügige Unterstützung beim Umgang mit den Analysesystemen, Herrn Mike Füssler für die vielen kleinen Hilfen im Laboralltag, Dipl.-Ing (FH) Jonas Wohlgemuth für die Bereitstellung von 3D-Druckkapazitäten und M. Sc. Siegfried Hohmann für die Hilfe bei elektrotechnischen Fragen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei B. Sc. Paul Buller, M. Sc. Manuel Merkel und M. Sc. Alexander Papadopoulos, dafür bedanken, dass sie im Rahmen von Abschlussarbeiten, Praktika oder hilfswissenschaftlichen Tätigkeiten das Gelingen meiner Arbeit tatkräftig unterstützt haben.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Funktionelle Grenzflächen, insbesondere meinen Kolleginnen und Kollegen in der Abteilung Bioprozesstechnik und Biosysteme, danke ich herzlich für die freundliche, offene und stets hilfsbereite Atmosphäre während meiner Zeit am Institut. Danke für die Hilfe, die spannenden Diskussionen, die entstandenen Freundschaften und letzten Endes den großen Spaß, den ich während meiner Zeit am Institut hatte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern, meinen Schwiegereltern und meinem Hund Darwin, die mich in allen Phasen der Promotion stets motiviert und unterstützt haben.

Vor allem und allen aber bedanke ich mich bei meiner Frau Juliane, die all dies mit ihrer Liebe und ihrem Vertrauen in mich erst möglich gemacht hat.

Zusammenfassung

Immobilisierte mikrofluidische Enzymreaktoren (IMER) haben einen großen Anwendungsbereich, zu dem die Biomedizin und Pharmazie zählen. In diesen Bereichen ist die Synthese von Glykanen und Glykokonjugaten von besonderem Interesse. Dabei ist die chemische Synthese der Glykokonjugate aufgrund ihrer strukturellen Diversität schwierig. Der Einsatz von Enzymen bietet dagegen attraktive Vorteile wie Regio- und Stereoselektivität. Entsprechende Enzymkaskaden haben bisher jedoch wenig Flexibilität zugelassen und deren Entwicklung und Optimierung war mit einem hohen Zeitaufwand verbunden. Daher ist die Nachfrage nach Reaktionssystemen hoch, in denen Enzymkaskadenreaktionen automatisiert ablaufen können. Ziel der vorliegenden Dissertation war es, ein automatisiertes, kompartimentiertes Mikroreaktorsystem (KMS) zu entwickeln, in welchem immobilisierte Enzyme in Reaktionskaskaden die Synthese von Nukleotidzuckern und Glykanen durchführen können. Das KMS wurde aus einem bereits bestehenden Mikroreaktorsystem entwickelt und für die Anwendungen angepasst und erweitert. Die sechs verwendeten rekombinanten Enzyme mit His₆-Tag wurden von Projektpartnern bereitgestellt. Sie wurden mittels Komplexbildung auf magnetischen Trägerpartikeln immobilisiert. Die durch die immobilisierten Enzyme katalysierten Reaktionen sollten charakterisiert und optimiert werden.

Das KMS ist aus modularen, kommerziellen Ventil-, Spritzenpumpen- und I/O-Modulen aufgebaut und wird mit der dazugehörigen Software gesteuert. Ein Helmholtz-Spulenpaar und ein Permanentmagnetarray, eingebaut in 3D-gedruckte Komponenten, bilden das Herz des Systems. Als Reaktionskammer werden wässrige Kompartimente in einem Fluorpolymer-Schlauch gebildet, der zwischen den Helmholtz-Spulen durchgeführt wird. Um Synthesen im präparativen Maßstab zu ermöglichen, wurden im fluidischen Peripheriesystem des KMS entsprechende Ventile und Schläuche verbaut, sodass wässrige Kompartimente mit bis zu 3 mL generiert werden können. Für enzymatische Reaktionen unter optimalen Bedingungen wurde ein Temperaturkontrollmodul (TKM) in das KMS implementiert. Dieses besteht aus einer mit Wasser gefüllten zylindrischen Polymerkammer, die zwei parallel verlaufende Schläuche ummantelt und mit einem Thermostat verbunden ist. Das reproduzierbare Erstellen von stabilen Kompartimenten wurde eingehend untersucht. Dafür wurden verschiedene Separationsfluide für unterschiedliche Schlauchgrößen getestet. Zudem wurde die Verteilung von Magnetpartikeln in diesen Kompartimenten durch verschiedene, zeitlich veränderliche, elektromagnetische Felder erprobt. Die Verbindung des KMS mit einem analytischen Massenspektrometrie-System ermöglichten es, die Produkte der Enzymsynthesen online zu analysieren.

Für jedes immobilisierte Enzym wurde die Beladungsausbeute ermittelt, um die optimalen Bedingungen für die Immobilisierung zu bestimmen. Auf diese Weise konnten bis zu 96% der eingesetzten Enzyme gebunden werden. Ausgehend von Angaben der Literatur wurde für alle immobilisierten Enzyme Aktivitätsassays und Analysemethoden entwickelt. Um die optimalen Reaktionsbedingungen jedes immobilisierten Enzyms zu bestimmen, wurden die Einflüsse der Parameter Enzymbeladung, pH-Wert, Temperatur und Substratkonzentration auf die spezifische

Enzymaktivität halb automatisiert im KMS untersucht. So konnte mit den immobilisierten Enzymen teilweise die spezifische Aktivität freier Enzyme übertroffen werden. Dieses Phänomen trat bei Tests mit Temperaturen auf, welche deutlich über denen lagen, die für freie Enzyme als optimal angegeben wurden. Mit der, durch die Immobilisierung erhaltenen, erhöhten Stabilität gegenüber Reaktionseinflüssen konnten optimierte Reaktionsbedingungen ermittelt und genutzt werden. Durch wiederholten Einsatz der gleichen magnetischen Enzymimmobilisate (MEI) in Aktivitätsassays, konnte die Wiederverwendbarkeit der immobilisierten Enzyme untersucht werden. Dabei erreichten die meisten immobilisierten Enzyme in 6 Zyklen eine durchschnittliche Restaktivität von mehr als 50%. Durch die Wiederverwendbarkeit konnten die immobilisierten Enzyme mehr Produkt umsetzen als die gleiche Menge an freien Enzymen.

Mit den optimierten Reaktionsbedingungen konnten Synthesereaktionen für 5 – 6 h im KMS automatisiert durchgeführt werden. Dazu wurden die enzymatisch katalysierten Reaktionen in einer komplexen Reaktionskaskade verknüpft. Die Nukleotidzucker-Substrate wurden durch parallelisierte Enzymreaktionen umgewandelt und die Zwischenprodukte zur Umwandlung durch nachfolgende immobilisierte Enzyme weiter transportiert. Die MEI wurden dabei durch das Magnetfeld des Permanentmagnetarrays abgetrennt und mittels eines alternierenden, elektromagnetischen Feldes der Helmholtz-Spulen resuspendiert. Da der Substratumsatz in den räumlich getrennten Enzymreaktionen optimiert wurde, verkürzte sich die Prozesszeit und die Raum-Zeit-Ausbeute wurde erhöht. Das schrittweise Anpassen der Reaktionsbedingungen und MEI-Verhältnisse ermöglichte eine Steigerung der, Gesamtausbeute des nicht-sulfatierten Human Natural Killer-1 (HNK-1) Glykan Epitops mit der Enzymkaskade auf 96%. Die Produkte konnten mit dem integrierten MS-System nachgewiesen werden. Eine Simulation der Enzymkaskade konnte das Ergebnis der Gesamtausbeute bestätigen. Wurde die Reaktionskaskade mit freien Enzymen unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, belief sich die Ausbeute nur auf 44%. Durch den Vergleich konnten somit die Vorteile eines Prozesses mit den MEI in dem KMS demonstriert werden.

Abstract

Immobilized microfluidic enzyme reactors (IMER) have a wide range of applications, including biomedicine and pharmaceuticals. In these areas the synthesis of glycans and glycoconjugates is of particular interest. The chemical synthesis of glycoconjugates is difficult due to their structural diversity. On the other hand, the use of enzymes offers attractive advantages such as regioselectivity and stereoselectivity. However, corresponding enzyme cascades have so far not allowed much flexibility and their development and optimization has been time-consuming. Therefore, there is a great demand for reaction systems in which enzyme cascade reactions can be automated. The aim of this dissertation was to develop an automated, compartmentalized microreactor system (CMS) in which immobilized enzymes can synthesize nucleotide sugars and glycans in reaction cascades. The CMS was developed from an existing microreactor system, adapted and extended for the applications. The six recombinant enzymes with His₆ tag were provided by project partners. They were immobilised on magnetic carrier particles by complex formation. The reactions catalyzed by the immobilized enzymes were to be characterized and optimized.

The CMS is composed of modular, commercial valve, syringe pump and I/O modules and is controlled by the corresponding software. A pair of Helmholtz coils and a permanent magnet array built into 3D-printed components form the heart of the system. Aqueous compartments are formed as reaction chambers in a fluoropolymer tube that is passed between the Helmholtz coils. In order to enable syntheses on a preparative scale in aqueous compartments of up to 3 mL, appropriate valves and tubes were installed in the fluidic peripheral system of the CMS. For enzymatic reactions under optimal conditions a temperature control module was implemented in the CMS. This module consists of a cylindrical polymer chamber filled with water, which sheathes two parallel tubes and which is connected to a thermostat. The reproducible creation of stable compartments was thoroughly investigated. Different separation fluids for different tube sizes were tested. In addition, the distribution of magnetic particles in these compartments was tested by various, time-varying, electromagnetic fields. The connection of the CMS with an analytical mass spectrometry system made it possible to analyze the products of the enzyme syntheses online.

For each immobilized enzyme, the loading yield was determined to ascertain the optimal conditions for immobilization. In this way, up to 96% of the enzymes used could be bound. Based on literature data, activity assays and analytical methods were developed for all immobilized enzymes. In order to determine the optimal reaction conditions of each immobilized enzyme, the influences of the parameters enzyme loading, pH value, temperature and substrate concentration on the specific enzyme activity were examined semi-automatically in the CMS. Thus, the immobilized enzymes could partially exceed the specific activity of free enzymes. This phenomenon occurred in tests with temperatures significantly higher than those indicated as optimal for soluble enzymes. With the increased stability against reaction influences obtained by immobilization, optimized reaction conditions could be determined and used. By conducting multiple cycles of activity assays with the same magnetic enzyme

immobilisates (MEI), the reusability of the immobilised enzymes could be investigated. Most immobilized enzymes reached an average residual activity of more than 50% in 6 cycles. Due to their reusability, the immobilized enzymes were able to convert more product than the same amount soluble enzymes.

With the optimized reaction conditions, synthesis reactions could be carried out automatically for 5 - 6 h in the CMS. The enzymatically catalyzed reactions were linked in a complex reaction cascade. The nucleotide sugar substrates were converted by parallel enzyme reactions and the intermediate products were transported further for conversion by subsequent immobilized enzymes. The MEI were separated by the magnetic field of the permanent magnet array and resuspended by an alternating electromagnetic field of the Helmholtz coils. Since the substrate turnover was optimized in the spatially separated enzyme reactions, the process time was shortened and the space-time yield was increased. The stepwise adaptation of the reaction conditions and MEI ratios enabled an increase of the total yield of the non-sulfated Human Natural Killer-1 (HNK-1) glycan epitope to 96%, using the enzyme cascade. The products could be detected with the integrated MS system. A simulation of the enzyme cascade confirmed the results of the total yield. When the reaction cascade was carried out with soluble enzymes under the same conditions, the yield was only 44%. The comparison thus demonstrated the advantages of a process with the MEI in the KMS.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Abstract	VII
Inhaltsverzeichnis	IX
Abbildungen	XII
Tabellen	XIV
Abkürzungsverzeichnis	XV
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Magnetismus	3
2.1.1 Magnetische Kenngrößen	3
2.1.2 Helmholtz-Spulen zur Erzeugung von Magnetfeldern	8
2.2 Mikroreaktoren	10
2.2.1 Magnettechnologische Mikroreaktoren	10
2.2.2 Immobilisierte mikrofluidische Enzymreaktoren (IMER)	15
2.2.3 Magnetpartikel	18
2.3 Immobilisierung von Enzymen	20
2.4 Glykane	23
2.5 Enzyme für die Glykokonjugatsynthese	24
2.5.1 UDP-Glucose-Dehydrogenase (UGDH)	24
2.5.2 NADH-Oxidase (NOX)	25
2.5.3 Galactokinase (GalK)	26
2.5.4 UDP-Zucker Pyrophosphorylase (USP)	27
2.5.5 β -1,4-Galactosyltransferase (GalT)	28
2.5.6 Glucuronyltransferase (GlcAT)	28
3 Materialien und Methoden	30
3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	30
3.2 Chemikalien	31
3.3 Bestandteile des kompartimentierten Mikroreaktorsystems (KMS)	32
3.4 Magnetische Trägerpartikel	33
3.5 Enzyme	33
3.5.1 Enzymmodule	34
3.6 Das kompartimentierte Mikroreaktorsystems (KMS)	36

3.6.1	KMS-Massenspektrometer Kopplung	40
3.7	Charakterisierung des KMS.....	42
3.7.1	Pluggenerierung im KMS	42
3.7.2	Partikelresuspendierung	43
3.8	Magnetische Enzymimmobilisate (MEI).....	44
3.8.1	Immobilisierung der Enzyme auf den magnetischen Trägerpartikeln....	44
3.8.2	Bestimmung der Enzymbeladung	45
3.8.3	Durchführung der Aktivitätsassays.....	46
3.8.4	Bestimmung der Aktivität	48
3.8.5	Parameter- und Kinetikstudien, Rezyklierungstests und Synthesereaktionen im KMS	49
3.8.6	Bestimmung der Temperaturstabilität der immobilisierten Enzyme	51
3.8.7	Reaktionskaskade mit MEI im KMS, mit freien Enzymen und Simulation der Reaktionskaskade	51
4	Ergebnisse und Diskussion	54
4.1	Charakterisierung des kompartimentierten Mikroreaktorsystems (KMS).....	54
4.1.1	Pluggenerierung.....	54
4.1.2	Partikelverteilung in 1/4“ AD und 1/2“ AD-Schläuchen.....	57
4.2	Magnetische Enzymimmobilisate (MEI).....	59
4.2.1	Beladung.....	60
4.2.2	Parameterstudien.....	61
4.3	Synthesereaktionen.....	86
4.3.1	EM UDP-GlcA	86
4.3.2	Enzymkaskade mit MEI im KMS	88
4.3.3	Validierung der online MS-Analyse	91
4.3.4	Schlussfolgerungen	94
5	Fazit und Ausblick.....	95
6	Literaturverzeichnis	98
7	Anhang.....	105
7.1	Zusammensetzung der Reaktionslösungen für die Enzymkaskaden	105
7.2	HPLC-Methoden für die Analyse der Enzymmodule	106
7.2.1	EM GlcA.....	106
7.2.2	EM Gal.....	107
7.2.3	EM GalT/ EM GlcAT	107
7.3	HPLC Chromatogramme	108

7.4 Beispielhaftes QmixElements Skript.....	109
Publikationen	110

Abbildungen

Abbildung 1: Magnetisierungskurve einer ferromagnetischen Substanz	5
Abbildung 2: Abhängigkeit der Suszeptibilität von Magnetit von der Partikelgröße ...	6
Abbildung 3: Magnetisierungskurve einer superparamagnetischen Substanz.....	7
Abbildung 4: Aufbau und Feldverlauf einer Helmholtz-Spule.....	9
Abbildung 5: Verwendung verschiedener Magnetfelder in magnetischen Mikroreaktoren	12
Abbildung 6: Einsatz weichmagnetischer Werkstoffe zur reversiblen Partikelfixierung	13
Abbildung 7: Durchmischung von Mikrotropfen durch Magnetpartikelketten	14
Abbildung 8: Magnetpartikelseparation im segmentierten Fluss.....	15
Abbildung 9: Die drei Hauptanordnungen der IMER.....	16
Abbildung 10: Darstellung von Magnetpartikeln	19
Abbildung 11: Übersicht über verschiedene Methoden der Immobilisierung von Enzymen.	20
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Komplexbindung einer Histidinseitenkette über ein Kupferion mit Iminodiacetat.....	21
Abbildung 13: Modell der ringförmigen Hexamerstruktur von UGDH	25
Abbildung 14: Molekularer Aufbau der humanen Galactokinase	27
Abbildung 15: Schematische Darstellung der verwendeten Enzymmodule.	35
Abbildung 16: Übersicht über das KMS als (A) Aufbau im Labor und (B) Fließschema.....	36
Abbildung 17: Darstellung (A) des Reaktormoduls, (B) des Magnetfeld-Moduls (MFM) und (C) des Permanentmagnetarrays.....	38
Abbildung 18: Darstellung des Temperaturkontrollmoduls (TKM).	40
Abbildung 19: Aufbau des KMS mit Kopplung an ein Massenspektrometer-System	41
Abbildung 20: Schematische Darstellung einer Pluggenerierung	42
Abbildung 21: Schematische Darstellung des Immobilisierungsprozesses der Enzyme auf Magnetpartikel.....	45
Abbildung 22: Schematische Darstellung der Enzymkaskade zur Herstellung des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops.	52
Abbildung 23: Flussdiagramm der Enzymreaktionskaskade im KMS.	53
Abbildung 24: Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Pluggenerierung	56
Abbildung 25: Resuspendierung der Magnetpartikel	58
Abbildung 26: Frequenzabhängigkeit der Partikelverteilung.....	59
Abbildung 27: Relative spezifische Aktivität von immobilisierten NOX (schwarz) und UGDH (grau) bei theoretischen Beladungen.....	62
Abbildung 28: Relative spezifische Aktivität von immobilisierten GalK (schwarz) und USP (grau) bei verschiedenen Beladungen	63
Abbildung 29: Relative spezifische Aktivität von immobilisierten GalT (schwarz) und GlcAT (grau) bei verschiedenen Beladungen.....	64

Abbildung 30: Vergleich der spezifischen Aktivitäten von (A) immobilisierten und freien NOX und (B) immobilisierten und freien UGDH bei verschiedenen pH-Werten.....	66
Abbildung 31: Vergleich der spezifischen Aktivitäten von (A) immobilisierten und freien GalK und immobilisierten und freien (B) USP bei verschiedenen pH-Werten.....	67
Abbildung 32: Einfluss des pH-Wertes auf die spezifische Aktivität der immobilisierten und freien GalT und immobilisierten GlcAT	68
Abbildung 33: Vergleich der spezifischen Aktivitäten von (A) immobilisierten und freien NOX und (B) immobilisierten und freien UGDH bei verschiedenen Temperaturen	70
Abbildung 34: Vergleich der spezifischen Aktivitäten von (A) immobilisierten und freien GalK und immobilisierten und freien (B) USP bei verschiedenen Temperaturen	72
Abbildung 35: Vergleich der spezifischen Aktivitäten von (A) immobilisierten und freien GalT und (B) immobilisierten GlcAT bei verschiedenen Temperaturen.....	73
Abbildung 36: Substratkinetiken von (A) NOX mit NADH und UGDH mit (B) UDP-Glc und (C) NAD ⁺	75
Abbildung 37: Substratkinetiken von GalK für die Substrate (A) Gal und (B) ATP, sowie von USP für die Substrate (C) Gal-1-P und (D) UTP	77
Abbildung 38: Substratkinetiken von GalT für die Substrate (A) GlcNAc-linker- β Boc und (B) UDP-Gal, sowie von immobilisiertem GlcAT für die Substrate (C) LacNAc-linker- β Boc und (D) UDP-GlcA	79
Abbildung 39: Auftragung der Restaktivität von immobilisierten (A) NOX und (B) UGDH in Abhängigkeit von der Zahl der Einsatzzyklen der gleichen MEI.....	81
Abbildung 40: Auftragung der Restaktivität von immobilisierten (A) GalK und (B) USP in Abhängigkeit von der Zahl der Einsatzzyklen der gleichen MEI.....	82
Abbildung 41: Auftragung der Restaktivität von immobilisierten (A) GalT und (B) GlcAT in Abhängigkeit von der Zahl der Einsatzzyklen der gleichen MEI.....	83
Abbildung 42: Umsatz-Zeit-Diagramm einer Synthesereaktion von UDP-GlcA (-●-) mit 1 mM UDP-Glc	87
Abbildung 43: Umsatz-Zeit-Diagramm einer Synthesereaktion von UDP-GlcA (-●-) mit 1,5 mM UDP-Glc	88
Abbildung 44: Ausbeuten der Reaktionskaskaden mit den MEI im KMS.....	90
Abbildung 45: Ausbeuten der Reaktionskaskade mit freien Enzymen in Reaktionsgefäßen	91
Abbildung 46: ESI-Q-ToF Massenspektren der Substrate und Produkte von jedem Schritt der Kaskadenreaktion von immobilisiertem GalT und GlcAT	93
Abbildung 47: Die HPLC Chromatogramme der Nukleotidzucker- und Glykansubstrate und Produkte	108

Tabellen

Tabelle 1: Alle Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software, welche im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden und ihre Hersteller.	30
Tabelle 2: Alle im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien und ihre Hersteller.	31
Tabelle 3: Bestandteile des entwickelten Mikroreaktorsystems.	32
Tabelle 4: Herstellerangaben der Magnetpartikel „PureCube Ni-IDA MagBeads“. ...	33
Tabelle 5: Zusammensetzung der Reaktionspuffer, Temperatur und theoretische Beladung für die Aktivitätsassays der verwendeten Enzyme.....	47
Tabelle 6: Parameter der Probennahmen.....	47
Tabelle 7: Für die Parameter- und Kinetikstudien variierte Parameter.	51
Tabelle 8: Für die Parameter- und Kinetikstudien eingesetzte Konzentration an immobilisierten und freien Enzymen in mg immobilisiertes/freies Enzym pro L Reaktionslösung.	51
Tabelle 9: Beladungsausbeuten aller untersuchten immobilisierten Enzyme.	60
Tabelle 10: Vergleich der enzymkinetischen Daten dieser Arbeit von immobilisierten NOX mit Literaturwerten des freien Enzyms.	74
Tabelle 11: Vergleich der enzymkinetischen Daten dieser Arbeit von UGDH mit Literaturwerten des freien Enzyms.	76
Tabelle 12: Enzymkinetische Daten von immobilisierten und freien GalK für die Substrate Gal und ATP, sowie von immobilisierten und freien USP für die Substrate Gal-1-P und UTP.....	78
Tabelle 13: Enzymkinetische Daten von immobilisierten GalT für das Substrat GlcNAc-linker- <i>t</i> Boc, von immobilisierten und freien GalT für das Substrat UDP-Gal, sowie von immobilisierten GlcAT für die Substrate LacNAc-linker- <i>t</i> Boc und UDP-GlcA.	80
Tabelle 14: Experimentell ermittelte optimale Reaktionsbedingungen und kinetische Daten im Vergleich zu Daten aus der Literatur in Klammern und Restaktivitäten nach den jeweils letzten Zyklen.....	84
Tabelle 15: Zusammensetzung der Reaktionslösung für das EM UDP-GlcA in der Reaktionskaskade im KMS bei 37 ° C.	105
Tabelle 16: Zusammensetzung der Reaktionslösung für das EM UDP-Gal/EM GalT in der Reaktionskaskade im KMS bei 37 ° C.	105
Tabelle 17: EM GlcA mit der Umkehrphasenchromatographie-Säule „TSKgel ODS-100V“	106
Tabelle 18: EM Gal mit der Normalphasenchromatographie-Säule „TSKgel Amide-80“	107
Tabelle 19: EM GalT/EM GlcAT mit der Umkehrphasenchromatographie-Säule „SunFire“	107

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AD	Außendurchmesser
AP	Alkalische Phosphatase
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure, engl. bicinchoninic acid
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cSt	Centistokes
Da	Dalton
DNA/S	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EM	Enzymmodul
ESI-Q-ToF-MS	Elektrosprayionisations-Quadrupol-Time of flight (Flugzeitanalyse)-Massenspektrometrie
FEP	Fluoriniertes Ethylenpropylen
g	Gramm
Gal	Galaktose
Gal-1-P	Galaktose-1-Phosphat
GalK	Galactokinase
GalT	β -1,4-Galactosyltransferase
Glc	Glucose
GlcA	Glucuronsäure
GlcAT	Glucuronyltransferase
GlcNAc-linker-tBoc	<i>Tert</i> -Butyloxycarbonyl-geschütztes N-Acetylglucosamin
h	Stunde
His ₆ -Tag	Motiv aus sechs Histidinresten
HNK-1	Human Natural Killer-1
HPLC	Hochleistungsflussigkeitschromatographie, engl. high performance liquid chromatography
Hz	Hertz
IDA	Iminodiacetat
IMER	Immobilisierte mikrofluidische Enzymreaktoren
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
K _i	Inhibierungskonstante
KMS	Kompartimentiertes Mikroreaktionssystem
LacNAc	N-Acetyllaktosamin
M	Molare Masse
MEI	Magnetischen Enzymimmobilisate

MFM	Magnetfeldmodul
mg	Milligramm
mHz	Millihertz
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mPa	Millipascal
MS	Massenspektrometrie
mT	Millitesla
mU	Milli-„Unit“
m/z	Molekulare Masse
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
Nm	Nanometer
NOX	NADH-Oxidase
NTA	Nitrilotriessigsäure
PPase	Anorganische Pyrophosphatase
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
s	Sekunde
TKM	Temperaturkontrollmodul
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	„Unit“, Umsatz eines μmol Substrates pro min
UDP	Uridindiphosphat
UGDH	UDP-Glucose-Dehydrogenase
UMP	Uridinmonophosphat
USP	UDP-Zucker Pyrophosphorylase
UTP	Uridintriphosphat
v_{max}	Maximale Umsatzgeschwindigkeit
v/v	Volumenprozent pro Volumen
μC	Mikrocontroller
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter

1 Einleitung

Kohlenhydratmoleküle, die an andere Verbindungen wie Proteine und Lipide gebunden sind, werden Glykokonjugate genannt und erfüllen verschiedene Funktionen, einschließlich derer bei der Wechselwirkungen von Zelle zu Zelle und von Zelle zu Matrix sowie der Vernetzung zwischen Proteinen [1, 2]. Für chemische stereoselektive und regioselektive Glykosylierungen sind mehrstufige Synthesen erforderlich, da die zahlreichen, an einzelnen Zuckern vorhandenen Hydroxylgruppen selektiv geschützt und entschützt werden müssen [3, 4]. Dies ist im Falle einer automatisierten chemischen Glykansynthese noch schwerwiegender, da jeder Schritt für hohe Produktausbeuten optimiert werden muss. Darüber hinaus sind auch langwierige und zeitraubende Verfahren zur Entfernung von Nebenprodukten, wie Stereoisomeren, Regioisomeren und nicht umgesetzten Zwischenprodukten, erforderlich. Es wurden elegante Strategien entwickelt, um diesen Herausforderungen für die automatisierte chemische Glykansynthese zu begegnen, die zu Hexasacchariden und sogar zu 50-meren eines Homopolysaccharids führen [5-7]. Die Ausbeuten sind jedoch immer noch niedrig oder moderat.

Die enzymunterstützte Glykansynthese ist eine attraktive Alternative zur chemischen Synthese, da sie den Vorteil hat, regio- und stereoselektive Glykosylierungen in einem Schritt zu erzielen. Mit freien Glykosyltransferasen in Lösung wurde eine automatisierte Glykansynthese unter Verwendung von polymergebundenen [8-10], markierten oder Festphasen-Substraten zum Einfangen und Freisetzen von Produkten [11, 12] entwickelt, wobei jede Strategie ihre eigenen Vor- und Nachteile aufweist [13, 14]. Ein häufiger Nachteil ist, dass Glykosyltransferase-Reaktionen nicht für hohe Produktausbeuten in kurzer Reaktionszeit optimiert werden und die wertvollen Biokatalysatoren nicht zurückgewonnen und wiederverwendet werden. Relevante Zahlen für die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA, g Produkt pro L pro Tag) und die produktspezifische, katalytische Produktivität (P, g Produkt / g Katalysator) sind daher für die automatisierte, enzymatische Synthese niedrig. Der Schlüssel zu einer hohen Enzymaktivität ist die orientierte Immobilisierung auf Oberflächen oder Polymeren, die durch terminale Peptide oder Proteine vermittelt wird, wie z.B. Polyhistidin-Tags [15]. Immobilisierte His-markierte Enzyme können aufgrund der hochspezifischen Orientierung der His₆-Verknüpfung nahezu die Aktivitäten von freien Enzymen in Lösung erreichen [16].

Magnetische Partikel eignen sich aufgrund ihrer einfachen Trennung durch Magnetfelder gut als Träger für immobilisierte Enzyme und ergeben so ein enzymfreies Produkt, ohne zeitaufwendige und teure Reinigungsschritte. Darüber hinaus vereinfachen magnetische Träger die Implementierung automatisierter Prozesse und Protokolle [17] und ermöglichen so die Automatisierung komplexer, mehrstufiger, enzymatischer Kaskaden.

Der Einsatz von immobilisierten Enzymen in mikrofluidischen Reaktoren bietet interessante Vorteile, wie die Miniaturisierung, Integration und Automatisierung biochemischer Assays mit Echtzeit- oder End-of-Line-Analysen [18-20]. Immobilisierte mikrofluidische Enzymreaktoren (IMER) ermöglichen aufgrund ihrer geringen Volumina reduzierte Prozesskosten, erhöhte Reaktionsgeschwindigkeiten und eine

verbesserte Kontrolle der Prozessparameter [21, 22]. Durch kompartimentierte Fluidik in IMER können für die Enzyme optimale Reaktionsbedingungen geschaffen werden, in der sie vor schädlichen Einflüssen geschützt sind. Durch Kontrolle der Substratkonzentration, kontinuierliche Produktentfernung, Vermischung ohne mechanische Rührer und streng kontrollierte Druck- und Temperaturbedingungen können signifikante Steigerungen der Umsatzzahlen erreicht werden [23]. Die kompartimentierte Mikrofluidik bietet die Möglichkeit, durch inline-Aufarbeitung und Reinigungsverfahren der enzymatischen Reaktionsprodukte, Einschränkungen zu umgehen, die bei Batchverfahren auftreten. Es können darüber hinaus gängige Techniken wie LC, GC und Massenspektrometrie für Produktanalysen und Echtzeit-Reaktionsüberwachung am Auslass des Systems angeschlossen werden. Außerdem zeigen immobilisierte Enzyme oft eine verbesserte Lagerstabilität und vereinfachte Wiederverwendung, wodurch das IMER-Konzept für biotechnologische Anwendungen immer interessanter wird [23, 24].

Ziel der Dissertation war daher die technische Entwicklung und Charakterisierung eines kompartimentierten Mikroreaktionssystems (KMS). In diesem sollten von Projektpartnern bereitgestellte und an magnetische Trägerpartikel immobilisierte Enzyme zur Synthese von Nukleotidzuckern und Glykanen im semi-präparativen Maßstab eingesetzt werden.

Dazu wurde die Arbeit in drei Abschnitte aufgeteilt:

- 1) Design, Aufbau und hydrodynamische Charakterisierung eines skalierbaren Mikroreaktorsystems zur Prozessierung kompartimentierter Enzymmodule.
- 2) Immobilisierung der Enzyme, Charakterisierung der Immobilisate und Optimierung der Reaktionsbedingungen.
- 3) Einsatz der immobilisierten Enzyme in einer Reaktionskaskade im KMS für die Synthese komplexerer Glykanstrukturen.

Das im Rahmen dieser Arbeit aus einem bereits bestehenden fluidischen Mikroreaktorsystem weiterentwickelte und hochskalierte, kompartimentierte Mikroreaktionssystem, stellt mit dem Einsatz von magnetischen Enzymimmobilisaten (MEI) eine attraktive Basistechnologie im Bereich der Biochemie und Bioverfahrenstechnik dar. Neben der Charakterisierung und Erprobung des Systems für den Einsatz von MEI wird dessen erweitertes Anwendungsspektrum demonstriert. Es werden automatisierte Screenings und Optimierungen von Bioprocessen mit immobilisierten Enzymen im KMS vorgestellt. Als weitere Anwendung wird mit einer Reaktionskaskade aus vier Teilschritten mit sechs verschiedenen MEI unter optimierten Bedingungen die Glykanstruktur Human Natural Killer Cell-1 Epitop im KMS synthetisiert.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Magnetismus

2.1.1 Magnetische Kenngrößen

In der Umgebung eines stromdurchflossenen Leiters herrscht ein Magnetfeld, dessen Feldlinien auf einer zum Stromleiter senkrechten, ebenen Fläche konzentrische Kreise bilden. Bringt man den Leiter in ein fremdes Magnetfeld, so überlagern sich die beiden Felder. Das superpositionierte Feld übt auf den Leiter eine Kraft F aus, die senkrecht zu den Feldlinien des Magnetfeldes und zur Stromrichtung steht. Den Quotienten:

$$B = \frac{F}{I \cdot L} \quad (2.1)$$

nennt man den Betrag der magnetischen Induktion oder Flussdichte des magnetischen Feldes. Die magnetische Flussdichte B ist ein Vektor, dessen Richtung derjenigen des Magnetfeldes entspricht und der senkrecht zur Kraft- und Stromrichtung steht. Das magnetische Feld kann somit durch die Wirkung beschrieben werden, die es auf einen stromdurchflossenen Leiter ausübt. Wenn ein Leiter der Länge $L = 1 \text{ m}$, der von einem Strom der Stärke $I = 1 \text{ A}$ durchflossen wird, in einem Magnetfeld die Kraft 1 N erfährt, so besitzt das Feld die Flussdichte 1 Tesla . Für die Einheit der magnetischen Flussdichte folgt demnach:

$$[B] = \frac{N}{A \cdot m} = \frac{V \cdot s}{m^2} = \frac{kg}{A \cdot s} = \text{Tesla} \quad (2.2)$$

2.1.1.1 Magnetische Feldstärke und Permeabilität

Ursache des magnetischen Feldes ist die magnetische Feldstärke H . Innerhalb einer stromdurchflossenen Spule wird ihr Betrag wie folgt definiert:

$$H = n \cdot \frac{I}{L} \quad (2.3)$$

Hierbei drückt L die Länge der Spule und n die Anzahl der Windungen aus. Die Einheit von H ist A/m und die Richtung von H entspricht derjenigen der magnetischen Flussdichte B . Zwischen der magnetischen Flussdichte und der magnetischen Feldstärke besteht ein linearer Zusammenhang. Es gilt:

$$B = \mu_0 \cdot \mu_r \cdot H \quad (2.4)$$

Dabei ist μ_0 die magnetische Feldkonstante (auch Vakuumpermeabilität genannt), die nach der Änderung der Basiseinheiten des SI-Systems, bei welcher die Definition des

Amperes seit dem 20. Mai 2019 auf Basis der Elementarladung e und der Definition der Sekunde erfolgt, wieder eine mit Messunsicherheit behafteten Messgröße mit dem Zahlenwert $1,257 \cdot 10^{-6} \text{ N} \cdot \text{A}^{-2}$ ist. μ_r ist die Permeabilitätszahl, eine Maßzahl die den verstärkenden oder abschwächenden Einfluss der innerhalb der Spule befindlichen Materie auf die sich ergebende magnetische Flussdichte beschreibt. Liegt innerhalb der Spule Vakuum vor, ist die Permeabilitätszahl eins.

2.1.1.2 Polarisation und Suszeptibilität

Wird eine Substanz in ein magnetisches Feld eingebracht, so ändert sich die magnetische Flussdichte innerhalb des Feldbereichs von dem Anfangswert B_{Vakuum} auf einen neuen Wert B_{Materie} . Die Änderung der magnetischen Induktion ΔB wird magnetische Polarisation J genannt. Es gilt:

$$J = \Delta B = B_{\text{Materie}} - B_{\text{Vakuum}} \quad (2.5)$$

Mit Ausnahme ferro- bzw. ferrimagnetischer Substanzen ist die Polarisation bei allen Stoffen zu der Feldstärke, die sie hervorruft, proportional:

$$J = \chi \cdot \mu_0 \cdot H \quad (2.6)$$

Der Proportionalitätsfaktor heißt magnetische Suszeptibilität χ :

$$\chi = \mu_r - 1 \quad (2.7)$$

Je nach Größe der Permeabilitätszahl μ_r werden die Stoffe mit konstanter Suszeptibilität χ in zwei Gruppen eingeteilt:

Stoffe mit $\mu_r > 1$ bzw. $\chi > 0$ heißen paramagnetisch und verstärken das Magnetfeld
 Stoffe mit $\mu_r < 1$ bzw. $\chi < 0$ heißen diamagnetisch und schwächen das Magnetfeld

Bei den ferro- bzw. ferrimagnetischen Stoffen ist die magnetische Polarisation J nicht proportional zu der Feldstärke H , sondern strebt bei sehr großen Feldstärken einem Maximalwert zu. Die Suszeptibilität ist damit eine Funktion der Feldstärke H .

2.1.1.3 Magnetisierung und Magnetisierungskurve

Anstelle der Polarisation J wird in der Technik der Einfluss eines Magnetfeldes auf ferro bzw. ferrimagnetische Substanzen meist mit der scheinbaren Erhöhung der Feldstärke, der Magnetisierung M , beschrieben.

$$M = \Delta H = H_{\text{Materie}} - H_{\text{Vakuum}} \quad (2.8)$$

Die Einheit der Magnetisierung ist $A \cdot m^{-1}$. Der Maximalwert der Polarisation bzw. Magnetisierung bei ferro- bzw. ferrimagnetischen Stoffen wird als Sättigungspolarisation J_s bzw. Sättigungsmagnetisierung M_s bezeichnet. Er kommt durch eine vollständige Ausrichtung der magnetischen Dipole unter der magnetischen Kraftwirkung des Magnetfeldes zustande. Die Magnetisierung wächst mit zunehmender Feldstärke solange bis eine vollständige Ausrichtung aller Dipole vorliegt.

Neben Angaben zur Suszeptibilität lassen sich die magnetischen Eigenschaften von Substanzen wesentlich detaillierter aus den Magnetisierungskurven dieser Stoffe ablesen. In Abbildung 1 ist eine solche Kurve exemplarisch dargestellt. Wird die Feldstärke ausgehend von einem, zur magnetischen Sättigung ausreichenden Wert bis auf einen Wert von Null verringert, verbleibt in der Regel eine Remanenz J_R , d.h. die Polarisation verschwindet auch ohne äußeres Feld nicht vollständig. Um die Polarisation bzw. die Magnetisierung auf null abzusenken, bedarf es eines, dem ursprünglichen Feld entgegengesetzten, Feldes der Stärke H_c , die als Koerzitivfeldstärke bezeichnet wird. Wenn ein magnetischer Werkstoff vom unmagnetischen Zustand ausgehend magnetisiert wird, ergibt sich eine Neukurve. Dieser Zustand liegt vor, wenn das Material über seinen Curiepunkt erhitzt worden ist. Meist genügt auch ein sorgfältiges abmagnetisieren mit Wechselfeldern. Die Neukurve ist praktisch mit der Kommutierungskurve identisch, welche die Verbindungslinie der Endpunkte J_s aller Hysteresekurven, bei zunehmender bzw. abnehmender Ansteuerung, darstellt. Die Form der Magnetisierungskurven ist normalerweise neben den Materialeigenschaften auch stark von der eingesetzten Probenform und deren Ausrichtung zum Magnetfeld abhängig. Von der Form unabhängige Magnetisierungskurven lassen sich durch die Verwendung ringförmig geformter Materialproben gewinnen.

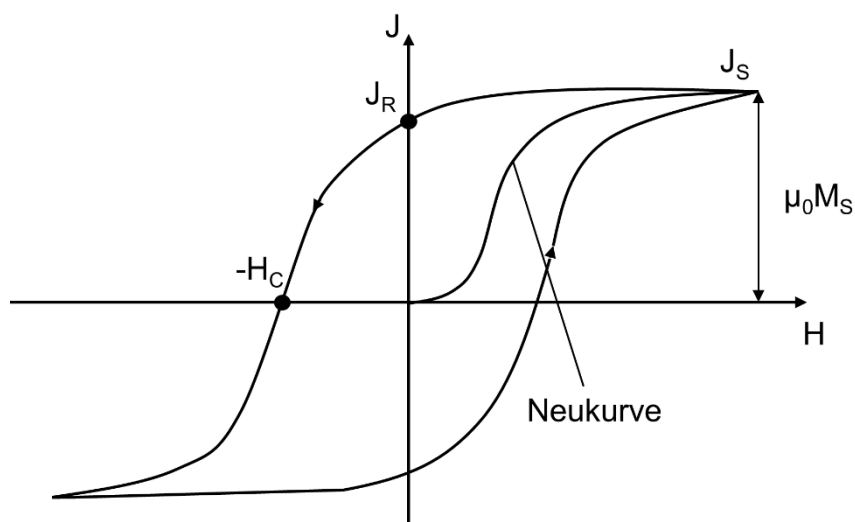


Abbildung 1: Magnetisierungskurve einer ferromagnetischen Substanz, ausgehend vom unmagnetisierten Zustand (Neukurve) und deren typischer Hysteresekurve mit Sättigungsmagnetisierung M_s , magnetischer Remanenz B_r und Koerzitivfeldstärke H_c .

2.1.1.4 Einfluss der Partikelgröße

Partikel aus ferro- bzw. ferrimagnetischem Material, die aufgrund ihrer Größe nur eine oder wenige magnetische Domänen umfassen, zeigen ein magnetisches Verhalten, das sich von jenem makroskopischer Materialproben stark unterscheidet. Partikel, die aufgrund ihrer Größe eine Vielzahl magnetischer Domänen beinhalten, ergeben weitgehend konstante Werte für die Remanenz und die Koerzitivfeldstärke H_c . Nach einer vorausgegangenen magnetischen Sättigung finden sich z.B. für große Magnetitpartikel Werte von $H_c \approx 2000 \text{ A/m}$ und $M_R \approx 40000 \text{ A/m}$, entsprechend ca. 10% der Sättigungsmagnetisierung. Unterschreitet die Partikelgröße ca. $100 \text{ }\mu\text{m}$, nimmt die Anzahl der magnetischen Domänen innerhalb der Partikel zunehmend ab. Dieser Rückgang ist begleitet von einem Anstieg der Koerzitivfeldstärke und einem Rückgang der Partikelsuszeptibilität (siehe Abbildung 2). Wird die Partikelgröße erreicht, unterhalb der das gesamte Partikel nur noch eine magnetische Domäne umfasst, ergibt sich für die Koerzitivfeldstärke ein Maximum und für die Suszeptibilität ein Minimum. Im Falle von Magnetit erfolgt der Übergang zu Eindomänenpartikeln bei einem Partikeldurchmesser von ca. $1 \text{ }\mu\text{m}$. In diesem Bereich finden sich Koerzitivfeldstärken von über 10000 A/m und Remanenzen von bis zu $M_R \approx 80000 \text{ A/m}$ bzw. $J_R \approx 0,1 \text{ Tesla}$.

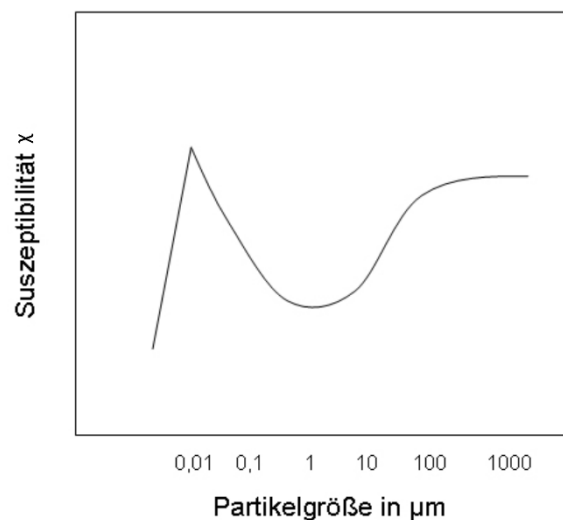


Abbildung 2: Abhängigkeit der Suszeptibilität von Magnetit von der Partikelgröße (nach [25]).

Für noch kleinere Partikel sinkt die Koerzitivfeldstärke H_c rasch ab und erreicht schließlich den Wert null [26]. Ferromagnetische Nanopartikel dieser Größe verhalten sich in Bezug auf Remanenz und Koerzitivfeldstärke damit wie paramagnetische Stoffe, die Absolutbeträge der Magnetisierung sind aber wesentlich größer. Man spricht daher von Superparamagnetismus bzw. superparamagnetischem Verhalten. Die kritische Partikelgröße für den Superparamagnetismus liegt für sphärische Magnetitteilchen bei ca. $0,05 \text{ }\mu\text{m}$ [25]. Die Bestimmung der Magnetisierungskurve einer superparamagnetischen Materialprobe führt zu einem durch Abbildung 3 repräsentierten Verlauf. Für ideal superparamagnetische Substanzen ($H_c = M_R = 0 \text{ A}\cdot\text{m}^{-1}$) verläuft die Magnetisierungskurve punktsymmetrisch zum Ursprung.

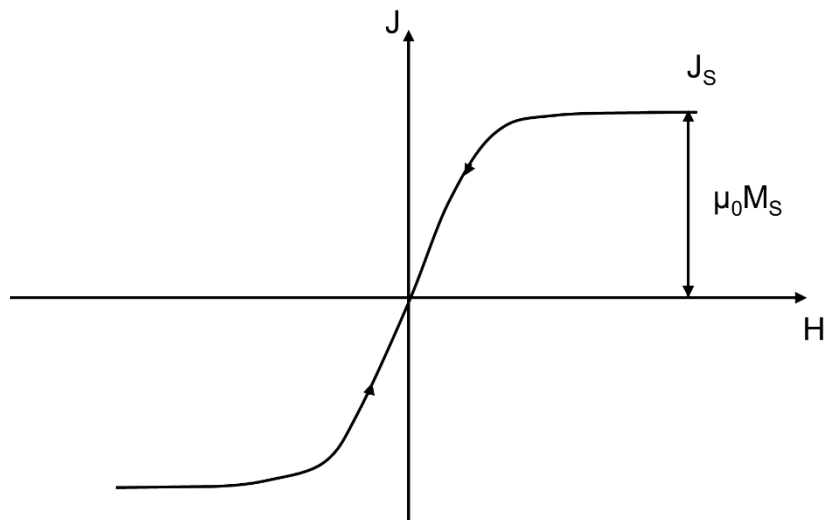


Abbildung 3: Magnetisierungskurve einer superparamagnetischen Substanz ausgehend vom Zustand magnetischer Sättigung.

2.1.1.5 Einfluss der Partikelform

Unter Einwirkung eines äußeren Magnetfeldes der Stärke H_0 ergibt sich für ein isotropes Material im einfachsten Fall folgende Magnetisierung entlang der Feldrichtung:

$$M = \chi \cdot H_0 \quad (2.9)$$

Die Suszeptibilität χ ist hierbei jedoch keine reine Stoffeigenschaft, sondern neben (wie bereits gezeigt wurde) der Partikelgröße auch von der Partikelform abhängig. Die Ursache für die Formabhängigkeit liegt darin begründet, dass im Fall eines endlichen Körpers das Magnetfeld innerhalb des Körpers nicht dem äußeren Feld entspricht. Die innerhalb des Körpers induzierten Magnetpole überlagern das Hintergrundmagnetfeld, wobei die Richtung der Feldlinien in der Regel denen des äußeren Feldes entgegengesetzt ist. Unter Einführung des Demagnetisierungsfaktors D_m gilt:

$$H_i = H_0 - D_m \cdot M \quad (2.10)$$

Bei Kenntnis des Demagnetisierungsfaktors kann entsprechend die Magnetisierung eines Körpers aus seinen reinen Materialeigenschaften, d.h. der intrinsischen Suszeptibilität χ_i , und dem äußeren Magnetfeld berechnet werden:

$$M = \frac{\chi_i}{1 + D_m \cdot \chi_i} \cdot H_0 \quad (2.11)$$

Der Demagnetisierungsfaktor ist in erster Linie formabhängig und liegt im Bereich von $0 < D_m < 1$.

Die intrinsische Suszeptibilität χ_i entspricht der Suszeptibilität, die an einem Probekörper gemessen wird, der keinerlei Selbstentmagnetisierung zeigt. Beispiele hierfür sind ein in axialer Richtung magnetisierter, sehr langer Zylinder oder ein aus dem Probenmaterial bestehender, geschlossener Ring. Für die Suszeptibilität gilt:

$$\chi = \frac{\chi_i}{1 + D_m \cdot \chi_i} \quad (2.12)$$

Hieraus ergeben sich folgende Grenzfälle für ein stark magnetisches Material wie Magnetit:

$$\begin{aligned} H_0 \ll M_S &\Rightarrow \chi_i \gg D_m &\Rightarrow \chi \approx \frac{1}{D_m} \\ H_0 \ll M_S &\Rightarrow \chi_i \ll D_m &\Rightarrow \chi \approx \chi_i \end{aligned}$$

2.1.2 Helmholtz-Spulen zur Erzeugung von Magnetfeldern

Helmholtz-Spulen werden aufgrund ihrer einfachen Konstruktion und Feldberechnung, zur Entwicklung von Magnetfeldern für eine Vielzahl von Forschungsanwendungen eingesetzt. Sie finden ihre Anwendung vor allem bei der Kalibrierung von Sensoren und anderen niederfrequenten Magnetfeldtestanwendungen [27]. Das Helmholtz-Spulensystem ist eine der am besten geeigneten Methoden zur Erzeugung gleichförmiger Magnetfelder. Dadurch werden sie häufig in der Industrie zur Kalibrierung und Prüfung von Magnetsensoren für magnetische Messungen verwendet [28], zur Detektion von leitfähigen Mikropartikeln [29], oder für die Bereitstellung von Wirkstoffen durch Magnetpartikel [30] eingesetzt. Spulensysteme mit homogenem Magnetfeld können auch für die räumliche Ausrichtung magnetischer Partikel verwendet werden. Werden die Helmholtz-Spulen mit Wechselstrom betrieben, können Magnetpartikel durch den schnellen Wechsel der Magnetfeldorientierung in Rotation gebracht werden. In einem Wirbelschichtreaktor, wird dadurch zum einen der Massentransfer zwischen Partikel und umgebendem Fluid erhöht, zum anderen die Partikelverteilung im Reaktionsraum verbessert [31].

Der Aufbau einer Helmholtz-Spule besteht aus mindestens zwei identischen kreisförmigen Magnetspulen mit der Windungszahl N , die symmetrisch entlang einer gemeinsamen Achse auf jeder Seite der Versuchsfläche angeordnet sind (siehe Abbildung 4A). Der Abstand a entspricht dabei dem Radius R der Spule und beide Spulen werden gleichsinnig von Strom durchflossen. Wenn der Ursprung des Koordinatensystems im Zentrum liegt, ergibt sich nach dem Biot-Savart-Gesetz die magnetische Flussdichte B im Zentrum des Spulenpaars als die Überlagerung der Flussdichten zweier Kreisströme im jeweiligen Abstand $\pm R/2$, die beide den gleichen positiven Beitrag liefern, gemäß Gleichung 2.13 (siehe Abbildung 4B).

$$2 \cdot B\left(\frac{R}{2}\right) = 2 \cdot \frac{1}{2} \cdot \mu_0 \cdot \frac{N \cdot I \cdot R^2}{\left(R^2 + \frac{R^2}{4}\right)^{\frac{2}{3}}} = \mu_0 \cdot \frac{N \cdot 8 \cdot I}{\sqrt{125} \cdot R} \quad (2.13)$$

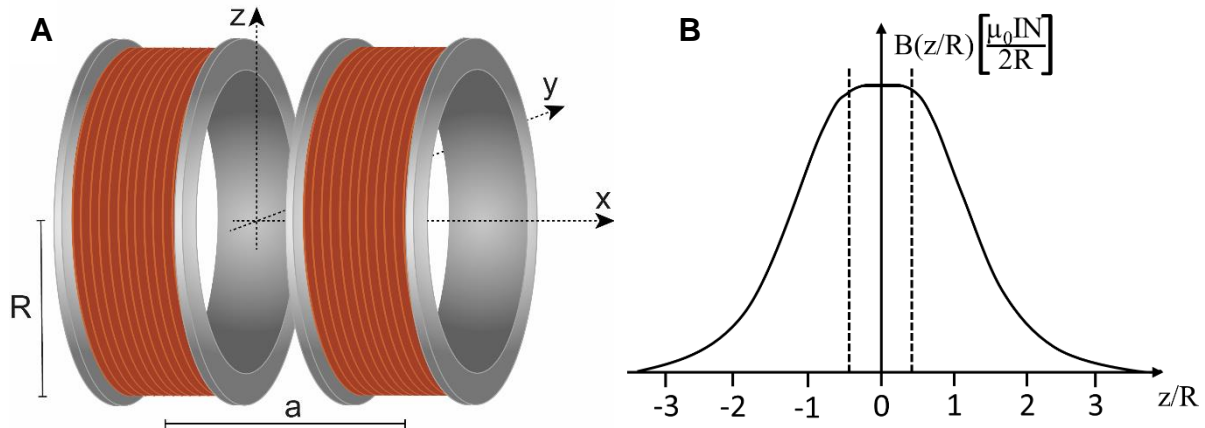


Abbildung 4: Aufbau und Feldverlauf einer Helmholtz-Spule. (A) Einzelspulen im klassischen Helmholtz-Aufbau angeordnet im Abstand a , der dem Spulenradius R entspricht. (B) Magnetische Flussdichte entlang der z -Achse durch das Zentrum der Spulen; $z = 0$ ist der Punkt in der Mitte zwischen den Spulen.

Betrachtet man die Spulenachse, ergibt sich für den x -axiale Verlauf der magnetischen Flussdichte $B(x)$ die Gleichung 2.14. In radialer Richtung ergibt sich ein ähnliches Verhalten. Die Gleichung zeigt, dass im Zentrum des Spulenpaar-Zwischenraums und bei dem Verhältnis $\frac{a}{R} = \frac{1}{1}$ eine maximale Homogenität erreicht wird. Wird der Spulenabstand verringert, führt das zu einem inhomogenen Feld, mit erhöhter Flussdichte im Zentrum. Durch eine Vergrößerung des Abstandes, verringerten sich dagegen die magnetische Flussdichte am gleichen Ort.

$$B(x) = \frac{\mu_0 \cdot N \cdot I}{2} \left\{ \frac{R^2}{[R^2 + (a+x)^2]^{\frac{2}{3}}} + \frac{R^2}{[R^2 + (a-x)^2]^{\frac{2}{3}}} \right\} \quad (2.14)$$

Dabei ist x (-) die Längenkoordinate auf der x -Achse.

2.2 Mikroreaktoren

Eine häufig verwendete Form eines Mikroreaktors ist ein mikrofluidisches System, das einen Mikrokanal als Reaktionsraum nutzt. Diese Mikrokapillarreaktoren bestehen aus verschiedenen Materialien, üblicherweise Glas, Silizium oder Polymermaterialien und werden häufig mit GC- oder LC-Teilen hergestellt [23]. Mit hydrophilen Kapillaren aus Glas- oder Silizium kann eine günstige Umgebung für Biomoleküle geschaffen werden. Diese lichtdurchlässigen Materialien eignen sich zur Detektion anhand optischer Effekte (Fluoreszenz oder Lichtabsorption), bieten eine gute Wärmeleitfähigkeit und können z.B. mit (3-Aminopropyl) triethoxysilan) oder APTES leicht modifiziert werden. Typischerweise werden als Polymere Poly (methylmethacrylat) (PMMA), Polydimethylsiloxan (PDMS) und Fluorpolymere wie Tetrafluorethylen-Hexafluorpropylen-Copolymer (FEP) verwendet. PMMA ist ein günstiges, transparentes, biokompatibles und mechanisch stabiles Material, mit dem eine kontinuierliche online Analyse z.B. durch Photometrie möglich ist. PDMS besteht auch aus einem kostengünstigen Material, das ungiftig, gasdurchlässig und in einem weiten Wellenlängenbereich lichtdurchlässig ist. Das ebenfalls transparente FEP weist Flexibilität, hohe Temperaturbeständigkeit, hervorragende Chemikalienbeständigkeit und Gasundurchlässigkeit auf. Mit entsprechenden Oberflächenmodifizierungen kann die Benetzung der Oberfläche oder das Docking von Biomolekülen verbessert werden [32, 33].

Die Herstellung von Bauelementen von Mikroreaktoren wurde durch die Einführung der dreidimensionalen (3D) Drucktechniken deutlich vereinfacht. Mit dieser Technologie können Bauteile mit einer Größe von wenigen Mikrometern bis mehreren Zentimetern in einem Schritt in kleinen bis mittleren Stückzahlen hergestellt werden, wofür kein speziell geschultes Personal nötig ist. Mit computergestützter Konstruktionssoftware (CAD) können Bauteile maßgeschneidert, zuverlässig und reproduzierbar gedruckt werden. Der 3D-Druck ersetzt damit die konventionelle Bearbeitung von Glas und Polymeren, wie sie seit langem bei der konventionellen Herstellung von Mikroreaktoren verwendet wird [34]. Die 3D-Drucktechnologie hat sogar das Potenzial sterilisierbare Produkte herzustellen, was den Anwendungsbereich für mögliche biologische Anwendungen erweitert. Auch wärme- und lösungsmittelbeständige Harze werden bereits getestet, während 3D-gedruckte Mikroreaktoren aus biokompatiblen und UV härtenden Harzen bereits Stand der Technik sind [35, 36].

2.2.1 Magnettechnologische Mikroreaktoren

In der Mikroreaktortechnologie werden Magnetfelder schon längere Zeit für die Verbesserung der Leistung eingesetzt. Dabei werden magnetische Mikro- oder Nanopartikel als Additiv zum Trägermaterial oder als Immobilisierungsträger verwendet. Es kann generell zwischen Magnetfeldern unterschieden werden, die entweder lokal scharf begrenzte Gradienten erzeugen oder großflächige, homogene Magnetfelder. Gerade bei Bioreaktoren bietet das Anlegen eines externen Magnetfelds

zur Steuerung der Bewegung des Biokatalysators im Reaktor eine Prozessführung ohne starke Scherkräfte bei relativ konstantem Druck. Mit einem Magnetreaktor können teure und zeitintensive nachgeschaltete Trennverfahren zur Rückgewinnung der Biokatalysatoren umgangen werden. Durch das Anlegen des entsprechenden Magnetfeldes konnte in verschiedenen Studien mit immobilisierten Enzymen die Durchmischung verbessert und Agglomeration verringert werden, was zu hohen Reaktionsgeschwindigkeiten führte. Eine gute Durchmischung ermöglicht makroskopisch eine verbesserte Nutzung des Reaktorvolumens und mikroskopisch einen reduzierten Massentransportwiderstand für Substratmoleküle an die Oberfläche des Trägerpartikels, wodurch der gesamte Prozess weitaus effizienter wird [37, 38]. Pamme sowie Cao et al. [39, 40] geben einen guten Überblick über magnetische Mikroreaktoren, die unter anderem immobilisierte Biokatalysator auf magnetischen Trägerpartikeln nutzen. Im Folgenden werden einige magnetische Mikroreaktorsysteme vorgestellt und diskutiert.

2.2.1.1 Magnetische Mikroreaktorsysteme

Magnetfelder werden häufig durch externe Elektromagnete mit Eisenkernen oder Permanentmagneten erzeugt. Als Permanentmagnete werden meist Neodym-Eisen-Bor-Magnete verwendet, die je nach Geometrie und Magnetisierungsgüte an den Oberflächen ihrer Polseiten magnetische Flussdichten von bis zu 500 mT und mehr aufweisen [39]. Bei Verwendung von Mikrokanalsystemen können so für einen bestimmten Bereich definierte, gleichmäßige Magnetfelder oder Hochgradientenfelder erzeugt werden [40]. Sung Kim und Park nutzen dieses Prinzip, um mit einem Gradientenfeld eines externen Permanentmagneten aus einer Mischsuspension im kontinuierlichen Fluss magnetische Partikel von nichtmagnetischen zu trennen (siehe Abbildung 5A). Dabei ändern die magnetischen Partikel durch den Einfluss des Hochgradienten-Magnetfeldes ihren Strömungsweg von ihrem ursprünglichen laminaren Fluss in einen parallel dazu verlaufenden laminaren Fluss. Die nichtmagnetischen Bestandteile verbleiben im Ursprungsfluss. So sollen in dem aus PDMS bestehenden Mikroreaktor, mit einer Kanallänge von 10 mm und einer Breite von 200 μm , mikrofluidische Immunoassays durch die Bindung von superparamagnetischen 50 nm Nanopartikeln an fluoreszierende 1 μm Polystyrolkugeln etabliert werden. Ein 50 x 25 x 10 mm³ (Länge x Breite x Höhe) großer Permanentmagnet mit einer Remanenz von 1,2 T wurde dabei für die Separation der magnetischen Zielpartikel eingesetzt [41]. Lee et al. verwendeten eine ähnliche Methode, um Hämoglobin mit siliziumdioxidbeschichteten, superparamagnetischen Nanopartikeln kontinuierlich und magnetophoretisch abzutrennen [42].

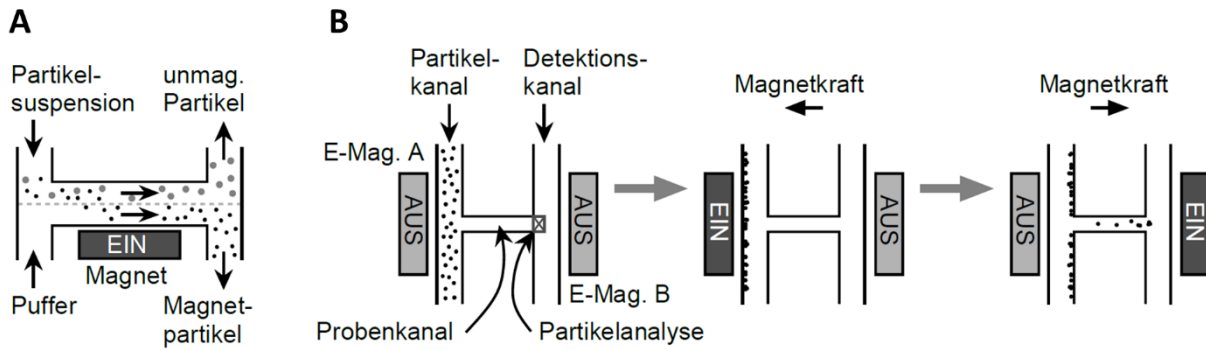


Abbildung 5: Verwendung verschiedener Magnetfelder in magnetischen Mikroreaktoren. **(A)** Separation magnetischer Partikel aus einer Mischsuspension im kontinuierlichen Fluss, mittels Hochgradientenfelder induziert von einem Permanentmagneten. **(B)** Einsatz zweier Elektrosolen zur Separation magnetischer Partikel zur Partikelgrößenanalyse – verändert nach [41, 43].

In Abbildung 5B ist die von Østergaard et al. publizierte Partikelseparation und differenzielle Größenanalyse von Einzelpartikeln und Partikelaggregaten mit zwei kleinen, externen Elektromagneten schematisch dargestellt. Der Mikroreaktor ist ein PMMA Block, mit H-förmig angeordneten Reaktionskanälen. Die Querschnittsfläche der beiden langen Hauptkanäle beträgt $400 \times 400 \mu\text{m}^2$ (Länge x Breite), welche durch einen 5 mm langen Kanal verbunden sind. Jeweils an der Seite der Hauptkanäle, auf Höhe des Verbindungskanals, sind die beiden Elektromagneten positioniert. Diese bestehen aus einem $80 \times 6 \text{ mm}^2$ (Länge x Durchmesser) großen Eisenzyylinder, der mit 400 Windungen eines isolierten Kupferdrahts umwickelt ist. An der Oberfläche der Polseiten der Elektromagnete kann eine magnetische Flussdichte von 0,22 T erzeugt werden. Für das Verfahren werden mit Fluorescein beschichtete superparamagnetische $2,8 \mu\text{m}$ Partikel verwendet. Bei ausgeschalteten Elektromagneten werden diese als Suspension in den Kanal neben dem Elektromagneten A (E-Magnet A) gefüllt, während in dem Kanal neben dem E-Magnet B reiner Puffer fließt. Zunächst wird der E-Magnet A aktiviert, wodurch die Magnetpartikel an die Kanalwand separiert werden. Durch das Ausschalten des E-Magnet A und der gleichzeitigen Aktivierung des E-Magnet B, werden die Magnetpartikel über den Verbindungskanal in den zweiten Hauptkanal transportiert. So können die Partikel mit dem im Verbindungskanal installierten Fluoreszenzdetektor analysiert werden.

Dabei können Partikel und Aggregate aufgrund ihrer verschiedenen Volumina und Suszeptibilität getrennt werden [43]. Grundlage für diese Methode ist folgende Gleichung, welche die auf einen Partikel wirkende magnetische Kraft beschreibt:

$$F_m = \frac{V \cdot \Delta\chi}{\mu_0} \cdot (B \cdot \nabla)B \quad (2.15)$$

Dabei ist F_m die magnetischen Kraft in N, B die magnetischen Flussdichte in T, V das Partikelvolumen in m^3 , μ_0 die magnetischen Feldkonstante in $\text{N}\cdot\text{A}^{-2}$ und $\Delta\chi$ die magnetische Suszeptibilitätsdifferenz zwischen Partikel und Fluid (-).

Eine weitere Möglichkeit Magnetpartikel in Mikroreaktoren zu bewegen, ist indirekt über großflächige, homogene Magnetfelder, die festverbaute, weichmagnetische Werkstoffe aufmagnetisieren. Es werden zwei weichmagnetische Stoffgruppen verwendet: Metalle und keramische Werkstoffe, die sich vor allem in ihrer Permeabilität unterscheiden. Bei den Metallen wird häufig Eisen oder Eisen-Nickel-Legierungen, wie beispielsweise Mu-Metall eingesetzt. Keramische Werkstoffe sind zumeist auf Metalloxiden basierende Ferrite. Eine mögliche Verwendung von weichmagnetischen Werkstoffen zur reversiblen Fixierung und Aufkonzentrierung magnetischer Mikropartikel im kontinuierlichen Fluss, ist in Abbildung 6 dargestellt. Die magnetischen Mikropartikel werden in einem Kanal durch ein lokal scharf abgegrenztes Magnetfeld fixiert, welches durch die Aufmagnetisierung zweier gegenüberliegender, weichmagnetischer Werkstoffe erzeugt wird. Würden in diesem System mit Biomolekülen beschichtete, magnetische Mikropartikel eingesetzt werden, könnten diese nun mit Reaktionslösung umspült werden. Bei Bedarf, können die Partikel durch Deaktivierung des Magnetfelds freigegeben und aus dem System exportiert werden [39].

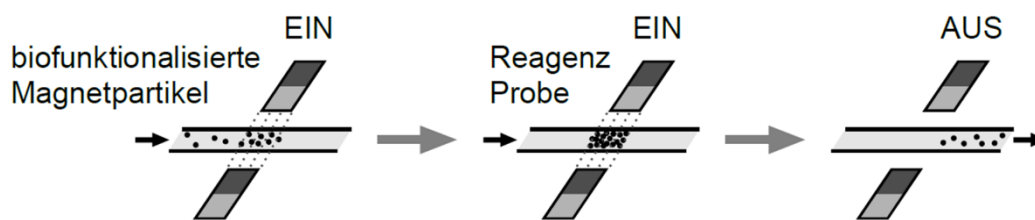


Abbildung 6: Einsatz weichmagnetischer Werkstoffe zur reversiblen Partikelfixierung – verändert nach [39].

Durch den Einsatz externer Magnetfelder können magnetische Mikropartikel zur Durchmischung der Reaktionslösung in Mikrokanälen verwendet werden. Biswal et. al bildet dafür Ketten magnetischer Mikropartikel, welche mit Linkermolekülen verbunden sind. Durch zwei Paare von Elektromagneten, die mit sinusförmigen Wechselströmen durchflossen wurden, konnte ein rotierendes Magnetfeld (60 bis 600 rpm, 1,5 mT) erzeugt werden. Über drei verschiedene Einlässe wurden ein Farbstoff und zwei Pufferströme, die jeweils Partikelketten enthielten, zusammengeführt und durch die Rotation der Partikelketten durchmischt. Die Funktionalität des Systems konnte auch durch die Vermischung einer Säure mit einer Base, in Gegenwart eines fluoreszierenden pH-Indikators, gezeigt werden. Die Durchflussraten lagen zwischen 0,3 und 1,4 mm/s [44].

Roy et al. zeigen, dass die Verteilung eines Farbstoffs mit Ketten aus magnetischen 2,65 µm Polystyrolpartikel auch in einem Wassertropfen möglich ist [45]. Die Tropfen-Magnetpartikel-Suspension wurde durch zwei parallel angebrachte Neodym-Eisen-Bor-Magneten (Flussdichte an den Polseiten 1,2 T) kontrolliert, welche auf einem Drehteller mit variabler Geschwindigkeit montiert waren. Durch dieses Magnetfeld richteten sich die Magnetpartikel im Tropfen entlang der Magnetfeldlinien aus (siehe Abbildung 7A). In Abbildung 7B ist zu erkennen, dass die Rotation des Drehtellers zu

einer Drehbewegung der Magnetpartikelkette und damit zu der Verteilung des Farbstoffs führt. Die Vermischung des Farbstoffs ist dabei abhängig von der Rotationsfrequenz des externen Magnetfelds, der Viskosität des umgebenden Fluids, sowie der Magnetpartikelzahldichte.

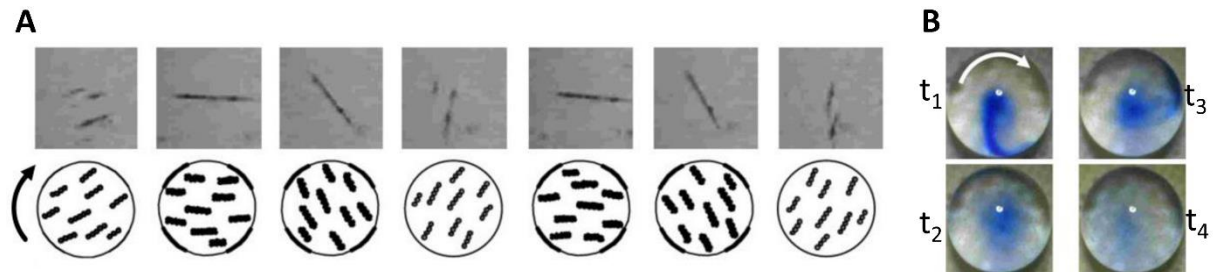


Abbildung 7: Durchmischung von Mikrotropfen durch Magnetpartikelketten. (A) Rotation der Magnetpartikelketten durch Drehung des angelegten Magnetfeldes. (B) Verteilung eines Farbstoffes durch die rotierenden Magnetpartikelketten in einem Wassertropfen, zu den Zeitpunkten t_1 - t_4 - verändert nach [45].

Verbruggen et al. stellen ein kompartimentiertes, mikrofluidisches System vor, das durch Einsatz einer Magnetpartikelsuspension in einem Wasser-in-Öl-Tropfen, einem Permanentmagneten und einer asymmetrischen Kompartimentaufteilung, eine Volumenreduktion von bis zu 90% erreichen kann. Der Aufbau des Systems ist in Abbildung 8 dargestellt. Durch eine T-Verzweigung werden zunächst die Tropfen gebildet. Die Magnetpartikel werden mit einem würfelförmigen Neodym-Eisen-Bor-Magneten (Kantenlänge 5 mm) aus dem Tropfen separiert, der nahe an den Kanal gesetzt wurde. Durch eine weitere T-Verzweigung mit geringerem Kanaldurchmesser und einer zusätzlichen Ölzufuhr konnte eine asymmetrische Aufteilung der magnetpartikelhaltigen Tropfen erreicht werden. Auch bei Verwendung unterschiedlich großer Magnetpartikel konnte durch die Kombination aus magnetischer Separation und asymmetrischer Kompartimentaufteilung ohne Verlust der Separationseffizienz das Volumen der Magnetsuspensionen reduziert werden [46].

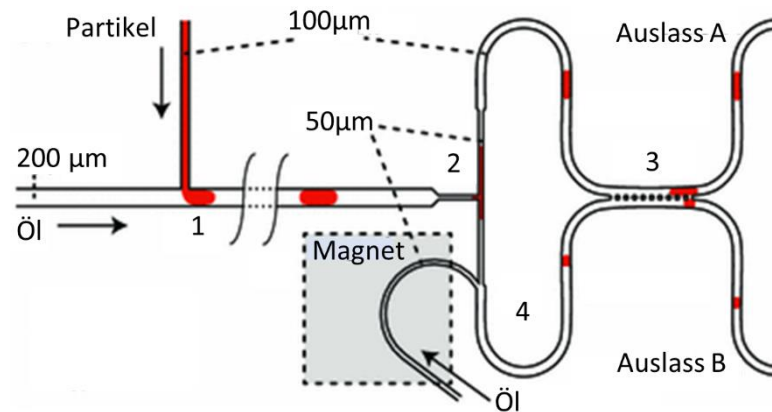


Abbildung 8: Magnetpartikelseparation im segmentierten Fluss während einer asymmetrischen Kompartimentaufteilung (1) T-Verzweigung zur Herstellung des magnetpartikelhaltigen Tropfens, kompartimentiert durch Öl. (2) Schmale T-Verzweigung zur asymmetrischen Kompartimentaufteilung. (3) Druckausgleich in beiden Flusszweigen. (4) Zusätzlicher Ölstrom zur Einstellung der Kompartiment-Aufteilungsrate – verändert nach [46].

2.2.2 Immobilisierte mikrofluidische Enzymreaktoren (IMER)

Für den Einsatz von Biokatalysatoren in Mikroreaktorsystemen wurden ursprünglich Durchflussreaktoren mit freien Enzymen verwendet. Mittlerweile werden jedoch überwiegend IMER auf diesem Forschungsgebiet eingesetzt. Der typische IMER ist ein Mehrphasenreaktor, in dem eine feste Phase mit einer meist wässrigen Phase in Kontakt gebracht wird. Eine zweite, mit Wasser nicht mischbare flüssige Phase und / oder eine Gasphase können ebenfalls vorhanden sein [24]. Es gibt drei Hauptanordnungen für IMERs, die üblicherweise verwendet werden: (i) offene Kapillar-Enzymreaktoren; (ii) monolithische Enzymreaktoren; und (iii) Festbett-Enzymreaktoren (siehe Abbildung 9).

In offenen Kapillar-Enzymreaktoren sind die Biokatalysatoren in der Innenwand der Kapillaren immobilisiert. In einem solchen Fall ist die Biomolekülbeladungskapazität wegen der kleinen Oberfläche relativ gering. Dadurch ergibt sich ein weiter Weg für die Substratdiffusion und eine niedrige enzymatische Umwandlungsrate. Aus diesem Grund muss ein solcher IMER möglichst klein entworfen werden, mit geringen Diffusionswegen und einem großen Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis. Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Konstruktion eines solchen IMER ist das Einbringen einer zusätzlichen Schicht auf die innere Oberfläche der Kapillare. Wenn die Wechselwirkung zwischen Substratmolekülen und der zusätzlichen Schicht sehr gering ist, können auf diese Weise unspezifische Adsorptionen vermieden werden [32]. Bei offenen Kapillar-Enzymreaktoren werden die Enzyme üblicherweise unter Verwendung von ionischer Bindung, kovalenter Bindung, Quervernetzung, oder bioaffinitätsbasierte Methoden immobilisiert [47]. Des Weiteren können die Innenwände der Kapillare mit reaktiven Gruppen modifiziert werden. Bei Verwendung von Kapillaren, die aus Polymeren hergestellt wurden, wird die innere Kapillaroberfläche häufig mit Polyethylenimin (PEI) behandelt. Dieses Polymer bietet eine große Anzahl von Aminogruppen, sowie eine schützende Mikroumgebung für das

Enzym. Soll das Enzym über eine kovalente Bindung gekoppelt werden, können diese modifizierten Oberflächen in einem weiteren Schritt mit Glutaraldehyd behandelt werden. Für eine Immobilisierung durch elektrostatische Wechselwirkungen kann das Kapillarinere mit Polyelektrolyten modifiziert werden. Dabei muss der pI und der optimale pH -Wert des Enzyms beachtet werden, damit sowohl die Oberflächengruppen richtig geladen sind als auch eine angemessene Aktivität gewährleistet wird [32].

Monolithische Enzymreaktoren bieten eine bessere Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für Substrate, Stabilität in den meisten Lösungsmitteln und Vielseitigkeit der verfügbaren funktionellen Oberflächengruppen. Im Gegensatz zu den Kapillarenzymreaktoren besitzen monolithische Enzymreaktoren Makro- und Mesoporen, wodurch eine hohe spezifische Oberfläche, kurze Diffusionswege und ein schneller Stoffübergang erreicht werden. Jedoch ist ihre Herstellung relativ komplex. Zunächst muss man das Trägermaterial wählen. Diese können anorganisch sein (z.B. Sol-Gele), organische Polymere (z.B. Acrylate oder Acrylamide) oder organisch-anorganische Hybridmaterialien. Für die Immobilisierung gibt es mehrere Möglichkeiten. Man kann das Enzym zuerst offline auf dem Trägermaterial immobilisieren und dieses Gemisch anschließend in das Mikroreaktorsystem injizieren. Ein anderer Ansatz ist, durch radikalische Polymerisation, Polykondensation oder Gefriertrocknung, eine Struktur mit Mikrokanälen herzustellen, deren Inneres mit dem Trägermaterial modifiziert ist. In einem weiteren Schritt kann das Enzym im modifizierten Mikroreaktor immobilisiert werden [32, 47].

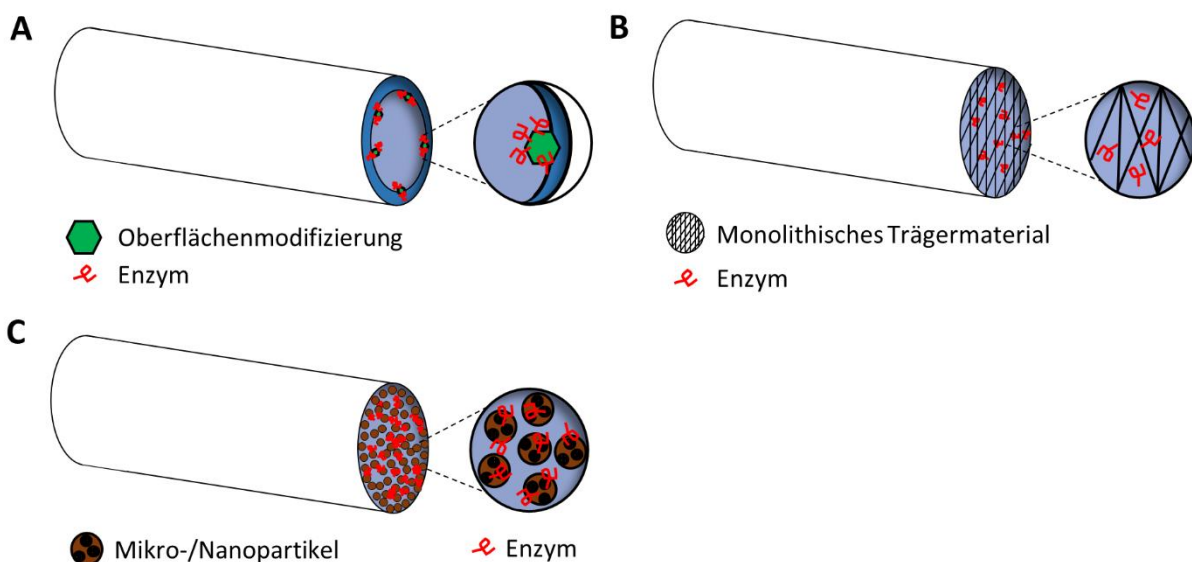


Abbildung 9: Die drei Hauptanordnungen der IMER. (A) Offene Kapillar-Enzymreaktoren, (B) monolithische Enzymreaktoren; und (C) Festbett-Enzymreaktoren.

Festbettmikroreaktoren werden für IMER häufig den monolithischen oder Kapillar-Enzymreaktoren vorgezogen, da sie das höchste Verhältnis von Oberfläche zu Volumen und die höchste Probenkapazität bieten, während ihre Packung mit enzymatisch aktiven Trägerpartikeln relativ einfach zu handhaben ist [47]. Für

enzymatische Festbettmikroreaktoren werden verschiedene Mikro- oder Nanopartikel für die Enzymimmobilisierung verwendet sowie die gleichen Immobilisierungsmethoden, die oben bei den Kapillar-Enzymreaktoren beschrieben wurden. Dabei wird das Immobilisierungsverfahren zunächst in einem separaten Gefäß durchgeführt, bevor das Material in das Mikroreaktorsystem injiziert wird. So können Tests zu Wechselwirkungen zwischen Enzym und Träger, der Aktivität der Enzyme und den enzymkatalytischen Eigenschaften zuvor in einfachen Batchversuchen durchgeführt werden. Bei diesem Mikroreakortyp spielen die Eigenschaften des verwendeten Immobilisierungsträgers eine große Rolle. Beispielsweise wurde festgestellt, dass unterschiedliche Träger im Nanobereich durch das hohe Oberfläche/Massenverhältnis Diffusionsbeschränkungen verringern, die biokatalytische Effizienz verbessern und die erreichbare Enzymbeladung erhöhen. Die Nanomaterialien sind so konzipiert, dass sie eine langfristige Lager- und Recyclingstabilität des immobilisierten Biokatalysators ermöglichen, während ihre einzigartigen physikalischen und chemischen Eigenschaften eine günstige Mikroumgebung für optimale enzymatische Effizienz schaffen [48, 49]. Boehm et al. zeigen in einer Studie, dass ein Festbettmikroreaktor eine erheblich höhere Substrataufnahme und anschließende Produktumwandlung liefert als ein Kapillar-Enzymreaktor, insbesondere bei hohen Durchflussraten [50]. Es wurde auch nachgewiesen, dass die Enzymaktivität nach der Immobilisierung an den inneren Mikrokapillarwänden deutlich geringer war, im Vergleich zu der chemisch weniger komplexen Immobilisierung an Mikropartikel.

Nach der Herstellung muss der Mikroreaktorteil über geeignete Kapillaren mit dem gesamten IMER-System verbunden werden. Im Allgemeinen umfasst ein IMER-System eine Fluidversorgung, eine Reaktionskammer (Mikroreaktor) und ein Abflusssammelsystem. In den meisten Fällen werden alle erforderlichen Flüssigkeiten über geeignete Pumpen (normalerweise peristaltische oder automatisierte Spritzenpumpen) bereitgestellt. Es können auch mehrere Analysemethoden hinter den Mikroreaktor oder in den Auslass des Mikrofluidsystems integriert werden, um eine on- oder inline Analyse zu erreichen. Alternativ kann das Produkt offline unter Verwendung einer der bekannten Analysetechniken analysiert werden.

2.2.2.1 Vorteile der Mikrofluidik für IMER

Mikrofluidische IMER bieten Vorteile im Hinblick auf eine integrierte Verarbeitung und analytische Kontrolle und die Möglichkeit zur Optimierung enzymkatalysierter Prozesse. Insbesondere können sie für schwer zu synthetisierende Verbindungen eingesetzt werden, für das Screening geeigneter Biokatalysebedingungen oder zur Kosten-Nutzen-Analyse einer kontinuierlichen Synthese vor der Skalierung. Darüber hinaus können mit diesen IMER die Enzymspezifität für verschiedene Zielanalyten bestimmt werden, kinetische Untersuchungen und Screenings nach enzymatischen Inhibitoren durchgeführt werden [32]. Durch Mikrofluidik in IMER kann eine günstige Umgebung für die Enzyme geschaffen werden, in der sie vor schädlichen Einflüssen geschützt sind. Durch Kontrolle der Substratkonzentration, kontinuierliche

Produktentfernung, der Vermeidung von mechanischem Rühren und streng kontrollierten Druck- und Temperaturbedingungen können signifikante Steigerungen der Umsatzzahl erreicht werden [23]. Die Mikrofluidik bietet die Möglichkeit durch inline-Aufarbeitung und Reinigungsverfahren der enzymatischen Reaktionsprodukte Einschränkungen zu umgehen, die bei Batchverfahren auftreten. Es können darüber hinaus gängige Techniken wie LC, GC und Massenspektrometrie für Produktanalysen und Echtzeit-Reaktionsüberwachung am Auslass des Systems angeschlossen werden. Es wurden auch verschiedene Arten von nicht-invasiven Sensoren entwickelt, die mit Mikrofluidikreaktoren kompatibel sind und die Temperatur, den pH-Wert, den gelösten Sauerstoff, die Konzentration von Substraten und anderen Verbindungen überwachen [23, 24].

2.2.3 Magnetpartikel

Magnetpartikel, die für den Einsatz in der Biotechnologie bestimmt sind, bestehen größtenteils aus einem magnetischen Kern, der von einer Polymerschicht umgeben ist, die wiederum mit verschiedenen Liganden funktionalisiert wurde. Sie erlauben aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften die schnelle und einfache Abtrennung von gebundenen Stoffen aus komplexen, biologischen Suspensionen durch einfache Aktivierung und Deaktivierung eines magnetischen Felds. Aus diesem Grund spielen Magnetpartikel in der Biotechnologie und Pharmazie eine Rolle in einer Vielzahl von Anwendungen. Zum Beispiel können sie mit Affinitätsliganden versehen werden und in der Aufreinigung zur gezielten Abtrennung des Produkts eingesetzt werden. Dabei werden sie, wie zuvor beschrieben, in magnetischen Mikroreaktoren eingesetzt. Die Verwendung von Magnetismus zur Abtrennung von der Fermentationsbrühe oder dem Reaktionsmedium erlaubt es, auf den Einsatz mehrerer aufeinander folgender Systeme zur Aufreinigung, wie Filtration, Zentrifugation oder Chromatographie, zu verzichten [51]. Es können auch pharmazeutisch aktive Substanzen oder Antikörper an Magnetpartikel gebunden werden, um für Diagnose-Assays oder für therapeutische Zwecke *in vivo* eingesetzt zu werden [52]. Ein anderes Einsatzgebiet ist die Immobilisierung von Enzymen an magnetische Nano- oder Mikropartikel [53]. Die Immobilisierung an einen magnetischen Träger erlaubt dabei die schnelle Abtrennung und Wiederverwendung der Enzyme. Mögliche Methoden zur Bindung der Enzyme an den Träger sind im folgenden Kapitel 2.3 beschrieben.

Für diese Einsatzmöglichkeiten müssen die Magnetpartikel eine Reihe von Anforderungen erfüllen. So sollten sie eine hohe spezifische Oberfläche besitzen, um eine hohe Bindekapazität zu ermöglichen. Sie sollten im Hinblick auf die Größe monodispers sein, um einheitliche Beladungen erzielen zu können und sie sollten leicht magnetisierbar sein, gleichzeitig aber keine bleibende Magnetisierung nach Deaktivierung des äußeren Magnetfelds aufweisen. Durch die fehlende bleibende Magnetisierung soll unerwünschte Agglomeration vermieden und eine schnelle Redispergierung ermöglicht werden [51]. Partikel, die sich in Anwesenheit eines Magnetfelds magnetisieren lassen, aber keine bleibende Magnetisierung nach Wegfall des Felds besitzen, werden als superparamagnetisch bezeichnet, wie zuvor bereits

erwähnt (2.1.1.4). Bei superparamagnetischen Partikeln liegen die magnetischen Dipole in einer ungeordneten Form vor, weshalb sie nicht magnetisiert sind. Nach Anlegen eines äußeren Magnetfelds ordnen sich diese Pole jedoch entlang der Richtung des Feldes, wodurch die Partikel magnetisch werden und von dem Ursprung des Feldes angezogen werden. Nach Wegfallen des äußeren Feldes verlieren die Pole ihre Orientierung wieder, ohne dass von außen Energie für die Demagnetisierung zugeführt werden muss und der Magneteffekt verschwindet.

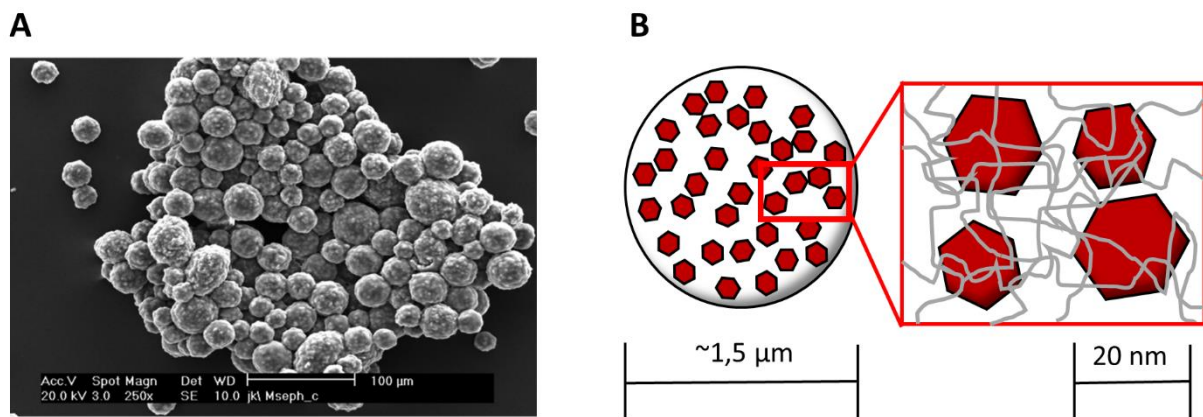


Abbildung 10: Darstellung von Magnetpartikeln. (A) Eine ESEM (engl. Environmental scanning electron microscope, eine spezielle Variante des Rasterelektronenmikroskops) – Aufnahme eines magnetischen Mikropartikels [54]. (B) Schematische Darstellung eines Magnetpartikels. Nanomagnetitpartikel sind in einer Polymerschicht eingeschlossen.

Meistens werden Magnetit oder Maghemit als Ausgangsmaterialien für Magnetpartikel verwendet. Bei diesen handelt es sich zunächst um ferrimagnetische Materialien. Das bedeutet, dass sie im Gegensatz zu superparamagnetischen Partikeln, eine bleibende Magnetisierung aufweisen. Durch Reduzierung der Größe unter einen Grenzwert im Nanobereich verändert sich die Art der Magnetisierung jedoch und die Partikel werden superparamagnetisch [55]. Für die Herstellung von superparamagnetischen Mikropartikeln werden die Nanopartikel in einer Polymermatrix eingeschlossen oder mittels einer Silikat-Struktur gebunden (siehe Abbildung 10) [56]. Durch die Polymerschicht werden die Partikel außerdem vor Wasser geschützt und mit Liganden funktionalisiert. Mögliche Polymere sind zum Beispiel Agarose, Methyl-Metacrylat oder Polystyrol [56, 57]. Zur Funktionalisierung können die gleichen Liganden verwendet werden, die auch für die Chromatographie eingesetzt werden. Beispiele sind Antikörper als Liganden, Streptavidin zur Abtrennung von biotinylierter Desoxyribonukleinsäure (DNS) [58] oder IDA gemeinsam mit Ni-Ionen zur Immobilisierung von Enzymen durch Ausbildung von Komplexbindungen [59] (siehe Kapitel 3.4.5).

2.3 Immobilisierung von Enzymen

Nach Definition von IUPAC beschreibt Immobilisierung eine Methode, mit der Biokatalysatoren wie Enzyme, Zellen oder Zellorganellen chemisch oder physikalisch an Träger fixiert oder mit Hilfe von Membranen räumlich eingeschlossen werden können [60]. Durch die Fixierung an unlösliche Träger oder den Einschluss in Membranen können die Katalysatoren einfach abgetrennt und wiederverwendet werden. Durch die Wiederverwendbarkeit werden auch Prozesse mit teuren Enzymen rentabel und die einfache Abtrennung von der Reaktionslösung erlaubt das Durchführen kontinuierlicher Prozesse mit höheren Ausbeuten [61]. Oft ist die Immobilisierung auch mit einer Erhöhung der Katalysatorstabilität verbunden, da insbesondere Enzyme anfällig für pH-Werte und Temperaturen abseits ihres Optimums sind [62]. Trotz der vielen Vorteile kann es bei der Immobilisierung auch zu Nachteilen kommen. So kann sich die Proteinkonformation aufgrund der Modifizierung zur Trägerbindung ändern oder es können Massentransferlimitationen auftreten. Das Resultat ist eine Abnahme der Aktivität im Vergleich zur freien Variante. Auch gibt es keine Systematik zur Herstellung von Immobilisaten, da sich die Einflüsse des Trägers und der Immobilisierungsmethode auf den Katalysator nur schwer vorhersagen lassen. Darum werden Immobilisate fast ausschließlich nach dem Trial-and-Error-Prinzip hergestellt [61]. Oft überwiegen die Vorteile jedoch die Einschränkungen, die sich durch Immobilisierung ergeben können. Deshalb gewinnen Immobilisate zunehmend an Bedeutung in der Industrie, was sich durch den Einsatz in den Bereichen Kosmetik, Pharmazie und Lebensmittel widerspiegelt. In Abbildung 11 sind verschiedene Methoden zur Immobilisierung von Enzymen dargestellt.

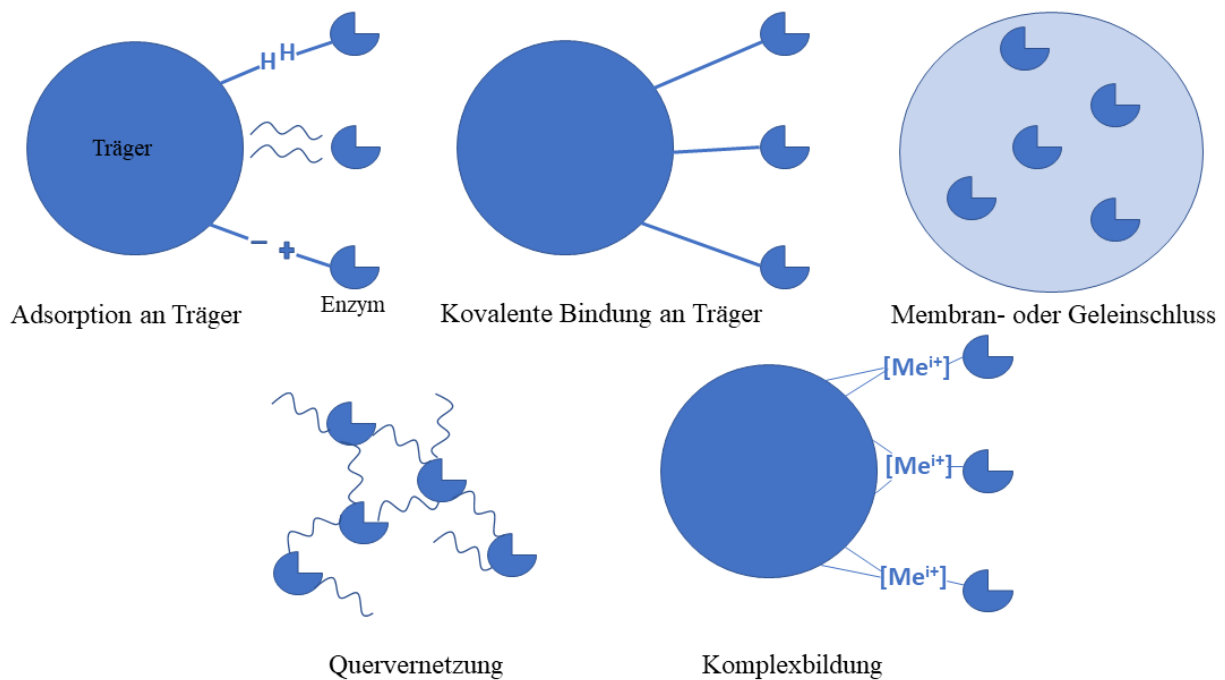


Abbildung 11: Übersicht über verschiedene Methoden der Immobilisierung von Enzymen.

Bei der Adsorption an einen Träger werden physikalische oder chemische Wechselwirkungen zwischen dem Trägerstoff und dem Enzym ausgenutzt, um diese

an den Träger zu binden. Diese Wechselwirkungen können schwache Bindungen wie Van-der-Waals-Kräfte, Ionenbindung, Wasserstoffbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen oder deren Kombination sein. Im Gegensatz dazu, werden bei der Immobilisierung mittels kovalenter Bindungen starke chemische Bindungen wie Peptid-Bindungen, Alkylierungen oder Diazo-Bindungen zwischen Träger und Enzym erzeugt [62]. Die Immobilisierung mittels kovalenter Bindung bietet den Vorteil, dass die Hitze- und pH-Stabilität der Enzyme aufgrund der Stärke der Bindung zunimmt. Allerdings sorgt die Ähnlichkeit der funktionellen Gruppen zu Gruppen im aktiven Zentrum für ein hohes Risiko für Aktivitätsverlust durch konformationelle Änderungen des Enzyms [63].

Es gibt auch Immobilisationsmethoden ohne Träger, wie beim Einschlussverfahren, bei welchem die Enzyme in eine Gelmatrix oder eine Membranhülle eingeschlossen werden. Dies bietet den Vorteil, dass die Enzyme frei beweglich bleiben und sie nicht durch die Ausbildung von chemischen Bindungen modifiziert werden. Bei der Methode der Quervernetzung wird das Enzym mit einer geringen Menge eines bifunktionellen Reagenzes über kovalente Bindungen an mehreren Stellen quervernetzt. Glutaraldehyd und Diisocyanate sind beliebte Reagenzien dafür [62]. Oftmals geht die Immobilisierung durch Quervernetzung jedoch mit Abnahme der Aktivität einher, da Aminosäuren des aktiven Zentrums modifiziert werden können [64].

Eine weitere Methode Enzyme zu immobilisieren ist mittels Komplexbildung. Bei dieser Methode wird die Affinität bestimmter Aminosäuren zu Metallionen, wie zum Beispiel Nickel, ausgenutzt, um die Enzyme über Koordinationsbindungen an Komplexbildner zu binden [65]. Oft werden die Enzyme dabei gezielt mit Peptid-Ketten, sogenannten Tags, bestehend aus diesen Aminosäuren versehen. Das gezielte Anbringen der Ketten kann ungewollte Adsorption der Enzyme an den Träger sowie die Modifikation der Enzymstruktur verhindern, was eine reduzierte Aktivität bedeuten würde. Ein Beispiel für einen oft verwendeten Tag ist der His₆-Tag. Dieser besteht meist aus zwei bis sechs aufeinanderfolgenden Histidin Molekülen [66]. Als Komplexbildner werden meist Nitrilotriessigsäure (NTA) [66] oder Iminodiacetat (IDA) verwendet mit Ni²⁺, Cu²⁺ oder Zn²⁺ als Zentralatome [67].

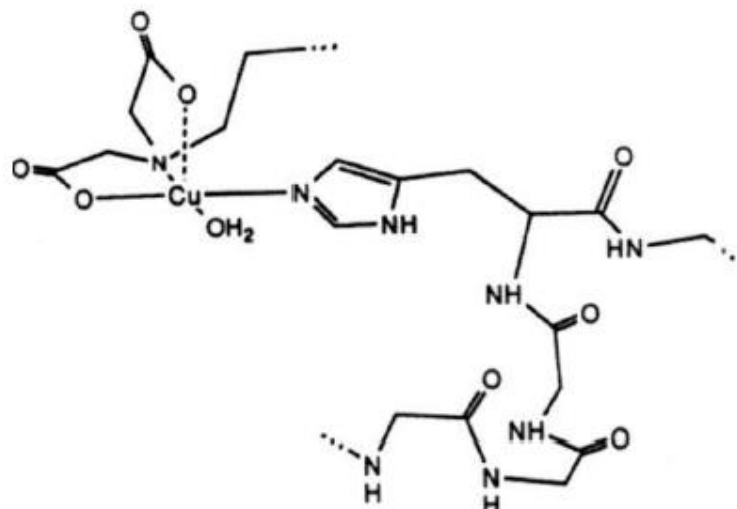


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Komplexbindung einer Histidinseitenkette über ein Kupferion mit Iminodiacetat [67].

IDA ist ein dreizähliger Ligand, der mit seinem Stickstoffatom und den Sauerstoffatomen der zwei Carboxylgruppen an das Zentralatom bindet (siehe Abbildung 12). Die Metallionen sind dazu in der Lage vier bis sechs Liganden zu binden. Nach der Komplexierung von IDA verbleiben ein bis drei Bindestellen, die durch die Elektronendonoren des Imidazolrings von Histidin besetzt werden können [68]. Neben Histidin können auch andere Aminosäuren wie Cytosin Komplexbindungen mit den Metallionen eingehen. Da jedoch Histidin die höchste Affinität aufweist, kommt es selten zur Ausbildung von Koordinationsbindungen mit den anderen freien Aminosäureketten. Die Methode, Proteine auf diese Weise mit Komplexbildung zu binden, wird auch in der Aufreinigung durch Chromatographie eingesetzt. Eluiert wird dabei durch Absenken des pH-Wertes, durch Spülen mit Lewis-Säuren oder durch Spülen mit Lewis-Basen. Lewis-Säuren konkurrieren mit dem Zentralatom um die Bindung an die Enzyme. Lewis-Basen, wie z.B. Imidazol, entziehen den Komplexen die Metallionen, wodurch sich die Bindung des Zielmoleküls löst [69].

2.4 Glykane

Glykane sind langkettige Zuckerverbindungen, die aus mindestens zehn, über glykosidische Bindungen gekoppelte, Einzelzucker bestehen [60]. In der Biologie treten sie häufig an Peptide oder Proteine gekoppelt auf. Dort beeinflussen sie die Stabilität der Proteine gegen Umwelteinflüsse wie pH und Temperatur. Außerdem beeinflussen sie die Stabilität gegenüber proteolytischem Verdau und sind verantwortlich für die Erkennung durch das Immunsystem [70]. Die Motive und Bausteine der Glykane verschiedener Spezies sind hochkonserviert und unterscheiden sich voneinander in den verwendeten Monosacchariden. So bestehen die Glykane von Säugetieren aus den Monosacchariden Fucose, Galaktose, N-Acetylgalactosamin, Glucose, Glucuronsäure, Mannose, Sialinsäure und Xylose. Im Hinblick auf die Glykosylierung, also das Versehen von Lipiden und Proteinen in Zellen mit Glykanstrukturen, wird zwischen O- und N-Glykoproteinen, Glykolipiden und Glykosaminglykanen unterschieden. Der Unterschied ist dabei, dass N-Glykoproteine mit Asparagin Seitenketten von Proteinen verbunden sind und O-Glykoproteine mit Threonin und Serin. Glykosaminglykane sind ähnlich zu O-Glykanen, werden jedoch mittels eines anderen Biosynthesewegs hergestellt und werden meist auch sulfatiert [2].

Nukleotidzucker spielen für die Synthese von Glykokonjugaten, die mit Glykosyltransferasen durchgeführt werden, als Donorsubstrate eine wichtige Rolle. Kommerziell verfügbar sind UDP- α -D-Glucose (UDP-Glc), UDP- α -D-Glucuronsäure (UDP-GlcA), UDP- α -D-Xylose (UDP-D-Xyl), UDP- α -D-Galaktose (UDP-Gal), UDP- α -D-Glucosamin (UDP-GlcNH₂), UDP- α -D-Galaktosamin (UDP-GalNH₂), CMP- β -D-Neuraminsäure (CMP-Neu5Ac), GDP- α -D-Mannose (GDP-Man) und GDP- β -L-Fukose (GDP-Fuc). Die Synthese dieser Donorsubstrate für die präparative Synthese von Glykokonjugaten ist meist mit hohen Kosten verbunden. Ein Beispiel stellt der Nukleotidzucker UDP-GlcA dar, der in pflanzlichen, tierischen und bakteriellen Organismen im Glucuronatweg entsteht. Dabei katalysiert die UDP-Glucose-Dehydrogenase (EC 1.1.1.22) die Oxidation des C6-Kohlenstoffatoms des Substrates UDP-Glc zur Uronsäure. Für die *in vitro* Glucuronidierung von Pharmazeutika und für die *in vitro* Synthese von kurzkettiger Hyaluronsäure muss UDP-GlcA in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen. Bei der Isolierung von UDP-GlcA aus pflanzlichen und/ oder bakteriellen Organismen kommt es zu schwankenden Konzentrationen und schlechten Ausbeuten. Daher besteht großes Interesse an Systemen, die Nukleotidzucker in größeren Mengen effektiv und nachhaltig synthetisieren können.

Enzym-Kaskaden zur Synthese von Glykokonjugaten sind wegen ihrer hohen Ausbeuten von natürlichen und neuen hybriden Zuckerstrukturen sehr gefragt. Es können Glykosidasen, Glykosyltransferasen sowie Enzyme zur Nukleotidzucker Synthese in maßgeschneiderten Synthesestrategien eingesetzt werden. Solche Multi-Enzym-Systeme werden bereits als eine Kombination von Enzym-Modulen, optimierte Synthesewege von Glykokonjugaten und Nukleotidzuckern, verwendet [71].

2.5 Enzyme für die Glykokonjugatsynthese

Die Synthese von Glykanen mittels Enzymen ist vorteilhaft im Vergleich zu chemischen Methoden, da durch die hohe Regio- und Stereoselektivität, insbesondere von sogenannten Leloir-Glykosyltransferasen, auf aufwendige Schutzgruppen-Verfahren größtenteils verzichtet werden kann. Diese ist bei chemischen Herstellungsverfahren nötig, da die verschiedenen Saccharid-Moleküle oft mehrere Gruppen mit ähnlicher oder gleicher Reaktivität besitzen, was ohne Schutzgruppen zu einer großen Bandbreite an unerwünschten Nebenprodukten führen kann [72, 73]. Leloir-Glykosyltransferasen sind eine bestimmte Art von Glykosyltransferasen, die dem Leloir-Reaktionsweg folgen. In Säugetierzellen produzieren sie einen Großteil der Oberflächenstrukturen auf der Zellmembran. Als Glykosyldonor benötigen sie Monosaccharide, die mit einer Nukleotidgruppe wie Uridin-Diphosphat (UDP) versehen sind. Bei Säugetieren gibt es davon neun verschiedene, von denen UDP-Glucose (UDP-Glc) die häufigste ist [74].

2.5.1 UDP-Glucose-Dehydrogenase (UGDH)

UDP-Glucose-Dehydrogenase (UGDH) ist eine Oxidoreduktase mit der Klassifizierungsnummer 1.1.1.22. Sie katalysiert die Oxidationsreaktion von UDP-Glc zu UDP-GlcA unter NAD^+ -Verbrauch (siehe Reaktionsgleichung R1):



UDP-GlcA ist wichtig für die Modifikation von Xenobiotika, Opioiden und weiteren Substanzen in der Leber von Säugetieren, weshalb UGDH dort in hohen Konzentrationen auftritt. UGDH ist außerdem von Bedeutung bei der Embryoentwicklung und der Synthese von Oberflächenstrukturen der Zellmembran [75]. Dieses Enzym ist beim Menschen ein Hexamer aus drei Dimer-Untereinheiten mit einem Gesamtmolekulargewicht von 345 kDa, die eine ringförmige Anordnung einnehmen (siehe Abbildung 13) [76, 77]. Der exakte Ablauf der Synthese von UDP-GlcA aus UDP-Glc ist in der Literatur noch nicht vollständig geklärt [77, 78].

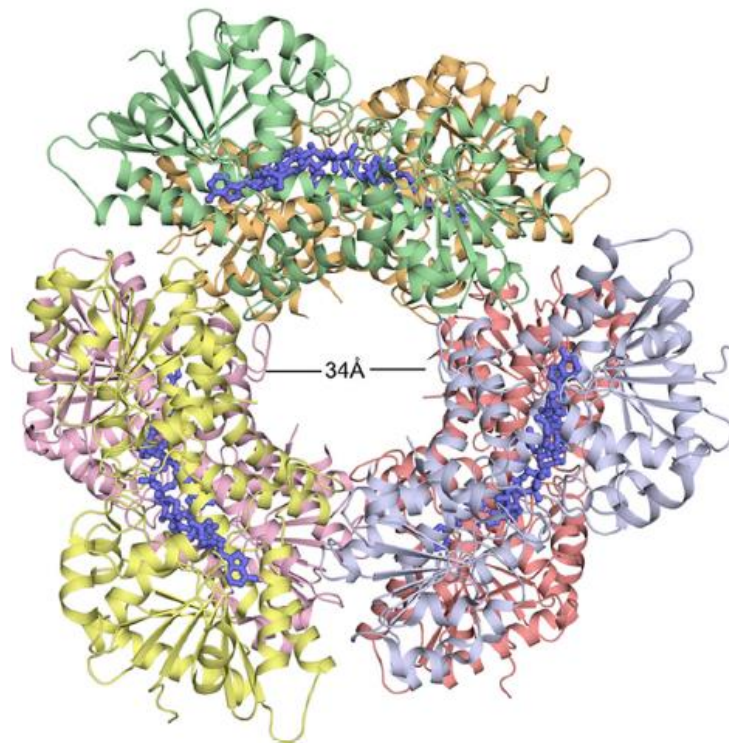
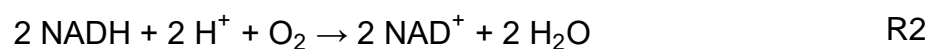


Abbildung 13: Modell der ringförmigen Hexamerstruktur von UGDH [79].

Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die Reaktion in drei Katalyseschritten über Hemiacetat- und Thioester-Intermediate abläuft. Die in dieser Arbeit verwendete UGDH ist rekombinant human und wurde in einem *Escherichia coli* Stamm exprimiert. Sie wurde außerdem mit einer sechsfachen Histidin-Kette (His₆-Tag) versehen, um das Enzym über Metallo-Affinitätschromatographie auftrennen zu können. Dieser His₆-Tag wird im Zuge dieser Arbeit zur Immobilisierung der Enzyme an Magnetpartikel genutzt, die mit einem Nickel-Iminodiacetat-Komplex funktionalisiert sind.

2.5.2 NADH-Oxidase (NOX)

Die NADH-Oxidase (NOX) zählt zu den Flavoproteinen und ist ein Enzym, das NADH unter Anwesenheit von Sauerstoff oxidiert (siehe Reaktionsgleichung R2).



Es gibt zwei Gruppen des Enzyms, wobei die eine Wasser produziert und die andere Wasserstoffperoxid [80]. Das in dieser Arbeit verwendete Enzym zählt zur ersten Gruppe und wurde aus dem Milchsäurebakterium *Lactobacillus brevis* isoliert und mit einem His₆-Tag versehen [73]. Im Enzymklassifikationssystem besitzt NOX die Nummer 1.6.3.4 und zählt damit zu der Klasse der Oxidoreduktasen. *Lactobacillus brevis* ist ein fakultativ anaerobes Bakterium, das keine Zellatmung betreibt, sondern ATP anaerob über Milchsäuregärung produziert. Kommt es jedoch in Kontakt mit Sauerstoff, stellt es seinen Stoffwechsel auf die Produktion von Acetat anstatt Lactat

um. Dabei wird für die Glykolyse NAD^+ benötigt, das durch NOX regeneriert wird [75]. Für diesen Zweck wird NOX industriell eingesetzt.

So werden für die Trennung von Racematen oder die Herstellung eines chiralen Produkts oft Dehydrogenasen eingesetzt, die NADH als Nebenprodukt produzieren und NAD^+ als Cofaktor benötigen. NOX wird für die kostengünstige Regeneration eingesetzt, um das Gleichgewicht Richtung Produktbildung zu verschieben [81].

2.5.3 Galactokinase (GalK)

Die Galactokinase (GalK, EC 2.7.1.6) ist eine Transferase, welche die Phosphorylierung von D-Galaktose katalysiert. Mit ATP als Cosubstrat wird so α -D-Galaktose-1-Phosphat (Gal-1-P) gebildet (siehe Reaktionsgleichung R3).



Bei humaner GalK (siehe Abbildung 14) können jedoch auch, 2-Deoxy-Galaktose, 2'-dATP, und 3'-dATP als Substrate eingesetzt werden, wobei es sich gezeigt hat, dass N-Acetylgalactosamin, L-Arabinose, D-Fucose, und D-Glucose nicht phosphoryliert werden [82]. Diese Reaktion ist ein Teilschritt des Leloir-Wegs, auf dem Galaktose reversibel in Glucose umgewandelt wird. Dieser Stoffwechselweg ist entscheidend für die zelluläre Energieproduktion, die Modifikation von zellulären Makromolekülen wie Glykoproteinen und Glykolipiden und für die normale menschliche Entwicklung [83]. GalK ist ein Mitglied der GHMP-Superfamilie, kleinmolekularen Kinasen wie Homoserinkinase, Mevalonatkinase und Phosphomevalonatkinase [84]. GalK wurde zuerst aus Säugetierleber isoliert [85, 86]. Seitdem wurde sie in Bakterien [87], Hefe [88, 89], Pflanzen [90] und Menschen [91] ausgiebig untersucht. Die kinetischen Eigenschaften des Enzyms scheinen sich je nach der Quelle des Proteins zu unterscheiden. In dem aus *E. coli* isolierten Enzym scheint der Reaktionsmechanismus zufällig zu sein, wobei entweder ATP oder Galaktose zuerst bindet [92]. Die in dieser Arbeit eingesetzte rekombinante GalK, welches einen N-terminaler His₆-Tag besitzt, wurde in einem *Escherichia coli* Stamm exprimiert [93].

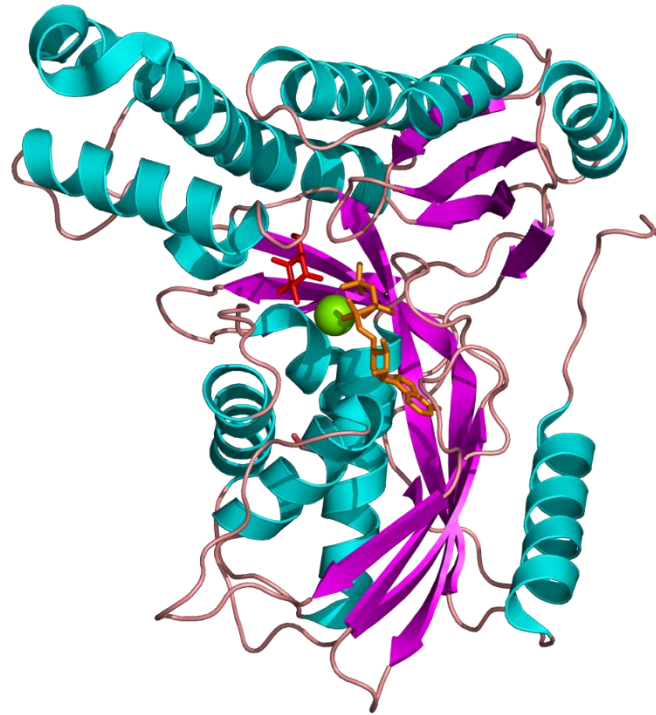
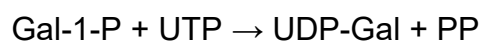


Abbildung 14: Molekularer Aufbau der humanen Galactokinase [94].

2.5.4 UDP-Zucker Pyrophosphorylase (USP)

Die Transferase UDP-Zucker Pyrophosphorylase (engl. UDP-sugar pyrophosphorylase, USP, EC 2.7.7.64) katalysiert die Reaktion von Monosaccharid-1-phosphaten und Uridintriphosphat (UTP) zu UDP-Zucker und Pyrophosphat (PP). Das Enzym wurde erst vor wenigen Jahren eindeutig identifiziert und charakterisiert [95], aber seit mindestens 50 Jahren wird bereits von USPase-ähnlichen Aktivitäten berichtet [96]. USPs sind hauptsächlich in höheren Pflanzen wie *Pisum sativum* (Gartenerbse) [95], *Cucumis melo* (Melone) [97] und *Glycine max* (Sojabohne) [98] zu finden. Hier werden Monosaccharide, die durch Glykosidasen von Zellwand-Polysaccharide, Glykoproteinen und Glykolipiden freigesetzt werden, in die Zellen eingebaut und dann über Monosaccharid-1-phosphate in UDP-Zucker umgewandelt. Diese Nukleotidzuckerbiosynthese scheint eine wichtige Rolle für die Synthese von Zellwandpolysacchariden und Zellwandarchitekturen in höheren Pflanzen zu spielen [99]. In dieser Arbeit wurde USP aus *Hordeum vulgare var. distichum* (Gerste) isoliert und rekombinant mit einem C-terminaler His₆-tag synthetisiert [100]. Die meisten UDP-Zucker-Pyrophosphorylasen können als Substrat Glucose-1-Phosphat, Galaktose-1-phosphat, Glucuronsäure-1-phosphat und Xylose-1-phosphat nutzen [101]. In der vorliegenden Arbeit wurde das durch GalK gebildete Gal-1-P durch USP zu UDP-Gal umgewandelt (siehe Reaktionsgleichung R4).

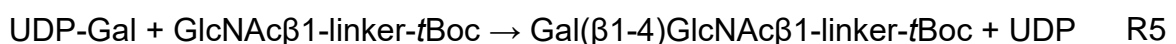


R4

2.5.5 β -1,4-Galactosyltransferase (GalT)

Die β -1,4-Galactosyltransferase (GalT) gehört zu den Trans-Golgi-Glykosyltransferasen, Enzyme, die auf der trans-Seite des Golgi-Apparates einer Zelle lokalisiert sind. Als Leloir-Glykosyltransferasen synthetisieren sie Oligosaccharid-Ketten durch die Übertragung einer Monosaccharid-Einheit von einem aktivierten Zuckerdonor auf ein Akzeptormolekül, unter Bildung einer glykosidischen Bindung [102]. Viele Enzyme dieser Art benötigen ein Metallion als Cofaktor. Als Cofaktor bei der β -1,4-Galactosyltransferase (GalT) dient Mangan. Die Konfiguration an dem anomeren Kohlenstoffatom des Donorzuckers wird entweder während der Transferreaktion beibehalten oder invertiert. Sie werden nach der Zuckereinheit, die sie übertragen, benannt und weiter unterteilt in Unterfamilien, basierend auf der Verknüpfung die zwischen dem Donor und dem Akzeptor erzeugt wird. Die Galactosyltransferase-Familie überträgt in Gegenwart eines Metallions Galaktose aus Uridin-Diphosphat- α -D-Galaktose an ein Akzeptor Zuckermolekül. Unter den vielen bisher bekannten Glykosyltransferasen wurde der kinetische Mechanismus von GalT ausführlich untersucht. Dem zugrunde liegt der folgende sequentielle Mechanismus: Zuerst bindet Mn_2 an das Enzym, gefolgt von UDP-Gal und dann das Akzeptorsubstrat GlcNAc [79].

Die, in dieser Arbeit eingesetzte, rekombinant humane GalT (EC 2.4.1.38), welche in *E. coli* mit einem His₆-tag exprimiert wurde, katalysiert den Transfer von Galaktose von UDP-Gal zu dem linker-modifizierten Substrat *N*-Acetylglucosamin, dessen Aminogruppe durch *tert*-Butyloxycarbonyl geschützt ist (GlcNAc-linker-*t*Boc), in Gegenwart von Mn_2 . Das Produkt dieser Reaktion ist LacNAc-linker-*t*Boc (siehe Reaktionsgleichung R5) [71].



2.5.6 Glucuronyltransferase (GlcAT)

Glucuronyltransferase (GlcAT) katalysiert spezifisch den Transfer von Glucuronsäure aus UDP-Glucuronsäure (UDP-GlcA) auf Glykoprotein-Akzeptorsubstrate mit terminaler Gal(β 1-4)GlcNAc-Sequenz, was zur Bildung des Human Natural Killer-1 (HNK-1) Epitop führt. Die GlcAT-Aktivität wird auch für die Proteoglykan- und Glykoprotein-Biosynthese benötigt [103, 104]. Auch extrazelluläre Matrix (ECM)-Proteine werden durch GlcAT modifiziert und es wurde nachgewiesen, dass einige ECM-Proteine das HNK-1 Epitop tragen [105]. In der *Drosophila* Fliege ist die Produktion und Sekretion mehrerer ECM-Moleküle eine essentielle Funktion der Hämocyten. Möglicherweise ist die Hämocytenmigration entlang ihrer normalen Routen und die Ankunft in ihren korrekten Zielgeweben, für Entwicklung und Überleben der Fliegen entscheidend, wodurch GlcAT eine wichtige Rolle einnimmt [106]. Es wurde gezeigt, dass GlcAT die Glykosyltransferase ist, welche überwiegend für die HNK-1 Epitop-Biosynthese im Gehirn verantwortlich ist. Es wird vermutet, dass das Gen des humanen GlcAT mit Schizophrenie-ähnlichen Psychosen in Zusammenhang steht [107]. Zusammengefasst zeigen diese Studien, dass GlcAT eine

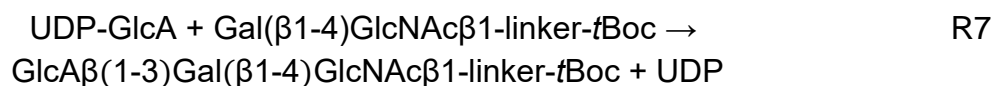
entscheidende Rolle bei der Entwicklung und / oder Funktion des Nervensystems spielt.

Das Human Natural Killer Cell-1 Epitop ist eine Glykanstruktur, die hauptsächlich als Bestandteil von Glykoproteinen im zentralen und peripheren Nervensystem auftritt [108]. Das Epitop ist ein Trisaccharid aus den Monomeren Glucuronsäure (GlcA), Galaktose (Gal) und N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc), wobei GlcA mit einer Sulfat-Gruppe versehen ist (siehe Reaktionsgleichung R6) [109].



Es spielt bei vielen Säugetieren und beim Menschen eine große Rolle bei der Entwicklung des Gehirns und der Nervensysteme im embryonalen Stadium, wohingegen es im ausgewachsenen Organismus im Gehirn kaum noch vorhanden ist. So ist das Epitop im Embryo Bestandteil von Glykoproteinen, die neuronale Zell-Interaktionen steuern [109] und an Zell-Migrationen [110] sowie Differenzierungen [111] beteiligt sind. Es beeinflusst damit neben motorischen Fähigkeiten auch das Erinnerungsvermögen, wie Morita et al. [111] anhand von Mäusen gezeigt haben. Eine Mutation des GlcAT, das ein wichtiger Bestandteil des Synthesewegs von HNK-1 ist, hat unter anderem eine Einschränkung des räumlichen Gedächtnisses ausgelöst. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass Glykane mit dem Epitop HNK-1 bei der Regeneration nach einer Verletzung der Wirbelsäule mitwirken. Dort unterstützen sie das Axonwachstum und die Neuausbildung der Myelinschicht [108].

Ein möglicher Syntheseweg des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops ist mit rekombinant murinen GlcAT (EC 2.4.1.17). Dieses transferiert GlcA von dem Glykosyldonor UDP-GlcA auf den Akzeptor LacNAc-linker-*t*Boc (siehe Reaktionsgleichung R7) [73].



3 Materialien und Methoden

Im Folgenden sind die Materialien, Geräte und Methoden aufgeführt, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte und Laborzubehöerteile sind in der nachfolgenden Tabelle 1 inklusive ihres Herstellers gelistet.

Tabelle 1: Alle Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software, welche im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden und ihre Hersteller.

Geräte Laborzubehör und Software	Hersteller
3D-Drucker Objet Eden 260VS	Stratasys
Bechergläser	Schott, VWT
Fluoriniertes Ethylenpropylen (FEP) Schlauch 1/16“	CS Chromatographie
FEP-Schlauch 1/8“	Wolf-Technik
FEP-Schlauch 1/4“	CS Chromatographie
FEP-Schlauch 1/2“	NMR Tubes from NORELL®
Fittings 1/16“, PEEK	CS Chromatographie
Fittings 1/8“, PEEK	CS Chromatographie
HPLC-Anlage Agilent 1100	Agilent Technologies
HPLC Säule TSK Gel-Amid80 (5 µm, 2.0 x 250 mm)	Tosoh Bioscience GmbH
HPLC Säule TSK Gel ODS 100V (4.6 x 150 mm)	Tosoh Bioscience GmbH
HPLC GaIT Säule SunFire (5 µm, 4.6 x 150 mm)	Waters Corporation
Inventor 2019	Autodesk
Kurzwindflasche (9 mm aD), 250µL und Schraubkappe	A-Z Analytik-Zubehör GmbH
Laborflaschen	Schott
Labor pH-Meter inoLab pH Level 2	WTW, Weilheim (Deutschland)
MagRag6	GE Healthcare
Magnet-Segment MR06.2xr03.5xh08xA60Zn-45H-dia S)N	HKCM Engineering e.K.
Massenspektrometer, ESI-Q-ToF, QSTAR Pulsar i	SCIEX
Mikroreaktionsgefäße, 1,5 mL	Eppendorf
Mikroreaktionsgefäße 2 mL	Eppendorf
Mikrotiterplatte 96 well F-Boden	Brand
Mikrotiterplatte 384 well F-Boden	Brand
Pipetten (Kolbenhub) Research	Eppendorf

Pipettenspitzen	Eppendorf
Präzisionswischtücher	Kimberly Clark Professional
Protein Assay Pierce BCA	Thermo Fisher Scientific
Protein Assay Micro BCA	Thermo Fisher Scientific
Reduziereinheit 1/8" zu 1/16"	CS Chromatographie
Reduziereinheit 1/4" zu 1/8"	Coleparmer
Reduziereinheit 1/2" zu 1/4"	Ace Glass Incorporated
Reinstwasseranlage Milli-Q Plus	Merck Millipore
Sigma Plot 11	Systat Software GmbH
Thermometer	Impac
ThermoMixer® comfort	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Memmert GmbH und Co.KG, Schwabach Deutschland
UV-vis-Spektrometer/ Plattenleser Enspire	Perkin Elmer, Waltham (USA)
Verbindung zwischen 1/8" AD-Schläuchen, Adapters & Connectors: Union, Threaded, 1/4"-28 (Thru-Threads), ETFE	Kinesis GmbH
VeroClear/VeroWhite PolyJet-Photopolymer	Stratasys
Vortexmischer Lab Dancer	IKA
Waage Adventure AX224	OHAUS, Greifensee Schweiz
Waage PG 5002-S	Mettler Toledo

3.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien waren, sofern nicht anders aufgeführt, von Analysequalität und wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Das für die Experimente verwendete Wasser war Reinstwasser und wurde mit einem MilliQ® System von Merck KGaA (Darmstadt) aufbereitet. Alle verwendeten Chemikalien dieser Arbeit sind in der nachfolgenden Tabelle 2 inklusive ihres Herstellers gelistet.

Tabelle 2: Alle im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien und ihre Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
α-D-Galactose-1-phosphat Dikaliumsalz Pentahydrat (G-1-P)	Sigma-Aldrich
Acetonitril HiPerSolv CHROMANORM®, gradient grade für die HPLC	VWR
Adenosin-5'-diphosphat Dinatriumsalz (ADP), 97%	VWR
Adenosin-5'-triphosphat Dinatriumsalz (ATP)	VWR
Anisol zur Synthese	VWR
D-(+)-Galactose, High Purity Grade (Gal)	VWR
Dithiothreitol (DTT)	VWR
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (AP) (1 U/μL)	Thermo Fisher Scientific

Kaliumhydrogenphosphat (KP)	VWR
Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺)	Merck
Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert (NADH)	Merck
Phospho(enol)pyruvic acid monopotassium salt	Sigma-Aldrich
Pyrophosphatase, anorganisch (PPase) (0,1 U/μL) (aus Hefe)	Thermo Fisher Scientific
Tert-Butylamin \geq99% (TBA)	VWR
UDP-α-D-Galactose, Dinatriumsalz (UDP-Gal)	VWR
Uridine 5'-diphosphoglucose Dinatriumsalz (UDP-Glc)	Sigma-Aldrich
Uridine 5-diphosphoglucuronat Triatriumsalz (UDP-GlcA)	Sigma-Aldrich
Uridin-5'-diphosphat Dinatriumsalz Hydrat (UDP) \geq96%	Sigma-Aldrich
Uridin-5'-triphosphat Trinatriumsalz (UTP) \geq98%, ultrarein	Sigma-Aldrich

3.3 Bestandteile des kompartimentierten Mikroreaktorsystems (KMS)

Die kommerziellen Bestandteile des KMS sind in der nachfolgenden Tabelle inklusive ihres Herstellers gelistet.

Tabelle 3: Bestandteile des entwickelten Mikroreaktorsystems.

Bestandteil	Hersteller
IR-Spot	Optron
Basismodul BASE 12	Cetoni
Desktop PC	Bechtle
Funktionsgenerator DG1022	Rigol
Halogen-/Deuteriumlampe DT-MINI-2-GS	OceanOptics GmbH
Hochdruckventil Qmix V HP	Cetoni
Qmix I/O Eingangs-/Ausgangsmodul	Cetoni
Lichtwellenleiterkabel Patch Cord	OceanOptics GmbH
Magnetsegmente, Neodymium, verzinkt	HKCM
Magnet N45, Neodymium, vernickelt	Webcraft GmbH - supermagnete
Mikrocontroller (μC) MICRO	Arduino/Genuino
Niederdruck Spritzenpumpe neMESYS 290N	Cetoni
Niederdruckventil Qmix V EX	Cetoni
Peltier-Thermostat PT31	A. KRÜSS Optronic GmbH,
Software QmixElements	Cetoni
Spektrometer Modul Qmix Lambda	Cetoni
Spritze 5/50 mL Gastight	Hamilton
Thermostat RC6	LAUDA
Transistorverstärker 19Z/500	FG-Elektronik GmbH

3.4 Magnetische Trägerpartikel

PureCube Ni-IDA MagBeads wurden von der Firma Cube Biotech GmbH (Monheim am Rhein, Germany) erworben und wurden ohne weitere Modifikationen als Trägerpartikel für die Enzyme verwendet (Tabelle 4).

Tabelle 4: Herstellerangaben der Magnetpartikel „PureCube Ni-IDA MagBeads“.

Magnetpartikeln „PureCube Ni-IDA MagBeads“	
Hersteller	Cube Biotech
Durchmesser	~25- 30 μm
Material	Magnetit-Shell-Core Partikel mit 6% Agarose beschichtet
Magnetisierung	ferrimagnetisch
Ligand	Nickel-Iminodiacetat
Bindekapazität	Bis zu 70 mg/mL
Konzentration	25 vol.%

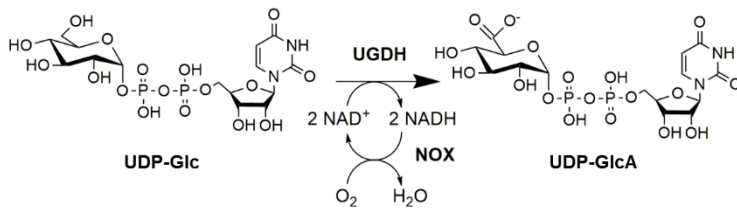
3.5 Enzyme

Die in dieser Arbeit untersuchten Enzyme sind Fusionskonstrukte mit einem N-terminalen Polyhistidin (His_6)-Tag. Die Enzymexpressionen wurden von der Gruppe des Projektpartners Prof. Elling, Helmholtz-Institut für Biomedizinische Technik, RWTH Aachen, durchgeführt. Die Expression von UDP-Glucose-Dehydrogenase (UDGH, EC 1.1.1.22), NADH-Oxidase (NOX, EC 1.6.99.-) und β 1,3-Glucuronyltransferase (GlcAT, EC 2.4.1.17) wurde von Engels et al. [73] beschrieben. Wahl et al. [72] beschrieb die Expression für Galactokinase (GalK, EC 2.7.1.6) und UDP-Zuckerpyrophosphorylase (USP, EC 2.7.7.64) [100] und Fischöder et al. [118] die Expression für β 1,4-Galactosyltransferase (GalT, EC 2.4.1.38). Das Linker-modifizierte Substrat N-Acetylglucosamin mit einer tert-Butyloxycarbonyl-geschützten Aminogruppe (GlcNAc-Linker-*t*Boc) wurde von Prof. Vladimir Křen (Institut für Mikrobiologie, Tschechische Akademie der Wissenschaften) geliefert und, wie von Sauerzapfe et al. [71] beschrieben, hergestellt. Hemmende Nebenprodukte wurden durch anorganische Pyrophosphatase (PPase) und alkalische Phosphatase (AP) entfernt, die von Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA) erworben wurden. Alle Chemikalien waren von analytischer Reinheit und wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Das für alle Experimente verwendete Wasser wurde mit einem Milli-Q Ultrapure-System der Merck Millipore KGaA (Darmstadt, Deutschland) entionisiert und gereinigt.

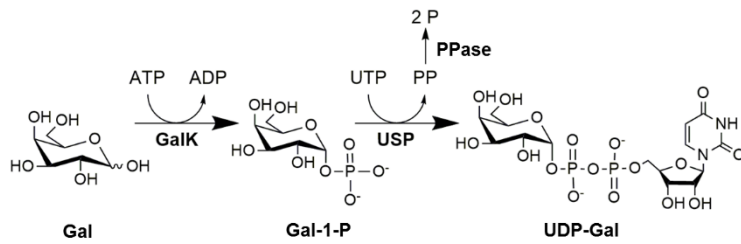
3.5.1 Enzymmodule

Die einzelnen freien Enzyme wurden in vorherigen Arbeiten in verschiedenen Enzymmodulen (EM) kombiniert (siehe Abbildung 15). Im EM UDP-GlcA wird Uridindiphosphat-Glucose (UDP-Glc) mittels UDP-Glucose-Dehydrogenase (UGDH) zu UDP-Glucuronsäure (UDP-GlcA) oxidiert. Für den Ablauf der Reaktion wird Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+) als Cofaktor benötigt, der als Elektronenakzeptor dient. Da das dabei entstehende Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrid (NADH) eine inhibierende Wirkung auf UGDH besitzt und NAD^+ eine teure Chemikalie ist [73], wird NADH-Oxidase (NOX) als weiteres Enzym zur Regeneration von NAD^+ eingesetzt. NOX nutzt dabei NADH als Elektronendonator für die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser [72]. Die Galactokinase (GalK) wurde mit UDP-Zuckerpyrophosphorylase (USP) in einer Enzymkaskadenreaktion zur Synthese von UDP-Galaktose (UDP-Gal) aus D-(+)-Galaktose (Gal) über α -D-Galaktose-1-phosphat (Gal-1-P) im EM UDP-Gal kombiniert [100]. Dabei wird Gal im ersten Schritt von der GalK mit einer Phosphatgruppe versehen, wobei Adenindiphosphat (ADP) als Nebenprodukt aus dem Cofaktor Adenintriphosphat (ATP) entsteht. Der nächste Schritt ist der Transfer von Uridin-Monophosphat (UMP) von Uridintriphosphat (UTP) auf Galaktose-1-Phosphat mittels USP unter Abspaltung von Pyrophosphat, wodurch UDP-Gal entsteht. Da Pyrophosphat inhibierend auf USP wirkt, wurde es durch Zugabe von PPase zu zwei anorganischen Phosphaten abgebaut. Im EM GalT überträgt β 1,4-Galactosyltransferase (GalT) einen Glykosyldonor auf ein *tert*-Butyloxycarbonyl-geschützten N-Acetylglucosamin (GlcNAc-Linker-*t*Boc) zur Synthese von N-Acetyl-D-Lactosamin (LacNAc-Linker-*t*Boc) [118]. Als Glykosyldonor kann der, zuvor im EM UDP-Gal synthetisierte Nukleotidzucker, UDP-Gal eingesetzt werden. Das im EM UDP-GlcA hergestellte UDP-GlcA wurde von der β 1,3-Glucuronyltransferase (GlcAT) verwendet, um im EM GlcAT das GlcA auf das LacNAc-Linker-*t*Boc zu übertragen, was zu dem Produkt nicht-sulfatiertes „human natural killer-1“ (HNK-1) Epitop führte [73]. Da bei den Enzymmodulen EM GalT und EM GlcAT UDP als Nebenprodukt anfällt und dieses beide Leloir-Glykosyltransferasen GalT und GlcAT inhibiert, wurde jeweils eine AP zugegeben, die UDP abbaut.

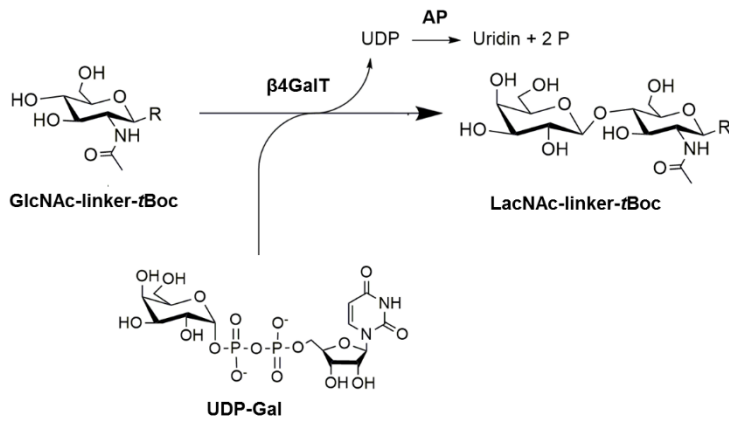
EM UPD-GlcA



EM UPD-Gal



EM GalT



EM GlcAT

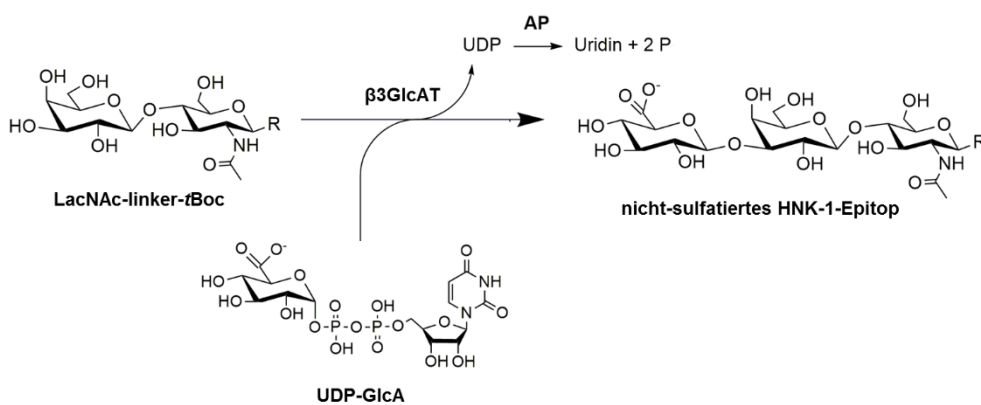


Abbildung 15: Schematische Darstellung der verwendeten Enzymmodule.

3.6 Das kompartimentierte Mikroreaktorsystems (KMS)

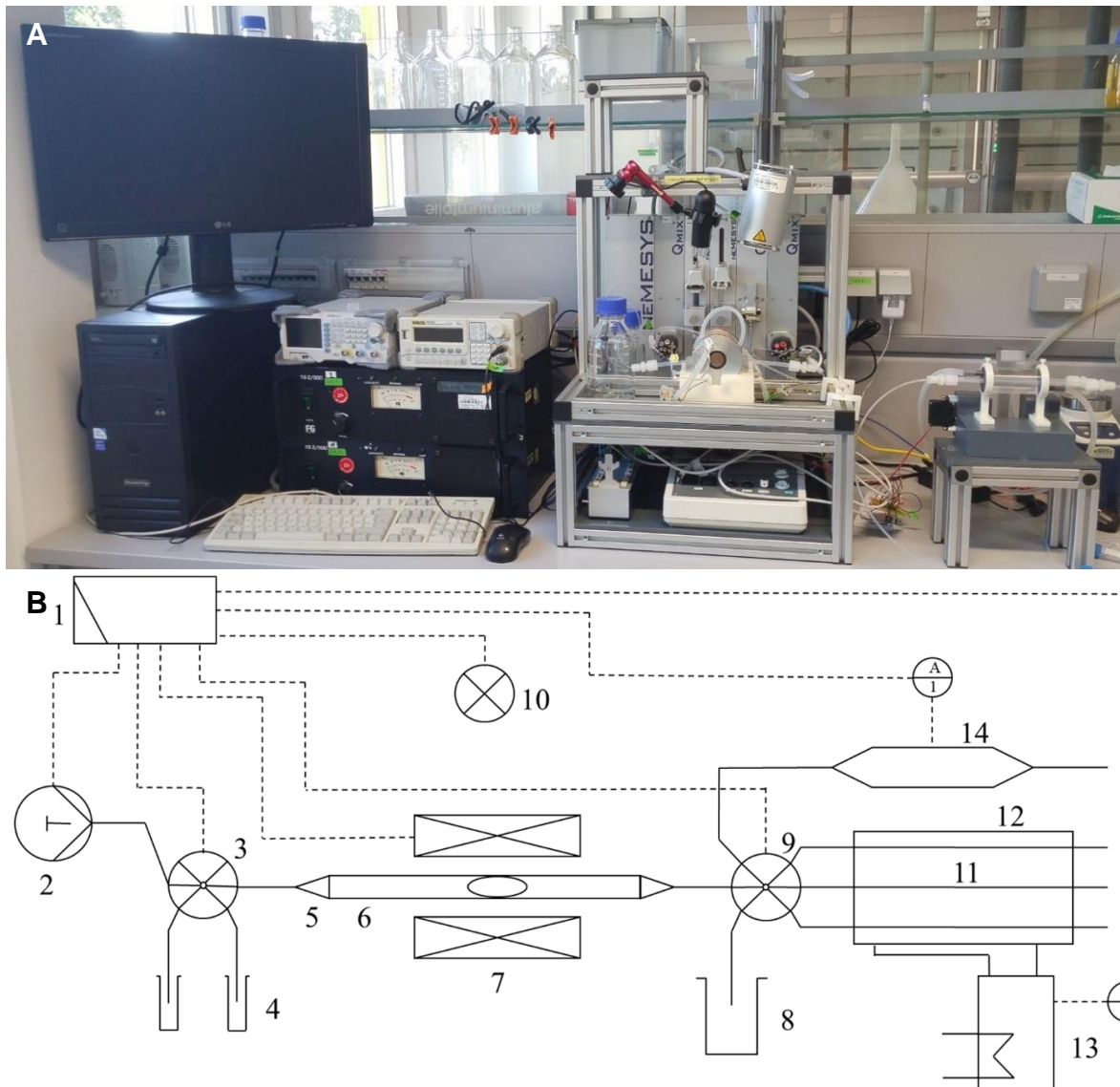


Abbildung 16: Übersicht über das KMS als (A) Aufbau im Labor und (B) Fließschema. (A) Links sieht man den Computer mit der kommerziellen Software „QmixElements“, mit der das gesamte KMS gesteuert wird. Daneben erkennt man zwei Transistorverstärker und Funktionsgeneratoren. In dem Gerüstaufbau sind kommerzielle Pump-/Ventil- und Spektrometermodule verbaut. Daran angeschlossen ist ein FEP-Schlauch, der zwischen zwei Elektropumpen in 3D-gedruckten Halterungen geführt wird. Darüber sind ein Infrarotstrahler und ein Videoaufnahmegerät und darunter ein Steuerpult angebracht. Rechts ist ein Reaktor mit Temperaturkontrolle angeschlossen. (B) Alle Module des Geräts sind an einen PC (1) angeschlossen. Spritzenpumpen (2), die an ein Mehrwegeventil (3) angeschlossen sind, transportieren alle prozessrelevanten Flüssigkeiten und magnetischen Enzymimmobilisate (MEI) aus den Behältern (4) über eine Reduziereinheit (5) zu dem Reaktionsschlauch (6) im Magnetfeldmodul (MFM) (7). Über ein weiteres Mehrwegeventil (9) können verbrauchte Lösungen zu entsprechenden Behältern (8) abgeführt werden. Temperaturabhängige Kurzzeitreaktionen können direkt im MFM durch Erwärmen mit einem Infrarotspot (10) durchgeführt werden. Alternativ können die MEI für temperaturabhängige Langzeitreaktionen in zwei Schläuche (11) des Temperaturkontrollmoduls (TKM) (12) transportiert werden, welches mit einem Peltier-Thermostat (13) verbunden ist. Der Überstand einer Reaktion kann zur Online-Analyse auf ein Spektrometermodul (14) übertragen werden.

Die Basis für die Entwicklung des modularen KMS wurde im Rahmen des Teilprojekts „Kompartimentkaskade mit magnetomechanischen Trennmembranen zur posttranslationalen Protein-Modifikation (synthetischer Golgi-Apparat)“ im Kooperationsprojekt „Selektive Kompartiment-Membranen (SeleKomM) - Neue Bausteine zur Konstruktion innovativer Reaktoren für die zellfreie Proteinbiosynthese mit angrenzendem in vitro Golgi-Apparat“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Franzreb am KIT gelegt. Das ursprüngliche Mikroreaktorsystem wurde für analytische Zwecke unter Verwendung kleiner Proben- und Reaktionskammervolumina von 10 bis 250 μl ausgelegt. Im Gegensatz dazu lag der Fokus des KMS dieser Arbeit auf der automatisierten Durchführung verschiedener Aufgaben der enzymatischen Bioprozessentwicklung unter Verwendung von immobilisierten Biokatalysatoren. Zu diesen Aufgaben gehören das Screening nach optimalen Prozessparametern, die Bestimmung der Prozesskinetik sowie Untersuchungen zur Wiederverwendung von MEI und der Einsatz enzymatischer Kaskadenreaktionen. Insbesondere im Hinblick auf die zuletzt genannte Aufgabe wurde die Vorrichtung modifiziert, um größere Volumina zu bewältigen und eine flexible Temperatursteuerung der Reaktionsräume zu ermöglichen.

Das Reaktormodul (siehe Abbildung 17A) des KMS (siehe Abbildung 16) besteht aus kommerziell erhältlichen Ventilen, Spritzenpumpen, einem online Spektrometer und einem Input/Output (I/O)-Modul, welche man modular kombinieren kann und die mit der Software des Herstellers gesteuert werden (Bestandteile siehe Kapitel 3.3). Das Reaktormodul beinhaltet außerdem das sogenannte Magnetfeld-Modul (MFM) (siehe Abbildung 17B). Dieses besteht aus einem Helmholtzspulen-Paar mit Kühlmantel, 3D-angefertigte Schlauchhalter und einen 3D-gedruckten Hebelarm mit einem Permanentmagnetarray, die an einem maßgeschneiderten 3D-gedruckten Grundkörper befestigt sind. Ein Helmholtzspulen-Paar, bestehend aus zwei Elektrosolen, die mit gleichem Radius, in einem definierten Abstand, auf derselben Achse parallel angeordnet werden und gleichsinnig mit Strom durchflossen werden, um zwischen sich ein homogenes Magnetfeld entlang der Achse zu erzeugen. Der eigentliche Reaktionsraum befindet sich in einem FEP-Schlauch, der durch die entsprechenden 3D-gedruckten Halterungen zwischen dem Helmholtzspulen-Paar entlanggeführt wird. Das Helmholtzspulen-Paar erzeugt ein elektromagnetisches Wechselfeld, welches die magnetischen Partikel nach der Separation durch die Permanentmagneten resuspendiert und verteilt. Der Kühlmantel der Elektrosolen ist an den Kühlkreislauf eines Thermostats angeschlossen, der sie mit 12°C kaltem Wasser versorgt. Die Spulen selbst sind über einen Funktionsgenerator mit zwei Transistorverstärkern verbunden, welche die Generierung des elektromagnetischen Wechselfeldes ermöglichen.

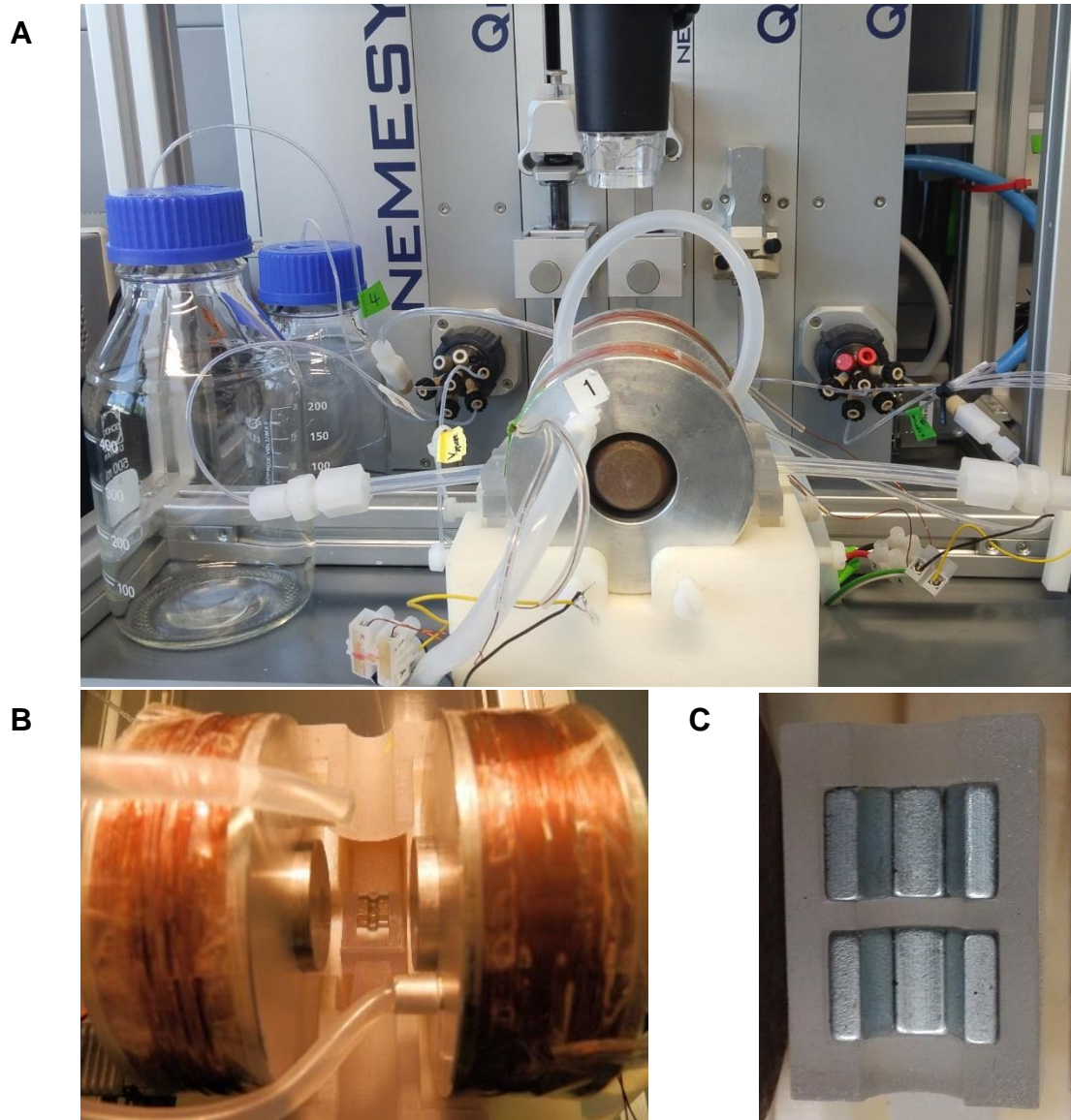


Abbildung 17: Darstellung (A) des Reaktormoduls, (B) des Magnetfeld-Moduls (MFM) und (C) des Permanentmagnetarrays. (A) Im Hintergrund erkennt man von links nach rechts die Basiseinheit, ein Ventilmodul, zwei Spritzenmodule, ein Spektrometermodul und ein weiteres Ventilmodul. An das linke Mehrwegeventil sind Reaktionslösungen, das Separationsfluid, die Spritze und der Reaktionsschlauch angeschlossen. Der Reaktionsschlauch ist auch mit dem rechten Mehrwegeventil verbunden, ebenso das Spektrometermodul und das TKM. Über dem MFM ist eine Kamera angebracht. (B) Draufsicht auf das MFM: An den Seiten sind die Helmholtzspulen mit Kühlmantel zu sehen. Dazwischen sind oben und unten im Bild die 3D-gedruckten Halterungen des Reaktionsschlauches angebracht. Unterhalb des Reaktionsschlauches ist ein 3D-gedruckter Hebelarm verbaut, der einen Permanentmagnetarray (für 1/8" AD-Schläuche) an den Reaktionsschlauch führt. (C) Draufsicht auf das Permanentmagnetarray für 1/4" AD-Reaktionsschläuche. Es sind zweimal drei verzinkte Neodymium-Magnetsegmente mit einem Innenradius von 3,5 mm und einer Länge von 8 mm so angebracht, dass sie die untere Hälfte des Reaktionsschlauches umschließen.

Der Hebelarm mit dem Permanentmagnetarray wird durch einen Miniatur-Servomotor bewegt, der für die automatisierte skriptbasierte Prozesssteuerung über einen Genuino MICRO Einplatinen-Mikrocontroller (μC) mit dem I/O-Modul des KMS verbunden ist. So kann der Hebelarm von unten an den Reaktionsschlauch geführt werden, um darin platzierte Partikel abzutrennen. Die Magnetplättchen des Permanentmagnetarrays wurden mit einer halbkreisförmigen Aussparung, für den Reaktionsschlauch maßgeschneidert, angefertigt, siehe Abbildung 17C. Das Permanentmagnetarray verfügt über mehrere Abschnitte in denen die Magnetplättchen angeordnet sind, wodurch die Magnetpartikel bei der Separation über die Länge des Reaktionsschlauches verteilt werden. Hierdurch lassen sie sich anschließend auch wieder schneller resuspendieren und es entsteht zudem eine geringere Schichthöhe im separierten Zustand, was zu einem geringeren Partikelverlust führt.

Die Möglichkeit, die Reaktionskammern 20- bis 50-fach zu skalieren, wurde durch einen Austausch der Mehrwegeköpfe der Niederdruckventile sowie der, als Reaktionsraum verwendeten, Schlauchleitung realisiert. FEP-Schläuche mit einem Außendurchmesser von 1/4"- 1/2" ermöglichen die Bildung von Reaktionskammern bis zu 3 mL. Dementsprechend musste die Größe der Permanentmagnetanordnung und der Schlauchhalterung angepasst werden. Die Reaktionsschläuche wurden mit den Ventilen durch FEP-Schläuche mit 1/8" Außendurchmesser verbunden. Dabei wurde der Reaktionsschlauch mit 1/4" Außendurchmesser durch eine Reduziereinheit aus PVDF mit dem 1/8" AD-Schlauch verbunden und der 1/2" AD-Reaktionsschlauch durch eine Reduziereinheit mit einem 1/4" AD-Schlauch. Das Spektrometermodul ist über ein Lichtwellenleiterkabel mit einer Halogen-/Deuteriumlampe verbunden. Die Temperaturkontrolle während Kurzzeit-Reaktionen, die innerhalb des MFM-Moduls durchgeführt wurden, wurde durch ein Infrarot (IR)-Spot erreicht, das über dem MFM zentriert wurde. Zusätzlich zu dem IR-Spot ermöglichte ein installiertes digitales USB-Kameramikroskop eine Online-Prozessbeobachtung innerhalb des Reaktionskompartiments. Der IR-Spot strahlt einen regionalen Fleck von IR-Licht auf den Reaktionskanal des MFM, etwas größer als ein Reaktionskompartiment. Bei langfristigen enzymatischen Umwandlungsreaktionen ist ein separates Temperaturkontrollmodul (TKM) mit der Reaktionsvorrichtung verbunden (siehe Abbildung 18). Das TKM ist ein 70 mm langer Kunststoffschlauch mit einem Außendurchmesser von 40 mm und einem Innendurchmesser von 30 mm. Die beiden Abdeckungen auf jeder Seite haben eine Öffnung für den Wasserein- und -austritt und bis zu vier Öffnungen für FEP-Schläuche mit einem Außendurchmesser von 1/4". Die FEP-Schläuche sind über 1/8" AD- Schläuche mit dem Auslass-Mehrwegeventil des Reaktionssystems verbunden. Die Wasserein- und -ausgänge sind mit einem Tisch-Peltier-Thermostaten verbunden, der für die Steuerung durch den PC über einen Mikrocontroller mit dem I/O-Modul des KMS verbunden ist. Der Kunststoffschlauch wird von zwei maßgeschneiderten, 3D-gedruckten Klammern gehalten, die an einen PVC-Block geschraubt wurden. Ein elektrischer Servomotor, der über einen weiteren Mikrocontroller mit dem I/O-Modul verbunden ist, wurde am PVC-Block befestigt und bewegt einen 3D-gedruckten Hebel, der einen vernickelten 30 x 30 x 15 mm Neodymium-Permanentmagneten bewegt. Indem der Hebel mit dem Magneten

wiederholt an den Schlauchmantel des TCM angenähert wird, werden magnetische Enzymimmobilisate (MEI), die in temperierten Reaktionskammern innerhalb der FEP-Schläuche angeordnet sind, suspendiert und gemischt.

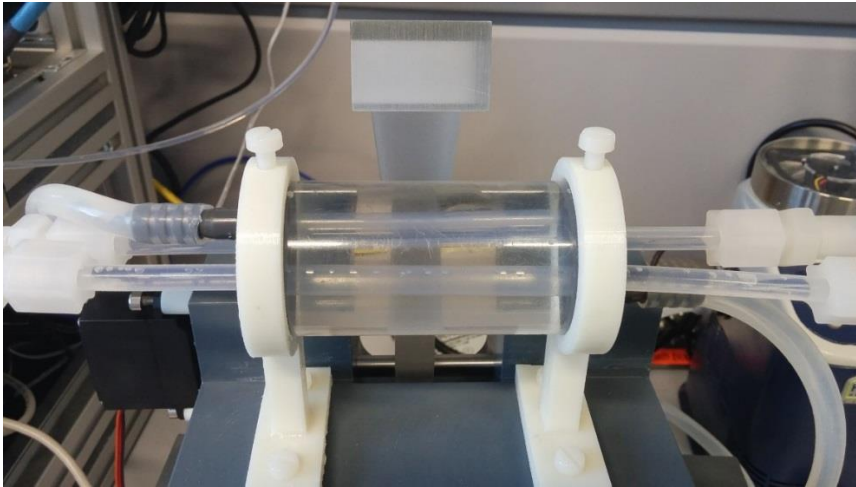


Abbildung 18: Darstellung des Temperaturkontrollmoduls (TKM).

3.6.1 KMS-Massenspektrometer Kopplung

Für eine zusätzliche online-Analyse konnte ein ESI-Q-ToF Massenspektrometer an das KMS geschlossen werden. Wie in Abbildung 19 A und B zu sehen, konnte das KMS über ein Hochdruckventil mit einem 1/16" AD-Schlauch an einen Injektionszugang für Flüssigchromatographie des MS-Systems angeschlossen werden. Das Niederdruckventil des KMS wurde mit dem Hochdruckventil über einen FEP-Schlauch verbunden, welcher einen Außendurchmesser von 1/8" hat und durch eine Reduziereinheit mit einem 1/16" AD-Schlauch verbunden ist, der an das Hochdruckventil angeschlossen wurde. Vor der Injektion in das MS mussten die Proben verdünnt werden. Hierfür wurde, wie in Abbildung 19 B und C dargestellt, ein Reaktionsgefäß als Mischkammer genutzt. Hier wurde zunächst eine definierte Menge an Milli-Q Wasser vorgelegt und nach Zugabe der Probe durch ein- und auspumpen gemischt. Da eine z.B. 3D-gedruckte Kammer aufwendig gereinigt werden müsste, um eine Verunreinigung der Proben zu vermeiden, wurden kommerzielle Einweg-Reaktionsgefäße genutzt, die nach jeder Probe leicht ausgetauscht werden konnten.

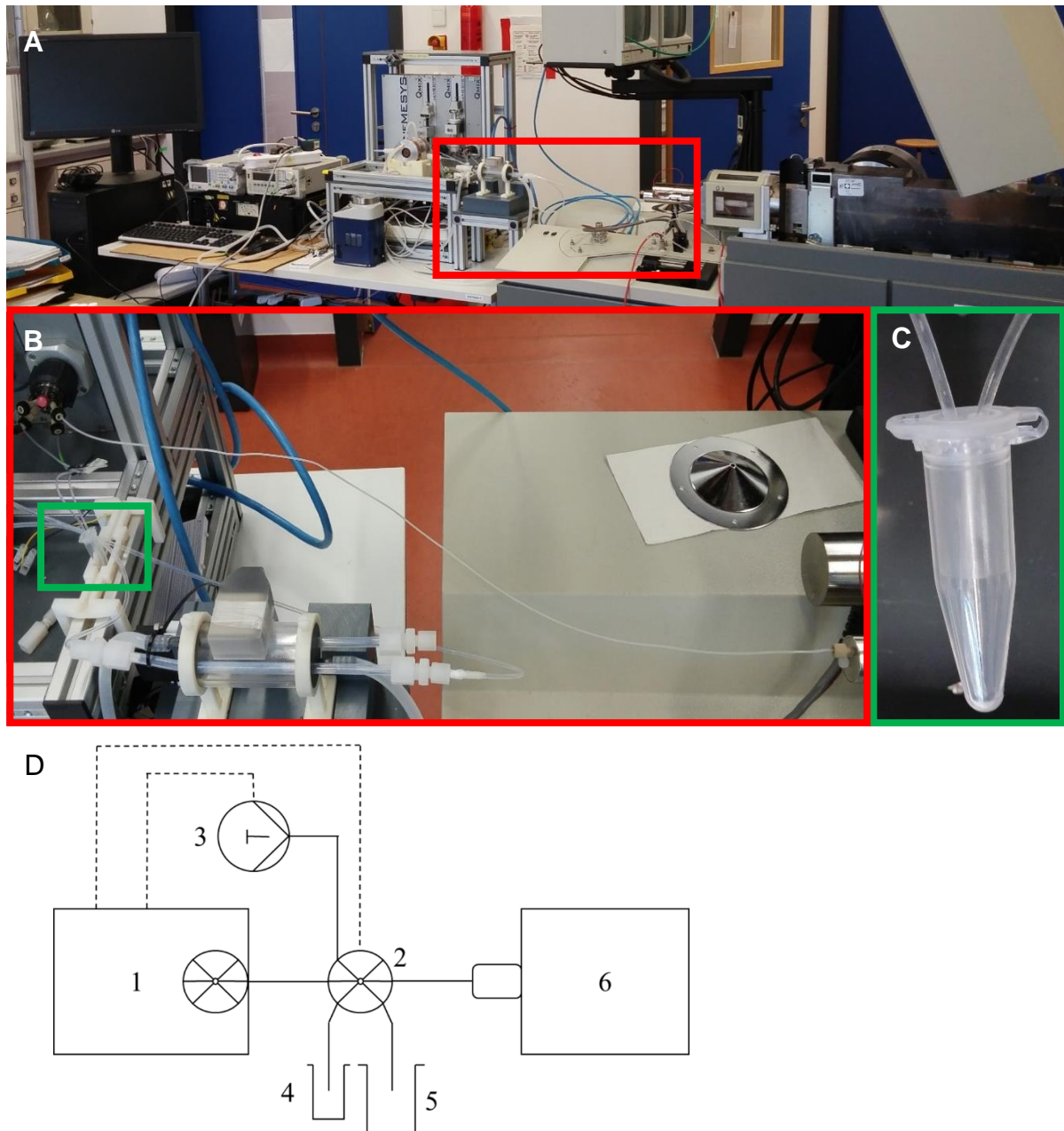


Abbildung 19: Aufbau des KMS mit Kopplung an ein Massenspektrometer-System. (A) zeigt den Gesamtaufbau, (B) die Verbindung des KMS über ein Hochdruckventil mit einem 1/16“ AD-Schlauch an den Injektionszugang für Flüssigchromatographie des MS-Systems und (C) ein Reaktionsgefäß, das als Mischkammer verwendet wird. (D) Allgemeines Fließschema der Verbindung des KMS mit dem MS-System. Die zu analysierenden Proben werden zunächst von dem KMS (1) mit einer Spritzenpumpe (3) über ein Hochdruck-Mehrwegeventil (2) in den Schlauch transportiert, der das Ventil und die Pumpe verbindet, und anschließend zu einer Mischkammer (4) gepumpt. Die Proben werden durch Zugabe von Milli-Q-Wasser aus einem entsprechenden Behälter (5) auf eine gewünschte Konzentration verdünnt. Die verdünnten Proben werden zu dem MS-System (6) gepumpt, das über einen Anschluss für Flüssigkeitschromatographie-Injektionen mit dem Hochdruck-Mehrwegeventil (2) verbunden ist.

3.7 Charakterisierung des KMS

Dieses Unterkapitel befasst sich mit den Methoden, die für die Evaluierung und Charakterisierung des erweiterten KMS verwendet wurden.

3.7.1 Pluggenerierung im KMS

In den Schläuchen des KMS wurden wässrige Flüssigkeitskompartimente als Reaktionsraum genutzt, die fortan Plugs genannt werden. Sie wurden allgemein durch alternierende Zugabe von Separationsfluid und wässriger Lösung generiert, siehe Abbildung 20A. Für eine bessere Visualisierung wurde die wässrige Lösung mit 0,1% v/v Tinte eingefärbt. Wie zu erkennen, wird die wässrige Lösung von dem Separationsfluid eingeschlossen (Abbildung 20B). Vor jedem Schalten des Ventils zwischen den Eingängen des Separationsfluids und der wässrigen Lösung, wurde der Pumpvorgang für eine Sekunde gestoppt, um während des Schaltens die Entstehung von Überdruck zu vermeiden. Das Volumen an Separationsfluid war stets größer als das der wässrigen Lösung. Dadurch wurde unter anderem verhindert, dass Plugs an den Übergängen zwischen verschiedenen großen Schläuchen, den Reduziereinheiten, vermischt werden.

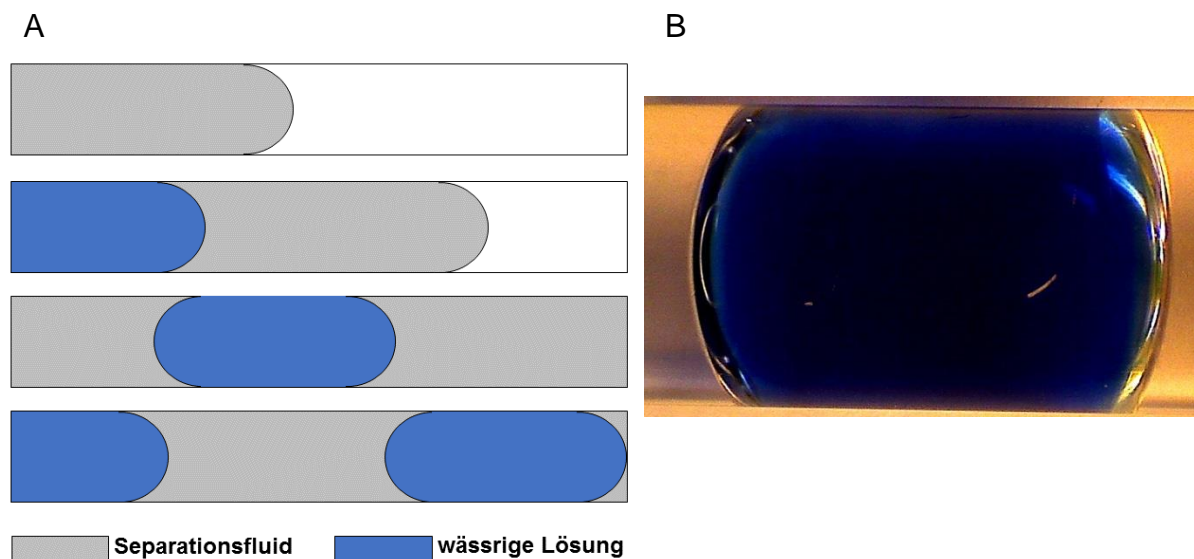


Abbildung 20: Schematische Darstellung einer Pluggenerierung in vier Schritten in **A** und **(B)** Fotografie eines mit 0,1% v/v Tinte gefärbten Plugs in einem 1/2“ AD-Reaktionsschlauch.

Um die Dosiergenauigkeit der Pluggenerierung zu testen und zu ermitteln, welches Separationsfluid am besten für eine Pluggenerierung in den 1/4“ AD und 1/2“ AD-Reaktionsschläuchen geeignet ist, wurden Plugs mit verschiedenen Zielvolumina bei unterschiedlichen Flussraten generiert. In dem 1/4“ AD-Schlauch wurden durchschnittlich 30 Plugs, unter Verwendung von Anisol bzw. Ethylacetat als Separationsfluid, mit Volumina von 0,03 mL, 0,24 mL und 0,45 mL jeweils bei einer Flussrate von 0,02 mL/s, 0,1 mL/s und 0,2 mL/s generiert. In dem 1/2“ AD-Schlauch konnte nur Anisol für die Pluggenerierung verwendet werden. Hier wurden 10 Plugs mit Volumina von 1 mL, 2 mL und 3 mL jeweils bei einer Flussrate von 0,05 mL/s,

0,1 mL/s und 0,4 mL/s generiert, wobei bei 0,1 mL/s weitere 10 Plugs getestet wurden. Mit der, senkrecht über dem Reaktionsschlauch installierten, Kamera wurde von jedem Plug ein Bild aufgenommen und mit dem freierhältlichen Bildbearbeitungsprogramm XnView zunächst in Schwarz-Weiß-Bilder umgewandelt. Mit dem auf ImageJ basierenden Open-Source-Bildverarbeitungspaket Fiji wurden diese anschließend ausgewertet. Hierzu wurden mit einem selbstgeschriebenen Skript die Flächen automatisch berechnet und in einer Microsoft Excel Datei ausgegeben. Durch die Berechnung des prozentualen Unterschieds der Flächen zu der eines genormten Plugs, dessen Volumina zuvor ermittelt wurde, konnten die Plugvolumina ausgerechnet werden.

3.7.2 Partikelresuspendierung

Für optimale Reaktionsbedingungen sollten die mit Enzymen beladenen Magnetpartikel nach der Separation mit dem Permanentmagneten durch die Resuspension mit den Elektrosolen möglichst vollständig wieder im Plug verteilt werden. Dementsprechend wurde die Partikelverteilung der in den 1/4" AD und 1/2" AD-Schläuchen generierten Plugs untersucht. Die wässrige Suspension in den Plugs bestand aus 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,5) und 10 g/L Magnetpartikel. Als Plugvolumen wurde in dem 1/4" AD-Schlauch 0,45 mL und in dem 1/2" AD-Schlauch 2 mL verwendet. Die wichtigsten Parameter für die Verteilung der Partikel in einem Plug sind die Stromstärke in den Elektrosolen sowie die Frequenz des generierten Wechselfelds. Die Ausgangssignale des Signalgebers wurden durch jeweils einen Transistorverstärker auf eine gewünschte Stromstärke eingestellt, wobei die Wärmeentwicklung der Elektrosolen die maximale Stromstärke limitiert. Eine Wasserkühlung der die Spulen umgebenden Kühlmäntel ermöglichte das Anlegen von bis zu 3 A. In Vorversuchen wurde ermittelt, dass eine bestmögliche Verteilung der Partikel im Plug durch eine Sinusspannung mit einer 90° Phasenverschiebung zwischen den beiden Elektrosolen möglich ist. Mit der Phasenverschiebung wurde eine zeitliche Versetzung der Maxima des generierten Magnetfelds zwischen den Spulen erreicht. Hierdurch kommt es zu einem Wechsel der Richtung, in die die Partikel durch die Spulen ausgelenkt werden. Dies führt zu einer Rotationsbewegung der Partikel über die Breite des Plugs, wobei sich die Partikel aufgrund der auftretenden Turbulenzen auch über die Länge verteilen. Ob sich die Partikel dabei über den gesamten Plug verteilen und wie lange sie dafür benötigen, ist von der Frequenz abhängig. Daher wurden Versuche durchgeführt, welche die Partikelverteilung pro Zeit für verschiedene Frequenzen und 3 A untersuchten. Mit der im System integrierten Kamera wurden alle 3 s Bilder der Partikelverteilung aufgenommen und mit dem Bildbearbeitungspaket Fiji die mit Partikeln bedeckte Fläche berechnet. In dem Reaktionsschlauch mit 1/4" AD, wurde die Partikelverteilung für 27 s untersucht und in dem 1/2" AD-Reaktionsschlauch für 36 s. Vor der Resuspension wurden die Magnetpartikel für 30 s mit dem Permanentmagneten fixiert.

3.8 Magnetische Enzymimmobilisate (MEI)

Dieses Unterkapitel befasst sich mit den eingesetzten Methoden zur Charakterisierung der magnetischen Enzymimmobilisate, der Optimierung ihrer Reaktionsparameter und deren Einsatz im KMS. Für Vergleichszwecke wurden auch freie Enzyme untersucht.

3.8.1 Immobilisierung der Enzyme auf den magnetischen Trägerpartikeln

Um einen effektiven Einsatz der Enzyme im KMS zu ermöglichen, wurden diese an Magnetpartikel immobilisiert. Dabei wurden die Magnetpartikel PureCube Ni-IDA MagBeads verwendet. Die Immobilisierung fand über Komplexbindung des His₆-Tags der rekombinanten Enzyme mit der IDA-Funktionalisierung der Partikel statt. Es wurden zur Immobilisierung je 500 µL-Ansatz 20 µL der reinen Partikelsuspension in ein 200 µL Reaktionsgefäß pipettiert und das sedimentierte Partikelvolumen nach Separation mittels eines Permanentmagneten kontrolliert. Die Partikel der gelieferten Stammsuspension wurden zuvor, durch Schütteln per Hand, resuspendiert, da die Partikel aufgrund ihrer Größe und Dichte schnell sedimentieren. Nach der Kontrolle des Partikelvolumens wurden die Partikel in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt. Der nachfolgende Immobilisierungsprozess ist in Abbildung 21 gezeigt. In einem Magnetständer wurden die paramagnetischen Partikel von der Lagerlösung getrennt. Der Überstand wurde verworfen und die Partikel anschließend dreifach mit je 500 µL Bindepuffer (20 mM Na₂PO₄/200 mM NaCl, pH 6,8) versetzt und anschließend für 5 s mit einem Vortexer geschüttelt. Die Überstände wurden mit dem Magnetständer abgetrennt und verworfen. Für die Immobilisierung wurde nach dem Waschen das, für die gewünschte Beladung benötigte, Volumen der Enzymstammlösung zugegeben. Dieses kann mit den Gleichungen 3.1 – 3.3 berechnet werden.

$$V_{\text{Partikel}} = V_{\text{Suspension}} * \beta_{\text{Partikel}} \quad (3.1)$$

$$m_{\text{Enzym}} = q_{\text{Ziel}} * V_{\text{Partikel}} \quad (3.2)$$

$$V_{\text{Enzym}} = m_{\text{Enzym}} / c_{\text{Enzym}} \quad (3.3)$$

V_{Partikel} ist dabei das Volumen des Partikelbetts in µL, $V_{\text{Suspension}}$ das Volumen der Stammpartikelsuspension in µL, β_{Partikel} der Volumenanteil an Partikel in der Stammpartikelsuspension in µL/µL, m_{Enzym} die benötigte Masse an Enzym in µg, q_{Ziel} die theoretische Zielbeladung in g/L, V_{Enzym} das benötigte Volumen der Enzymstammlösung in µL und c_{Enzym} die Konzentration der Enzymstammlösung in mg/mL.

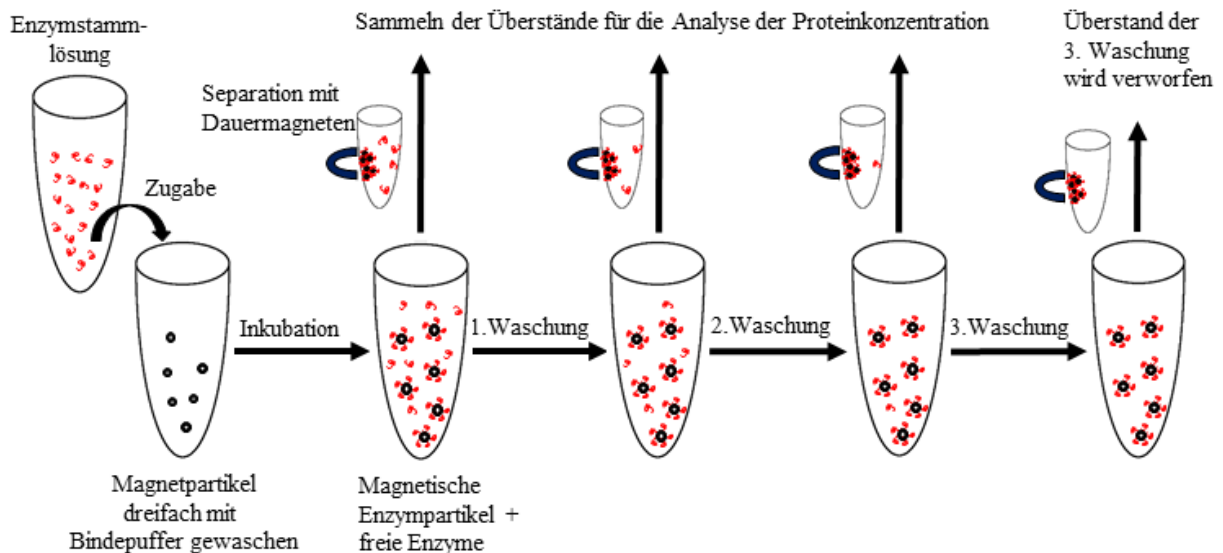


Abbildung 21: Schematische Darstellung des Immobilisierungsprozesses der Enzyme auf Magnetpartikel

Anschließend wurde mit Bindepuffer auf 250 μL aufgefüllt, wobei das Volumen der Partikel vernachlässigt wurde. Im Anschluss erfolgte die Inkubation im Thermoschüttler bei 24 $^{\circ}\text{C}$ und 1000 rpm für 30 min. Nach der Inkubation wurde der Überstand mittels Magnetständer abgetrennt und für die Beladungsbestimmung aufgehoben. Es folgten drei Waschdurchgänge mit jeweils 5s Durchmischung auf dem Vortexer zur Entfernung von ungebundenem Enzym. Dazu wurde zuerst mit 250 μL 1 M NaCl-Lösung gewaschen und dann dreimal mit 250 μL des jeweiligen Reaktionspuffers (siehe Tabelle 5, nur Puffersalze). Die ersten drei Wasch-Überstände wurden für die Beladungsbestimmung aufgehoben und der letzte verworfen, da mehrfach nachgewiesen wurde, dass dieser eine vernachlässigbare Menge an Enzym enthält. Zum Lagern wurden die MEI in 500 μL des jeweiligen Reaktionspuffers überführt.

3.8.2 Bestimmung der Enzymbeladung

Die Bestimmung der Menge an Enzym, mit der die Magnetpartikel beladen wurden, erfolgte mit Hilfe eines Micro-Bicinchoninsäure-Assay-Kits. Das BCA-Assay basiert auf der Ausbildung eines 2:1 Komplexes zwischen BCA und Cu^{1+} -Ionen. Durch die Ausbildung dieses Komplexes entsteht ein grün-blauer Chromophor mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm Wellenlänge. Um die Proteinkonzentration einer Lösung zu bestimmen, wird die Eigenschaft von Proteinen genutzt, zweiwertige Cu^{2+} -Ionen zu einwertigen Cu^{1+} -Ionen zu reduzieren. Diese Reaktion wird auch als Biuret-Reaktion bezeichnet. Dabei bilden Cu^{2+} -Ionen Komplexe mit je zwei Peptidbindungen. Im alkalischen pH-Bereich kommt es anschließend zur Reduktion der Ionen. Das Arbeitsreagenz beinhaltet Cu^{2+} in Form von CuSO_4 sowie eine basische Verbindung zur Einstellung des pH-Werts. Durch die Reaktion der Cu^{2+} -Ionen mit Proteinen werden Cu^{1+} -Ionen gebildet, die mit dem BCA einen Komplex bilden, dessen Konzentration anschließend mit Hilfe des Photometers bestimmt werden kann [112].

Nach Anleitung des Herstellers wurde das Arbeitsreagenz aus 25 Teilen Reagenz A, 24 Teilen Reagenz B und einem Teil Reagenz C des Assay-Kits hergestellt. Für die Kalibriergeraden wurden Verdünnungsreihen eines bovinen Serumalbumin BSA-Standards mit einer Konzentration von 2 mg/mL im Bereich von 0,1 mg/mL bis 0,00313 mg/mL mit den jeweils verwendeten Puffern hergestellt. Von jedem Überstand der Immobilisierung und jedem Standard wurden 150 μ L in den Reaktionsgefäßen einer 96er Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wurden jeweils 150 μ L des Arbeitsreagenzes mit einer Multipipette zugegeben und durch Rückpipettieren vermischt. Die Inkubation erfolgte bei 60°C für 30 min in einem Trockenschrank. Nach 5 min Abkühlen wurden die Ansätze bei 562 nm im Photometer ausgewertet. Die Masse an beladenem Enzym, bezogen auf das Partikelvolumen, wurde wie folgt berechnet (siehe Gleichung 3.4).

$$B_{\text{tat}} = (m_{\text{Enzym}} - m_{\text{Enzym,Ü}} - \sum_{W1}^{W3} m_{\text{Enzym,i}}) / V_{\text{Partikel}} \quad (3.4)$$

B_{tat} ist dabei die tatsächliche Enzymbeladung pro Partikelvolumen in g/L, m_{Enzym} die eingesetzte Enzymmasse in μ g, $m_{\text{Enzym,Ü}}$ die Masse an Enzym im Überstand in μ g, $m_{\text{Enzym,i}}$ die Masse an Enzym der Waschschrte W1-3 in μ g und V_{Partikel} das Volumen der Partikel in μ L.

3.8.3 Durchführung der Aktivitätsassays

Zunächst wurde die Aktivität der freien Enzyme gemessen. Die Aktivitätsassays der MEI wurden an dieser Stelle ebenfalls in Mikro-Reaktionsgefäßen durchgeführt, um die Aktivität der neu beladenen MEI zu bestimmen.

3.8.3.1 Aktivitätsbestimmung für immobilisierte Enzyme in Reaktionsgefäßen

Nachdem die immobilisierten Enzyme vom Lagerpuffer getrennt und in 10 μ L des entsprechenden Reaktionspuffers gegeben wurden, wurde diese Suspension und die entsprechende Reaktionslösung (siehe Tabelle 5) für 5 min auf die jeweilige Reaktionstemperatur vorgewärmt. Durch Zugabe der MEI-Suspension zur Reaktionslösung wurde der Test gestartet. Die Reaktion lief bei der zu untersuchenden Temperatur und 1400 rpm im Thermomixer ab. Das Schütteln bei 1400 rpm diente der Durchmischung der Reaktionslösung und verhindert, dass die Immobilisate aufgrund ihrer hohen Dichte sedimentieren und agglomerieren. Die genommenen Proben (siehe Tabelle 6) wurden in 1,5 mL-Reaktionsgefäße pipettiert und die Immobilisate unter Verwendung des Magnetständers vom Überstand getrennt. Der Überstand wurde in ein weiteres Reaktionsgefäß übertragen, in dem Acetonitril (ACN) mit dem gleichen Volumen wie die jeweilige Probe vorgelegt war, um eventuell gelöste oder nicht abgetrennte Enzyme zu inaktivieren. Nach 5 min Inkubation wurde das ACN bei 40°C für 10 min abgedampft. Eventuell denaturierte Proteine und nicht abgetrennte Partikel

wurden durch Zentrifugation bei 4°C und 10.000 rpm für 5 Minuten entfernt. Die Probe wurde anschließend entweder sofort analysiert oder bei -20°C eingefroren. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der immobilisierten Enzyme erfolgte als Dreifachbestimmung.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Reaktionspuffer, Temperatur und theoretische Beladung für die Aktivitätsassays der verwendeten Enzyme.

Enzyme	Pufferzusammensetzung	Temperatur (°C)	Theoretische Beladung (g/L)
UGDH	50 mM Tris (pH 8,7), 3 mM NAD ⁺ , 2 mM UDP-Glc, 5 mM DTT	30	10
NOX	50 mM KP (pH 6,5), 1 mM NADH, 1mM DTT	30	10
GalK	50 mM Tris (pH 7,5), 2 mM MgCl ₂ , 2 mM Gal, 2 mM ATP	37	15
USP	50 mM Tris 8 (pH 7,5), 4 mM MgCl ₂ , 2 mM Gal-1-P, 2mM UTP, 0,1 U PPase	37	15
GalT	100/25 mM HEPES/KCl (pH 7,5), 6,52 mM MnCl ₂ , 6,52 mM UDP-Gal, 5 mM GlcNAc-linker- <i>t</i> Boc, 1 U AP	30	15
GlcAT	100/25 mM HEPES/KCl (pH 6,5), 5 mM MnCl ₂ , 5 mM UDP-GlcA, 5 mM LacNAc-linker- <i>t</i> Boc, 5 mM DTT, 1 U AP	30	15

Tabelle 6: Parameter der Probennahmen.

Enzyme	Zeitpunkt der Probennahme (min)	Proben-Volumen (mL)
UGDH	1,3,5,7,10,15,30	25
NOX	1,3,5,7,10,15,30	25
GalK	1,3,5,7,10,15	40
USP	1,3,5,7,10,15	40
GalT	1,7,13,20,30	6
GlcAT	1,7,13,20,30	6

3.8.3.2 Ablauf für die freien Enzyme

Die Aktivitätsassays mit freien Enzymen entsprachen denen der entsprechenden immobilisierten Enzyme, jedoch mit dem Unterschied, dass keine Magnetpartikel abgetrennt werden mussten. Daher entfiel dieser Schritt. Zudem wurden die Lösungen nur bei 300 rpm durchmischt, da keine Partikel in Suspension gehalten werden mussten.

3.8.4 Bestimmung der Aktivität

3.8.4.1 Photometrische Bestimmung (UGDH und NOX)

Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität der Enzyme UGDH und NOX, wurden nach der Durchführung der Aktivitätsassays, die Konzentrationen an Coprodukt NADH in den Proben mittels photometrischer Bestimmung ermittelt. Dazu wurde die Absorption der Proben bei 340 nm gemessen. Um möglichst kleine Probevolumen messen zu können, wurden 384er Mikrotiterplatten verwendet. Diese ermöglichten ein Probevolumen von 20 μL zu analysieren. Mit folgenden Gleichungen (siehe Gleichung 3.5 – 3.7) konnten die spezifischen Aktivitäten berechnet werden.

$$A_{\text{vol,UV,frei}} = \text{Steigung} \left(\frac{dE_{340\text{nm}}}{dt} \right) * \frac{V_{\text{Ansatz}} * X}{V_{\text{Enzym}} * d * \varepsilon * \vartheta} \quad (3.5)$$

$$A_{\text{vol,UV,im}} = \text{Steigung} \left(\frac{dE_{340\text{nm}}}{dt} \right) * \frac{V_{\text{Ansatz}} * c_{\text{Enzym}}}{m_{\text{Enzym}} * d * \varepsilon * \vartheta} \quad (3.6)$$

$$A_{\text{spez}} = \frac{A_{\text{vol}}}{c_{\text{Enzym}}} \quad (3.7)$$

$A_{\text{vol,UV}}$ ist dabei die photometrisch bestimmte volumetrische Aktivität jeweils für das freie und immobilisierte Enzym in U/mL, $dE_{340\text{nm}}$ die Änderung der Absorption an NADH, dt die Änderung der Zeit in min, V_{Ansatz} das Volumen des Reaktionsansatzes in mL, X dem Verdünnungsfaktor, V_{Enzym} das Volumen der Enzymstammlösung in mL, d die Schichtdicke in cm, ε der Extension Koeffizient von NADH (6,2 ml/ $\mu\text{mol}/\text{cm}$) in ml/ $\mu\text{mol}/\text{cm}$, ϑ das stöchiometrische Verhältnis von NADH zum jeweiligen Produkt (UDP-GlcA = 2, NAD^+ = 1), m_{Enzym} die Masse an Enzym in mg, A_{spez} die spezifische Aktivität in U/mg, und c_{Enzym} die Konzentration der Enzymstammlösung in mg/mL. Eine Enzymeinheit U korreliert mit einem μmol Produkt pro Minute.

3.8.4.2 Bestimmung mittels HPLC (GalK, USP, GalT, GlcAT)

Für die Enzyme GalK, USP, GalT, GlcAT wurden die Proben der Aktivitätsassays mittels HPLC analysiert, um die spezifische Aktivität zu bestimmen. Auch für die Analyse des Umsatzes der einzelnen Enzymmodule der Reaktionskaskade wurde das HPLC-System genutzt. Durch Verwendung verschiedener Chromatographie-Säulen (Methoden siehe 7.2), konnten für alle Enzyme die Substrate und Produkte bzw. Cosubstrate und Coprodukte quantifiziert werden, ausgenommen Gal und Gal-1-P. Die Konzentration der Substrate / Cosubstrate und der Produkte / Coprodukte wurde durch das Verhältnis der jeweiligen Peakfläche zur Summe der beiden Peakflächen und der entsprechenden Eichkurve der Standards berechnet. Aus den resultierenden Konzentrationen wurde die Aktivität durch den Anstieg des Produkts im Laufe der Zeit berechnet. Die spezifischen Aktivitäten wurden wie folgt berechnet (siehe Gleichung 3.8 – 3.10).

$$c_{\text{Produkt}} = c_{\text{Substrat},0} * \frac{F_{\text{Produkt}}}{F_{\text{Produkt}} + F_{\text{Substrat}}} \quad (3.8)$$

$$A_{\text{vol,frei}} = \text{Steigung} \left(\frac{dc_{\text{Produkt}}}{dt} \right) * \frac{V_{\text{Ansatz}}}{V_{\text{Enzym}}} \quad (3.9)$$

$$A_{\text{vol,Im}} = \text{Steigung} \left(\frac{dc_{\text{Produkt}}}{dt} \right) * \frac{V_{\text{Ansatz}} * c_{\text{Enzym}}}{m_{\text{Enzym}}} \quad (3.10)$$

Hierbei ist c_{Produkt} die jeweilige Produktkonzentration in $\mu\text{mol/mL}$, $c_{\text{Substrat},0}$ die jeweils eingesetzte Substratkonzentration in $\mu\text{mol/mL}$, F_{Produkt} die Fläche des Produktpeaks, F_{Substrat} die Fläche des Substratpeaks, A_{vol} die volumetrische Aktivität jeweils für das freie und immobilisierte Enzym in U/mL , dc_{Produkt} die Änderung der Produktkonzentration in $\mu\text{mol/mL}$, dt die Änderung der Zeit in min , V_{Ansatz} das Volumen des Reaktionsansatzes in mL , V_{Enzym} das Volumen der Enzymstammlösung in mL und m_{Enzym} die Masse des Enzyms in mg .

3.8.5 Parameter- und Kinetikstudien, Rezyklierungstests und Synthesereaktionen im KMS

Um die Aktivität der Enzymartikel im KMS hinsichtlich pH, Temperatur und Beladung zu charakterisieren, die Substratkinetiken zu bestimmen, die Stabilität der MEI bei wiederholtem Einsatz zu untersuchen und die Synthesen mit optimierten Bedingungen durchzuführen, wurden die entsprechenden MEI in den Reaktionsschlauch des Systems gepumpt. Die MEI wurden mit dem Permanentmagnetarray von dem Lagerungspuffer getrennt, in $100 \mu\text{L}$ (Parameter- und Kinetikstudien), $300 \mu\text{L}$ (Rezyklierungstest) oder $200 \mu\text{L}$ (Synthesereaktion) eines vorerwärmten Reaktionspufferkompartiments resuspendiert und zu dem TKM befördert. Die verschiedenen Parameter, die getestet wurden, sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die Parameter, die nicht verändert wurden, waren dieselben wie in Tabelle 5 gezeigt. Für jeden Test wurden $15 \mu\text{g}$ immobilisiertes Enzym in einem $100 \mu\text{L}$ -Kompartiment verwendet und dafür die Konzentration der MEI in der Reaktionslösung entsprechend der Beladung angepasst. Die daraus resultierenden Konzentrationen der eingesetzten, immobilisierten Enzyme in mg pro L Reaktionslösung sind in Tabelle 8 mit den, für die freien Enzyme verwendeten Konzentrationen aufgelistet. Bei den verschiedenen Parametertests wurden die gleichen Konzentrationen verwendet, mit geringen Abweichungen. Um mögliche Auswirkungen der Enzymdeaktivierung zu vermeiden, wurden frische MEI der gleichen Charge in jedem Test verwendet, mit Ausnahme der Rezyklierungstests. Während der Tests wurden Proben der Reaktionslösung zu den gleichen Zeitpunkten, wie zuvor bei den Aktivitätsassays in Reaktionsgefäßen beschrieben (siehe Tabelle 6), genommen. Dazu wurde die Reaktionssuspension aus dem TKM über das Mehrwegeventil zu einem Auslassschlauch befördert und von dort das jeweilige Probenvolumen in ein Probengefäß gepumpt. Anschließend wurde die Reaktionssuspension zurück in das TKM befördert. Die Probengefäße befanden sich in einem Magnetständer, durch den die MEI vom Überstand getrennt wurden. Wie zuvor in 3.8.3.1 beschrieben, wurde

ACN zum Abstoppen der Reaktion hinzugefügt. Um den Einfluss verschiedener Temperaturen auf die spezifische Aktivität der MEI zu testen, wurde diese Temperaturen über die Software im TKM eingestellt. Für die Untersuchung der spezifischen Aktivitäten bei verschiedenen pH-Werten, Substratkonzentrationen oder Enzymbeladungen, wurden die jeweiligen Reaktionspuffer oder MEI-Suspensionen an das Mehrwege-Einlassventil angeschlossen und bei Bedarf in das System gepumpt. Die kinetischen Konstanten wurden mit der Software Sigma Plot 11 berechnet, die der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 3.11) bzw. der Michaelis-Menten-Gleichung für Substratinhibierung (Gleichung 3.12) entsprach.

$$v = v_{\max} * [S] / (K_m + [S]) \quad (3.11)$$

$$v = v_{\max} / \left(1 + K_m/[S] + [S]/K_i\right) \quad (3.12)$$

v ist die Umsatzgeschwindigkeit in U/mg, v_{\max} die maximale Umsatzgeschwindigkeit in U/mg, $[S]$ die Substratkonzentration in mM, K_m die Michaelis-Konstante in mM und K_i die Inhibierungskonstante in mM.

Bei den Rezyklierungstests wurden mehrere Aktivitätsassays mit den gleichen MEI durchgeführt. Zwischen den Reaktionszyklen wurden die MEI abgetrennt und dreimal mit je 200 μ L Reaktionspuffer gewaschen. Danach wurden sie in einer neuen Reaktionslösung resuspendiert und für den nächsten Zyklus in das TKM befördert. Für diese Versuchsreihe wurde das dreifache Volumen an Reaktionslösung und MEI-Suspension eingesetzt. Für die Synthesereaktionen wurden die Produkt- und Substratkonzentrationen, wie in 3.8.4.2 beschrieben, ermittelt. Für die Synthesereaktion von UDP-GlcA wurden 213-438 mg/L immobilisierte UGDH mit einer theoretischen Beladung von 10-30 g/L und 13-62 mg/L der 10 g/L immobilisierte NOX eingesetzt. Die Reaktionslösung setzte sich zusammen aus 50 mM Tris (pH 8,7) als Puffer, 5 mM DTT, sowie 1-2 mM UDP-Glc und 2-4 mM NAD^+ . Die Reaktionstemperatur betrug stets 37°C.

Tabelle 7: Für die Parameter- und Kinetikstudien variierte Parameter.

Enzyme	Beladung (g/L)	Temperatur (°C)	pH	Substratkonzentration (mM)
UGDH	2,5/10/30/50	30/35/40/45	7/7,5/8/8,7/9,5/10	UDP-Glc: 0,025 – 4 NAD ⁺ : 0,05 – 4
NOX	2,5/10/30/50	25/30/35/40	5,5/6/6,5/7/7,5/8/8,7	NADH: 0,05 – 1,5
GalK	5/10/15/50	30/37/45	7/7,5/8	Gal: 0,5 – 8 ATP: 0,5 – 8
USP	5/10/15/50	30/37/45	7/7,5/8	Gal-1-P: 0,5 – 8 UTP: 0,5 – 8
GalT	5/10/15/30/50	25/30/35/40	6,5/7,5/8,5	GlcNAc-linker- <i>t</i> Boc: 0,5 – 5 UDP-Gal: 0,25 – 6,52
GlcAT	5/10/15	25/30/35/40/45/50	5,5/6,5/7,5/8,5	LacNAc-linker- <i>t</i> Boc: 0,25 – 10 UDP-GlcA: 0,25 – 10

Tabelle 8: Für die Parameter- und Kinetikstudien eingesetzte Konzentration an immobilisierten und freien Enzymen in mg immobilisiertes/freies Enzym pro L Reaktionslösung.

Enzyme		UGDH	NOX	GalK	USP	GalT	GlcAT
Konzentration (mg/L)	immobilisiert	22,8	4,2	16,7	16,7	210	256
	frei	16,5	16,5	6,7	13,3	50	20

3.8.6 Bestimmung der Temperaturstabilität der immobilisierten Enzyme

Im Verlauf der Parameterstudie der immobilisierten und freien Enzyme, wurde bei der Untersuchung der optimalen Temperatur auch die Stabilität der Enzyme gegenüber Temperaturen, die über dem Optimum liegen, getestet. Dazu wurde nach der letzten Probenahme erneut Substrat zugegeben und das Assay um 20 min verlängert. Anschließend wurde entweder direkt nach der Zugabe (UGDH, NOX, GalT, GlcAT), oder 5 min danach (GalK, USP) die erste Probe genommen. Die Menge an zugegebenem Substrat und Cosubstrat wurde so gewählt, dass die jeweilige Anfangskonzentration eingestellt wurde. Diese entsprach der ursprünglichen Konzentration vor der ersten Probenahme.

3.8.7 Reaktionskaskade mit MEI im KMS, mit freien Enzymen und Simulation der Reaktionskaskade

Mit den optimierten Reaktionsparametern wurden die MEI aller Enzymmodule in einer Reaktionskaskade kombiniert (siehe Abbildung 22), die im KMS durchgeführt wurde. Dabei wurde als Endprodukt das nicht-sulfatierte HNK-1 Epitop synthetisiert. Der

Ablauf der Reaktionskaskade war wie folgt: Zunächst wurde das EM UDP-GlcA durchgeführt. Da UDP-Gal als Glykosyldonor für GalT verwendet werden kann, wurden EM UDP-Gal und EM GalT kombiniert. Durch die Übertragung von Gal von UDP-Gal auf GlcNAc-linker-*t*Boc wurde das LacNAc-linker-*t*Boc gebildet. Im EM GlcAT wurde schließlich das GlcA des zuvor im EM UDP-GlcA produzierten UDP-GlcA auf das LacNAc-Linker-*t*Boc transferiert, wodurch das nicht-sulfatierte HNK-1 Epitop synthetisiert wurde. Anorganische Pyrophosphatase (PPase) und alkalische Phosphatase (AP) wurden verwendet, um die hemmenden Nebenprodukte Pyrophosphat und UDP zu entfernen.

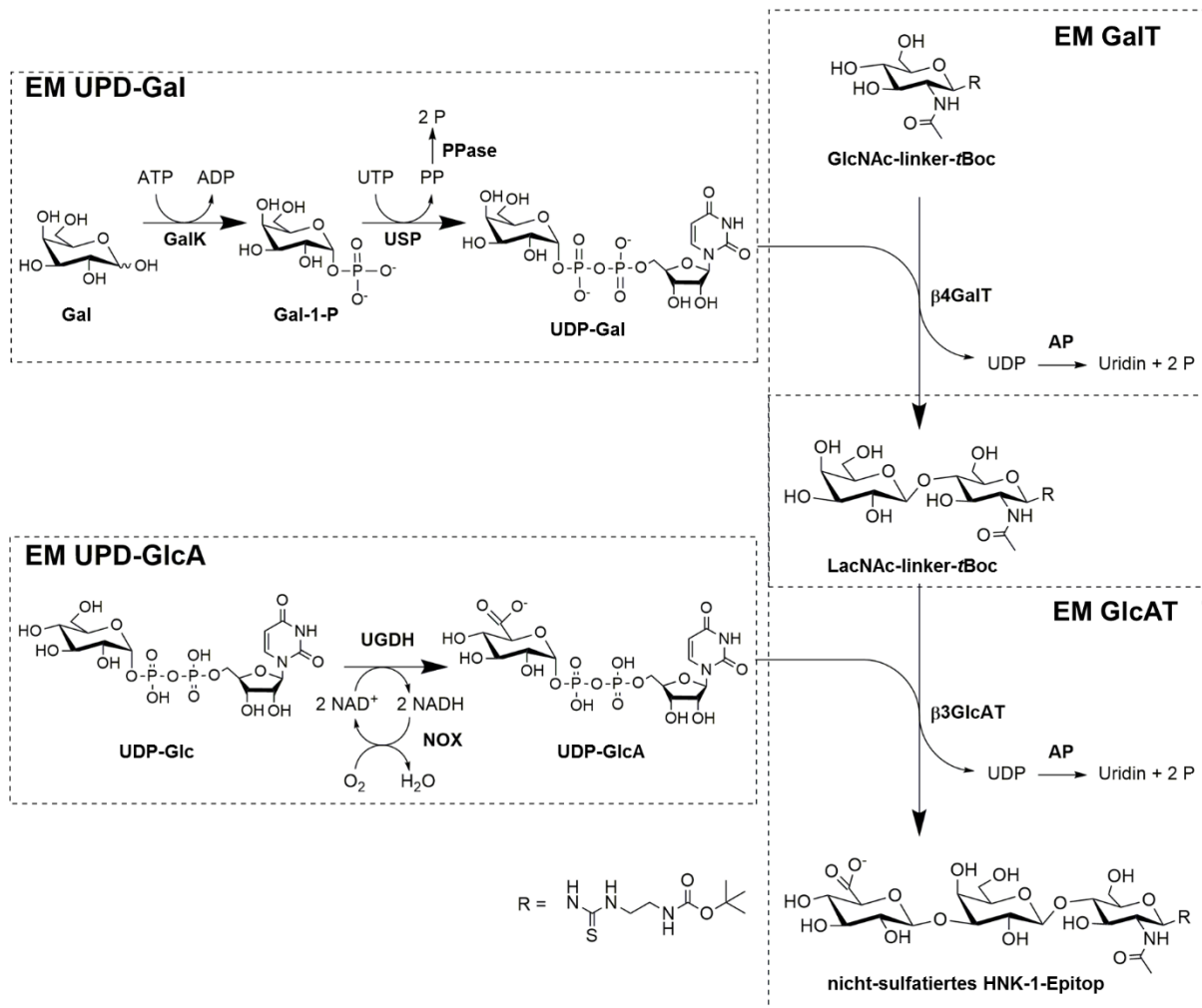


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Enzymkaskade zur Herstellung des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops.

Dieser Ablauf der Reaktionskaskade wurde im KMS realisiert, indem in zwei Schläuchen des TKM die Reaktionen bei 37°C in 150 µL Kompartimenten durchgeführt wurden (siehe Abbildung 23). Dabei wurde das EM UDP-GlcA parallel zu dem Produktionsmodul EM UDP-Gal/EM GalT für 150 min verwendet. Bei dem Produktionsmodul EM UDP-Gal/EM GalT wurde zuerst das EM UDP-Gal für 90 min und anschließend das EM GalT für 60 min eingesetzt. Die MEI des EM UDP-Gal (GalK und USP) wurden nach den 90 min im MFM von der Reaktionslösungen des Produktionsmodul EM UDP-Gal/EM GalT separiert, in Reaktionspuffer resuspendiert

und abtransportiert. Anschließend wurden die MEI mit GalT im MFM nach Abtrennung der Lagerlösung, die 1 U/ μ L AP enthielt, in der Reaktionslösung des Produktionsmodul EM UDP-Gal/EM GalT resuspendiert. Da bei der Separation der MEI von einer Lösung immer ein Rest der Lösung zurückbleibt, konnte so die AP der Reaktionslösung hinzugefügt werden. Für die 60-minütige Reaktion wurde die Reaktionssuspension in das TKM befördert. Nach 150 min wurden die Reaktionslösungen beider Schläuche zu den MEI des EM GlcAT gegeben und weitere 60 min synthetisiert. Es wurden verschiedene Mischungsverhältnisse der MEI und Substratkonzentrationen untersucht, um die Produktausbeute zu erhöhen. Dabei wurden die Substratkonzentrationen zwischen 2 – 4 mM und die Konzentrationen der immobilisierten UGDH und NOX von 0,4 – 1 μ g/ μ L, die der GalK und USP von 0,2 – 0,5 μ g/ μ L und die der GalT und GlcAT von 0,1 – 0,5 μ g/ μ L variiert. Die entsprechenden, quasi optimierten, Reaktionslösungen sind in Tabelle 15 und Tabelle 16 zu finden.

3.8.7.1 Vergleich mit einer Simulation und freien Enzymen in Reaktionsgefäßen

Als Kontrolle wurde ein Experiment mit der gleichen parallelen Reaktionssequenz und der gleichen Zusammensetzung der Reaktionslösungen wie für die MEI im KMS beschrieben, mit der gleichen Menge an freien Enzymen durchgeführt. Die freien Enzyme wurden nach und nach den Reaktionslösungen für jedes EM zugegeben. Auch wurde mit der Software SimBiology eine Simulation der Reaktionskaskade mit den MEI im KMS durchgeführt. Hierfür wurden die Ergebnisse aus der Kinetikstudie als Grundlage verwendet. Die eingesetzten Substratkonzentrationen und der Prozessablauf, waren dieselben wie für das Experiment mit den MEI im KMS.

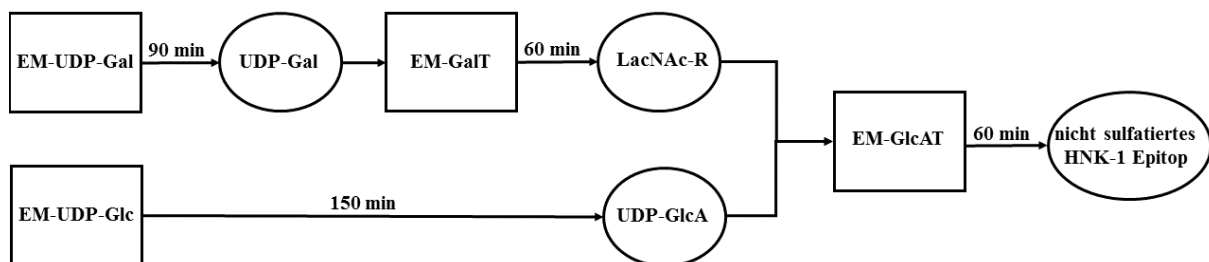


Abbildung 23: Flussdiagramm der Enzymreaktionskaskade im KMS.

4 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel sind die wichtigsten Ergebnisse, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielt wurden, dargestellt und werden diskutiert. Die Ergebnisse werden dabei mit dem aktuellen Stand der Technik und Wissenschaft verglichen.

4.1 Charakterisierung des kompartimentierten Mikroreaktorsystems (KMS)

Im folgenden Unterkapitel werden die Ergebnisse der Charakterisierung und Validierung des erweiterten KMS erläutert.

4.1.1 Pluggenerierung

Das reproduzierbare Erstellen von stabilen Plugs stellt eine der Basisaufgaben des KMS da. Dabei gilt, je geringer die Volumenschwankungen der Plugs, desto robuster die Pluggenerierung. Da in den verwendeten Schläuchen mit 1/4" und 1/2" Außendurchmesser andere Drücke, Kapillarkräfte und Grenzflächenspannungen der Plugs herrschen, als in den zuvor verwendeten 1/16" AD und 1/8" AD-Schläuchen, wurden die Pluggenerierung mit verschiedenen, zum Teil bereits eingesetzten und zum Teil noch nicht verwendeten, Separationsfluiden untersucht. Dabei handelte es sich um die organischen Lösungsmittel Anisol, Cyclohexan, Ethylacetat, n-Decan, n-Hexan und Perflourhexan (FC72) sowie Silikonöl mit einer Viskosität von 5 cSt und Rapsöl. Im Folgenden werden nur die Ergebnisse mit Ethylacetat und Anisol erläutert, da diese die geringsten Gesundheitsrisiken aufweisen und eine Plugbildung mit den beiden Ölen nicht möglich war. Bei dem Reaktionsschlauch mit einem Außendurchmesser von 1/2" stellte sich bei Versuchen mit Ethylacetat zunächst heraus, dass die Kapillarkräfte nicht mehr ausreichten, um einen stabilen Plug zu generieren. Durch die Dichteunterschiede zwischen wässriger und organischer Phase stellte sich ein Zweiphasensystem mit einer Trenngrenze in vertikaler statt der gewünschten horizontalen Richtung ein. Daher wurde ein organisches Lösungsmittel gewählt, dessen Dichte sehr nahe an der von Wasser liegt. Anisol weist eine Dichte von 995 kg/m³ auf, und ermöglichte damit die Bildung von Plugs in dem 1/2" AD-Reaktionsschlauch.

In Abbildung 24 ist für verschiedene Fließgeschwindigkeiten und für verschiedene Zielvolumina die Verteilung der Volumina der experimentell generierten Plugs dargestellt. In dem Schlauch mit 1/4" Außendurchmesser wurden Plugs mit Ethylacetat (EtOAc) und Anisol als Separationsfluid bei Fließgeschwindigkeiten von 0,02 mL/s, 0,1 mL/s, und 0,2 mL/s und mit Volumina von 0,03 mL, 0,24 mL und 0,45 mL generiert. Die relativen Standardabweichungen der Plugvolumina für Plugs mit einem Volumen von 0,45 mL und 0,24 mL, die mit EtOAc als Separationsfluid erstellt wurden (siehe Abbildung 24A), lagen bei allen Fließgeschwindigkeiten unter 3,2%. Vor allem bei geringen Fließgeschwindigkeiten konnten die Plugs mit höheren Volumina am stabilsten erzeugt werden. Die auftretenden Abweichungen werden vermutlich durch

die geringere dynamische Viskosität von EtOAc (0,451 mPa·s bei 20 °C laut Hersteller) gegenüber der dynamischen Viskosität von Wasser verursacht. Der insbesondere bei höheren Fließgeschwindigkeiten durch die Spritzenpumpe erzeugte Unterdruck im Schlauch könnte hierdurch bei Schaltvorgängen bevorzugt durch EtOAc ausgeglichen werden, wodurch mehr EtOAc und weniger wässrige Lösung in den Schlauch transportiert wird. Dadurch würden wässrige Reaktionsplug mit geringerem Volumen entstehen. Durch eine Verringerung der Plugvolumina auf 0,03 mL, verschlechterte sich die Reproduzierbarkeit mit einer relativen Standardabweichung der Plugvolumina von durchschnittlich etwa 22% bei allen Fließgeschwindigkeiten. Bei größeren Plugvolumina verursachen die während der Schaltvorgänge erzeugten Fehler geringe relative Abweichungen. Da in dem erweiterten KMS größere Plugvolumina als in dem alten System (Plugvolumina bis zu 50 µL) eingesetzt werden sollten, stellt EtOAc ein geeignetes Separationsfluid für den 1/4" AD-Reaktionsschlauch da.

Im Falle von mit Anisol getrennten Plugs (siehe Abbildung 24B), lagen die relativen Standardabweichungen bei allen Plugvolumina und Fließgeschwindigkeiten unter 8,5%, mit Ausnahme von Plugs, die mit der geringsten Fließgeschwindigkeit von 0,02 mL/s generiert wurden. Bei dieser Fließgeschwindigkeit lagen die relative Standardabweichung bei fast dem doppelten Wert. Die stabilste Pluggenerierung mit Anisol war mit 2% relativer Standardabweichung für das höchste Volumen von 0,45 mL Plugs bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,1 mL/s möglich. Dies könnte daran liegen, dass das höhere Volumen Fehler durch z.B. dem bereits angesprochenen Unterdruck und der, im Fall von Anisol, höheren dynamischen Viskosität (1,42 mPa·s bei 15 °C laut Hersteller), besser ausgleicht. Da mit EtOAc als Separationsfluid die Pluggenerierung durchschnittlich stabiler und genauer war und da Anisol eine starke Geruchsbildung aufweist, wurde fortan EtOAc als Separationsfluid in dem 1/4" AD-Reaktionsschlauch verwendet.

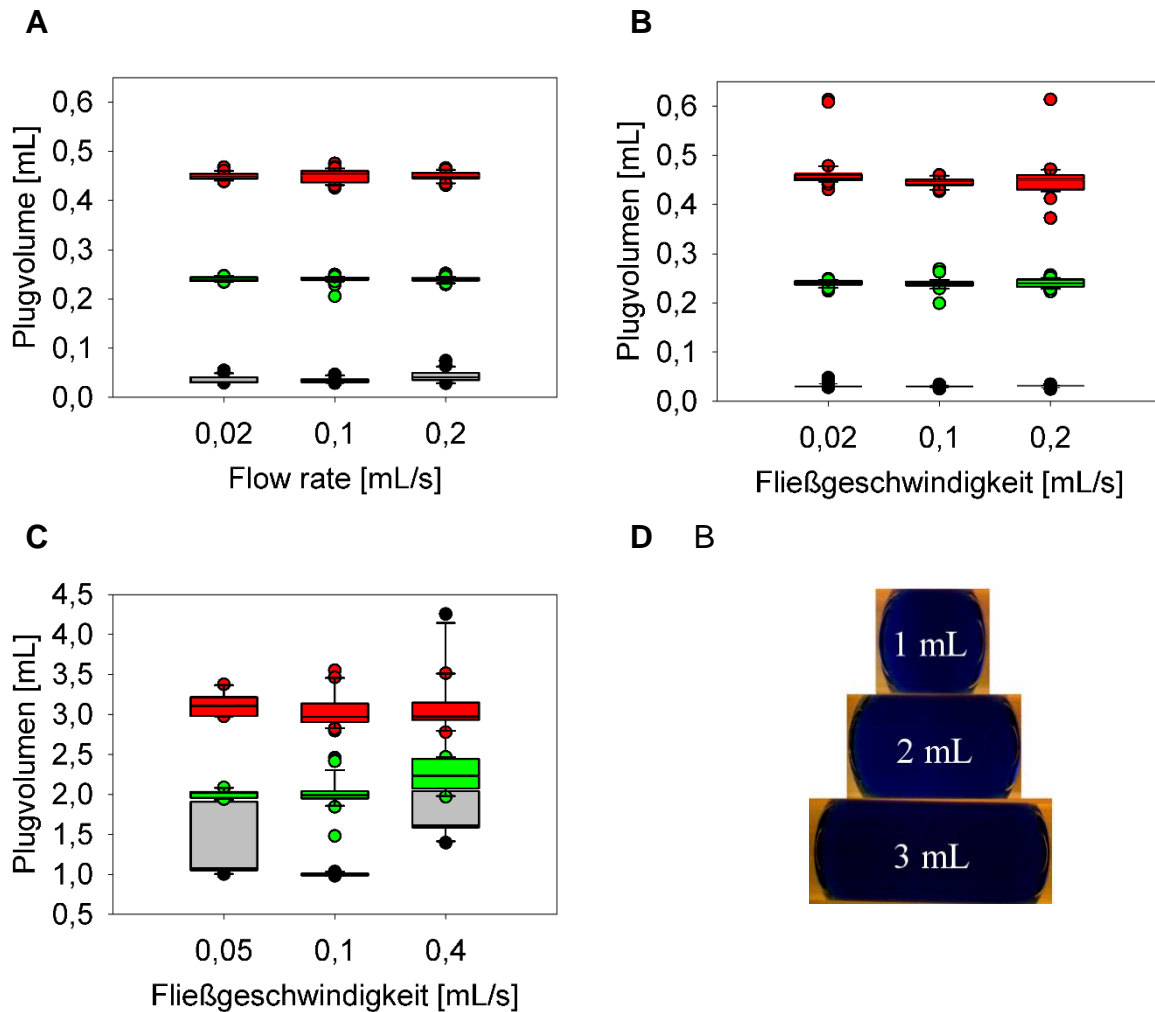


Abbildung 24: Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Pluggenerierung in Abhängigkeit des verwendeten Separationsfluids, des Schlauchdurchmessers, der Fließgeschwindigkeit und des Plugvolumens. In den Graphen (A) und (B) sind die Ergebnisse der Pluggenerierung in einem 1/4" AD-Schlauch dargestellt, in dem die Plugvolumina auf 0,03 mL (grau), 0,24 mL (grün) und 0,45 mL (rot) eingestellt wurden. Die Plugs wurden durch (A) Ethylacetat und (B) Anisol getrennt und bei Flussraten im Bereich von 0,02-0,2 mL/s generiert. In der Graphik (C) sind die Pluggrößenverteilungen in einem 1/2" AD-Schlauch gezeigt, in welchem die Plugvolumina 1 mL (grau), 2 mL (grün) und 3 mL (rot) betragen. Die Plugs wurden mit dem Separationsfluid Anisol bei Fließgeschwindigkeiten von 0,05-0,4 mL/s erstellt. Bilder der mit 0,1% v/v Tinte gefärbten Plugs mit einem Volumen von 1 mL, 2 mL und 3 mL, die mit der im KMS integrierten Kamera aufgenommen wurden, sind in (D) zu sehen.

In dem 1/2" AD-Schlauch wurde Anisol verwendet, um Plugs bei 0,05 mL/s, 0,1 mL/s und 0,4 mL/s mit 1 mL, 2 mL und 3 mL zu erstellen (siehe Abbildung 24C). In Abbildung 24D sind Fotografien der 1 mL, 2 mL und 3 mL Plugs zu sehen, die für die Untersuchung mit 0,1% v/v blauer Tinte eingefärbt wurden. Die relativen Standardabweichungen der Plugs mit hohen Volumen von 2 mL und 3 mL lagen bei allen Fließgeschwindigkeiten unter 10%. Die Erzeugung von Plugs mit dem geringsten Volumen bei der geringsten und höchsten Fließgeschwindigkeit war schlecht reproduzierbar, mit relativen Standardabweichungen der Plugvolumina von 30% und 46%. Hier kam es oft zur Zusammenführung zweier Plugs. Bei der mittleren

Fließgeschwindigkeit von 0,1 mL/s konnten jedoch mit den 1 mL Plugs die beste Reproduzierbarkeit der Pluggenerierung, mit einer relativen Volumenstandardabweichung von nur 1,5%, erreicht werden, mit Ausnahme einer Messung. Bei der Generierung der Plugs mit geringem Volumen bei hohen und niedrigen Fließgeschwindigkeiten, wurde häufig beobachtet, dass es bei den Übergängen der Schläuche zu einer Zusammenführung der Plugs kam. Hier könnten die Abweichungen vom laminaren Strömungsprofil aufgrund der Änderung des Schlauchdurchmesser eine Rolle spielen, ebenso die bereits angesprochene Differenz der dynamischen Viskosität der Fluide. Um das Zusammenführen kleiner Plugs zu verhindern, wurde fortan, bei der Bildung von 1 mL Plugs, das Volumen der Separationsplugs aus Anisol auf 2 mL verdoppelt. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine gute Genauigkeit und Volumenreproduzierbarkeit der Pluggenerierung zwischen 0,24 und 3 mL, wenn bei deren Erzeugung entsprechende Fließgeschwindigkeiten verwendet werden.

4.1.2 Partikelverteilung in 1/4“ AD und 1/2“ AD-Schläuchen

Für den Einsatz von Magnetpartikeln im KMS sind deren Resuspendierung und Verteilung im Plug nach einer Separation durch das Permanentmagnetarray wichtige Faktoren. Eine gute Verteilung führt im Falle der in dieser Arbeit untersuchten Anwendung der Partikel als Enzymträger dazu, dass die Substratverfügbarkeit pro immobilisiertes Enzym steigt, was in höheren Aktivitäten resultiert. Auch eine gute Durchmischung spielt eine wichtige Rolle, da diese einen Einfluss auf die Häufigkeit der Begegnungen zwischen Enzymen und Substrat hat. Die Magnetpartikel in den Plugs wurden daher kontaktlos durch ein magnetisches Wechselfeld bewegt, das mittels eines Helmholtzspulen-Paars erzeugt wurde. Je höher die angelegte Stromstärke war, desto stärker war das Magnetfeld und desto besser konnten die Magnetpartikel bewegt werden. Aber auch die Temperatur der Spulen steigt mit der Stromstärke. Trotz Kühlung der Spulen konnten maximal 3 A über einen längeren Zeitraum angelegt werden. Im Verlauf der Versuche stellte sich heraus, dass eine sinusförmige Anregung des Helmholtzspulenpaars mit einer 90° Phasenverschiebung zwischen den beiden Spulen zu einer Rotationsbewegung der Magnetpartikel und einer Translation entlang der Achse des Reaktionsschlauchs führte. Dadurch konnte die beste Verteilung und Durchmischung erzielt werden. Für die Untersuchungen wurde mit der, senkrecht über dem Reaktionsschlauch installierten, Kamera alle 3 s Bilder aufgenommen. In Abbildung 25 sind exemplarische Bilder der separierten und vollständig verteilten Magnetpartikel in den 1/4“ AD und 1/2“ AD-Reaktionsschläuchen dargestellt. Die, mit Magnetpartikeln bedeckte, Plugfläche war dabei das Maß für die Verteilung im Plug. Neben der Stromstärke hatte die Frequenz der Sinusspannung den größten Einfluss auf die Verteilung der Magnetpartikel. Daher wurde mit Frequenzen in dem 1/4“ AD-Schlauch von 10 mHz bis 10 Hz in einem 0,45 mL Plug und im 1/2“ AD-Schlauch von 10 mHz bis 1 Hz in einem 2 mL Plug getestet, ob und wie schnell die Magnetpartikel im Plug vollständig verteilt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 für den 1/4“ AD-Schlauch (A) und 1/2“ AD-Schlauch (B) graphisch

dargestellt. Man erkennt, dass in dem 1/4" AD-Schlauch bei der geringsten Frequenz von 10 mHz die Verteilung am langsamsten ist und maximal knapp 64% der Plugfläche bedeckt wird. Bei einer Frequenz von 1 Hz waren nach 3 s zwar zunächst nur ca. 38% der Plugfläche bedeckt, dafür wurden nach 6 s schon etwa 84% erreicht. Die Partikelverteilung lief bei 1 Hz nach den ersten 3 s generell am schnellsten ab und konnte mit fast 100% bedeckter Plugfläche nach der gesamten Untersuchungsdauer von 27 s auch den höchsten Wert erzielen. Bei der höchsten Frequenz von 10 Hz und auch bei 100 mHz war am Ende der Testzeit fast 98% der Plugfläche bedeckt. Also konnten in knapp 30 Sekunden mit 100 mHz, 1 Hz und 10 Hz die Partikel fast vollständig im Plug verteilt werden.

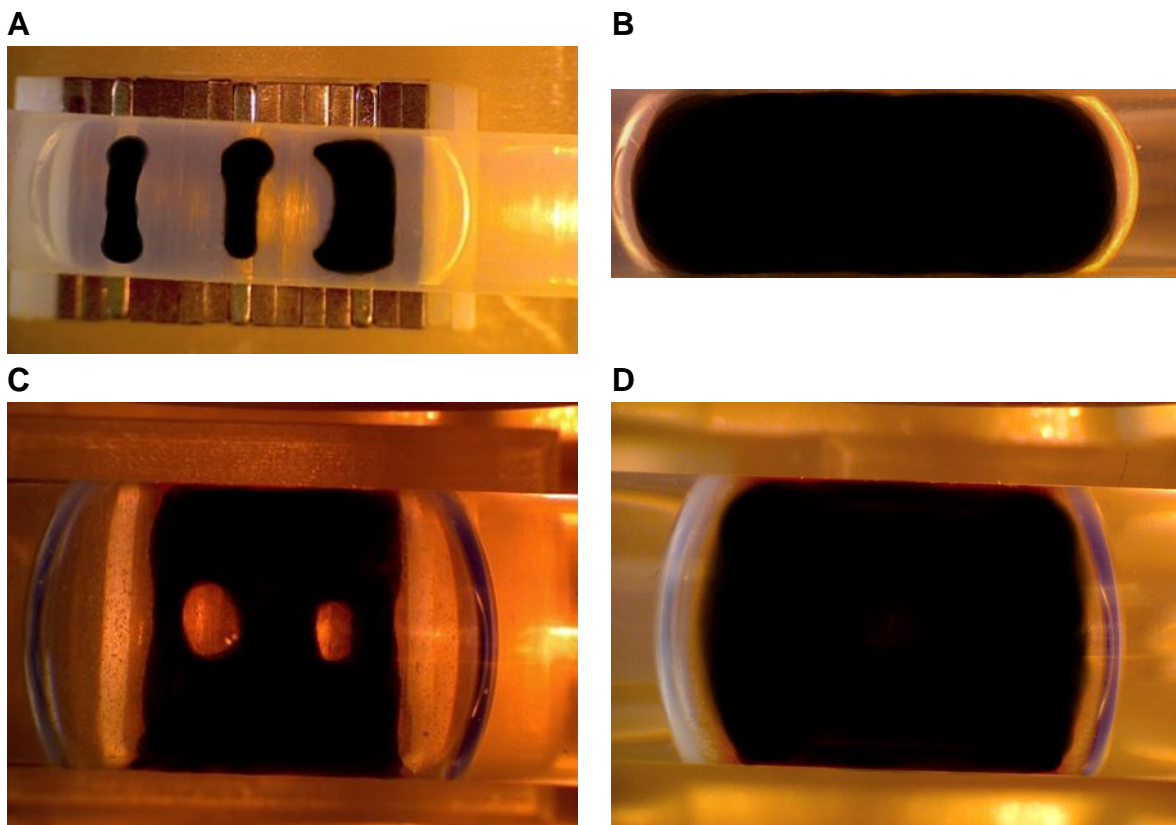


Abbildung 25: Resuspendierung der Magnetpartikel in den (A)/(B) 1/4" AD und (C)/(D) 1/2" AD-Reaktionsschläuchen. Die Bilder zeigen die Magnetpartikel im (A)/(C) separierten und (B)/(D) vollständig verteilten Zustand.

Bei der Partikelverteilung in dem 1/2" AD Schlauch in Abbildung 26B fällt auf, dass ebenfalls bei 10 mHz die Plugfläche am langsamsten und wenigsten bedeckt wird. Auch ist wieder ein ähnlicher Kurvenverlauf bei 100 mHz und 1 Hz zu erkennen. Da mit 10 Hz in Vorversuchen keine guten Ergebnisse im 2 mL Plug erzielt wurden, wurden bei dieser Frequenz keine weiteren Untersuchungen durchgeführt. Bei den Frequenzen 100 mHz und 1 Hz waren nach den ersten 3 s etwa 45% und 40% der Plugfläche bereits bedeckt. Nach weiteren 24 s lagen die Werte mit 100 mHz bei ca. 96% und mit 1 Hz bei 90%. Diese Versuche wurden weitergeführt, bis nach insgesamt 36 s mit 100 mHz fast 99% der Plugfläche bedeckt war und mit 1 Hz etwa 97%.

Die Verläufe der Partikelverteilung, die einer Sättigungskurve ähneln, sind vermutlich auf die Geometrie der Plugs zurückzuführen. In dem zylindrischen Teil des Plugs können die Partikel zunächst schnell verteilt werden. In die halbkugelförmigen Bereiche am Anfang und Ende des Plugs können die Partikel mit der Bewegung durch das Magnetfeld nicht so schnell vordringen. Zudem scheint eine gewisse Geschwindigkeit der Magnetpartikel durch eine Frequenz höher als 10 mHz nötig zu sein, damit sie in die äußeren Bereiche des Plugs verteilt werden. Dies könnte an der Größe und Masse der Partikel liegen, wodurch sie ohne ein auf sie wirkendes Magnetfeld schnell sedimentieren. Da bei einer schnelleren Durchmischung vermutlich größere Scherkräfte auf die Partikel und den später darauf immobilisierten Enzymen wirken, wurde für die weiteren Versuche die Frequenz 100 mHz verwendet.

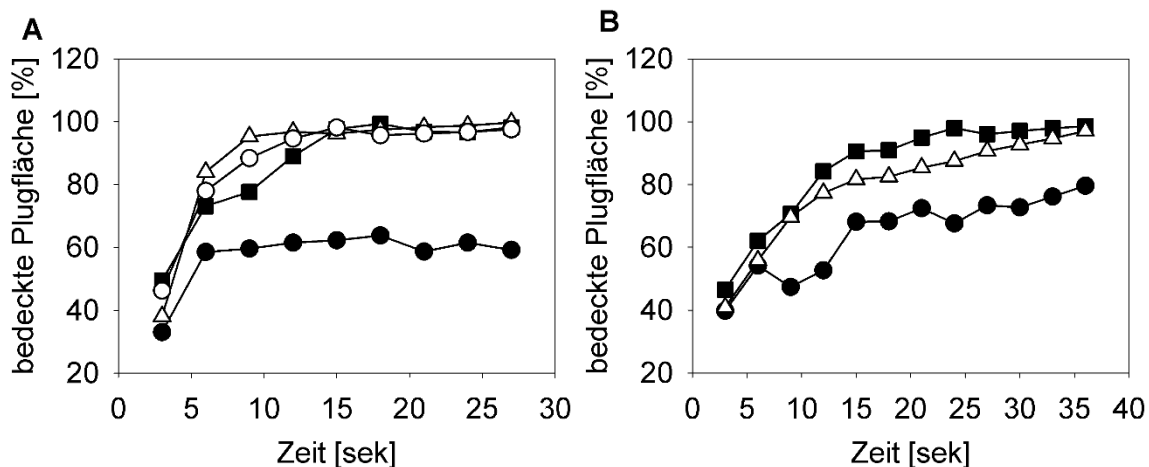


Abbildung 26: Frequenzabhängigkeit der Partikelverteilung. Es sind für (A) 1/4" AD und (B) 1/2" AD-Schläuche die mit Partikel bedeckte Plugfläche über die Zeit aufgetragen. Dabei wurde die Frequenzen (-●-) 10 mHz, (-■-) 100 mHz, (-△-) 1 Hz und (-○-) 10 Hz untersucht.

4.2 Magnetische Enzymimmobilisate (MEI)

Ziel der in diesem Kapitel vorgestellten und diskutierten Arbeiten war es, mit den MEI im KMS eine Reaktionskaskade durchzuführen. Dafür wurde zunächst die Beladung der Magnetpartikel mit den verschiedenen Enzymen charakterisiert und optimiert. Mit Hilfe von Angaben aus der Literatur wurden für jedes immobilisierte Enzym Aktivitätsassays mit den MEI entwickelt. Anschließend wurde die katalytische Aktivität jedes immobilisierten Enzyms bei verschiedenen Reaktionsparametern bestimmt, um optimale Reaktionsbedingungen zu ermitteln. Mit diesen Resultaten wurden die MEI zunächst in den sogenannten Enzymmodulen (siehe 3.5.1) kombiniert, um durch das Zusammenspiel verschiedener Enzyme selektive Teilreaktionen, wie z.B. eine UDP-Galaktose-Synthese, zu erreichen. Diese Enzymmodule wurden final im KMS zu einer Enzymkaskade verknüpft.

4.2.1 Beladung

Die im KMS einzusetzenden Enzyme mussten zunächst auf magnetische Trägerpartikel immobilisiert werden. Da die rekombinanten Enzyme für die Aufreinigung mit einem His₆-Tag versehen waren, wurde als Kupplungsmethode die Affinitätsbindung der His₆-Tags an Chelatkomplexe auf den Partikeln gewählt. Darüber hinaus verspricht diese gerichtete Immobilisierung höhere Enzymaktivitäten als, z.B. eine kovalente Bindung durch Carbodiimide (EDC) [113]. Eine Kenngröße für eine erfolgreiche Immobilisierung der Enzyme ist die Beladungsausbeute. Sie beschreibt den Anteil der eingesetzten Enzyme, welche an die Magnetpartikel gebunden haben, in Bezug auf die eingesetzte Menge.

In Tabelle 9 ist eine Übersicht der Beladungsausbeuten für die am häufigsten verwendeten Beladungen aufgelistet. Für UGDH und NOX schwankten die Beladungsausbeuten im Bereich zwischen 56% und 80%. Beladungsausbeuten bei GalT und GlcAT lagen etwa im gleichen Bereich von 71% - 88%. Die Immobilisierung von GalK und USP führte zu Beladungsausbeuten von fast 100%. Die Reproduzierbarkeit der Immobilisierung von UGDH und NOX war mit Standardabweichungen von knapp 20% und 30% für beide Enzyme bei einer Beladung von 50 g/L am schlechtesten. Dagegen waren die Beladungsausbeuten bei allen anderen Enzymen mit Standardabweichungen teilweise deutlich unter 10%, gut reproduzierbar. Bezüglich einer Korrelation zwischen Beladungsausbeute und Beladung, ist bei allen Enzymen kein eindeutiger Trend zu erkennen. Es wäre bei allen Enzymen eine Abnahme der Beladungsausbeute mit zunehmender Beladung zu erwarten gewesen, da die Anzahl der freien Bindungsstellen abnimmt. Auch die sterische Hinderung durch die Struktur der Enzyme selbst oder durch die Positionierung auf der Oberfläche nach der Immobilisation, müsste mit ansteigender Beladung zunehmen, wodurch Bindungsstellen schwer zugänglich für ungebundene Enzyme werden. Da die meisten Beladungswerte noch weit von der, vom Hersteller angegebenen, maximalen Bindungskapazität (70 g/L) entfernt sind, treten diese Effekte und die erwartete Abnahme der Beladung womöglich nicht auf. Schwankungen der Beladungsausbeute könnten an den verschiedenen verwendeten Enzymbatches liegen, bei welchen z.B. die Enzymkonzentrationen abwichen.

Tabelle 9: Beladungsausbeuten aller untersuchten immobilisierten Enzyme.

	UGDH	NOX	GalK	USP	GalT	GlcAT
2,5 g/L	64% ± 8%	56% ± 9%	93% ± 4%	96% ± 2%	n.b.	n.b.
5 g/L	67% ± 2%	67% ± 13%	96% ± 1%	94% ± 3%	80% ± 2%	85%
10 g/L	58% ± 7%	63% ± 10%	93% ± 3%	93% ± 1%	71% ± 2%	78% ± 5%
15 g/L	n.b. ^a	n.b.	94%	91%	71% ± 3%	73%
30 g/L	56% ± 7%	70% ± 6,5%	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
50 g/l	64% ± 19%	80% ± 29%	87% ± 7%	94% ± 5%	88% ± 7%	88% ± 9%

^a nicht bestimmt

4.2.1.1 Schlussfolgerung

Es konnte für alle verwendeten Enzyme die Beladungsausbeuten in einem großen Bereich bestimmt werden. Für alle Enzyme hatte im untersuchten Bereich die Menge an Enzym, die immobilisiert wird, keinen signifikanten Einfluss auf die Beladungsausbeute. Somit konnte in den nachfolgenden Experimenten die Beladung im untersuchten Bereich frei gewählt werden. Es zeigte sich, dass die Enzyme eines jeweiligen Enzymmoduls ähnliche Beladungsausbeuten erreichten. Dagegen unterschieden sich die Beladungsausbeuten zwischen den EM teilweise um mehr als 40%. Da meist die Enzyme eines Enzymmoduls gemeinsam geliefert und dadurch zeitgleich untersucht wurden, könnte dies die Ursache sein.

4.2.2 Parameterstudien

Für jedes immobilisierte Enzym wurde zunächst, basierend auf Parameterstudien aus der Literatur, Aktivitätsassays in Mikro-Reaktionsgefäßen (2 mL) entwickelt. Mit diesen konnten die massenspezifischen Aktivitäten in Enzymeinheit U pro mg immobilisiertem Enzym ermittelt werden. Ein U korreliert mit einem μmol Produkt pro Minute. Um die optimalen Reaktionsbedingungen der MEI zu bestimmen, wurden die Einflüsse der Parameter Beladung, pH-Wert, Temperatur und Substratkonzentration auf die spezifische Enzymaktivität halb automatisiert im KMS untersucht. Soweit es möglich war, wurden diese Tests auch mit den freien Enzymen als Referenz in Eppendorfgefäßen durchgeführt. Für einen besseren Vergleich der Einflüsse der Parameter auf die spezifischen Aktivitäten der MEI, wurde die relative spezifische Aktivität ($A_{\text{rel, spez}}$) ermittelt, welche das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der immobilisierten ($A_{\text{spez, immob}}$) zu den freien Enzymen ($A_{\text{spez, frei}}$) darstellt:

$$A_{\text{rel, spez}} = A_{\text{spez, immob}} / A_{\text{spez, frei}} \quad (4.1)$$

4.2.2.1 Ermittlung der relativen spezifischen Aktivität in Abhängigkeit der Beladung

UGDH und NOX

Der Einfluss des Enzym-zu-Partikel Verhältnisses auf die relative spezifische Aktivität wurde zuerst mit immobilisierten UGDH und NOX untersucht. Getestet wurden jeweils theoretische Beladungen von 2,5 g/L, 10 g/L, 30 g/L und 50 g/L.

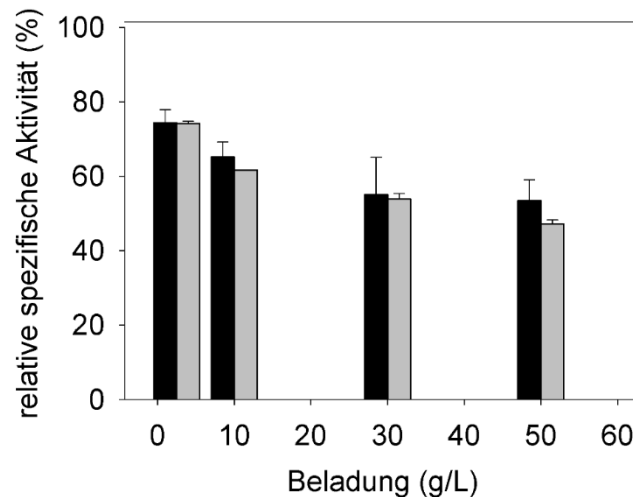


Abbildung 27: Relative spezifische Aktivität von immobilisierten NOX (schwarz) und UGDH (grau) bei theoretischen Beladungen von 2,5, 10, 30 und 50 g/L. Referenz ist das jeweilige freie Enzym. Bei beiden MEI sank die spezifische Aktivität bei zunehmender Beladung im Verhältnis zu der spezifischen Aktivität der freien Enzyme.

Für beide Enzyme ist in Abbildung 27 eine Abnahme der relativ spezifischen Aktivität bei steigender Beladung zu erkennen. Dieser Effekt tritt häufig bei immobilisierten Enzymen auf und wird damit erklärt, dass immobilisierte Enzyme, die sich in naher Umgebung zueinander befinden, sich gegenseitig durch sterische Hinderung beeinflussen. Dadurch werden die Bindungen der Substrate mit den aktiven Zentren und damit die Aktivität beeinträchtigt [114]. Für UGDH und NOX MEI wurden relative spezifische Aktivitäten von 47% - 74% gemessen. Diese sind im Vergleich mit Werten für immobilisierte Enzyme aus der Literatur überdurchschnittlich [115] und eröffnen die Möglichkeit, bereits nach wenigen Rezyklierungen dieser MEI im KMS, pro Enzym eine höhere Produktmenge zu synthetisieren, als dies bei der einmaligen Verwendung von freiem Enzymen möglich ist.

Sehr geringe Beladungen wie 2,5 g/L erforderten eine große Menge an Partikeln, was die Wahrscheinlichkeit von Agglomerationen der MEI erhöhte. Im Folgenden wurden MEI mit Beladungen beider Enzyme von etwa 10 g/L eingesetzt, was einen guten Kompromiss zwischen relativer spezifischer Aktivität und dem Vorbeugen von Agglomeration darstellte.

GaK und USP

Das nächste Enzympaar, dessen MEI charakterisiert und dessen Reaktionsbedingungen optimiert wurden, waren GaK und USP. Da USP durch das Nebenprodukt Pyrophosphat inhibiert wird, wurden stets 0,1 U anorganische Pyrophosphatase zu den Assays hinzugefügt. Die Auswirkungen der verschiedenen Enzym-zu-Partikel Verhältnisse auf die relativen spezifischen Aktivitäten wurden jeweils mit theoretischen Beladungen von 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L und 50 g/L ermittelt.

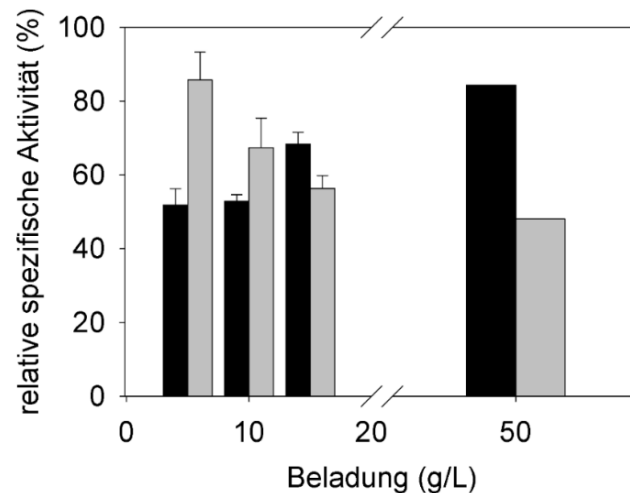


Abbildung 28: Relative spezifische Aktivität von immobilisierten GalK (schwarz) und USP (grau) bei verschiedenen Beladungen. Referenz ist das jeweilige freie Enzym. Auffallend ist die Zunahme der relativen spezifischen Aktivität von USP mit steigender Enzymbeladung auf den Magnetpartikeln.

Abbildung 28 zeigt den Anstieg der relativen spezifischen Aktivität von immobilisiertem GalK mit zunehmender Beladung von etwa 52% bei 5 g/L bis auf knapp 84% bei 50 g/L. Dies könnte auf die geringere Partikelmenge bei höheren Enzym-zu-Partikel Verhältnissen zurückzuführen sein. Da bei den Parameter- und Kinetikstudien stets die gleiche Masse an immobilisiertem Enzym untersucht wurde, wurden mit steigender Beladung geringere Magnetpartikelmengen eingesetzt. Substrat könnte in der Partikelmatrix diffundieren und so unzugänglich für Enzyme anderer Partikel sein. Bei einer geringen Partikelanzahl wäre damit die Menge an verfügbarem Substrat höher. Auch scheint GalK durch die Immobilisierung so angeordnet zu sein, dass keine sterische Hinderung bei einer höheren Beladung auftritt. Dagegen nahm bei immobilisiertem USP, wie zuvor bei UGDH und NOX, die relative spezifische Aktivität mit steigender Beladung ab. Dabei sank sie um fast die Hälfte von etwa 86% bei 5 g/L bis 48% bei 50 g/L. Bei passender Beladung konnten mit Werten von ca. 80% jedoch bereits für beide immobilisierten Enzyme ohne weitergehende Optimierung hohe relative spezifische Aktivitäten erzielt werden. Im Folgenden wurden GalK und USP-MEI mit einer Beladung von etwa 15 g/L eingesetzt. Damit wurden zum einen bei USP-MEI Agglomerationseffekte vermieden, zum anderen hatte sich bei GalK-MEI mit Beladungen von ca. 50 g/L gezeigt, dass eine sehr geringe Partikelmenge die Durchführung der Aktivitätsassays erschwert.

GalT und GlcAT

Die Transferasen GalT und GlcAT waren die letzten beiden Enzyme deren MEI charakterisiert und deren Reaktionsbedingungen optimiert wurden. Das Nebenprodukt UDP wurde durch 1 U der thermosensitiven, alkalinen Phosphatase (AP) abgebaut, um eine Inhibierung der Enzyme zu vermeiden. Für GalT wurde der Einfluss der verschiedenen Enzym-zu-Partikel Verhältnisse auf die relative spezifische Aktivität mit theoretischen Beladungen von 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 30 g/L und 50 g/L untersucht. Für

GlcAT konnten aufgrund der geringen Verfügbarkeit des Enzyms nur theoretische Beladungen von 5 g/L, 10 g/L und 15 g/L getestet werden.

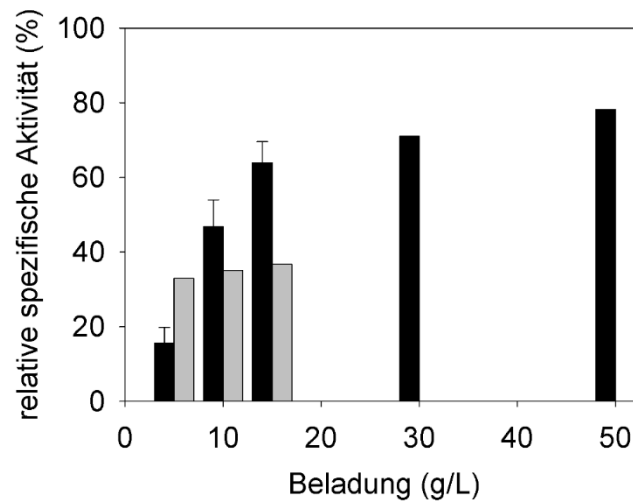


Abbildung 29: Relative spezifische Aktivität von immobilisierten GalT (schwarz) und GlcAT (grau) bei verschiedenen Beladungen. Referenz ist das jeweilige freie Enzym. Bei GalT MEI nimmt die relative spezifische Aktivität mit steigender Beladung deutlich zu.

Abbildung 29 stellt die relative spezifische Aktivität immobilisierter GalT bzw. GlcAT über die Beladung dar. Man erkennt bei immobilisiertem GalT einen Anstieg der relativen spezifischen Aktivität mit zunehmender Beladung. Dabei war die Zunahme bei GalT von etwa 16% bei 5 g/L auf 69% bei 15 g/L eindeutig. Bei immobilisiertem GlcAT gab es keinen signifikanten Einfluss der Beladung auf die relative spezifische Aktivität. Der Anstieg der relativen spezifischen Aktivität von GalT-MEI nahm mit zunehmender Beladung ab. Der Anstieg dieser spezifischen Aktivität bei GalT, wie auch zuvor bei USP, ist ungewöhnlich, da dies einen Anstieg der Aktivität pro immobilisiertem Enzym bedeutet. Womöglich verbleiben bei der Immobilisierung auch freie Enzyme in der Agarosematrix der Magnetpartikel, die durch die Waschschrte nicht entfernt werden. Durch höhere Beladungen würden auch mehr freie Enzyme in der Matrix gefangen werden. Da die freien Enzyme höhere spezifische Aktivitäten, als die immobilisierten aufweisen, steigt die relative spezifische Aktivität durch eine zunehmende Beladung bzw. zunehmender Anzahl an gefangenen freien Enzymen, bis ein Gleichgewicht und damit ein Plateau erreicht wird. Dies würde den Verlauf der relativen spezifischen Aktivität der GalT MEI erklären. Die geringen relativen spezifischen Aktivitäten der immobilisierten GlcAT könnten dazu führen, dass selbst durch wiederholten Einsatz dieser MEI, der Umsatz pro Enzym geringer ist als der der freien GlcAT. Trotzdem bieten die immobilisierten Enzyme den Vorteil, dass sie im KMS von Nebenprodukten separiert und bei optimierten Bedingungen in einer Reaktionskaskade eingesetzt werden können. Da, wie zuvor bereits erwähnt, die Anzahl der Magnetpartikel bei Aktivitätsassays mit MEI mit hohen Beladungen sehr gering ist, wurden im Folgenden GalT und GlcAT MEI mit einer Beladung von 15 g/L verwendet.

4.2.2.2 Charakterisierung des pH-Einflusses auf die spezifische Aktivität

UGDH und NOX

Zur Bestimmung des pH-Einflusses auf die spezifische Aktivität von immobilisierten UGDH und NOX wurden Aktivitätsassays bei UGDH mit pH 7-10 und bei NOX mit pH 5,5-8,7 durchgeführt. Diese Bereiche wurden nach Angaben der Literatur für die optimalen Bedingungen der freien Enzyme gewählt (UGDH: pH 8,7; NOX: pH 6,5) [73, 81]. Für die UGDH Assays wurde 50 mM Tris eingesetzt, auch wenn bei pH 9,5 und 10 die Pufferkapazität nicht mehr ideal ist. Die verschiedenen pH-Werte wurden mit Salzsäure eingestellt. Für die NOX Assays wurde 50 mM Kaliumhydrogenphosphat (KP) als Reaktionspuffer verwendet, obwohl bei pH 5,5 und 6 KP nicht der ideale Puffer ist. Für pH 8,7 wurde der Tris-Puffer eingesetzt und der pH-Wert mittels Phosphorsäure und Natronlauge angepasst. Die optimalen pH-Werte der Puffer wurden über- und unterschritten, da bei der Untersuchung des pH-Einflusses so der unbekannte Einfluss eines Wechsels des Puffersalzes ausgeschlossen werden konnte.

In Abbildung 30A sind die spezifischen Aktivitäten der freien und immobilisierten NOX in Abhängigkeit des pH-Wertes aufgetragen. Die höchste spezifische Aktivität wurde für freie NOX mit 23,2 U/mg bzw. 23,4 U/mg bei einem pH-Wert 6 bzw. 6,5 erreicht. Das Auftreten des pH-Optimums bei pH 6 - 6,5 stimmt mit den Angaben in der Literatur überein [72, 81]. Dagegen wurden in der Literatur mit freien Enzymen höhere spezifische Aktivitäten von 87,3 U/mg [116] bis 116 U/mg [81] erreicht. Das kann einerseits an der verwendeten Enzym-Charge liegen, da es bei verschiedenen Ansätzen oft zu Schwankungen der Enzymaktivität kommt. Andererseits haben auch die Zellaufschlussmethode und die zur Aufreinigung angewandten Methoden einen großen Einfluss auf die spezifische Aktivität der Enzyme, was einen Vergleich erschwert [81].

Wie bei den freien Enzymen befand sich das spezifische Aktivitätsmaximum auch bei immobilisierter NOX bei einem pH-Wert von 6 – 6,5 und war mit 17,6 U/mg etwa 24% geringer als bei den freien Enzymen. Mit zunehmender Entfernung des pH-Werts vom Optimum sank die spezifische Aktivität der freien und immobilisierten Enzyme. Das könnte an einer Änderung der Ladungen von Aminosäureseitenketten im aktiven Zentrum des Enzyms liegen, welche für die Bindung des Substrats oder für den Ablauf der Katalyse von Bedeutung sind [79]. Dabei wurde die spezifische Aktivität bei den immobilisierten Enzymen stärker durch den pH-Wert beeinträchtigt als bei den freien Enzymen. Dies zeigt sich beim Betrachten des Verlaufs der relativen spezifischen Aktivität, also dem Verhältnis der spezifischen Aktivität der immobilisierten zu den freien Enzymen. Diese hat ihr Maximum, wie erwartet, bei einem pH-Wert von 6 mit 75,6%. Abseits davon sinkt sie mit zunehmendem pH-Wert. Die geringste relative spezifische Aktivität von knapp 26% wurde bei einem pH-Wert von 8,7 gemessen. Die Abnahme ist unerwartet, da durch die Immobilisierung unter anderem eine Stabilisierung des Enzyms bezweckt wird. Der Grund dafür kann eine Destabilisierung der Enzymkonformation durch die Immobilisierung sein. Diese kann auftreten, wenn das Enzym mit weiteren Histidindgruppen neben dem gezielt angebrachten His₆-Tag an

das Magnetpartikel bindet. Dadurch kann einerseits die Zugänglichkeit zum aktiven Zentrum beeinträchtigt werden, andererseits auch die Beweglichkeit des Enzyms. Dies wirkt sich wiederum auf Konformationsänderungen aus, die für die Katalyse wichtig sind. Ein Hinweis auf das Auftreten solcher Effekte ist die reduzierte spezifische Aktivität von immobilisierter NOX im Vergleich zu den freien Enzymen. Neben der Destabilisierung der Konformation kann, unabhängig vom pH-Wert, auch eine Diffusionslimitierung ein Grund für die, im Vergleich zu den freien Enzymen, reduzierte spezifische Aktivität sein. Da es sich bei den hier verwendeten Magnetpartikeln um poröse Partikel handelt, wurde vermutlich ein Großteil der Enzyme in Poren gebunden. Je nach Größe und Zugänglichkeit dieser Poren kann es zu Diffusionseinschränkungen für das Substrat kommen. Dies führt wiederum zu einer geringeren Aktivität.

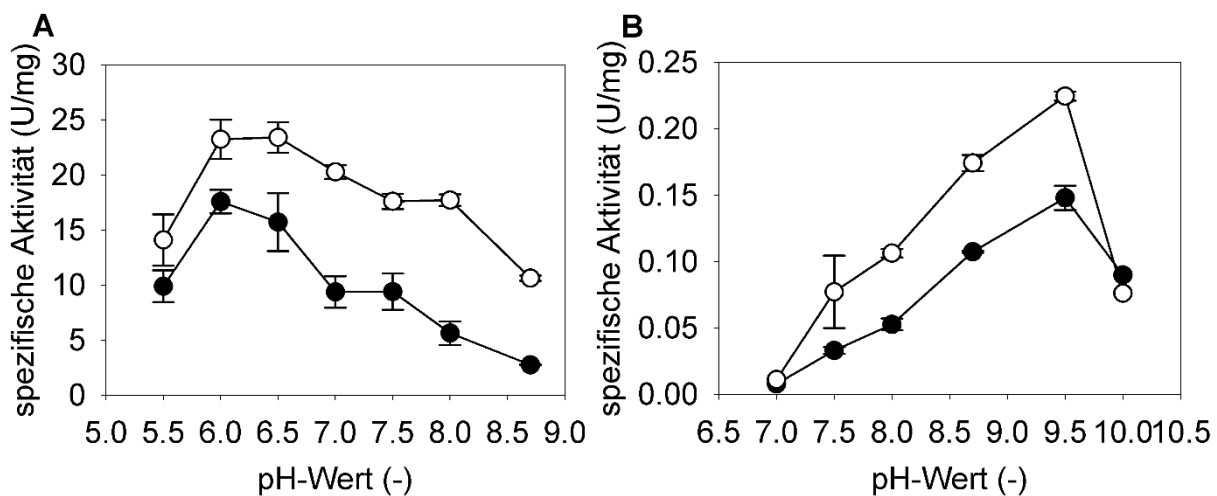


Abbildung 30: Vergleich der spezifischen Aktivitäten von (A) immobilisierten und freien NOX und (B) immobilisierten und freien UGDH bei verschiedenen pH-Werten. (-○-) repräsentiert die freien Enzyme und (-●-) die MEI. Die höchsten spezifischen Aktivitäten von freien und immobilisierten NOX konnten im leicht sauren Bereich erzielt werden. Der optimale pH-Wert von freien und immobilisierten UGDH lag im basischen Bereich.

Man sieht in Abbildung 30B einen Anstieg der spezifischen Aktivität mit dem pH-Wert sowohl der immobilisierten als auch der freien UGDH von 0,008 U/mg bzw. 0,011 U/mg bei pH 7. Der höchste Wert wurde mit 0,148 U/mg für die UGDH MEI beziehungsweise 0,224 U/mg für die freien UGDH bei einem pH-Wert von 9,5 ermittelt. Bei pH 10 sank die spezifische Aktivität der MEI auf ca. 60% des maximalen Wertes und auf etwa 20% für die freien UGDH. Ein ähnlicher Trend zeigte sich für die relative spezifische Aktivität, welche bei pH 9,5 auf fast 66% anstieg. Die spezifische Aktivität von freien UGDH war bei einem pH-Wert von 8,7 mit 0,174 U/mg deutlich geringer als die, in der Literatur berichtete, spezifische Aktivität von 0,9 U/mg [72]. Vermutlich sind auch hier Schwankungen der Aktivität bei verschiedenen Enzym-Batches sowie eventuelle Stresseinflüsse während des Transports für die geringe spezifische Aktivität verantwortlich. Auch die Lage des hier ermittelten pH-Optimums von 9,5 weicht etwas vom, in der Literatur berichteten, Optimum für freie Enzyme bei einem pH-Wert von 8,7 ab [72]. Ein Grund dafür könnte sein, dass der pH-Wert der Pufferlösung nicht

exakt dem endgültigen pH-Wert in der Reaktionslösung entsprach, sondern sich aufgrund der anderen Komponenten leicht Richtung 9 verschoben hat. Generell sind jedoch pH-Optima von Enzymen etwas breiter [117], wodurch eine pH Abweichung von 0,8 nicht ungewöhnlich ist.

Die Abnahme der spezifischen Aktivität nach der Immobilisierung könnte die gleichen Ursachen haben, wie schon bei NOX erwähnt. Dabei fällt auf, dass im Bereich des jeweiligen pH-Optimums ähnliche relative spezifische Aktivitäten um 60% - 70% ermittelt wurden. Dies könnte darauf hinweisen, dass ähnliche, für die Immobilisierungsmethode charakteristische Effekte, für den Aktivitätsverlust verantwortlich sind. Für die relativen spezifischen Aktivität von immobilisierten UGDH, wurde eine Abnahme mit sinkendem pH-Wert ermittelt. Dies könnte bedeuten, dass durch die Immobilisierung keine Verbesserung der pH-Stabilität des Enzyms aufgetreten ist. Stattdessen wurden die Enzyme anfälliger gegen Inaktivierung aufgrund des pH-Werts. Dies könnte, wie auch bei NOX, ein Anzeichen dafür sein, dass die Ladungsverteilung im aktiven Zentrum des Enzyms, durch die Immobilisierung beeinträchtigt wurde.

Für den weiteren Einsatz von NOX und UGDH in Kombination, wurde ein pH-Wert von 8,7 mit 50 mM Tris als Pufferlösung verwendet. Der Grund dafür ist, dass immobilisierte NOX bei diesem, für NOX untypischen, pH-Wert von 8,7 noch eine spezifische Aktivität aufweisen, die mit 2,75 U/mg deutlich höher ist als die von immobilisierten UGDH mit 0,108 U/mg. Auch wurde bei einem pH-Wert von 9,5, dem optimalen pH-Wert von UGDH, bei NOX nach nur wenigen Minuten keine Aktivität mehr festgestellt.

GaK und USP

Der pH-Einfluss auf die spezifische Aktivität von immobilisierten GaK und USP wurden von pH 7-8 bestimmt. Diese Bereiche wurden nach Angaben der Literatur für die optimalen Bedingungen der freien Enzyme gewählt (GaK/USP: pH 7,5) [72, 100].

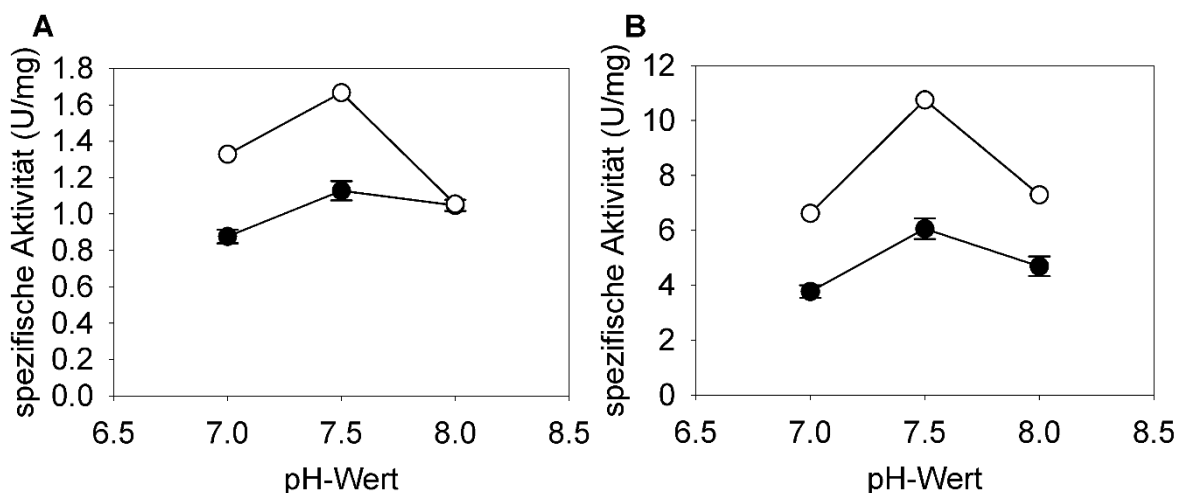


Abbildung 31: Vergleich der spezifischen Aktivitäten von (A) immobilisierten und freien GaK und immobilisierten und freien (B) USP bei verschiedenen pH-Werten. (-○-) repräsentiert die freien Enzyme und (-●-) die MEI. Bei beiden immobilisierten Enzymen wurde die höchste spezifische Aktivität bei demselben pH-Wert gemessen wie bei den freien Enzymen.

In Abbildung 31A sind die spezifischen Aktivitäten der freien und immobilisierten GalK in Abhängigkeit des pH-Wertes aufgetragen. Die höchste spezifische Aktivität von immobilisierter und freier GalK lag mit ca. 1,1 U/mg bzw. 1,7 U/mg bei pH 7,5. In der Literatur wird die maximale spezifische Aktivität auch bei pH 7,5 erreicht, ist aber knapp 3-mal höher, als die hier für die freien GalK gemessenen. Wie zuvor beschrieben, kann dies unter anderem am Enzym-Batch liegen.

Auch bei den immobilisierten und freien USP (siehe Abbildung 31B) befand sich das spezifische Aktivitätsmaximum, mit 6 U/mg bei den immobilisierten und knapp 11 U/mg bei den freien USP, bei einem pH-Wert von 7,5. Damit war die maximale spezifische Aktivität der freien USP knapp 42% geringer, als die, in der Literatur beschriebene. Sowohl bei den GalK als auch bei den USP kann man eine typische Optimumskurve erkennen, die mit zunehmender Entfernung zu pH 7,5 abfällt. Diese ist bei beiden immobilisierten Enzymen flacher als bei den freien, was eine Stabilisierung gegenüber starken pH-Wert-Einflüssen durch die Immobilisation anzeigen könnte. Am deutlichsten sieht man dies an der relativen spezifischen Aktivität von GalK, die bei pH 8 bei 99,3% liegt.

GalT und GlcAT

Um die Auswirkungen des pH-Wertes auf die spezifische Aktivität von immobilisiertem GalT und GlcAT zu bestimmen, wurde eine Versuchsreihe mit pH-Werten von 6,5-8,5 bzw. 5,5-8,5 erstellt. In der Literatur wurde der optimale pH-Wert für freie GalT bei pH 7,5 [118] und für freie GlcAT bei pH 6,5 [73] angegeben.

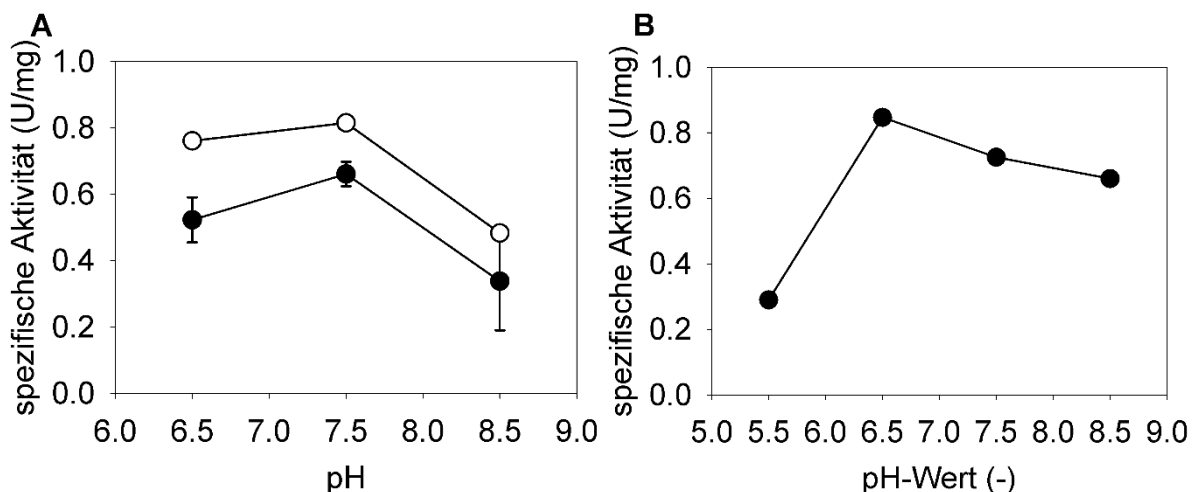


Abbildung 32: Einfluss des pH-Wertes auf die spezifische Aktivität der immobilisierten und freien GalT und immobilisierten GlcAT. (○-) repräsentiert die freien Enzyme und (-●-) die MEI. Bei den immobilisierten GalT und GlcAT, stimmt der pH-Wert, bei dem die höchste spezifische Aktivität erreicht wurde, mit den Angaben aus der Literatur überein.

In Abbildung 32A ist zu erkennen, dass sowohl immobilisiertes als auch freies GalT die höchste spezifische Aktivität bei einem pH-Wert von 7,5 aufweisen. Dieser liegt bei den GalT-MEI bei 0,622 U/mg und entspricht damit 76% der spezifischen Aktivität der freien Enzyme. Dieser pH-Wert entspricht auch den Angaben der Literatur [118] und ist darauf zurückzuführen, dass es sich bei der verwendeten GalT um ein Typ 2

Transmembranprotein handelt, welches unter dem neutralen pH-Wert des Cytoplasma am besten arbeitet [119]. Außerdem ist die katalytische Funktion des Enzyms abhängig von dem Metallion Mangan als Kofaktor. Um das Mangan binden zu können, muss die dafür zuständige Aminosäure Histidin in deprotonierter Form vorliegen und dies ist in einem leicht basischen Milieu der Fall [120].

Der in Abbildung 32B dargestellte Verlauf der spezifischen Aktivität der immobilisierten GlcAT zeigt eine Optimumskurve mit einem maximalen Wert von 0,85 U/mg bei pH 6,5. Durch das Entfernen vom optimalen pH-Wert, fiel die spezifische Aktivität bis auf etwa ein Drittel des Wertes. Dieses pH-Optimum stimmt mit den Ergebnissen von Engels et al. [73] überein. Dagegen scheinen die immobilisierten Enzyme sensibler gegen niedrigere, aber auch stabiler gegen höhere pH-Werte als die freien GlcAT von Engels et al. zu sein.

4.2.2.3 Charakterisierung des Temperatureinflusses auf die spezifische Aktivität

UGDH und NOX

Die Charakterisierung des Temperatureinflusses auf die spezifische Aktivität von immobilisiertem und freiem NOX und UGDH erfolgte mit der Durchführung von NOX Aktivitätsassays bei 25°C - 40°C und UGDH Assays bei 30°C - 45°C. Diese Bereiche wurden nach Angaben der Literatur für die optimalen Bedingungen der freien Enzyme gewählt (UGDH: 30°C [72], NOX: 30-40°C [81, 121]). Zusätzlich wurde die Temperaturstabilität der Enzyme untersucht, indem erneut Substrat nach der letzten Probennahme zugegeben und das Assay 20 min fortgeführt wurde. Abbildung 33A zeigt die spezifischen Aktivitäten von immobilisierten und freien NOX bei verschiedenen Temperaturen. Das Temperaturmaximum wurde sowohl für die freien als auch für die immobilisierten NOX bei 25 °C erreicht. Die freien Enzyme erzielten dabei eine spezifische Aktivität von 27,4 U/mg und die immobilisierten Enzyme eine spezifische Aktivität von 12,3 U/mg, was zu einer relativen spezifischen Aktivität von 44,8% führte. Mit zunehmender Temperatur sank die spezifische Aktivität sowohl der freien als auch der immobilisierten NOX. Im Gegensatz zum pH-Wert, hatte die Temperatur keine große Auswirkung auf die relative spezifische Aktivität der NOX. Diese lag im untersuchten Temperaturbereich zwischen 44,8% und 51,9%. Das ermittelte Temperaturoptimum für die freie und immobilisierte NOX von 25 °C wich leicht von Berichten in der Literatur ab. Allerdings sieht man bei den angegebenen Werten, dass auch Temperaturoptima von Enzymen etwas breiter sind, denn diese schwanken zwischen 30-40 °C [81, 121]. Findrik et al. ermittelten einen Einfluss des verwendeten Reaktionspuffers auf die optimale Temperatur. So wurde in Tris/HCl-Puffer die maximale spezifische Aktivität bei 30 °C und in Glycerin-Natriumpyrophosphat bei 35 °C erreicht [121].

Nach der Zugabe der neuen Substratlösung nach Ablauf des Standard-Assays, zeigten sowohl die freien als auch die immobilisierten NOX eine Abnahme der spezifischen Aktivität. Bei 25 °C wurde für die freien Enzyme, bezogen auf die bei dieser Temperatur zuvor ermittelte spezifische Aktivität, eine Restaktivität von 32,9% und für die immobilisierten Enzyme von 44,0% ermittelt. Durch die Zunahme der

Temperatur fiel die spezifische Aktivität der freien und immobilisierten NOX auf etwa 2-3 U/mg bei 35°C, welche bis 40°C konstant blieb. Die Abnahme der spezifischen Aktivität, sowohl bei freien als auch bei immobilisierten NOX kann einerseits mit thermischer Inaktivierung begründet werden, dies ist insbesondere bei höheren Temperaturen der Fall. Andererseits wirkt NAD⁺ inhibierend auf die spezifische Aktivität von NOX [121]. Die Akkumulation von NAD⁺ im Laufe der Reaktion kann somit ein weiterer Grund für die Abnahme sein. Betrachtet man die relativen spezifischen Aktivitäten stellt sich heraus, dass diese bei dem Assay nach der erneuten Substratzugabe mit bis zu 94% höher waren als bei dem Standard-Assay. Dies könnte auf eine leichte Stabilisierung des immobilisierten NOX gegenüber längerer Temperaturbeanspruchung hindeuten.

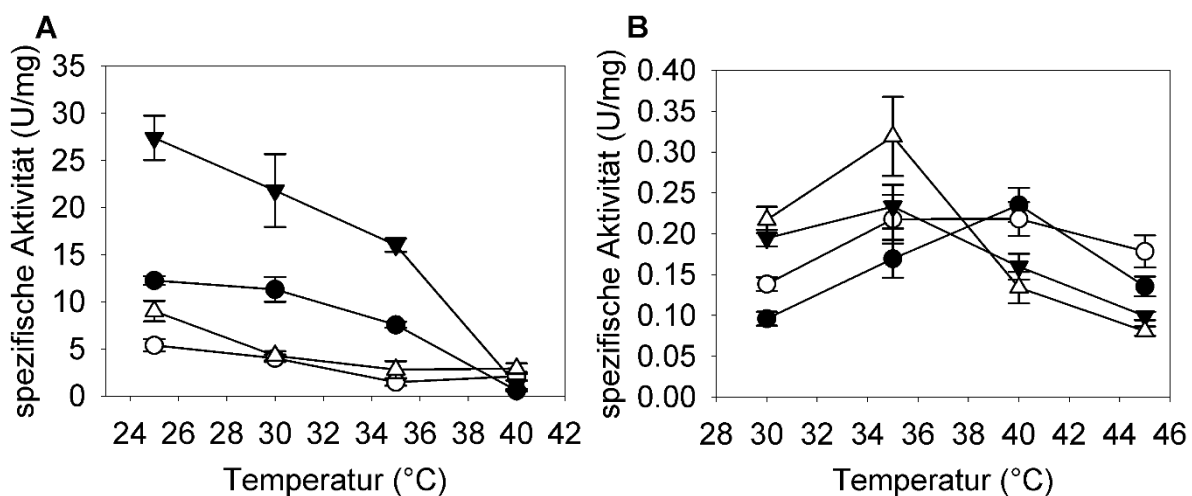


Abbildung 33: Vergleich der spezifischen Aktivitäten von (A) immobilisierten und freien NOX und (B) immobilisierten und freien UGDH bei verschiedenen Temperaturen. Nach dem Ablauf der Standard-Assays, wurden frische Reaktionslösungen mit der gleichen Zusammensetzung wie die des jeweiligen Standard-Assays zugegeben und für 20 min weitergemessen. (-▼-) repräsentiert die freien Enzyme, (-△-) die freien Enzyme nach erneuter Substratzugabe, (-●-) die MEI und (-○-) die MEI nach Substratzugabe. Bei den freien und immobilisierten NOX fällt die spezifische Aktivität mit steigender Temperatur und nähert sich an. Immobilisierte UGDH weisen ihre maximale spezifische Aktivität bei einer höheren Temperatur auf als die freien UGDH.

Bei den freien UGDH wurde das Temperaturmaximum bei 35°C mit 0,233 U/mg ermittelt (siehe Abbildung 33B). Hierbei war das Maximum 5°C höher, als in der Literatur angegeben [72]. Dagegen wurde das Temperaturmaximum bei den immobilisierten Enzymen bei 40°C erreicht und betrug 0,235 U/mg. Bei sowohl den freien als auch den immobilisierten UGDH hatten die spezifischen Aktivitäten über die Temperatur den Verlauf einer Optimumskurve. Das Auftreten der maximalen spezifischen Aktivität bei höheren Temperaturen könnte auf eine Stabilisierung der immobilisierten UGDH gegen Hitzedenaturierung hinweisen. Dies zeigt sich auch bei den relativen spezifischen Aktivitäten der immobilisierten Enzyme. Diese stiegen mit zunehmender Temperatur an, beginnend mit 49,4% bei 30 °C und dem Maximum bei 40 °C mit 147,3%. Auch die spezifischen Aktivitäten der immobilisierten UGDH, die nach der erneuten Substratzugabe ermittelt wurden, weisen auf eine Stabilisierung

durch die Immobilisierung hin. Meist lagen diese sogar über denen des Standard-Assays. Die relative spezifische Aktivität nahm auch nach der erneuten Substratzugabe mit steigender Temperatur zu und erreichte bei 45 °C mit 290%, die höchste relative spezifische Aktivität in der Versuchsreihe.

Aufgrund der Stabilisierung von immobilisierten UGDH gegen Hitze-Denaturierung wurden folgende Synthesereaktionen bei 37°C durchgeführt, um eine möglichst hohe Aktivität zu erreichen.

Galk und USP

Sowohl bei Galk als auch bei USP wurde der Einfluss der Temperatur auf deren spezifische Aktivität bei 30, 37 und 45°C untersucht. In der Literatur wurde die optimale Temperatur für freie Galk bei 40°C [72] und bei freien USP bei 45°C [100] angegeben. Da bei Langzeitversuchen die Stabilität der Enzyme bei noch höheren Temperaturen nicht gewährleistet ist, wurde bei dieser Versuchsreihe 45°C nicht überschritten. Es wurde, wie zuvor beschrieben, auch die Temperaturstabilität der Enzyme ermittelt. Abbildung 34A zeigt die spezifischen Aktivitäten von immobilisierter und freier Galk bei verschiedenen Temperaturen. Es wurde das Temperaturmaximum sowohl für die freien als auch für die immobilisierten Galk bei 45°C erreicht, wobei bei den immobilisierten Galk die spezifische Aktivität bei 37°C nicht signifikant geringer war. Diese Temperaturoptima decken sich somit mit den Angaben der Literatur, mit einer kleinen Abweichung von den 40°C [72]. Mit etwa 69% war dagegen die relative spezifische Aktivität bei 30°C am höchsten. Vergleicht man jedoch die spezifischen Aktivitäten der immobilisierten und freien Galk nach erneuter Substratzugabe, liegt die größte relative spezifische Aktivität mit 152% bei 45°C. Auch bei 37°C war die spezifische Aktivität der immobilisierten Galk nach erneuter Substratzugabe höher als die der freien und stellte mit ca. 1 U/mg den gleichen maximalen Wert dieser immobilisierten Enzyme dar, wie zuvor beim Standard-Assay bei 37°C und 45°C. Somit zeigt sich, dass auch Galk durch die Immobilisierung Stabilität gegen Temperatureinflüsse gewonnen haben könnten.

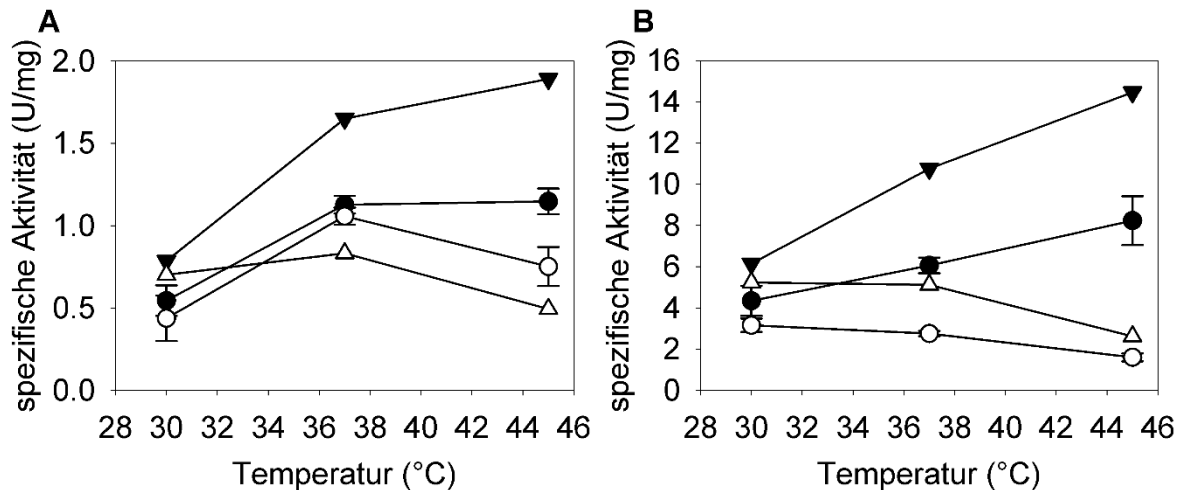


Abbildung 34: Vergleich der spezifischen Aktivitäten von (A) immobilisierten und freien GalK und immobilisierten und freien (B) USP bei verschiedenen Temperaturen. Nach dem Ablauf der Standard-Assays, wurden frische Reaktionslösungen mit der gleichen Zusammensetzung wie die des jeweiligen Standard-Assays zugegeben und für 20 min weitergemessen. (-▼-) repräsentiert die freien Enzyme, (-△-) die freien Enzyme nach erneuter Substratzugabe, (-●-) die MEI und (-○-) die MEI nach Substratzugabe. Nach erneuter Substratzugabe zeigt immobilisiertes GalK bei höheren Temperaturen größere spezifische Aktivitäten als die freien GalK.

Auch bei immobilisierter und freier USP wurde zunächst die höchste spezifische Aktivität bei 45°C gemessen (siehe Abbildung 34B). In der Literatur [100] wurde bei dieser Temperatur gleichermaßen die maximale Aktivität ermittelt. Wie bei GalK, lag die größte relative spezifische Aktivität mit fast 71% bei 30°C. Nach der erneuten Substratzugabe, nahmen dagegen die spezifischen Aktivitäten der immobilisierten und freien USP mit steigender Temperatur ab. Mit ca. 61% lag die höchste relative spezifische Aktivität nach erneuter Substratzugabe bei 45°C. Da diese beim Standard-Assay bei knapp 57% lag, kann man hier kaum eine Verbesserung der Temperaturstabilität vermuten. Die Abnahme der spezifischen Aktivitäten sowohl bei freien als auch bei immobilisierten USP kann, wie zuvor diskutiert, unter anderem mit einer thermischen Inaktivierung begründet werden.

Mit diesen Resultaten für die maximalen Aktivitäten und Stabilitäten, wurden die folgenden Synthesen mit GalK und USP bei 37°C durchgeführt.

GalT und GlcAT

Der Einfluss der Temperatur auf die spezifische Aktivität von immobilisierter und freier GalT und immobilisierter GlcAT wurde ermittelt, indem Aktivitätsassays mit GalT bei 25-40°C und mit GlcAT bei 25-50°C durchgeführt wurden. Diese Bereiche wurden nach Angaben der Literatur für die optimalen Bedingungen der freien Enzyme gewählt (GalT: 30°C [118, 122], GlcAT: 45°C [73]). Durch erneute Substratzugabe wurde auch bei diesen Enzymen die Stabilität gegen höhere Temperaturen bestimmt. Die in Abbildung 35A dargestellten Messwerte für GalT zeigen einen Anstieg der spezifischen Aktivität sowohl der immobilisierten als auch der freien Enzyme mit steigender Temperatur. Bei 40°C konnte mit 1,85 U/mg eine 25% höhere spezifische

Aktivität der immobilisierten als der freien GalT gemessen werden. Es fällt auf, dass die optimale Temperatur sowohl der freien als auch der immobilisierten Enzyme deutlich über der Angabe von 30°C aus der Literatur liegt. In diesen, zum Vergleich genutzten, Arbeiten wurde jedoch keine Temperaturen über 30°C verwendet. Nach erneuter Substratzugabe zeigt sich bei den GalT-MEI ein fast identischer Verlauf der spezifischen Aktivität, bei den freien Enzymen sank die spezifische Aktivität nach erneuter Substratzugabe bei Temperaturen über 30°C ab. Dies zeigt eine deutliche Temperaturstabilität der GalT-MEI, die wahrscheinlich, wie zuvor diskutiert, durch die Immobilisierung zustande kommt.

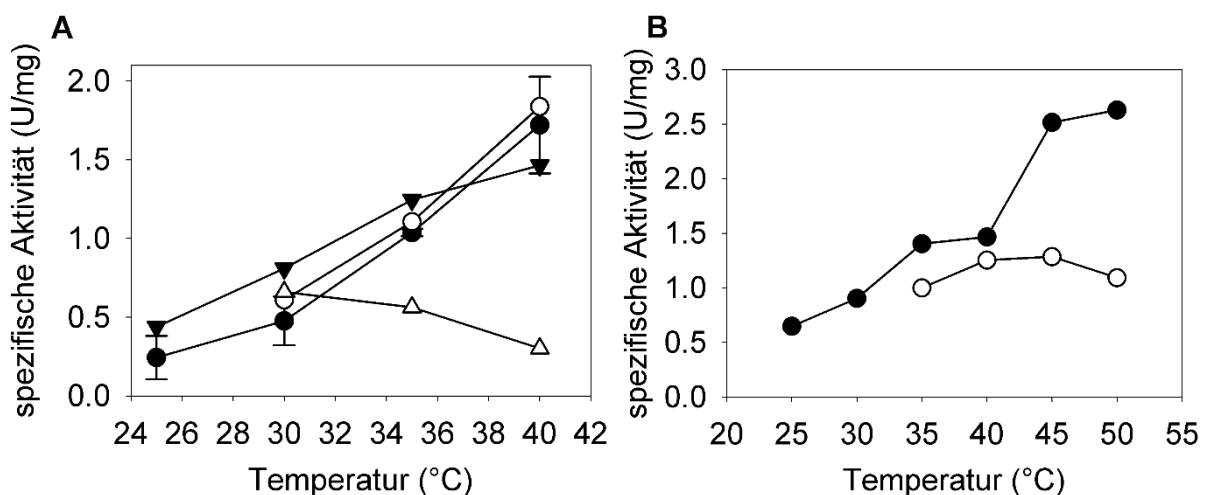


Abbildung 35: Vergleich der spezifischen Aktivitäten von (A) immobilisierten und freien GalT und (B) immobilisierten GlcAT bei verschiedenen Temperaturen. Nach dem Ablauf der Standard-Assays, wurden frische Reaktionslösungen mit der gleichen Zusammensetzung wie die des jeweiligen Standard-Assays zugegeben und für 20 min weitergemessen. (-▼-) repräsentiert die freien Enzyme, (-△-) die freien Enzyme nach erneuter Substratzugabe, (-●-) die MEI und (-○-) die MEI nach Substratzugabe. Nach der erneuten Substratzugabe stimmen die spezifischen Aktivitäten der GalT-MEI mit denen des Standard-Assays überein.

Die spezifische Aktivität von immobilisierter GlcAT stieg ebenfalls mit zunehmender Temperatur bis 2,6 U/mg bei 50°C (siehe Abbildung 35B). Dabei gab es von der Messung bei 40°C zu der bei 45°C einen Sprung um fast 72%. Nach der erneuten Substratzugabe blieben die spezifischen Aktivitäten über die Temperatur nahezu konstant und es konnte bis zu 85% der spezifischen Aktivität des Standard-Assays erreicht werden. Die maximale spezifische Aktivität wurde nach der erneuten Substratzugabe bei 45°C erreicht. In der Literatur wurde auch bei 45°C die höchste Aktivität von freier GlcAT nachgewiesen [73], es wurde jedoch nur bis zu diesem Wert gemessen. Der fast konstante Verlauf nach der erneuten Substratzugabe und die noch relativ hohen spezifischen Aktivitäten lassen auch bei den GlcAT-MEI auf eine Stabilisierung gegen Temperatureinflüsse durch die Immobilisierung schließen. Diese Ergebnisse zeigen, dass bei 40°C Synthesen mit den immobilisierten Transferasen schon nach einfacher Nutzung deutlich höhere Ausbeuten erreicht werden könnten als mit den freien Enzymen.

4.2.2.4 Ermittlung der Substratkinetiken

UGDH und NOX

Ein weiterer Parameter, dessen Einfluss auf die Aktivität der immobilisierten Enzyme untersucht wurde, war die Substratkonzentration. Dazu wurden für NOX Aktivitätsassays mit variierender NADH-Konzentration von 0,05-1,5 mM durchgeführt und für UGDH NAD⁺ Konzentrationen von 0,05-4 mM und 0,025-4 mM UDP-Glc eingesetzt. Das jeweils nicht untersuchte Substrat wurde mit 6 mM im Überschuss zugegeben. Dadurch konnten limitierende Effekte vermieden werden und für jedes Substrat die entsprechenden kinetischen Parameter bestimmt werden. Auf den direkten Vergleich mit den freien Enzymen wurde hier aus Zeitgründen verzichtet und stattdessen auf Literaturwerte für K_m und v_{max} von freien NOX zurückgegriffen.

Die Substratkinetik von immobilisiertem NOX ist in Abbildung 36A dargestellt. Wie in Tabelle 10 zu sehen, ist der für NOX-MEI ermittelte K_m -Wert von 0,37 mM vergleichbar mit anderen in der Literatur ermittelte K_m -Werte für freie Enzyme. Diese wurden jedoch bei einem pH-Wert von 8,7 - 9 erhalten, bei welchem über 80% geringere spezifische Aktivitäten erreicht werden als bei einem pH-Wert von 6,5, wie in 0 gezeigt wurde. Die Immobilisierung über Komplexbindung kann eine Veränderung der K_m -Werte bewirken, wenn zum Beispiel das aktive Zentrum durch die Bindung beeinträchtigt wird. Die großen Abweichungen der K_m -Werte in Abhängigkeit vom pH-Wert oder von der Pufferlösung zeigen, dass NOX empfindlich auf Stresseffekte reagiert, wie sie auch durch die Immobilisierung ausgelöst werden können. Zusätzlich kann auch die bereits zuvor beschriebene Limitierung der Porendiffusion der Substrate eine Erhöhung des K_m -Werts bewirken.

Tabelle 10: Vergleich der enzymkinetischen Daten dieser Arbeit von immobilisierten NOX mit Literaturwerten des freien Enzyms.

K_m [mM]	v_{max} [U/mg]	Quelle	Reaktionsparameter
0,37	16,84	Diese Arbeit	50 mM KP pH 6,5
0,024	116	[81]	KP pH 7
0,25	3,41	[121]	pH 9 Tris HCl
0,47	235	[72]	pH 8,7 Tris
0.047	5,29	[121]	pH 9 Glycerin-Natriumpyrophosphat

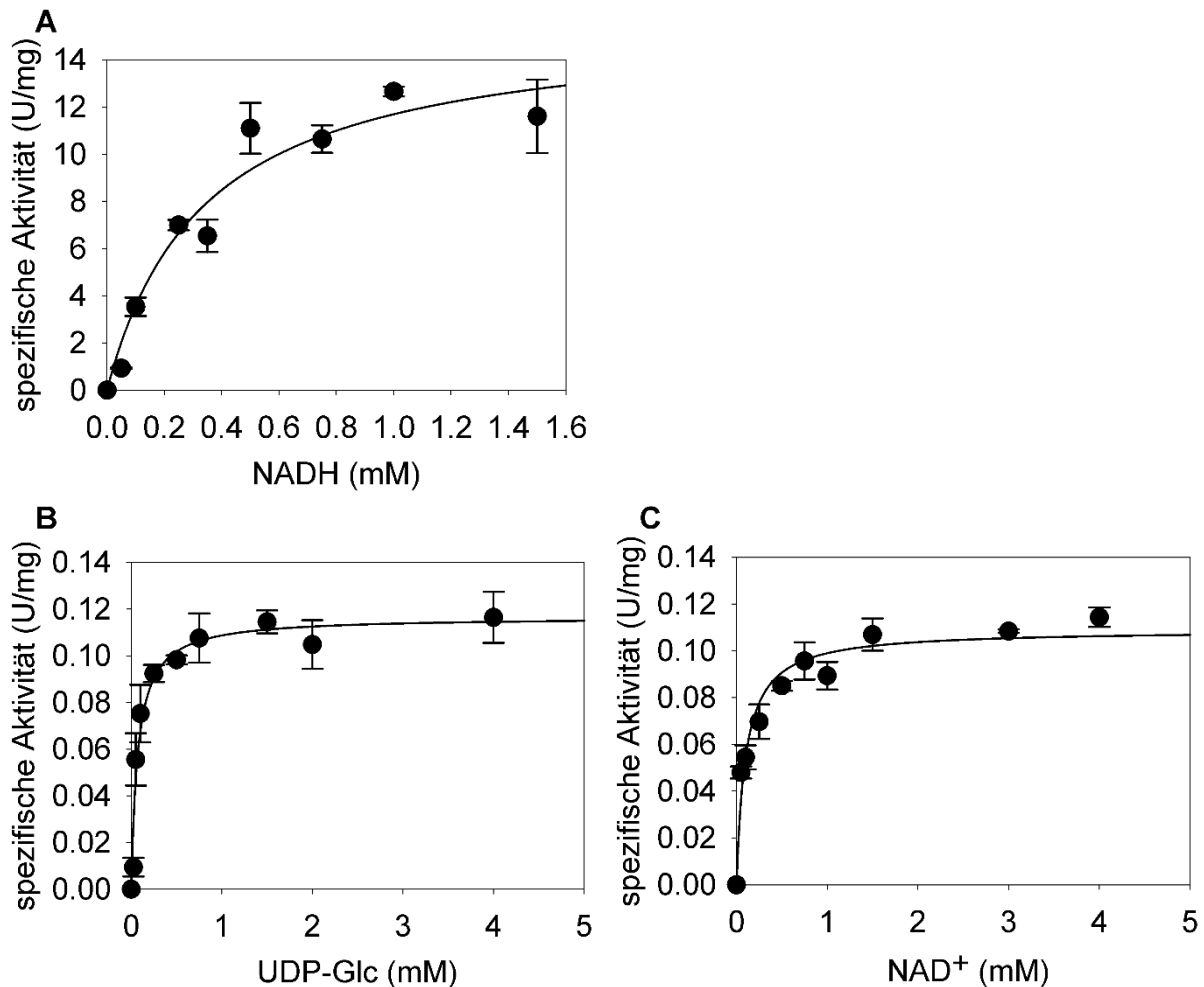


Abbildung 36: Substratkinetiken von (A) NOX mit NADH und UGDH mit (B) UDP-Glc und (C) NAD⁺. Für (B) wurde NAD⁺ und für (C) wurde UDP-Glc jeweils mit 6 mM im Überschuss zugegeben.

Für UDP-Glc als Substrat ergab sich ein K_m -Wert von 0,087 mM und ein Wert für v_{max} von 0,119 U/mg (siehe Abbildung 36B). Für NAD⁺ wurde ein K_m -Wert von 0,164 mM und ein v_{max} von 0,114 U/mg ermittelt (siehe Abbildung 36C). Dass der K_m -Wert für NAD⁺ fast doppelt so groß ist wie der für UDP-Glc zeigt, dass UGDH spezifischer für UDP-Glc als für NAD⁺ ist. Das bedeutet für die Reaktion, dass NAD⁺ bei stöchiometrischem Verhältnis der Anfangskonzentrationen schneller limitierend auf die Aktivität wirkt als UDP-Glc. In Tabelle 11 sind die hier erhaltenen Werte für v_{max} und K_m für die immobilisierte UGDH sowie Werte aus der Literatur für freie UGDH aufgeführt. Im Vergleich mit der Literatur wurde für UDP-Glc ein 7,9-mal größerer K_m -Wert erhalten, aber ein 53,8% kleinerer für NAD⁺. Dies deutet auf eine Veränderung des katalytischen Zentrums durch die Immobilisierung hin. Dies würde mit den, in den vorherigen Kapiteln erhaltenen, Ergebnissen bezüglich der Temperaturstabilisierung und der Destabilisierung gegen pH-Einflüsse übereinstimmen. Für die Katalyse bedeutet die Zunahme des K_m -Werts für UDP-Glc eine geringere Affinität für dieses Substrat. Dadurch wirkt UDP-Glc bei den immobilisierten Enzymen im Vergleich zu den freien Enzymen früher limitierend bei geringen UDP-Glc-Konzentrationen, da v_{max} erst bei höheren Konzentrationen erreicht wird. Gleichermäßen deutet die Abnahme

des K_m -Werts für NAD^+ eine erhöhte Affinität für das Cosubstrat an und damit eine spätere Limitierung im Vergleich zu den freien Enzymen.

Tabelle 11: Vergleich der enzymkinetischen Daten dieser Arbeit von UGDH mit Literaturwerten des freien Enzyms.

K_m [mM]	v_{\max} [U/mg]	Quelle	Reaktionsparameter
UDP-Glc:			
0,087	0,119	Diese Arbeit	30 °C, Tris, pH 8,7
0,011	0,12	[76]	25 °C, Tris, pH 7,5
0,03	0,81	[73]	30 °C, Tris, pH 8,7
NAD ⁺ :			
0,164	0,114	Diese Arbeit	30 °C, Tris, pH 8,7
0,355	0,12	[76]	25 °C, Tris, pH 7,5
0,44	0,92	[73]	30 °C, Tris pH 8,7

Galk und USP

Die Substratkinetiken von Galk und USP wurden ermittelt, indem Galaktose und ATP bzw. Gal-1-P und UTP von 0,5-8 mM getestet wurden. Das Substrat, dessen Einfluss nicht untersucht wurde, wurde mit 6 mM im Überschuss zugegeben.

In der in Abbildung 37A dargestellten Grafik erkennt man, dass immobilisiertes Galk nach einem Anstieg der spezifischen Aktivität bis 3 mM Gal eine maximale spezifische Aktivität von fast 1,9 U/mg erreicht, diese aber mit zunehmender Gal-Konzentration fällt. Einen ähnlichen Verlauf sieht man bei den freien Enzymen, die bei 4 mM Gal ihre höchste spezifische Aktivität von etwa 2,4 U/mg erzielen, welche sich bis 8 mM auf ca. 1,5 U/mg verringert. Dies lässt auf eine Substratinhibition schließen, weswegen für die Auswertung die entsprechende Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 3.12) verwendet wurde. Es ergab sich für immobilisierte Gal eine K_i von 1,8 mM. Alle weiteren Daten zu den Substratkinetiken von Galk und USP sind in Tabelle 12 aufgelistet. Wahl et al. [72] beschrieb unlängst zwar ebenfalls einen ähnlichen Verlauf der spezifischen Aktivität, jedoch wurde zuvor keine Hemmung durch Galaktose festgestellt [82, 123]. Genauso verhält es sich mit ATP (siehe Abbildung 37B). Bei immobilisierter Galk zeigt sich bei Konzentrationen von 2-3 mM eine Substratinhibition mit $K_i(\text{ATP}) = 3,15$ mM, bei freier Galk kann man diese schon bei 1 mM ATP erkennen, was fast mit den Ergebnissen von Wahl et al. übereinstimmt.

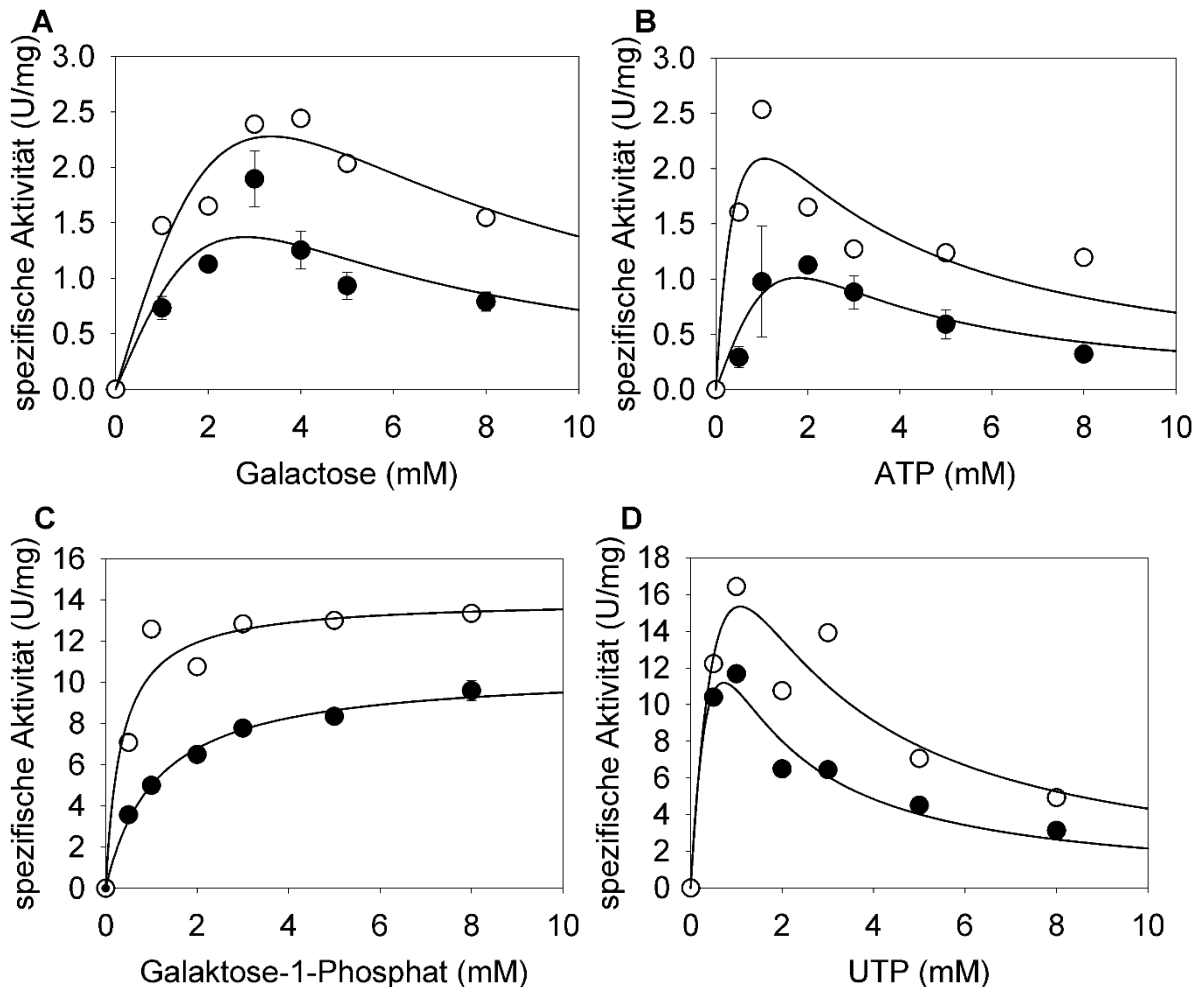


Abbildung 37: Substratkinetiken von GalK für die Substrate (A) Gal und (B) ATP, sowie von USP für die Substrate (C) Gal-1-P und (D) UTP. (-○-) repräsentiert die freien Enzyme und (-●-) die MEI. Das jeweils nicht untersuchte Substrat wurde mit 6 mM im Überschuss zugegeben. Bei den freien und immobilisierten GalK zeigte sich sowohl bei dem Substrat Galaktose als auch ATP eine Substratinhibition. Bei den freien und immobilisierten USP war das auch für das Cosubstrat UTP der Fall.

Dagegen sieht man in Abbildung 37C für USP mit Gal-1-P als Substrat einen ungehemmten Verlauf einer Michaelis-Menten-Kinetik. Betrachtet man die entsprechenden enzymkinetischen Daten in Tabelle 12, erkennt man, dass der v_{max} -Wert der freien USP etwas über dem von Wahl et al. [100] liegt und der K_m -Wert bei knapp der Hälfte. Die immobilisierte USP zeigen zwar eine dreifach geringere Affinität zu Gal-1-P, erreichen aber fast 76% der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit. Dies wäre interessant für eine Synthese mit höheren Substratmengen, doch zeigt immobilisiertes USP eine starke Inhibition durch UTP bei Konzentrationen über 1 mM bzw. freies USP bei 2-3mM. Die Inhibition durch UTP wurde ebenfalls von Wahl et al. beschrieben und trat bei freier UTP mit einem K_i von 1,8 mM auch über 3 mM auf.

Tabelle 12: Enzymkinetische Daten von immobilisierten und freien GalK für die Substrate Gal und ATP, sowie von immobilisierten und freien USP für die Substrate Gal-1-P und UTP.

Enzym	Substrat	Anwendungsform	v_{max} (U/mg)	K_m (mM)	K_i (mM)
GalK	Gal	immobilisiert	1,9	1,54	1,8
		frei			
	ATP	immobilisiert	1,13	0,7	3,15
		frei			
USP	Gal-1-P	immobilisiert	10,6	1,1	-
		frei	14	0,35	-
	UTP	immobilisiert	11,7	1,6	1,87
		frei			

GalT und GlcAT

Um in Erfahrung zu bringen, wie sich die Konzentration der Substrate auf die GalT-Aktivität auswirkt, wurde der Aktivitäts-Assay mit Substratkonzentrationen von 0,5-5mM GlcNAc-linker-*t*Boc und 0,25-6,52 mM UDP-Gal durchgeführt. Dabei konnten die Substratkinetiken mit verschiedenen UDP-Gal Konzentrationen auch mit freier GalT untersucht werden. Für immobilisiertes GlcAT wurde LacNAc-linker-*t*Boc und UDP-GlcA von 0,25-10 mM variiert. Das Substrat, dessen Einfluss nicht untersucht wurde, wurde mit einer Konzentration von 5 mM im Überschuss zugegeben.

Abbildung 38A zeigt den Verlauf der Substratkinetik von GlcNAc-linker-*t*Boc bei immobilisiertem GalT. Die spezifische Aktivität stieg mit zunehmender Substratkonzentration von ca. 0,13 U/mg bei 0,25 mM bis auf den höchsten gemessenen Wert von 0,68 U/mg bei 3 mM GlcNAc-linker-*t*Boc. Bei höheren Substratkonzentrationen sank die spezifische Aktivität von den GalT-MEI. Dies lässt auf eine Substrathemmung bei Konzentrationen über 3 mM schließen. Dadurch ergab sich eine Dissoziationskonstante $K_i = 3,24$ mM. In der Literatur [122] wird von einem ähnlichen Verlauf berichtet, mit einem K_i -Wert von 2,66 mM. Trotz einer niedrigeren Kapazität als die freier GalT, weisen die GalT-MEI für GlcNAc-linker-*t*Boc eine höhere Affinität auf. Die weiteren enzymkinetischen Daten von GalT und GlcAT sind in Tabelle 13 aufgeführt. Die Substratkinetik für UDP-Gal von immobilisiertem und freiem GalT in Abbildung 38B zeigt keine Inhibition. Freie GalT erreichte eine doppelt so hohe maximalen Umsatzgeschwindigkeit für UDP-Gal wie immobilisierte GalT. Auch zeigte sich, dass die Affinität zu UDP-Gal bei der freien GalT fast fünfmal höher war als die der immobilisierten GalT.

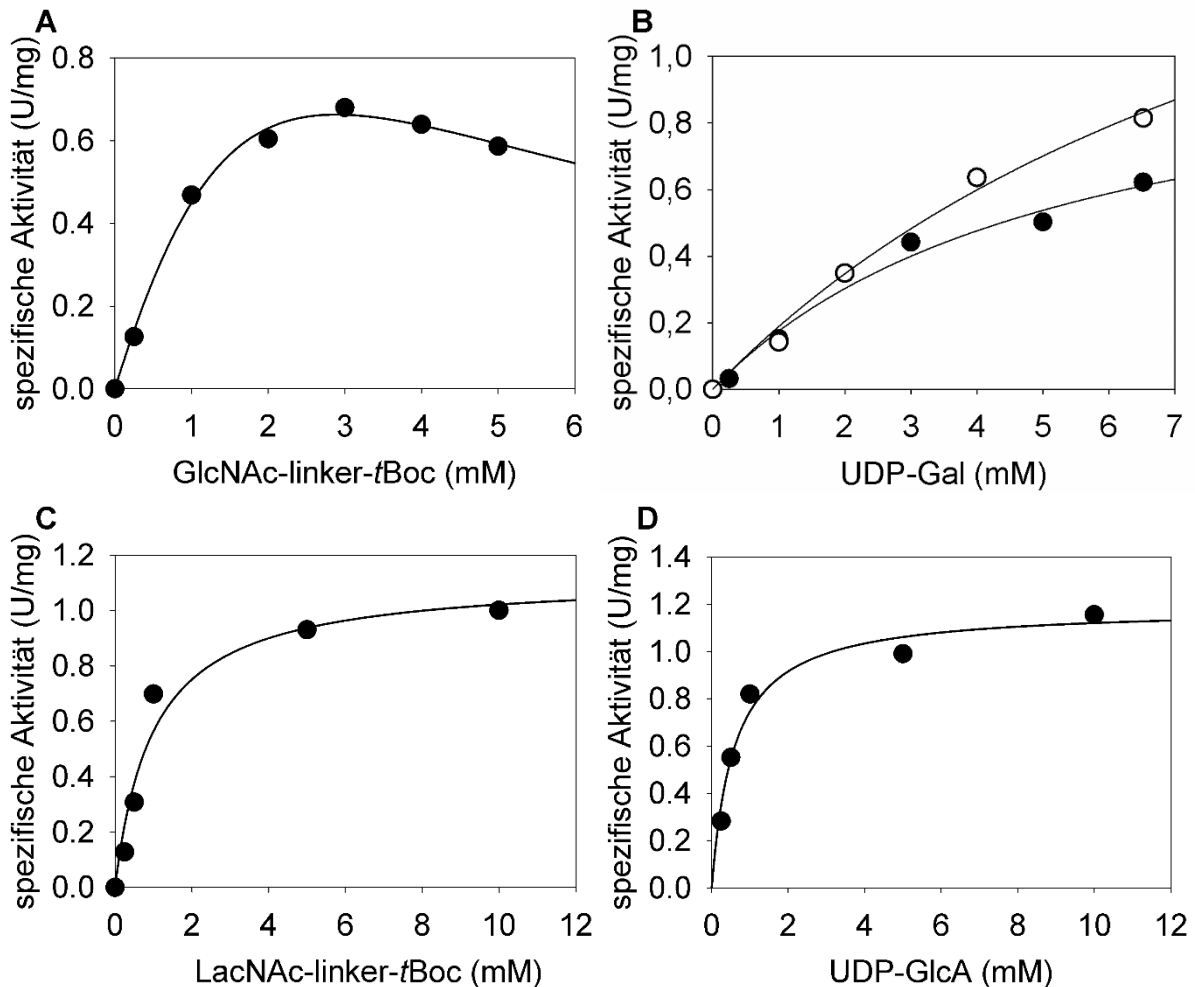


Abbildung 38: Substratkinetiken von GalT für die Substrate (A) GlcNAc-linker-tBoc und (B) UDP-Gal, sowie von immobilisiertem GlcAT für die Substrate (C) LacNAc-linker-tBoc und (D) UDP-GlcA. (—○—) repräsentiert die freien GalT und (—●—) die jeweiligen MEI. Dabei wurde das jeweils nicht untersuchte Substrat mit 5 mM zugegeben. Das Substrat GlcNAc-linker-tBoc hemmt immobilisiertes GalT bei Konzentrationen über 3 mM.

Mit GlcAT konnte nur für die MEI Substratkinetiken gemessen werden. Für LacNAc-linker-tBoc ergab sich eine doppelt so hohe maximale Reaktionsgeschwindigkeit der immobilisierten GlcAT, wie die der für freie Enzyme in der Literatur angegebene [73]. Die LacNAc-linker-tBoc Affinität war dagegen viermal geringer. Mit dem Substrat UDP-GlcA war die maximale Reaktionsgeschwindigkeit mehr als doppelt so hoch für UDP-GlcA und die Affinität ein Drittel so groß wie in der Literatur beschrieben. Somit wird mehr Substrat für die Synthese mit immobilisierten GlcAT benötigt, jedoch wird der Umsatz pro Zeit höher ausfallen.

Tabelle 13: Enzymkinetische Daten von immobilisierten GalT für das Substrat GlcNAc-linker- β Boc, von immobilisierten und freien GalT für das Substrat UDP-Gal, sowie von immobilisierten GlcAT für die Substrate LacNAc-linker- β Boc und UDP-GlcA.

Enzym	Substrat	Anwendungsform	v_{\max} (U/mg)	K_m (mM)	K_i (mM)
GalT	GlcNAc-linker- β Boc	immobilisiert	0,68	0,72	3,24
		frei [122]	1,13	3,07	2,66
	UDP-Gal	immobilisiert	1,1	5,4	-
		frei	2,2	1,1	-
GlcAT	LacNAc-linker- β Boc	immobilisiert	1,1	0,99	-
		frei [73]	0,48	0,24	-
	UDP-GlcA	immobilisiert	1,2	0,59	-
		frei [73]	0,45	0,19	-

4.2.2.5 Ermittlung der Rezyklierbarkeit

UGDH und NOX

Zur Ermittlung der Rezyklierbarkeit von NOX- und UGDH-MEI wurden mehrere Aktivitätsassays in Folge durchgeführt, bei denen die Enzymimmobilisate wiederverwendet wurden. Zwischen den Reaktionen wurden die MEI abgetrennt und dreimal mit je 200 μ L Reaktionspuffer gewaschen. Die Ergebnisse des Versuchs mit immobilisierter NOX sind in Abbildung 39A dargestellt. Als Ausgangspunkt wurde eine spezifische Aktivität von 15,18 U/mg ermittelt. Nach der ersten Wiederholung sank diese um fast 85% auf 2,29 U/mg. Bei der zweiten Wiederholung wurde nur noch eine spezifische Aktivität von 0,11 U/mg erhalten. Ein Grund für die hohe Aktivitätsabnahme könnte Inaktivierung aufgrund thermischer Effekte sein. Ein möglicher Beleg dafür ist, dass auch beim Versuch zur Bestimmung des Temperatureinflusses auf die spezifische Enzymaktivität nach erneuter Substratzugabe hohe Aktivitätsabnahmen unter moderaten Bedingungen (25 °C – 30 °C) ermittelt wurden. So wurde bei 30 °C eine Abnahme der spezifischen Enzymaktivität um etwa 65% nach 30 min festgestellt. Dies begründet die hier gemessene Abnahme jedoch nur teilweise, da bei den Temperaturversuchen auch Inhibitionseffekte eine Rolle gespielt haben können. Diese wurden durch den Austausch der Reaktionslösungen in diesem Versuch vermieden. Ein weiterer Einfluss war die Adhäsion der MEI an die Wände der verwendeten Pipettenspitzen bei der Probennahme, was zu Verlusten an MEI führte. Ein Einfluss durch die Waschschrte wurde nicht gefunden, da auch nach Wiederholung des Versuchs mit nur einem Waschschrte ähnliche Ergebnisse erzielt wurden wie beim hier beschriebenen Versuch. Ein hoher Aktivitätsverlust bei längeren Anwendungen wurde zwar auch von der Gruppe von Prof. Elling, Universität Aachen, von der die Enzyme bezogen wurden, beobachtet, in der Literatur ist mit den freien Enzymen dagegen kein so massiver Aktivitätsverlust beschrieben [72]. Jedoch wurde in dieser Arbeit von Wahl et al. generell deutlich höhere Aktivitäten und maximale Umsatzgeschwindigkeit

ermittelt. Daher könnte der starke Aktivitätsverlust, wie zuvor beschrieben, an dem Enzyymbatch liegen, der in dieser Arbeit verwendet wurde und an Stresseffekten durch den Transport.

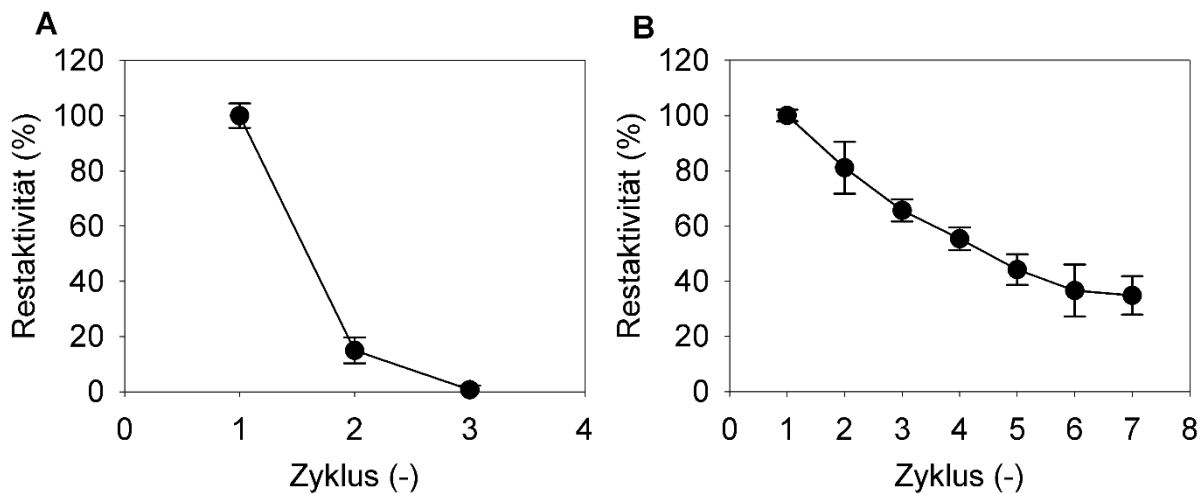


Abbildung 39: Auftragung der Restaktivität von immobilisierten (A) NOX und (B) UGDH in Abhängigkeit von der Zahl der Einsatzzyklen der gleichen MEI. Referenz ist jeweils die durch das erste durchgeführte Assay erhaltene spezifische Aktivität. Die NOX-MEI besitzen nach dem dritten Einsatz kaum noch Aktivität. Nach sieben Zyklen haben die UGDH-MEI noch etwa 35% Restaktivität.

Somit zeigt der Rezyklierungsversuch, dass NOX auch nach Immobilisierung unter den hier verwendeten Bedingungen nur schwer wiederverwendbar ist. Da NOX-MEI im Vergleich zu UGDH-MEI eine hohe spezifische Aktivität besitzen und außerdem nicht für die Synthese des Hauptprodukts zuständig sind, werden nur geringe Mengen des Enzyms benötigt. Dies macht eine Wiederverwendung von NOX weniger entscheidend für die Rentabilität der Gesamtsynthese. Dadurch kann der Aktivitätsverlust durch den Einsatz größerer Mengen an NOX-MEI etwas ausgeglichen werden. Wichtiger ist dabei die Abtrennung des Enzyms nach der Synthese von UDP-GlcA, um Komplikationen mit nachfolgenden Reaktionsschritten sowie eine Verunreinigung des Produkts zu vermeiden.

Die Ergebnisse der Rezyklierung von immobilisierter UGDH sind in Form der prozentualen Restaktivität in Abbildung 39B dargestellt. Nach dem zweiten Zyklus waren 81% Restaktivität vorhanden. Anschließend sank sie schrittweise auf etwa 35% nach 7 Zyklen. Mit einem Mittelwert von fast 60% bei 7 Zyklen könnten die UGDH-MEI die vierfache Menge an freien Enzymen ersetzen.

GalK und USP

Auch mit den GalK und USP-MEI wurde untersucht, welche Restaktivität diese nach wiederholten Einsätzen besitzen. Die Ergebnisse der Rezyklierungsversuche mit immobilisierten GalK sind in Abbildung 40A dargestellt. Als Ausgangspunkt wurde eine spezifische Aktivität von 1,1 U/mg ermittelt. Nach der ersten Wiederholung sank diese auf knapp 80% Restaktivität. Ein weiteres Assay mit den MEI ergab eine spezifische Aktivität von 0,84 U/mg, was einer Abnahme der Restaktivität von 5,6% entsprach. Bis

zum fünften Zyklus sank die restliche Aktivität auf 50,3% und blieb auch beim sechsten und damit letzten Zyklus relativ konstant. Die möglichen Gründe für den Aktivitätsverlust von etwa 51% nach sechs wiederholten Einsätzen der GalK-MEI wurden bereits zuvor beschrieben. Addiert man den Umsatz dieser sechs Zyklen und vergleicht ihn mit einem der freien GalK, stellt sich heraus, dass die GalK-MEI mindestens die vierfache Menge an freiem Enzym ersetzen können.

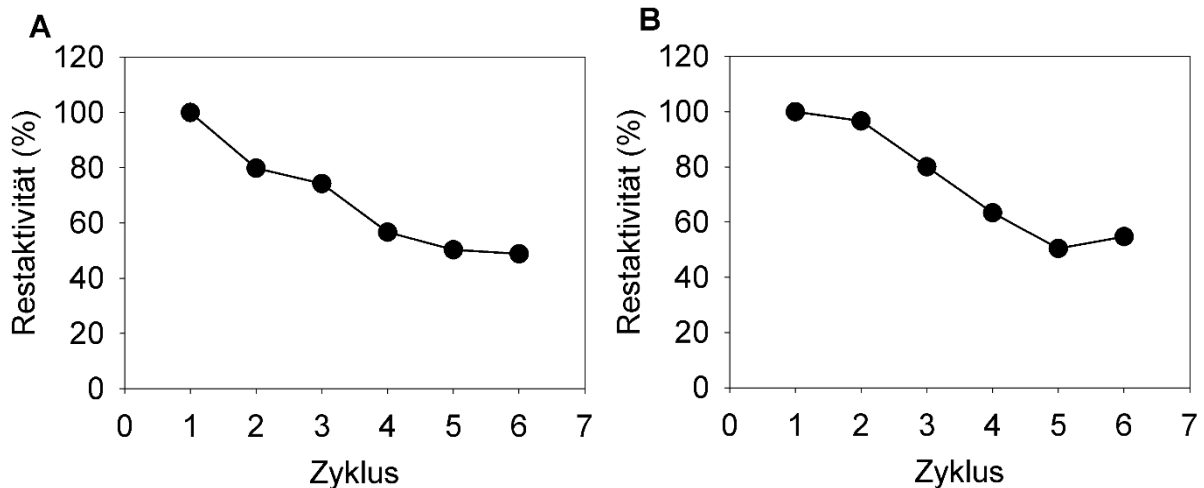


Abbildung 40: Auftragung der Restaktivität von immobilisierten (A) GalK und (B) USP in Abhängigkeit von der Zahl der Einsatzzyklen der gleichen MEI. Referenz ist jeweils die durch das erste durchgeführte Assay erhaltene spezifische Aktivität. Sowohl die GalK-MEI als auch die USP-MEI besitzen nach 6 Zyklen noch mehr als 50% Restaktivität.

In Abbildung 40B erkennt man, dass durch ein erneutes Verwenden der immobilisierten USP ca. 96,6% der Aktivität erhalten blieb. Nach drei weiteren Assays sank die Aktivität auf fast die Hälfte des ersten Versuchs. Beim letzten Zyklus konnte eine höhere spezifische Aktivität gemessen werden, die fast 55% der des ersten Assays betrug. Durch diese sechs Zyklen könnten die USP-MEI die vierfache Menge an freiem USP ersetzen. Damit eignen sich beide MEI hervorragend für automatisierte Synthesen im KMS.

GalT und GlcAT

In dieser Versuchsreihe wurden die immobilisierten GalT und GlcAT auf ihre Wiederverwendbarkeit untersucht. Die spezifische Aktivität der immobilisierten GalT verringerte sich nach dem ersten Zyklus um fast 40% (siehe Abbildung 41A). Während den drei weiteren Zyklen sank sie auf ca. 44% der Aktivität des ersten Versuchs, bei dem sechsten und siebten Zyklus konnten jedoch 52% und 53% Restaktivität gemessen werden. Damit könnten die GalT-MEI mindestens die vierfache Menge an freien Enzymen ersetzen.

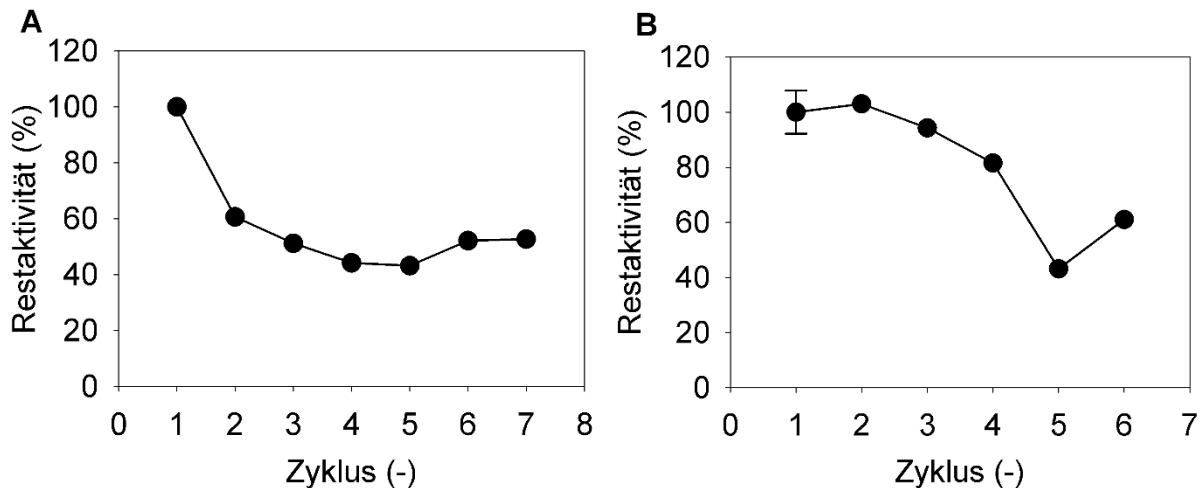


Abbildung 41: Auftragung der Restaktivität von immobilisierten (A) GalT und (B) GlcAT in Abhängigkeit von der Zahl der Einsatzzyklen der gleichen MEI. Referenz ist jeweils die durch das erste durchgeführte Assay erhaltene, spezifische Aktivität. Die GalT- und die GlcAT-MEI besitzen nach 6 Zyklen mehr als 50% Restaktivität.

Der in Abbildung 41B zu sehende Verlauf der Restaktivität über die Assay-Zyklen der GlcAT-MEI zeigt für die ersten drei Zyklen keinen signifikanten Unterschied. Nach insgesamt sechs Zyklen ist noch eine Restaktivität von etwa 61% vorhanden. Damit konnte mit immobilisierter GlcAT die beste Rezyklierbarkeit erreicht werden. Würden die GlcAT-MEI für sechs Assays wiederverwendet werden, könnte die fünffache Menge an freien GlcAT ersetzt werden.

Im Allgemeinen könnte der Abfall der Enzymaktivität durch wiederholtes Verwenden dadurch begründet werden, dass die immobilisierten Enzyme mit der Zeit reversible Bindungen mit der Magnet-Agarose-Matrix eingehen und somit ihre Wirkungsspezifität verlieren. Zwar reduziert die neutrale Oberfläche der Agarose-Matrix unspezifische Bindungen, kann diese aber nicht gänzlich verhindern. Eine andere mögliche Ursache dafür könnte eine Agglomeration der Magnetpartikel untereinander oder mit der Enzym-Partikel-Matrix sein. Das reaktive Zentrum der Enzyme könnte sich dadurch im gesamten Komplex so positionieren, dass die Substratzugänglichkeit gestört oder sogar vollkommen verhindert wird. Weiterhin könnten die zuvor erwähnten Gründe, wie der Partikelverlust bei der Probenahme, für den Aktivitätsverlust verantwortlich sein. Generell konnten große Aktivitätsverluste durch Ablösen der immobilisierten Enzyme von den Magnetpartikeln ausgeschlossen werden. Unter extremen Bedingungen lösten sich so viel Enzyme ab, dass 3,5% an spezifischer Aktivität verloren wurden. Unter normalen Bedingungen lag dieser Wert durchschnittlich unter 0,5% und somit im Bereich der Messungenauigkeit.

Die Ergebnisse dieser Rezyklierungsversuche zeigen, dass die MEI wiederverwendbar sind und dabei meist noch hohe Aktivität aufweisen, womit sie einen großen Vorteil gegenüber freien Enzymen besitzen.

4.2.2.6 Übersicht der Ergebnisse

Für eine bessere Übersicht sind die jeweils ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen und kinetischen Daten sowie die Daten aus der Literatur in Tabelle 14 aufgelistet. Außerdem sind in dieser Tabelle die Restaktivitäten nach den jeweils letzten Assays der Rezyklierungstests zu finden.

Tabelle 14: Experimentell ermittelte optimale Reaktionsbedingungen und kinetische Daten im Vergleich zu Daten aus der Literatur in Klammern und Restaktivitäten nach den jeweils letzten Zyklen.

	UGDH	NOX	GalK	USP	β 4GalT	β 3GlcAT
pH-Optimum	9,5 (9,7)	6 (6-6,5)	7,5 (7,5)	7,5 (7,5)	7,5 (7,5)	6,5 (6,5)
Temperatur-optimum	40°C (30°C)	25°C (30-40°C)	37-45°C (40°C)	45°C (45°C)	40°C (30°C)	50°C (45°C)
Beladung (theoretisch)	2,5 g/L	2,5 g/L	50 g/L	5 g/L	50 g/L	15 g/L
v_{max}	UDP-Glc: 0,12 U/mg (0,81 U/mg)	NADH+H ⁺ : 16,8 U/mg (116 U/mg)	Gal: 1,9 U/mg (5 U/mg)	Gal-1-P: 10,6 U/mg (13,1 U/mg)	GlcNAc-linker- β Boc: 0,68 U/mg (1,13 U/mg)	LacNAc-linker- β Boc: 1,1 U/mg (0,48 U/mg)
	NAD ⁺ : 0,11 U/mg (0,92 U/mg)		ATP: 1,13 U/mg (6,5 U/mg)	UTP: 11,7 U/mg	UDP-Gal: 1,1 U/mg	UDP-GlcA: 1,2 U/mg (0,45 U/mg)
K_m	UDP-Glc: 0,09 mM (0,03 mM)	NADH+H ⁺ : 0,37 mM (0,024 mM)	Gal: 1,54 mM (0,24 mM)	Gal-1-P: 1,1 mM (0,83 mM)	GlcNAc-linker- β Boc: 0,72 mM (3,07 mM)	LacNAc-linker- β Boc: 0,99 mM (0,24 mM)
	NAD ⁺ : 0,16 mM (0,44 mM)		ATP: 0,7 mM (0,31 mM)	UTP: 1,6 mM	UDP-Gal: 5,4 mM	UDP-GlcA: 0,59 mM (0,19 mM)
K_i	-	-	Gal: 1,8 mM (33,1 mM)	UTP: 1,87 mM	GlcNAc-linker- β Boc: 3,24 mM (2,66 mM)	-
			ATP: 3,15 mM (5,8 mM)			
Restaktivität nach letztem Zyklus	35% (7. Zyklus)	1% (3. Zyklus)	51% (6. Zyklus)	55% (6. Zyklus)	53% (7. Zyklus)	61% (6. Zyklus)
Referenzen	[73], [72]	[81, 121]	[72]	[100]	[118], [122]	[73]

4.2.2.7 Schlussfolgerungen

In diesem Teil der Arbeit gelang es, die Einflüsse der Parameter Beladung, pH-Wert und Temperatur auf die katalytische Aktivität der immobilisierten Enzyme zu ermitteln. Außerdem konnten die Substratkinetiken und die Stabilität bei wiederholtem Verwenden der MEI bestimmt werden. Dabei zeigte sich bei den UGDH, NOX und USP-MEI, dass eine Erhöhung der Beladung deren spezifische Aktivität verringert. Dagegen nahm bei den GalK und GalT-MEI die spezifische Aktivität mit steigender Beladung zu. Bei den GlcAT-MEI konnte kein signifikanter Einfluss der Beladung festgestellt werden. Bezogen auf die spezifische Aktivität der freien Enzyme, lagen die höchsten relativen spezifischen Aktivitäten in dieser Versuchsreihe zwischen 74% und 86%. Der Einfluss der Beladung auf immobilisiertes GalK und GalT ist untypisch, da bei höheren Beladungen meist sterische Hinderung auftritt. Daher sollten weitere Untersuchungen mit anderen Batches dieser Enzyme vorgenommen werden. Da von GlcAT nur eine geringe Menge zu Verfügung stand, sollte auch mit diesen MEI der Einfluss der Beladung weiter getestet werden.

Die Versuche bei verschiedenen pH-Werten zeigten, im Vergleich zu den freien Enzymen, keinen Einfluss auf den optimalen pH-Wert der MEI. Die maximalen spezifischen Aktivitäten wurden bei jedem immobilisierten Enzym bei dem gleichen Wert wie dem der freien Enzyme erreicht. Damit stimmten die optimalen pH-Werte auch mit den Angaben aus der Literatur überein. Allerdings lagen die höchsten relativen spezifischen Aktivitäten meist bei nicht optimalen pH-Werten. Für GalK-MEI konnten bei pH 8 über 99% erreicht werden. Das könnte auf eine erhöhte Stabilität hinweisen, welche die Enzyme durch die Immobilisierung gegenüber starken Einflüssen durch den pH-Wert erhalten haben.

Es wurde auch der Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf die spezifische Aktivität der MEI untersucht. Dabei lag der Wert für die optimale Temperatur teilweise über dem der freien Enzyme und den Angaben der Literatur. Die Stabilität der Enzyme gegenüber Temperatureinflüssen bei längeren Synthesen wurde getestet, indem nach Ablauf des Standard-Assays erneut Substrate hinzugefügt und die Reaktionen für weitere 20 min fortgesetzt wurden. Es stellte sich heraus, dass bei höheren Temperaturen die spezifische Aktivität der MEI die der freien Enzyme häufig überschritt. Somit konnte die erhöhte Stabilität der MEI gegenüber starken Temperatureinflüssen gezeigt werden. Da in dieser Arbeit die Enzyme kombiniert wurden und nicht jedes Enzym hohe Stabilität über 40°C aufwies, wurde dieses Phänomen nicht weiter untersucht.

Für jedes immobilisierte Enzym konnte der Einfluss von Substratkonzentrationen und die Substratkinetiken ermittelt werden. Im Vergleich zu den Werten, welche die freien Enzyme in den Experimenten oder laut Literatur erreichten, zeigten alle MEI geringere Affinitäten und maximale Umsatzgeschwindigkeiten, bis auf GalT und GlcAT. GalT-MEI wiesen für GlcNAc-linker- β Boc eine höhere Affinität als die freien GalT auf und GlcAT-MEI für beide Substrate, LacNAc-linker- β Boc und UDP-GlcA, höhere maximale Reaktionsgeschwindigkeiten. Damit stellen GalT und GlcAT-MEI die Ausnahme da, denn für gewöhnlich verringern sich die Affinitäten und maximalen Umsatzgeschwindigkeiten durch die Immobilisierung, aufgrund von

Diffusionsbeschränkung des Substrats oder Konformationsänderungen des Enzyms. Bei den GalK, USP und GalT-MEI traten, wie bei deren freien Enzymen, Substrathemmungen ab bestimmten Konzentrationen auf. Daher eignen sich diese Enzyme nicht für Synthesen mit hohen Substratkonzentrationen.

Die Stabilität der immobilisierten Enzyme bei wiederholtem Einsatz wurde im letzten Abschnitt dieses Kapitels untersucht. Die geringste Stabilität wiesen die NOX-MEI auf, welche schon nach dem zweiten Zyklus kaum noch Restaktivität hatten. Da deren spezifische Aktivität jedoch sehr hoch ist, und dadurch bei einer Synthesereaktion nur wenige MEI eingesetzt werden müssten, könnte dieser Nachteil bei mehreren Synthesesyklen durch eine geringe Nachdosierung von NOX-MEI ausgeglichen werden. UGDH-MEI erreichten hingegen nach 7 Zyklen noch 35% Restaktivität. GalK, USP, GalT und GlcAT-MEI wiesen sogar mehr als 50% Restaktivität nach 6 Wiederverwendungen auf. Somit könnten die MEI durch mehrere Synthesesyklen mehr Produkt umsetzen als die gleiche Menge an freien Enzymen, die nur für einen Zyklus verwendet werden können.

4.3 Synthesereaktionen

4.3.1 EM UDP-GlcA

Die Synthese von UDP-GlcA mit den immobilisierten Enzymen UGDH und NOX war die erste Synthese mit MEI im KMS, die über mehrere Stunden ablief. Um den Umsatz zu verbessern, wurde der Einfluss der Substratkonzentrationen und der UGDH und NOX-MEI Verhältnisse untersucht. Mit den zuvor angepassten Reaktionsbedingungen konnte so die Synthese von UDP-GlcA optimiert werden. Der Umsatz beschreibt das Verhältnis der Produktkonzentration zu der initial eingesetzten Substratkonzentration.

Zu Beginn wurde eine Testsynthese mit 2 mM UDP-Glc und 3 mM NAD⁺ durchgeführt. Die eingesetzten Aktivitäten von immobilisierter UGDH und NOX betragen 4,95 mU und 6,68 mU (bestimmt aus den spezifischen Aktivitäten bei einem pH-Wert von 8,7 in 50 mM Tris, bei 30 °C, sowie mit jeweils 5 mM oder 1 mM DTT), die Konzentration der immobilisierten UGDH 213 mg/mL und die der immobilisierten NOX 13 mg/mL. Damit konnte jedoch nach 6 h nur ein Umsatz von 55,4% erreicht werden. Im weiteren Verlauf wurden schrittweise die eingesetzten Mengen an immobilisierten NOX und UGDH sowie die Substratkonzentration angepasst (Daten hier nicht gezeigt). Die angepassten Substratkonzentrationen betragen 1 mM UDP-Glc und 3 mM NAD⁺. Die NAD⁺-Konzentration von 3 mM wurde gewählt, um NAD⁺ im Überschuss vorliegen zu haben und dadurch die spezifische Aktivität von UGDH nicht durch eine mögliche Verringerung der NOX-MEI Aktivität zusätzlich zu limitieren. Da es bei einer MEI-Partikelkonzentration über 50 µL MEI-slurry pro mL Reaktionspufferkompartiment zur Agglomeration der MEI und dadurch zu einer Abnahme der spezifischen Aktivität der Enzyme kam, wurde entschieden bei UGDH anstatt einer theoretischen Beladung von 10 g/L, eine Beladung der MEI von 30 g/L zu verwenden. Bei NOX wurden MEI mit einer theoretischen Beladung von 10 g/L eingesetzt. Dadurch konnte die MEI-

Partikelkonzentration auf 33,7 $\mu\text{L/mL}$ (25 $\mu\text{L/mL}$ UGDH-MEI und 8,7 $\mu\text{L/mL}$ NOX-MEI) insgesamt reduziert werden. Die eingesetzten Aktivitäten der immobilisierten Enzyme beliefen sich für UGDH auf etwa 10,2 mU und für NOX auf ca. 32,2 mU. Das Reaktionsvolumen betrug 0,2 mL.

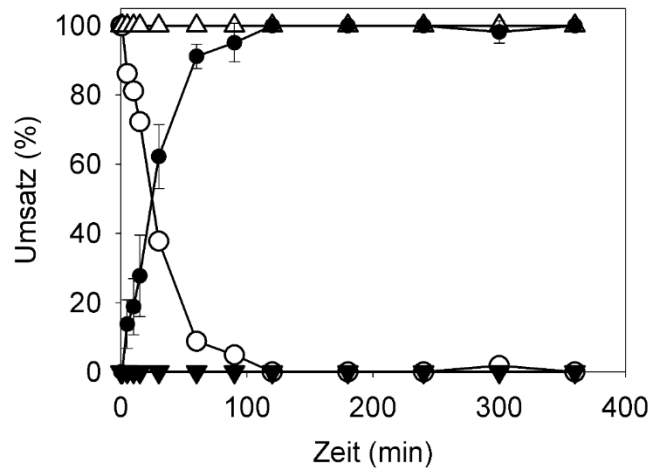


Abbildung 42: Umsatz-Zeit-Diagramm einer Synthesereaktion von UDP-GlcA (-●-) mit 1 mM UDP-Glc (-○-). Das Cosubstrat NAD⁺ (-△-) wurde zu NADH+H⁺ (-▼-) umgesetzt. Es wurde 438 mg/L immobilisierte UGDH mit einer Beladung von 16,5 g/L und 62 mg/L der 6,7 g/L immobilisierte NOX eingesetzt. Die Reaktionslösung setzte sich zusammen aus 50 mM Tris (pH 8,7) als Puffer, 1,5 mM UDP-Glc und 3 mM NAD⁺ sowie 5 mM DTT. Die Reaktionstemperatur betrug 37°C.

In Abbildung 42 ist zu erkennen, dass mit diesen Einstellungen nach rund 120 min ein vollständiger Umsatz des Substrats UDP-Glc zu UDP-GlcA erreicht werden konnte. Da der vollständige Umsatz bei 120 min im Vergleich zu den Angaben der Literatur [72] früher eintrat, wurde die Synthesereaktion nochmal mit erhöhter UDP-Glc-Konzentration von 1,5 mM wiederholt. Abgesehen von der UDP-Glc-Konzentration wurden alle anderen Bedingungen beibehalten. Wie in Abbildung 43 zu erkennen, wurden nach 120 min ein Umsatz von 86,2% erzielt. Bei beiden Synthesen wurde NADH fast zu 100% umgesetzt, was nach den Rezyklierungsversuchen überrascht und vielmehr die Stabilität der NOX-MEI bei Langzeitversuchen zeigt. Nach 6 h konnte mit den verwendeten Parametern 95,1% UDP-Glc umgesetzt werden. Wahl et al. [72] erreichte mit den freien Enzymen in einem 0,3 mL Ansatz eine Raum-Zeit-Ausbeute, bezogen auf die eingesetzte Menge an UGDH, von 4,3 g UDP-GlcA pro L, h und U UGDH. Mit 22 g/L/h/U, konnte mit den immobilisierten Enzymen die mehr als 5-fache Raum-Zeit-Enzym-Ausbeute erreicht werden. Auch Engels et al. [73] erzielten zuvor in einem 0,3 mL Ansatz nur 2 g/L/h/U. Damit konnte mit den MEI eine effizientere Synthese durchgeführt werden. Betrachtet man die kinetischen Daten der immobilisierten und freien Enzyme, überrascht dieses Ergebnis. Es kann vermutet werden, dass hier der Gewinn an Stabilität durch die Immobilisierung eine Rolle spielt. Wahl et al. berichtete einen Verlust von knapp 50% Aktivität der UGDH nach 3 h Inkubation unter den Synthesebedingungen. UGDH-MEI scheinen über die Zeit der Synthese von 5 h stabiler zu sein und weniger Aktivität zu verlieren, wodurch ihre Produktivität gegenüber den freien Enzymen steigt.

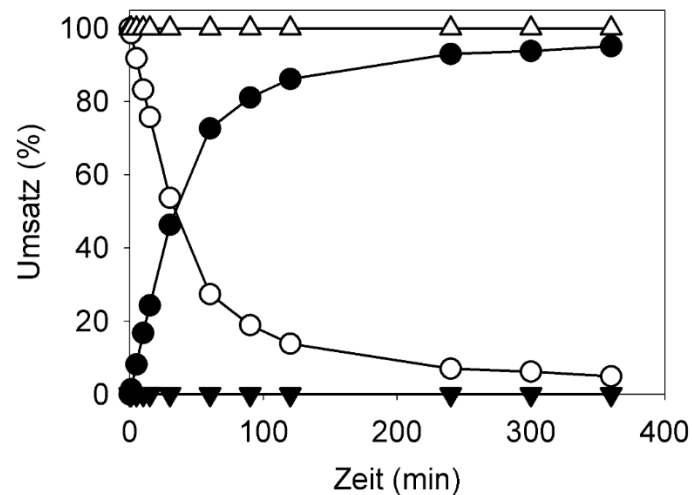


Abbildung 43: Umsatz-Zeit-Diagramm einer Synthesereaktion von UDP-GlcA (-●-) mit 1,5 mM UDP-Glc (-○-). Das Cosubstrat NAD^+ (-△-) wurde zu $\text{NADH}+\text{H}^+$ (-▼-) umgesetzt. Es wurde 438 mg/L immobilisierte UGDH mit einer Beladung von 16,5 g/L und 62 mg/L der 6,7 g/L immobilisierte NOX eingesetzt. Die Reaktionslösung setzte sich zusammen aus 50 mM (pH 8,7) als Puffer, 1,5 mM UDP-Glc und 3 mM NAD^+ sowie 5 mM DTT. Die Reaktionstemperatur betrug 37°C.

4.3.2 Enzymkaskade mit MEI im KMS

Mit den zuvor ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen der immobilisierten Enzyme konnte nun die Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops im KMS optimiert werden. Die Reaktionskaskade im KMS wurde in zwei Schläuchen des TKM bei 37°C in 150 μL Kompartimenten durchgeführt (siehe Abbildung 23). Dabei wurde das EM UDP-GlcA parallel zu dem Produktionsmodul EM UDP-Gal/EM GalT für 150 min verwendet. Bei dem Produktionsmodul EM UDP-Gal/EM GalT wurde zuerst das EM UDP-Gal für 90 min und anschließend das EM GalT für 60 min eingesetzt. Dem EM GalT wurde 1 μL der 1 U/ μL AP hinzugefügt. Nach 150 min wurden die Reaktionslösungen beider Schläuche zu den MEI des EM GlcAT gegeben und weitere 60 min synthetisiert. Die entsprechenden Reaktionslösungen sind in Tabelle 15 und Tabelle 16 zu finden.

Um eine möglichst hohe Gesamtausbeute zu erzielen, wurden verschiedene Mischungsverhältnisse der MEI und Substratkonzentrationen untersucht. Im Optimierungsversuch-1 wurden zunächst 4 mM aller Substrate eingesetzt, was nach der Kombination der Reaktionslösungen für das EM GlcAT in 2 mM vollständig umgesetztes Produkt resultieren würde. Die Anfangskonzentrationen der immobilisierten Enzyme betragen 0,4 μg Enzym / μL Reaktionsvolumen für UGDH und NOX, 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ für GalK und USP und 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ GalT und GlcAT. Damit wurde eine Gesamtausbeute von nur 2,1% erzielt (siehe Abbildung 44A). Die Gesamtausbeute berechnet sich aus den Umsätzen der einzelnen Enzymmodule. Dabei sind die Umsätze der EM anhängig von dem jeweiligen vorherigen EM. Der Umsatz von EM GalT z.B. bezieht sich auf die in EM UDP-Gal umgesetzte Produktmenge. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde für den Optimierungsversuch-2 die Konzentration aller Substrate halbiert, sodass 1 mM Produkt nach einem vollständigen Umsatz entstehen

würde. Die Anfangskonzentrationen der immobilisierten Enzyme wurde erhöht auf 0,67 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ für UGDH und NOX und 0,33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ für GalK, USP, GalT und GlcAT. Die Gesamtausbeute konnte so auf 52,2% erhöht werden (siehe Abbildung 44B). Der beträchtliche Anstieg der Gesamtausbeute könnte auf die komplexe Zusammensetzung der Enzymkaskade zurückzuführen sein. Der Gesamtumsatz der Kaskade setzt sich multiplikativ aus den Umsätzen der Teilschritte zusammen. Da für fünf Enzyme (der Einfluss von NOX spielt hier vermutlich keine große Rolle) die Reaktionsbedingungen optimiert werden, hat schon eine geringe Verbesserung der Produktivität jedes Enzyms einen erheblichen Einfluss. Für den letzten Optimierungsversuch-3, wurden die Substratkonzentrationen beibehalten, und die Anfangskonzentrationen der immobilisierten Enzyme wurden weiter erhöht auf 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ für UGDH und NOX und 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ für GalK, USP, GalT und GlcAT. Somit konnte eine Gesamtausbeute von 96,3% erreicht werden (siehe Abbildung 44C).

Zusätzlich zu den experimentellen Arbeiten wurde die Reaktionskaskade mit MEI im KMS auf Grundlage der kinetischen Daten simuliert (siehe Abbildung 44D), die zuvor mit den einzelnen MEI-Systemen erhalten wurden (siehe Tabelle 14). Die simulierten EM UDP-GlcA und EM UDP-Gal erreichten beide einen Umsatz von 100%, wobei im Experiment das EM UDP-GlcA einen Umsatz von 97,7% und das EM UDP-Gal einen Umsatz von 99,2% aufwies. Basierend auf diesen Substratmengen wurde EM GalT simuliert, welches 99,2% umsetzte. Im Experiment übertraf EM GalT die Simulation und setzte 99,7% von GlcNAc-linker-*t*Boc um. Weiterhin setzte das simulierte EM GlcAT 100% des zur Verfügung stehenden Substrats um, was zu einer Gesamtausbeute von 99,2% führte. Das experimentelle EM GlcAT setzte 98% von LacNAc-linker-*t*Boc und 99,3% von UDP-GlcA um, was zu einer Gesamtausbeute von 96,3% für das nicht-sulfatierte HNK-1 Epitop führte. Die katalytische Gesamtproduktivität GP des Experiments beträgt daher 0,37 g Produkt pro g Gesamtmasse aller immobilisierten Enzyme und für die Simulation 0,38 g/g. Somit entspricht die Simulation fast dem Experiment. Basierend auf dem Experiment im KMS und den Ergebnissen der Recyclingversuche, wäre das KMS in der Lage, in 18 Stunden insgesamt 40 mg nicht-sulfatiertes HNK-1 Epitop zu produzieren, was 6 Zyklen entspricht. Es wurde angenommen, dass ein 3 mL Kompartiment mit 5 mM Substraten verwendet wird und dass sechs Zyklen mit den gleichen Enzymen durchgeführt werden. Dies würde zu einer Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) von HNK-1 Epitop von 17,63 g/L/Tag führen. In Anbetracht der Simulation kann ein RZA von 18,16 g/L/Tag erreicht werden. Das ist fast die 10-fache RZA, die Engels et al. mit freien Enzymen in 24 h erzielt haben [73]. Deren Enzymkaskade umfasste dabei nur drei EM, mit dem EM UDP-GlcA, EM GlcAT und einem in dieser Arbeit nicht verwendetem EM.

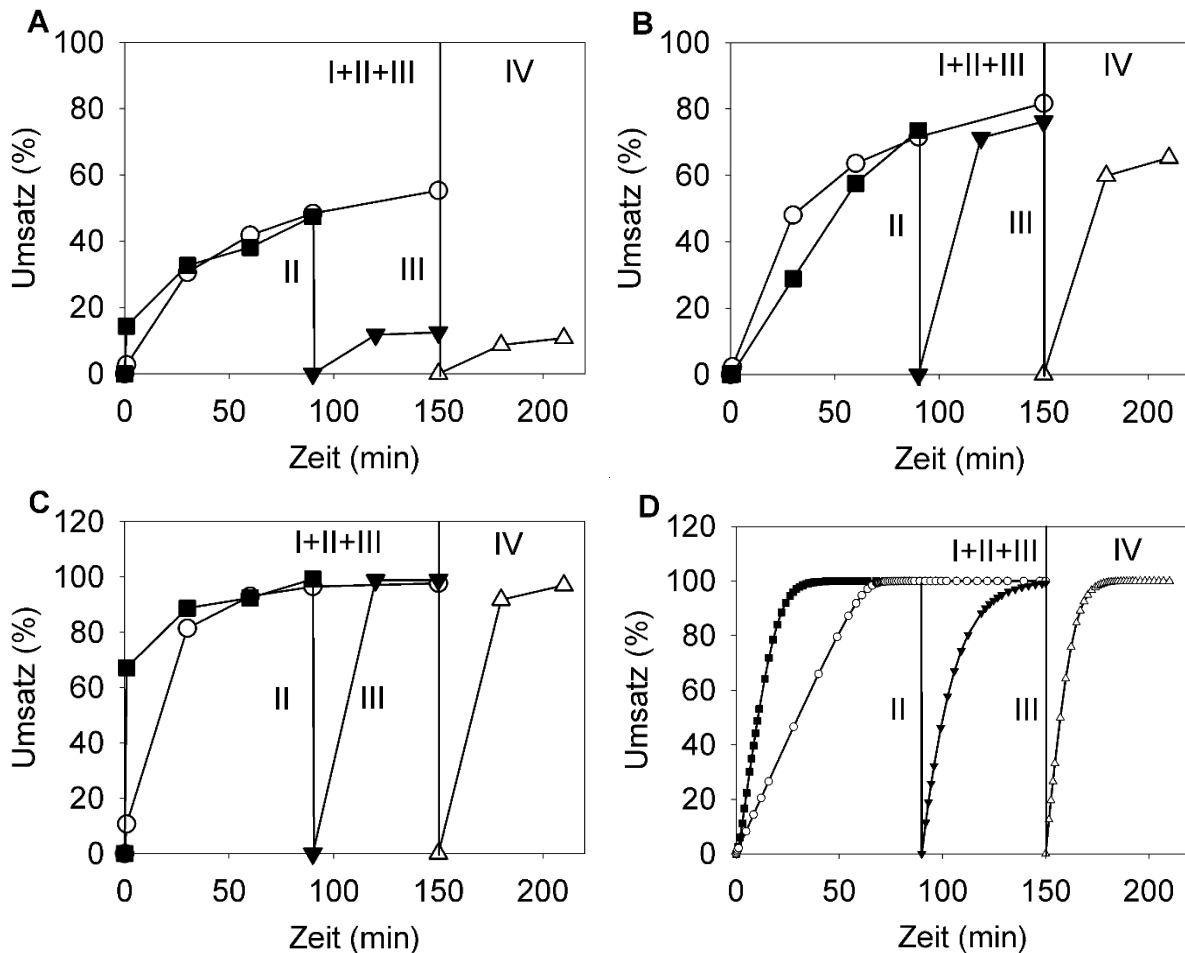


Abbildung 44: Ausbeuten der Reaktionskaskaden mit den MEI im KMS als (A) Optimierungsversuch-1, (B) Optimierungsversuch-2, (C) Optimierungsversuch-3 und (D) als Simulation mit MEI im KMS. Es wurden folgende Enzymmodule eingesetzt: (I) EM UDP-GlcA, (II) EM UDP-Gal, (III) EM GalT und (VI) EM GlcAT. Zwischen- und Endprodukte: (-○-) UDP-GlcA, (-■-) UDP-Gal, (-▼-) LacNAc-linker- β Boc und (-△-) nicht-sulfatiertes HNK-1 Epitop. Im Optimierungsversuch-2 in B, konnte durch Halbierung der Substratkonzentrationen und der etwa 1,5 bis 3-fachen Menge der immobilisierten Enzyme, die Gesamtausbeute um ca. 50 Prozentpunkte gesteigert werden. Durch eine weitere ca. 1,5-fache Erhöhung der Enzymmenge konnte im Optimierungsversuch-3 in C die Gesamtausbeute nochmal auf 96,3% fast verdoppelt werden. Die Simulation in D basiert auf den zuvor ermittelten kinetischen Daten und konnte eine Gesamtausbeute von 99,2% erreichen.

4.3.2.1 Vergleich mit freien Enzymen in Reaktionsgefäßen

Für einen genaueren Vergleich der erreichbaren Gesamtausbeuten mit MEI bzw. mit freien Enzymen, wurde mit der gleichen Menge an freien Enzymen der gleiche parallele Reaktionsablauf mit der gleichen Zusammensetzung der Reaktionslösungen durchgeführt, wie für die MEI im KMS beschrieben. Statt, wie im KMS die immobilisierten Enzyme des verwendeten Enzymmoduls zu separieren und Reaktionslösungen zu den nächsten MEI zu transportieren, mussten die freien Enzyme nach und nach zu der Reaktionslösungen gegeben werden, während die freien Enzyme des zuvor verwendeten Enzymmoduls in der Lösung verblieben. Die Umsatzkurven dieses Versuchs sind in Abbildung 45 abgebildet. Nach 210 min lag die

Gesamtausbeute von nicht-sulfatiertem HNK-1 Epitop bei 43,8%. Das EM UDP-Glc hatte den höchsten Umsatz mit 100%. Im EM UDP-Gal hatte freies GalK zunächst fast 91% der Galaktose umgesetzt, freies USP anschließend nur 83% des zu Verfügung stehenden Gal-1-P, was zu 75,5% Gesamtumsatz dieses Enzymmoduls führte. Auch die freie GalT setzte nur knapp 83% der zuvor synthetisierten UDP-Gal um. Den geringsten Umsatz erreichten die freien GlcAT in den letzten 60 min mit 57,5%. Somit konnte die gleiche Menge an immobilisierten Enzymen im KMS insgesamt eine mehr als 50% höhere Gesamtausbeute an nicht-sulfatiertes HNK-1 Epitop erreichen. Dies zeigt den Vorteil der Kompartimentierung, welche der durch die Verwendung von MEI möglich ist und wodurch die optimalen Reaktionsbedingungen für jedes Enzym oder Enzymmodul genutzt werden können. Auch kann dadurch gewährleistet werden, dass nur die gewünschten Reaktionen ablaufen, was ein Grund dafür sein kann, dass die Reaktionskaskade mit den freien Enzymen einen geringeren Umsatz erzielte. Durch eine Optimierung der Reaktionskaskade mit den freien Enzymen ist eine Steigerung des erreichten Gesamtumsatzes in einen ähnlichen Bereich, wie mit den immobilisierten Enzymen, denkbar. Selbst in diesem Fall wäre der Versuch mit den MEI im KMS mit 96,3% Gesamtumsatz erfolgreich, da die immobilisierten Enzyme wiederverwendet werden können, was zu deutlich höheren Produktausbeuten pro verwendetem Enzym führt. Auch das zeit- und kostenintensive Aufreinigen der freien Enzyme entfällt mit den MEI.

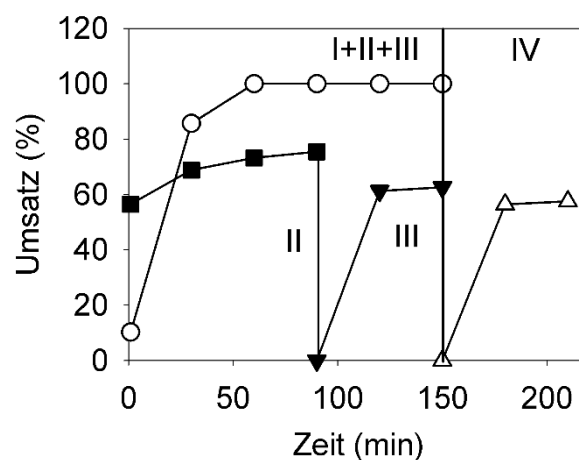


Abbildung 45: Ausbeuten der Reaktionskaskade mit freien Enzymen in Reaktionsgefäßen. Es wurden folgende Enzymmodule eingesetzt: (I) EM UDP-GlcA, (II) EM UDP-Gal, (III) EM GalT und (VI) EM GlcAT. Zwischen- und Endprodukte: (-○-) UDP-GlcA, (-■-) UDP-Gal, (-▼-) LacNAc-linker-*t*Boc und (-△-) nicht-sulfatiertes HNK-1 Epitop. Das Experiment mit den freien Enzymen erzielte eine Gesamtausbeute von 43,8%.

4.3.3 Validierung der online MS-Analyse

Für eine online Analyse während des mehrstufigen Reaktionsprozesses wurde ein MS-System an das KMS gekoppelt (siehe 3.6.1). Die erfolgreiche Einbindung des MS-Systems wurde gezeigt, indem die Reaktionslösungen der Enzymkaskade mit den MEI im KMS, in das MS-System gepumpt und damit analysiert wurden. Dabei wurden Proben der Reaktionslösungen nach 90 min, vor dem Start des EM GalT, nach 150

min und am Ende der Reaktionskaskade nach 210 min untersucht. Die Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie mit Quadrupol und Flugzeitanalyse (engl. time-of-flight) - Analysatoren (ESI-Q-ToF-MS) Massenspektren sind in Abbildung 46 dargestellt. Vor dem Hinzufügen von GalT, wurde für das Substrat GlcNAc-linker-*t*Boc eine molekulare Masse (m/z) von 422 Da gemessen (siehe Abbildung 46A). Die Molekülmasse 444 Da stammt vermutlich von einem GlcNAc-linker-*t*Boc mit einem Natriumaddukt, das ein Proton durch ein Natrium der Pufferlösung ersetzt. Da durch das GalT eine 180 Da schwere Galaktose unter Abspaltung eines H_2O Moleküls angefügt wird, wurde für LacNAc-linker-*t*Boc eine molekulare Masse von 584 Da berechnet. In Abbildung 46B ist zu erkennen, dass dieser Wert ebenfalls mit dem MS für das 162 Da schwerere Zwischenprodukt gemessen wurde. Berücksichtigt man die durch GlcAT katalysierte Reaktion im EM GlcAT, bei der das 194 Da schwere GlcA aus dem zuvor produzierten UDP-GlcA übertragen wird, ist der theoretische Wert für das nicht-sulfatierte HNK-1 Epitop 760 g/mol. Dies entspricht derselben Molekülmasse, wie sie mit der ESI-Q-ToF-MS Messung ermittelt wurde (siehe Abbildung 46C). Auch Engels et al. konnte diese molekulare Masse nachweisen [73]. Somit konnte auch das Produkt der Enzymkaskade mit den MEI im KMS erfolgreich nachgewiesen werden.

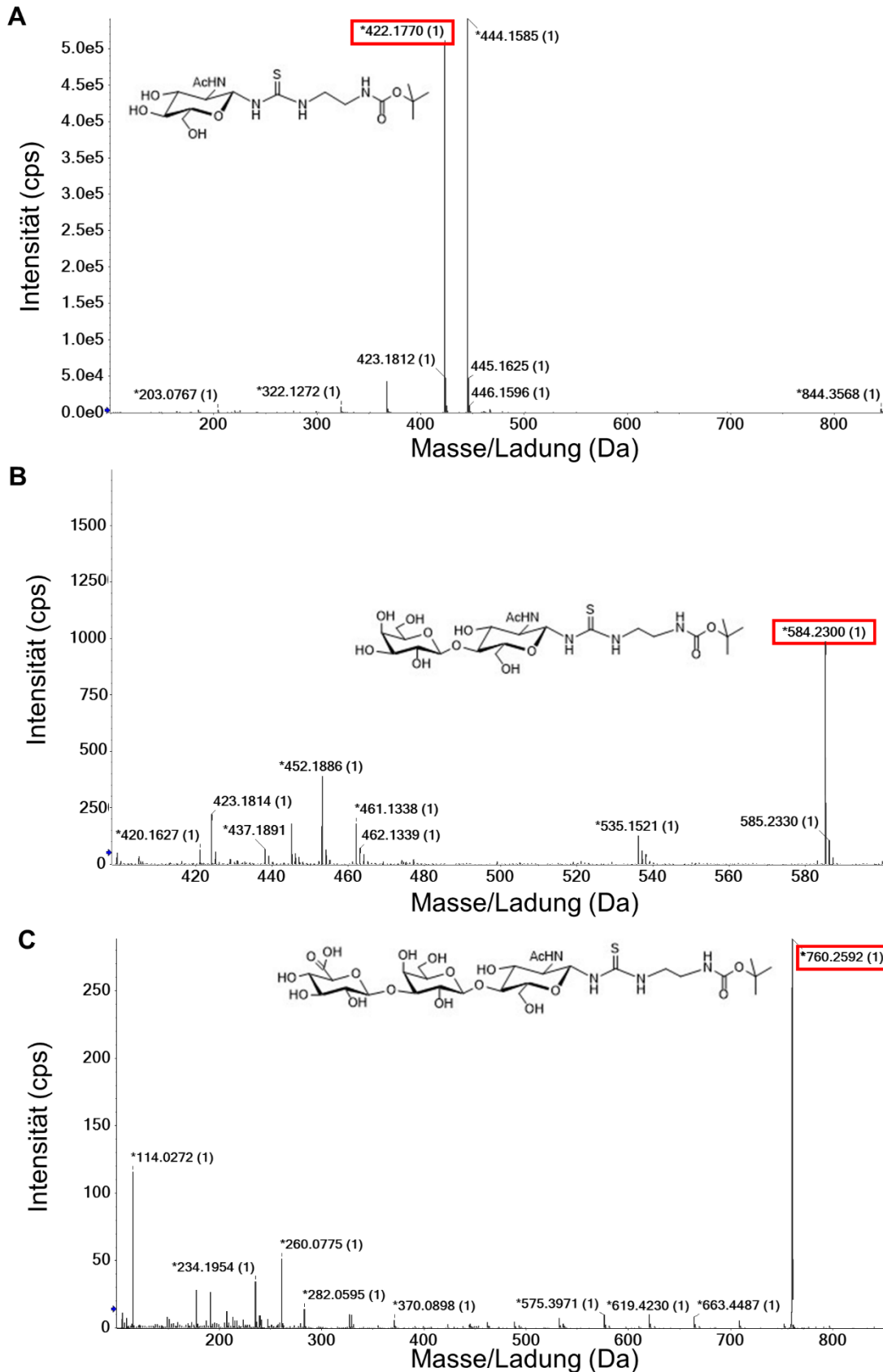


Abbildung 46: ESI-Q-ToF Massenspektren der Substrate und Produkte von jedem Schritt der Kaskadenreaktion von immobilisiertem GalT und GlcAT. In (A) ist das Substrat GlcNAc-linker-tBoc gezeigt, berechnete Masse (m/z): 422,2, in (B) das Zwischenprodukt LacNAc-linker-tBoc, berechnete Masse (m/z): 584,2 und in (C) das Endprodukt nicht-sulfatiertes HNK-1 Epitop, berechnete Masse (m/z): 760,3. Alle Proben wurden 1:10000 verdünnt.

4.3.4 Schlussfolgerungen

Mit dem EM UDP-GlcA wurde erstmals eine Synthesereaktion im KMS durchgeführt. Dabei wurden verschiedene MEI- und Substratkonzentrationen getestet. Es zeigte sich, dass geringe Enzymbeladungen der MEI für Synthesen nicht geeignet sind, da es durch die, in diesem Fall notwendigen, hohen MEI-Konzentration zu Agglomerationen kommt. Durch die schrittweise Optimierung konnte eine Raum-Zeit-Ausbeute, bezogen auf die eingesetzte Menge an UGDH in U, von 41 g/L/h/U erreicht werden. Diese war mehr als 10-fach höher, als in der Literatur mit freien Enzymen angegeben.

Mit allen zuvor optimierten Reaktionsparametern wurde die Enzymkaskade mit allen MEI im KMS durchgeführt. Um eine optimale Ausbeute an nicht-sulfatiertem HNK-1 Epitop zu erzielen, wurden auch hier die MEI-Mischverhältnisse und Substratkonzentrationen variiert. So konnte die Gesamtausbeute des Produktes von 2,1% auf 96,3% schrittweise gesteigert werden. Mit dem in das KMS integrierten MS-System, konnte das, mit der Enzymkaskade angestrebte, Zielmolekül (nicht-sulfatiertes HNK-1 Epitop) in der Produktlösung nachgewiesen werden. Mit den zuvor ermittelten kinetischen Daten der MEI wurde für die gleichen Reaktionsbedingungen, wie für die Synthese eine Simulation durchgeführt. Diese resultierte in einer Gesamtausbeute von 99,2% im Vergleich zu 96,3% Gesamtausbeute des Experiments. Um die MEI mit den freien Enzymen zu vergleichen, wurde die gleiche Enzymkaskade mit den gleichen Prozessschritten auch mit den freien Enzymen durchgeführt. Dieses Experiment erzielte nur eine Gesamtausbeute von 43,8%. Dies zeigt, dass selbst bei einer 1-fachen Verwendung der MEI im KMS, diese mehr Produktumsatz generieren können als freie Enzyme. Selbst bei einer Steigerung der mit freien Enzymen erreichbaren Gesamtausbeute hätten die MEI durch ihre Wiederverwendbarkeit einen klaren ökonomischen Vorteil. Durch den quasi automatischen Prozessablauf im KMS sind Synthesen mit den MEI auch zeitsparend. Zudem müssen die MEI nicht aufwendig aus der Produktlösung aufgereinigt werden. Aufgrund der Rezyklierungs-, Synthese- und Simulationsdaten wurde berechnet, dass in 18 Stunden, also 6 Zyklen, in 3 mL Kompartimenten und bei Einsatz von 5 mM Substrat, eine RZA von 17,6 – 18,2 g/L/Tag erzielt werden kann. Diese Werte sind etwa 10-fach höher als publizierte RZA für ähnliche Enzymkaskaden mit freien Enzymen und nicht-sulfatiertem HNK-1 Epitop als Produkt. Damit konnten die Syntheseexperimente die Vorteile des Einsatzes der MEI im KMS zeigen.

5 Fazit und Ausblick

Diese Arbeit hatte das Ziel, automatisierte enzymatische Glykansynthesen durch Enzymkaskadenreaktionen in einem kompartimentierten Mikroreaktorsystem (KMS) durchzuführen, unter Verwendung von Enzymen, die an magnetische Mikropartikel immobilisiert sind.

Das KMS wurde aus einem Mikroreaktorsystem weiterentwickelt, das in einem vorherigen Projekt der Arbeitsgruppe Franzreb konstruiert wurde. Es wurde hochskaliert, damit wässrige Kompartimente (Plugs) bis 3 mL stabil generiert werden können. Die zuverlässige Erzeugung von Plugs wurde für verschiedene Volumina bei variierenden Fließgeschwindigkeiten mit unterschiedlichen Separationsfluiden nachgewiesen. Für die Generierung von 3 mL Plugs musste ein Schlauch mit ½“ Außendurchmesser verwendet werden. Bei diesem Schlauchdurchmesser konnten Plugs nur mit dem organischen Lösungsmittel Anisol als Separationsfluid stabil erzeugt werden, da dieses eine Dichte nahezu wie Wasser hat. Da durch die Verwendung dieses organischen Lösungsmittels eine starke Be- und Entlüftung notwendig ist, sollte ein weniger schädliches oder flüchtiges Separationsfluid für die Generierung von Plugs mit 3 mL und höherem Volumen getestet werden. Die Untersuchung der Verteilung der Magnetpartikel in den Kompartimenten durch das elektromagnetische Feld eines Helmholtz-Spulenpaares für verschiedene Pluggrößen zeigte, dass trotz des Hochskalierens der Plugs eine schnelle Resuspendierung möglich ist. Das KMS könnte daher weiter hochskaliert werden, um höhere Produktivitäten zu erhalten. Durch das Anfügen des temperaturkontrollierten Moduls an das KMS können für beliebige Enzymreaktionen oder z.B. Aufreinigungsschritte, die optimalen Bedingungen eingestellt werden. Mit dem angeschlossenen MS-System besitzt das KMS eine attraktive online Analyseverfahren, die es gegenüber vielen immobilisierten mikrofluidischen Enzymreaktoren (IMER) hervorhebt.

Die in dieser Arbeit verwendeten sechs rekombinanten Enzyme wurden mit einem His₆-Tag exprimiert. Über Komplexbildung wurden sie an Ni-IDA funktionalisierte, magnetische Mikropartikel gebunden. Bei den Immobilisierungsversuchen wurden durchschnittlich fast 80% der verwendeten Enzyme gebunden. Abhängig von dem Enzym und dem Verhältnis Enzym zu Magnetpartikel, konnten in Einzelfällen Bindungsausbeuten bis zu 98% erreicht werden. Noch stabilere Beladungen könnten mit alternativen Immobilisierungsmethoden erreicht werden. Es könnten z.B. Enzyme mit SNAP- oder CLIP-Tag ausgestattet werden, um eine kovalente Bindung zu erhalten.

Für die immobilisierten Enzyme wurden die Reaktionsbedingungen durch automatisierte Parameterstudien im KMS optimiert. Dabei wurden die Einflüsse der Parameter Enzymbeladung, pH-Wert, Temperatur und Substratkonzentration auf die spezifische Enzymaktivität analysiert. So konnte neben der Optimierung der Reaktionsbedingungen auch die Stabilität demonstriert werden, welche die Enzyme durch die Immobilisierung erlangt haben. Die immobilisierten Enzyme β 4GalT und β 3GlcAT zeigten Aktivität bei Temperaturen von über 40°C, bei denen die entsprechenden freien Enzyme inaktiv sind. Dadurch war die spezifische Aktivität der immobilisierten Enzyme teilweise höher als die der freien. Diese immobilisierten

Enzyme sollten bei Temperaturen von über 40°C über mehrere Stunden inkubiert werden, um zu untersuchen, ob sie auch bei langandauernden Synthesereaktion aktiv bleiben. Somit könnten sie mit anderen Enzymen kombiniert werden, die in immobilisierter Form bei hohen Temperaturen aktiv sind, wodurch höhere Produktivitäten erreicht werden könnten.

Die Wiederverwendbarkeit der immobilisierten Enzyme wurde getestet, indem aufeinanderfolgende Aktivitätsassays mit den gleichen Enzymen und wechselnden Reaktionslösungen durchgeführt wurden. Mit durchschnittlich mehr als 50% Restaktivität nach 6 Zyklen konnte für die meisten immobilisierten Enzyme eine höhere Produktivität, als für die gleiche Menge an freien Enzymen gezeigt werden. Somit konnte einer der wichtigsten Vorteile der Immobilisierung von Enzymen bestätigt werden. Noch höhere Restaktivitäten könnten durch eine andere Immobilisierungsmethode erreicht werden, wie den zuvor erwähnten kovalenten Kupplungen.

Mit den zuvor gewonnenen Daten aus den Parameterstudien wurden Nukleotidzucker- und Glykansynthesen in dem KMS getestet. Es wurden die Verhältnisse der eingesetzten immobilisierten Enzyme und die Substratmengen variiert, um die Produktausbeute zu optimieren. Für die Synthese des nicht-sulfatierten Human Natural Killer-1 (HNK-1) Glykan Epitops wurden die, in Enzymmodule unterteilten, Reaktionen in einer komplexen Enzymkaskade kombiniert. In dem KMS konnte die Enzymkaskade automatisiert und teilweise parallelisiert durchgeführt werden. Somit wurde eine Gesamtausbeute des Produktes von 96% erreicht. Dieses Ergebnis wurde durch eine Simulation überprüft. Diese wurde mit den zuvor ermittelten, kinetischen Daten der immobilisierten Enzyme durchgeführt, unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie die der experimentellen Synthese. Mit 99% Gesamtausbeute konnte damit das experimentelle Ergebnis bestätigt werden. Für den Vergleich mit einer Synthese mit freien Enzymen wurde die Enzymkaskade bei gleichen Reaktionsbedingungen durch sequentielles Zugeben der freien Enzyme durchgeführt. Dabei konnte nur eine Gesamtausbeute von knapp 44% erreicht werden. Somit konnte die deutlich höhere Produktivität durch den Einsatz von immobilisierten Enzymen im KMS demonstriert werden. Dies zeigt erneut den großen Vorteil der Kompartimentierung im KMS, das für jeden Reaktionsschritt optimale Reaktionsbedingungen bietet und Inhibierungen verhindern kann. Aufgrund der Modularität des KMS könnte die Produktivität erhöht werden, indem mehr Schläuche für parallele Reaktionen hinzugefügt werden, wodurch Kaskaden, die aus noch mehr Enzymen bestehen, verwendet werden könnten. Mit weiteren immobilisierten Enzymmodulen könnte die automatisierte Synthese noch komplexerer Glykane in dem KMS realisiert werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das KMS die Entwicklung effizienter Enzymkaskaden durch die Kombination kompatibler enzymatischer Reaktionen, in unterschiedlichen Anordnungen, unter optimalen Bedingungen ermöglicht. Im Vergleich zu anderen publizierten Enzymkaskaden in Mikroreaktoren, in denen auf Magnetpartikel immobilisierte Enzyme verwendet werden, ist die Anzahl der verwendeten Enzyme und der Automatisierungsgrad deutlich höher. Durch die Modularität des Systems können jedoch auch andere biotechnologischen Prozesse

bewältigt werden. Die einfache Skalierbarkeit erlaubt die Anwendung von Prozessen verschiedenster Dimensionen. Im Rahmen eines teilweise parallel verlaufenden Projektes konnte eine mehrstufige, komplexe Aufreinigung von DNA mit magnetischen Mikropartikeln im analytischen Bereich implementiert und automatisiert werden. Mögliche Anwendungsgebiete dieses Mikroreaktorsystems könnten die Biomedizin, die Biopharmazie und die Lebensmittelindustrie sein. Wie hier demonstriert, könnten Glykane in kleinen Mengen automatisch synthetisiert werden, z.B. für das Wirkstoffscreening oder als Analysestandard für Muttermilch-Oligosaccharide. Im Vergleich zu herkömmlichen *liquid-handling* Stationen bietet das entwickelte KMS auch den Vorteil eines vollständig geschlossenen Systems. Somit wird die Verdampfung von Lösungsmitteln, das Risiko einer Kontamination, das bei der Handhabung von z.B. offene 96-Well-Platten besteht und die Gefahr durch schädliche Substrate wie z.B. Cyanide vermieden werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Yu, R.K., Y. Suzuki, and M. Yanagisawa, *Membrane glycolipids in stem cells*. FEBS Letters, 2010. **584**(9): p. 1694-1699.
2. Ohtsubo, K. and J.D. Marth, *Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease*. Cell, 2006. **126**(5): p. 855-867.
3. Wang, C.-C., et al., *Regioselective one-pot protection of carbohydrates*. Nature, 2007. **446**: p. 896.
4. Zhu, X. and R.R. Schmidt, *New Principles for Glycoside-Bond Formation*. Angewandte Chemie International Edition, 2009. **48**(11): p. 1900-1934.
5. Hsu, C.-H., et al., *Toward Automated Oligosaccharide Synthesis*. Angewandte Chemie International Edition, 2011. **50**(50): p. 11872-11923.
6. Guberman, M. and P.H. Seeberger, *Automated Glycan Assembly: A Perspective*. Journal of the American Chemical Society, 2019. **141**(14): p. 5581-5592.
7. Panza, M., et al., *Automated Chemical Oligosaccharide Synthesis: Novel Approach to Traditional Challenges*. Chemical Reviews, 2018. **118**(17): p. 8105-8150.
8. Sears, P. and C.-H. Wong, *Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins*. Science, 2001. **291**(5512): p. 2344-2350.
9. Halcomb, R.L., H. Huang, and C.-H. Wong, *Solution-and solid-phase synthesis of inhibitors of H. pylori attachment and E-selectin-mediated leukocyte adhesion*. Journal of the American Chemical Society, 1994. **116**(25): p. 11315-11322.
10. Zhang, J., et al., *Machine-Driven Enzymatic Oligosaccharide Synthesis by Using a Peptide Synthesizer*. Angewandte Chemie, 2018. **130**(51): p. 16880-16884.
11. Cai, C., et al., *Fluorous-Assisted Chemoenzymatic Synthesis of Heparan Sulfate Oligosaccharides*. Organic Letters, 2014. **16**(8): p. 2240-2243.
12. Li, T., et al., *An automated platform for the enzyme-mediated assembly of complex oligosaccharides*. Nature Chemistry, 2019. **11**(3): p. 229-236.
13. Wen, L., et al., *Toward Automated Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides*. Chemical Reviews, 2018. **118**(17): p. 8151-8187.
14. Pohl, N.L.B., *Robots command enzymes*. Nature Chemistry, 2019. **11**(3): p. 201-203.
15. Nahalka, J., et al., *Superbeads: Immobilization in "Sweet" Chemistry*. Chemistry – A European Journal, 2003. **9**(2): p. 372-377.
16. Cha, T., A. Guo, and X.-Y. Zhu, *Enzymatic activity on a chip: The critical role of protein orientation*. PROTEOMICS, 2005. **5**(2): p. 416-419.
17. Hübner, J., C. Arlt, and M. Franzreb, *Automated, quantitative DNA purification and spectrometric analysis from whole blood samples in a compartmented reactor device*. Reaction Chemistry & Engineering, 2019. **4**(3): p. 575-586.
18. Haeberle, S. and R. Zengerle, *Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications*. Lab on a Chip, 2007. **7**(9): p. 1094-1110.
19. Zhang, X. and S.J. Haswell, *Micro-Fluidic and Lab-on-a-Chip Technology*, in *New Avenues to Efficient Chemical Synthesis: Emerging Technologies*, P.H. Seeberger and T. Blume, Editors. 2007, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 21-37.
20. Malic, L., et al., *Integration and detection of biochemical assays in digital microfluidic LOC devices*. Lab on a Chip, 2010. **10**(4): p. 418-431.

21. Matosevic, S., G.J. Lye, and F. Baganz, *Immobilised enzyme microreactor for screening of multi-step bioconversions: Characterisation of a de novo transketolase-w-transaminase pathway to synthesise chiral amino alcohols*. Journal of Biotechnology, 2011. **155**(3): p. 320-329.
22. Křenková, J. and F. Foret, *Immobilized microfluidic enzymatic reactors*. ELECTROPHORESIS, 2004. **25**(21-22): p. 3550-3563.
23. Tamborini, L., et al., *Flow Bioreactors as Complementary Tools for Biocatalytic Process Intensification*. Trends in Biotechnology, 2018. **36**(1): p. 73-88.
24. Bolivar, J.M., J. Wiesbauer, and B.J.T.i.b. Nidetzky, *Biotransformations in microstructured reactors: more than flowing with the stream?* 2011. **29**(7): p. 333-342.
25. Svoboda, J., *Magnetic methods for the treatment of minerals*. Development in Mineral Processing Vol. vol. 8. 1987, Amsterdam, Niederlande: Elsevier Science Publishers B.V.
26. Michalowsky, L., Heinecke, U., Schneider, J. and Wich, H., *Magnettechnik: Grundlagen und Anwendungen*. Vol. second ed. 1995, Leipzig: Fachbuchverlag Leipzig GmbH.
27. DeTroye, D.J., und Chase, R. J., *The Calculation and Measurement of Helmholtz Coil Fields*. US Army Res. Lab. Rep. ARL-TN-35, 1994.
28. Beiranvand, R., *Analyzing the uniformity of the generated magnetic field by a practical one-dimensional Helmholtz coils system*. 2013. **84**(7): p. 075109.
29. Somsak, T., et al. *Conductive microbead detection by Helmholtz coil technique with SV-GMR sensor*. in *Third IEEE International Workshop on Electronic Design, Test and Applications (DELTA'06)*. 2006.
30. Han, X., Q. Cao, and L. Li, *Design and Evaluation of Three-Dimensional Electromagnetic Guide System for Magnetic Drug Delivery*. IEEE Transactions on Applied Superconductivity, 2012. **22**(3): p. 4401404-4401404.
31. Franzreb, M., et al., *Liquid-phase mass transfer of magnetic ion exchangers in magnetically influenced fluidized beds: I. DC fields*. Reactive and Functional Polymers, 2001. **46**(3): p. 247-257.
32. Meller, K., et al., *Microfluidic reactors with immobilized enzymes—characterization, dividing, perspectives*. 2017. **244**: p. 84-106.
33. Kecskemeti, A. and A.J.T. Gaspar, *Particle-based immobilized enzymatic reactors in microfluidic chips*. 2018. **180**: p. 211-228.
34. Ko, D.-H., K.-W. Gyak, and D.-P.J.J.o.F.C. Kim, *Emerging microreaction systems based on 3D printing techniques and separation technologies*. 2017. **7**(3-4): p. 72-81.
35. Takenaga, S., et al., *Fabrication of biocompatible lab-on-chip devices for biomedical applications by means of a 3D-printing process*. 2015. **212**(6): p. 1347-1352.
36. Au, A.K., et al., *3D-printed microfluidic automation*. 2015. **15**(8): p. 1934-1941.
37. Al-Qodah, Z., et al., *Immobilized enzymes bioreactors utilizing a magnetic field: a review*. 2017. **121**: p. 94-106.
38. Al-Qodah, Z., et al., *On the performance of immobilized cell bioreactors utilizing a magnetic field*. 2018. **34**(3): p. 385-408.
39. Pamme, N.J.L.o.a.C., *Magnetism and microfluidics*. 2006. **6**(1): p. 24-38.
40. Cao, Q., X. Han, and L.J.L.o.a.C. Li, *Configurations and control of magnetic fields for manipulating magnetic particles in microfluidic applications: magnet systems and manipulation mechanisms*. 2014. **14**(15): p. 2762-2777.

41. Kim, K.S. and J.-K.J.L.o.a.C. Park, *Magnetic force-based multiplexed immunoassay using superparamagnetic nanoparticles in microfluidic channel*. 2005. **5**(6): p. 657-664.
42. Lee, S.H.S., et al., *Microfluidic continuous magnetophoretic protein separation using nanoparticle aggregates*. 2011. **11**(4): p. 429.
43. Østergaard, S., et al., *A novel approach to the automation of clinical chemistry by controlled manipulation of magnetic particles*. 1999. **194**(1-3): p. 156-162.
44. Biswal, S.L. and A.P. Gast, *Micromixing with Linked Chains of Paramagnetic Particles*. *Analytical Chemistry*, 2004. **76**(21): p. 6448-6455.
45. Roy, T., et al., *Magnetic microsphere-based mixers for microdroplets*. 2009. **21**(2): p. 027101.
46. Verbruggen, B., et al., *Separation of magnetic microparticles in segmented flow using asymmetric splitting regimes*. 2015. **18**(1): p. 91-102.
47. Liu, X., J. Yang, and L.J.R.i.A.C. Yang, *Capillary electrophoresis-integrated immobilized enzyme reactors*. 2016. **35**(3): p. 115-131.
48. Tziaila, A.A., et al., *Lipase immobilization on smectite nanoclays: Characterization and application to the epoxidation of α -pinene*. 2010. **101**(6): p. 1587-1594.
49. Pavlidis, I., et al., *Functionalized multi-Wall carbon nanotubes for lipase immobilization*. 2010. **12**(5): p. B179-B183.
50. Boehm, C.R., P.S. Freemont, and O.J.L.o.a.C. Ces, *Design of a prototype flow microreactor for synthetic biology in vitro*. 2013. **13**(17): p. 3426-3432.
51. Franzreb, M., et al., *Protein purification using magnetic adsorbent particles*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006. **70**(5): p. 505-516.
52. John, U., et al., *Biochemical and biomedical application of monodisperse polymer particles*. *Macromolecular Symposia*, 1996. **101**(1): p. 491-500.
53. Sommaruga, S., et al., *Immobilization of carboxypeptidase from *Sulfolobus solfataricus* on magnetic nanoparticles improves enzyme stability and functionality in organic media*. *BMC Biotechnology*, 2014. **14**(1): p. 82.
54. Hübner, J., et al., *An automated and compartmented fluidic reactor device for multi-step sample-to-answer processes using magnetic particles*. *Reaction Chemistry & Engineering*, 2017. **2**: p. 349.
55. Figuerola, A., et al., *From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications*. *Pharmacological Research*, 2010. **62**(2): p. 126-143.
56. Shang, H., et al., *Synthesis and Characterization of Paramagnetic Microparticles through Emulsion-Templated Free Radical Polymerization*. *Langmuir*, 2006. **22**(6): p. 2516-2522.
57. Levison, P.R., et al., *New approaches to the isolation of DNA by ion-exchange chromatography*. *Journal of chromatography. A*, 1998. **827**(2): p. 337-344.
58. Ugelstad, J., et al., *Monodisperse polymer particles — a step forward for chromatography*. *Nature*, 1983. **303**: p. 95.
59. Petr, P., et al., *Magnetic IDA-modified hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for IMAC protein separation*. *Journal of Separation Science*, 2006. **29**(16): p. 2541-2549.
60. Nagel, B., H. Dellweg, and L.M. Gierasch, *Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992)*, in *Pure and Applied Chemistry*. 1992. p. 143.
61. Dwevedi, A., *Basics of Enzyme Immobilization*. 2016. 21-44.
62. Chotani, G., et al., *Enzymes, 2. Discovery and Production*. 2008.

63. Koneracká, M., et al., *Direct binding procedure of proteins and enzymes to fine magnetic particles*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002. **18**(1): p. 13-18.
64. Cesar, M., et al., *A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates*. Biotechnology and Bioengineering, 2004. **86**(3): p. 273-276.
65. Keller, D., et al., *Nitrilotriacetic Amine-Functionalized Polymeric Core–Shell Nanoparticles as Enzyme Immobilization Supports*. Biomacromolecules, 2017. **18**(9): p. 2777-2788.
66. Hochuli, E., et al., *Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent*. Bio/Technology, 1988. **6**: p. 1321.
67. Arnold, F.H., *Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing*. Nature biotechnology, 1991. **9**(2): p. 151-156.
68. Khan, F., M. He, and M.J. Taussig, *Double-Hexahistidine Tag with High-Affinity Binding for Protein Immobilization, Purification, and Detection on Ni–Nitrilotriacetic Acid Surfaces*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(9): p. 3072-3079.
69. Arnold, F.H., *Metal-Affinity Separations: A New Dimension in Protein Processing*. Bio/Technology, 1991. **9**: p. 151.
70. Olden, K., et al., *Function of glycoprotein glycans*. Trends in Biochemical Sciences, 1985. **10**(2): p. 78-82.
71. Sauerzapfe, B., et al., *Characterization of recombinant fusion constructs of human β 1,4-galactosyltransferase 1 and the lipase pre-propeptide from *Staphylococcus hyicus**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2008. **50**(2): p. 128-140.
72. Wahl, C., D. Hirtz, and L. Elling, *Multiplexed Capillary Electrophoresis as Analytical Tool for Fast Optimization of Multi-Enzyme Cascade Reactions – Synthesis of Nucleotide Sugars*. Biotechnology Journal, 2016. **11**(10): p. 1298-1308.
73. Engels, L., et al., *Enzyme Module Systems for the Synthesis of Uridine 5'-Diphospho- α -D-glucuronic Acid and Non-Sulfated Human Natural Killer Cell-1 (HNK-1) Epitope*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2015. **357**(8): p. 1751-1762.
74. Weijers, C.A.G.M., M.C.R. Franssen, and G.M. Visser, *Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides*. Biotechnology Advances, 2008. **26**(5): p. 436-456.
75. Guo, T., et al., *Oxygen-Inducible Conversion of Lactate to Acetate in Heterofermentative *Lactobacillus brevis* ATCC 367*. Applied and Environmental Microbiology, 2017. **83**(21).
76. Sommer, B.J., J.J. Barycki, and M.A. Simpson, *Characterization of Human UDP-glucose Dehydrogenase: CYS-276 IS REQUIRED FOR THE SECOND OF TWO SUCCESSIVE OXIDATIONS*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(22): p. 23590-23596.
77. Egger, S., et al., *Structure and Mechanism of Human UDP-glucose 6-Dehydrogenase*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(27): p. 23877-23887.
78. Eixelsberger, T., L. Brecker, and B. Nidetzky, *Catalytic mechanism of human UDP-glucose 6-dehydrogenase: in situ proton NMR studies reveal that the C-5 hydrogen of UDP-glucose is not exchanged with bulk water during the enzymatic reaction*. Carbohydrate Research, 2012. **356**: p. 209-214.

79. H. Chmiel, R.T., and D. Weuster-Botz (Hrsg.) *Bioprozesstechnik*. Vol. 4. 2018, Heidelberg: Springer Spektrum.
80. Sakamoto, M. and K. Komagata, *Aerobic growth of and activities of NADH oxidase and NADH peroxidase in lactic acid bacteria*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1996. **82**(3): p. 210-216.
81. Hummel, W. and B. Riebel, *Isolation and biochemical characterization of a new NADH oxidase from Lactobacillus brevis*. Biotechnology Letters, 2003. **25**(1): p. 51-54.
82. Yang, J., et al., *Studies on the Substrate Specificity of Escherichia coli Galactokinase*. Organic Letters, 2003. **5**(13): p. 2223-2226.
83. Leloir, L.F., *Far Away and Long Ago*. Annual Review of Biochemistry, 1983. **52**(1): p. 1-16.
84. Bork, P., C. Sander, and A. Valencia, *Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: The hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases*. Protein Science, 1993. **2**(1): p. 31-40.
85. Ballard, F.J., *Kinetic studies with liver galactokinase*. Biochemical Journal, 1966. **101**(1): p. 70-75.
86. Walker, D.G. and H.H. Khan, *Some properties of galactokinase in developing rat liver*. Biochemical Journal, 1968. **108**(2): p. 169-175.
87. VERHEES, C.H., et al., *Biochemical adaptations of two sugar kinases from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus*. Biochemical Journal, 2002. **366**(1): p. 121-127.
88. Schell, M.A. and D.B. Wilson, *Purification and properties of galactokinase from Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, 1977. **252**(4): p. 1162-1166.
89. Timson, D.J. and R.J. Reece, *Kinetic analysis of yeast galactokinase: implications for transcriptional activation of the GAL genes*. Biochimie, 2002. **84**(4): p. 265-272.
90. DEY, P.M., *Galactokinase of Vicia faba seeds*. European Journal of Biochemistry, 1983. **136**(1): p. 155-159.
91. Timson, D.J. and R.J. Reece, *Functional analysis of disease-causing mutations in human galactokinase*. European Journal of Biochemistry, 2003. **270**(8): p. 1767-1774.
92. Gulbinsky, J.S. and W.W. Cleland, *Kinetic studies of Escherichia coli galactokinase*. Biochemistry, 1968. **7**(2): p. 566-575.
93. Claudia, W., H. Dennis, and E. Lothar, *Multiplexed Capillary Electrophoresis as Analytical Tool for Fast Optimization of Multi-Enzyme Cascade Reactions – Synthesis of Nucleotide Sugars*. Biotechnology Journal, 2016. **11**(10): p. 1298-1308.
94. Thoden, J.B., et al., *Molecular Structure of Human Galactokinase: IMPLICATIONS FOR TYPE II GALACTOSEMIA*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(10): p. 9662-9670.
95. Kotake, T., et al., *UDP-sugar Pyrophosphorylase with Broad Substrate Specificity Toward Various Monosaccharide 1-Phosphates from Pea Sprouts*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(44): p. 45728-45736.
96. Ginsburg, V., E.F. Neufeld, and W.Z. Hassid, *ENZYMATIC SYNTHESIS OF URIDINE DIPHOSPHATE XYLOSE AND URIDINE DIPHOSPHATE ARABINOSE*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1956. **42**(6): p. 333-335.
97. Dai, N., et al., *Cloning and Expression Analysis of a UDP-Galactose/Glucose Pyrophosphorylase from Melon Fruit Provides Evidence for the Major Metabolic*

- Pathway of Galactose Metabolism in Raffinose Oligosaccharide Metabolizing Plants*. Plant Physiology, 2006. **142**(1): p. 294-304.
98. Litterer, L.A., et al., *Biosynthesis of UDP-glucuronic acid in developing soybean embryos: possible role of UDP-sugar pyrophosphorylase*. Physiologia Plantarum, 2006. **128**(2): p. 200-211.
 99. Kotake, T., et al., *Properties and Physiological Functions of UDP-Sugar Pyrophosphorylase in Arabidopsis*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007. **71**(3): p. 761-771.
 100. Wahl, C., M. Spiertz, and L. Elling, *Characterization of a new UDP-sugar pyrophosphorylase from Hordeum vulgare (barley)*. Journal of Biotechnology.
 101. Kleczkowski, L.A., et al., *A common structural blueprint for plant UDP-sugar-producing pyrophosphorylases*. Biochemical Journal, 2011. **439**(3): p. 375-381.
 102. Paulson, J.C. and K.J. Colley, *Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(30): p. 17615-8.
 103. Oka, S., et al., *A novel glucuronyltransferase in nervous system presumably associated with the biosynthesis of HNK-1 carbohydrate epitope on glycoproteins*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(32): p. 22711-4.
 104. Kitagawa, H., et al., *Molecular Cloning and Expression of Glucuronyltransferase I Involved in the Biosynthesis of the Glycosaminoglycan-Protein Linkage Region of Proteoglycans*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(12): p. 6615-6618.
 105. Uusitalo, M. and T. Kivelä, *The HNK-1 Carbohydrate Epitope in the Eye: Basic Science and Functional Implications*. Progress in Retinal and Eye Research, 2001. **20**(1): p. 1-28.
 106. Wood, W. and A. Jacinto, *Drosophila melanogaster embryonic haemocytes: masters of multitasking*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007. **8**: p. 542.
 107. Jeffries, A.R., et al., *β -1,3-Glucuronyltransferase-1 gene implicated as a candidate for a schizophrenia-like psychosis through molecular analysis of a balanced translocation*. Molecular Psychiatry, 2003. **8**: p. 654.
 108. Sahu, S., et al., *The human natural killer-1 (HNK-1) glycan mimetic ursolic acid promotes functional recovery after spinal cord injury in mouse*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2018. **55**: p. 219-228.
 109. Chou, D.K., et al., *Structure of sulfated glucuronyl glycolipids in the nervous system reacting with HNK-1 antibody and some IgM paraproteins in neuropathy*. Journal of Biological Chemistry, 1986. **261**(25): p. 11717-11725.
 110. Bronner-Fraser, M., *Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1*. Developmental Biology, 1986. **115**(1): p. 44-55.
 111. Morita, I., et al., *HNK-1 (human natural killer-1) glyco-epitope is essential for normal spine morphogenesis in developing hippocampal neurons*. Neuroscience, 2009. **164**(4): p. 1685-1694.
 112. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical Biochemistry, 1985. **150**(1): p. 76-85.
 113. Rusmini, F., Z. Zhong, and J. Feijen, *Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips*. Biomacromolecules, 2007. **8**(6): p. 1775-1789.
 114. Guo, Z., S. Bai, and Y. Sun, *Preparation and characterization of immobilized lipase on magnetic hydrophobic microspheres*. Enzyme and Microbial Technology, 2003. **32**(7): p. 776-782.
 115. Kazenwadel, F., et al., *Optimization of enzyme immobilization on magnetic microparticles using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) as a crosslinking agent*. Analytical Methods, 2015. **7**(24): p. 10291-10298.

116. Engels, L., *Modulare Enzym-Kaskaden zur Synthese von Glykanepitopen*. unv. Diss RWTH Aachen University, 2015.
117. Chu, X., et al., *Characterization of UDP-glucose dehydrogenase from Pasteurella multocida CVCC 408 and its application in hyaluronic acid biosynthesis*. Enzyme and Microbial Technology, 2016. **85**: p. 64-70.
118. Fischöder, T., et al., *Enzymatic Synthesis of N-Acetyllactosamine (LacNAc) Type 1 Oligomers and Characterization as Multivalent Galectin Ligands*. Molecules, 2017. **22**(8): p. 1320.
119. Qasba, P.K., B. Ramakrishnan, and E. Boeggeman, *Substrate-induced conformational changes in glycosyltransferases*. Trends in Biochemical Sciences, 2005. **30**(1): p. 53-62.
120. Amado, M., et al., *Identification and characterization of large galactosyltransferase gene families: galactosyltransferases for all functions*¹This paper is dedicated to Drs. Harry Schachter and Akira Kobata on the occasion of their 65th birthdays. This paper constitutes part of the requirement for a Ph.D. thesis for Margarida Amado. 1. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1999. **1473**(1): p. 35-53.
121. Findrik, Z., A.V. Presečki, and Đ. Vasić-Rački, *Mathematical modelling of NADH oxidation catalyzed by new NADH oxidase from Lactobacillus brevis in continuously operated enzyme membrane reactor*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007. **104**(4): p. 275-280.
122. Rech, C., et al., *Combinatorial One-Pot Synthesis of Poly-N-acetyllactosamine Oligosaccharides with Leloir-Glycosyltransferases*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2011. **353**(13): p. 2492-2500.
123. Hoffmeister, D., et al., *Creation of the first anomeric D/L-sugar kinase by means of directed evolution*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(23): p. 13184-13189.

7 Anhang

Im folgenden Kapitel sind zusätzlichen Daten und Informationen für die Versuche in dieser Arbeit gegeben.

7.1 Zusammensetzung der Reaktionslösungen für die Enzymkaskaden

Tabelle 15: Zusammensetzung der Reaktionslösung für das EM UDP-GlcA in der Reaktionskaskade im KMS bei 37 ° C.

Medienkomponenten	Puffersalzkonzentration (mM)	Volumen (μ L)
Tris (pH 8,7)	100	50
UDP-Glc	2	3
NAD ⁺	4	6
Milli-Q	-	91

Tabelle 16: Zusammensetzung der Reaktionslösung für das EM UDP-Gal/EM GalT in der Reaktionskaskade im KMS bei 37 ° C.

Medienkomponenten	Puffersalzkonzentration (mM)	Volumen (μ L)
Tris/KCl (pH 7,5)	100/25	50
Gal	2	3
ATP	2	3
UTP	2	3
MgCl ₂	8	12
MnCl ₂	6	9
GlcNAc-linker- <i>t</i> Boc	2	3
PPase	0,1 U/ μ L	2
Milli-Q	-	65

7.2 HPLC-Methoden für die Analyse der Enzymmodule

7.2.1 EM GlcA

Zur Analyse des verbleibenden UDP-Glucosegehalts und der Konzentration der neu synthetisierten UDP-Glucuronsäure wurde eine Umkehrphasenchromatographie-Säule verwendet. Die Parameter, mit denen die HPLC betrieben wurde, sind in Tabelle 17 aufgeführt. Diese Methode erlaubte das Auftrennen der vier Komponenten der Reaktionslösung (NADH, NAD⁺, UDP-Glc und UDP-GlcA) mit Basislinientrennung. Für eine genauere Konzentrationsbestimmung von NADH konnte zusätzlich die Absorption bei 340 nm gemessen werden, da NADH bei dieser Wellenlänge besonders stark absorbiert. Zur Vorbereitung der Probe wurde ein Mischverhältnis von wässrigem Puffer zu organischem Lösungsmittel von 30:70 angewendet. Dazu wurden 15 µL der Probe mit 16,5 µL Ammoniumacetat-Puffer gemischt und 73,5 µL Acetonitril zugegeben. Für die Messung der Proben wurden HPLC-Gefäße mit Einsätzen aus Glas verwendet, um das Probenvolumen gering halten zu können.

Tabelle 17: EM GlcA mit der Umkehrphasenchromatographie-Säule „TSKgel ODS-100V“.

Parameter	Einstellung
Flussrate	0,3 mL/min
Mobile Phase	Ammoniumacetat 50 mM pH 4,5/Acetonitril
Gradient	0 - 10 min: 30/70 10 - 15 min: 30/70 → 40/60 15 - 20 min: 40/60 20 - 22 min: 40/60 → 30/70 22 - 30 min: 30/70
Dauer	30 min
DAD-Spektrum	1. Sig = 260,10; Ref. = 400,100 2. Sig = 340,10; Ref. = 400,100
Injektionsvolumen	30 µL
Verdünnung der Probe	1:7

7.2.2 EM Gal

Tabelle 18: EM Gal mit der Normalphasenchromatographie-Säule „TSKgel Amide-80“.

Parameter	Einstellung
Flussrate	0,9 mL/min
Mobile Phase	20 mM Tert-Butylamin in Milli-Q/Methanol
Gradient	0 - 35 min: 100/0 → 90/10 35 - 37 min: 90/10 → 100/0
Dauer	37 min
DAD-Spektrum	Sig = 260,10; Ref. = 400,100
Injektionsvolumen	30 µL
Verdünnung der Probe	1:7

7.2.3 EM GalT/ EM GlcAT

Tabelle 19: EM GalT/EM GlcAT mit der Umkehrphasenchromatographie-Säule „SunFire“.

Parameter	Einstellung
Flussrate	0,3 mL/min
Mobile Phase	Acetonitril / 0,1% Ameisensäure in Milli-Q - 24/76
Dauer	30 min
DAD-Spektrum	Sig = 254,4; Ref. = 360,100
Injektionsvolumen	30 µL
Verdünnung der Probe	1:50

7.3 HPLC Chromatogramme

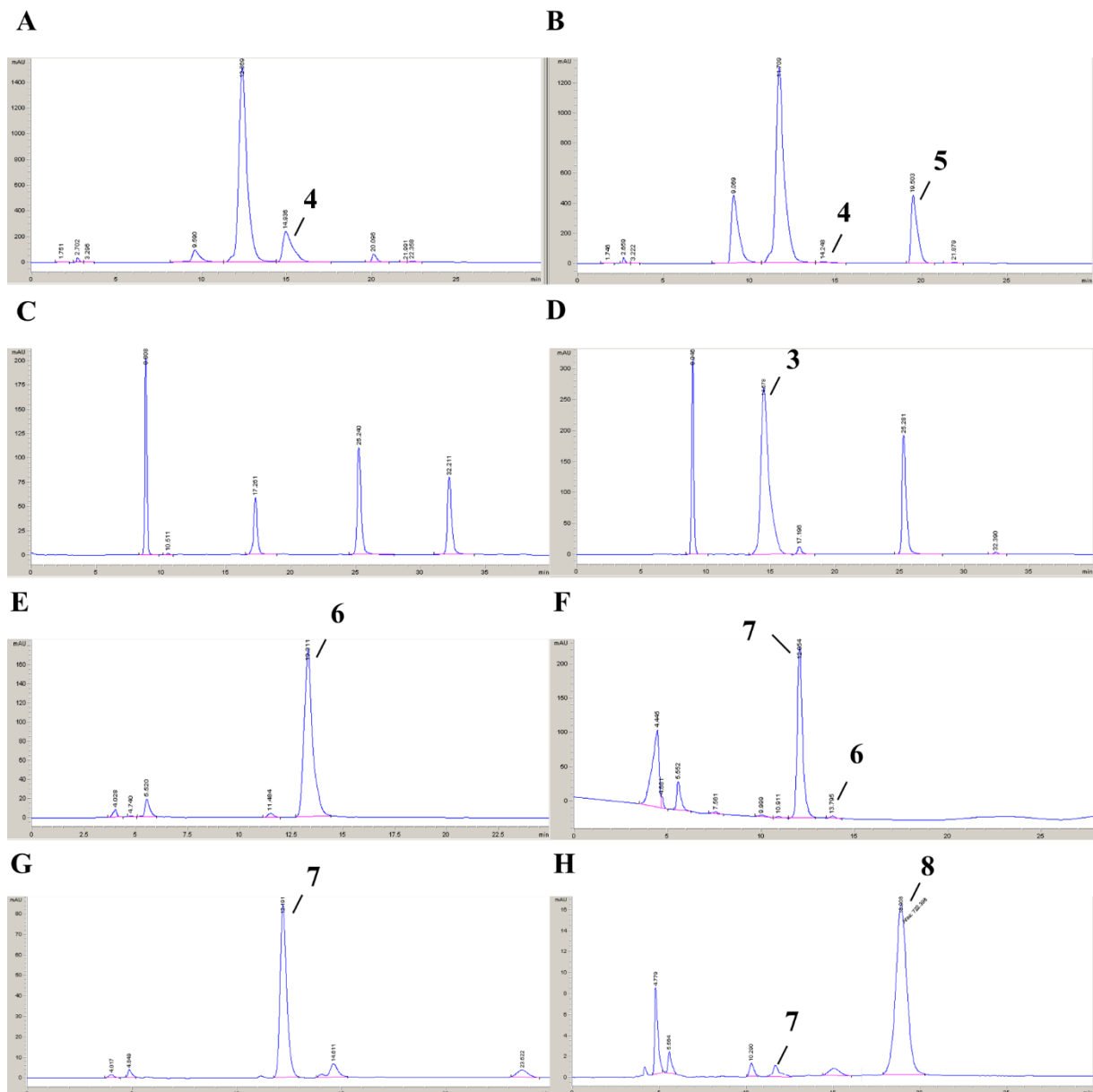


Abbildung 47: Die HPLC Chromatogramme der Nucleotidzucker- und Glykansubstrate und Produkte der Enzymkaskade mit den MEI im KMF. Die HPLC Chromatogramme zeigen: EM UDP-GlcA bei (A) 1 min mit (4) UDP-Glc und bei (B) 150 min mit (5) UDP-GlcA; EM UDP-Gal bei (C) 1 min und (D) 90 min mit (3) UDP-Gal; EM GalT bei (E) 90 min mit (6) GlcNAc-linker-*t*Boc und bei (F) 150 min mit (7) LacNAc-linker-*t*Boc; EM GlcAT bei (G) 150 min mit 7 und (H) 210 min mit (8) dem nicht-sulfatierten HNK-1 Epitop. Die jeweiligen Ausbeuten sind: EM UDP-GlcA: 97,7%, EM UDP-Gal: 99,2%, EM GalT: 99,7% und EM GlcAT: 98% mit 7 als Substrat and 99.3% mit 5 als Substrat. Es wurde eine Gesamtausbeute von 96.3% erreicht.

7.4 Beispielhaftes QmixElements Skript

Bildschirmfoto aus einem QmixElements Skript, das die Erstellung eines Plugs, der MEI enthält, und die Überführung der MEI in einen Plug mit Reaktionspuffer zeigt. Das Skript beginnt mit der Einstellung der Temperatur des TKM. Nach dem Generieren des 300 μL Magnetpartikel-Plugs, wird dieser in dem MFM positioniert. Dort wird der Hebelarm mit dem Permanentmagnetarray an den FEP-Schlauch geführt. Nach dem Separationsvorgang von 5 s, wird ein Plug mit Reaktionspuffer erstellt und, während der Lagerpuffer über den Ablaufschlauch entfernt wird, an die Position der Magnetpartikel transportiert. Dort werden die Magnetpartikel in dem Reaktionsplug durch Aktivieren des elektromagnetischen Feldes für 30 s resuspendiert. Danach wird dieser Reaktionsplug für eine anschließende Reaktion in das TKM befördert.

Script function

- Set Analog Out**
Qmix I/O 1 Analog Out 3 9,500 V
- Interrupt Script**
- Partikelaufnahme 1** Loop counter \$i: 0
Loop cycles: 1
 - Switch Valve**
Qmix V 1 to position: 1 - inlet
 - Switch Valve**
Qmix V 2 to position: 1 - inlet
 - Dose Volume**
neMESYS Low Pressure 1 Volume: -0,500000 ml Flow: 0,050000 ml/s rtc
 - Delay**
0:0:1:0
 - Switch Valve**
Qmix V 1 to position: 2 - outlet
 - Dose Volume**
neMESYS Low Pressure 1 Volume: -0,300000 ml Flow: 0,050000 ml/s rtc
 - Delay**
0:0:1:0
 - Switch Valve**
Qmix V 1 to position: 1 - inlet
 - Dose Volume**
neMESYS Low Pressure 1 Volume: -0,500000 ml Flow: 0,050000 ml/s rtc
 - Delay**
0:0:1:0
 - Switch Valve**
Qmix V 1 to position: 9
 - Dose Volume**
neMESYS Low Pressure 1 Volume: -2,430000 ml Flow: 0,050000 ml/s rtc
 - Delay**
0:0:2:0
- Counting Loop** Loop counter \$i: 0
Loop cycles: 1
 - Set Digital Out**
Qmix I/O 1 Dig Out 1 on
 - Set Digital Out**
Qmix I/O 1 Dig Out 1 off
 - Delay**
0:0:3:0

- Switch Valve**
Qmix V 1 to position: 1 - inlet
- Dose Volume**
neMESYS Low Pressure 1 Volume: -0,500000 ml Flow: 0,050000 ml/s rtc
- Delay**
0:0:1:0
- Switch Valve**
Qmix V 1 to position: 4
- Dose Volume**
neMESYS Low Pressure 1 Volume: -0,150000 ml Flow: 0,050000 ml/s rtc
- Delay**
0:0:1:0
- Switch Valve**
Qmix V 1 to position: 1 - inlet
- Dose Volume**
neMESYS Low Pressure 1 Volume: -0,500000 ml Flow: 0,050000 ml/s rtc
- Delay**
0:0:1:0
- Switch Valve**
Qmix V 1 to position: 9
- Dose Volume**
neMESYS Low Pressure 1 Volume: -2,430000 ml Flow: 0,050000 ml/s rtc
- Delay**
0:0:1:0
- Counting Loop** Loop counter \$i: 0
Loop cycles: 1
 - Set Digital Out**
Qmix I/O 1 Dig Out 1 on
 - Set Digital Out**
Qmix I/O 1 Dig Out 1 off
 - Delay**
0:0:2:0
- Counting Loop** Loop counter \$i: 0
Loop cycles: 1
 - Set Digital Out**
Qmix I/O 1 Dig Out 2 on
 - Delay**
0:0:3:0
 - Set Digital Out**
Qmix I/O 1 Dig Out 2 off
 - Dose Volume**
neMESYS Low Pressure 1 Volume: -1,540000 ml Flow: 0,050000 ml/s rtc
 - Delay**
0:0:1:0
 - Switch Valve**
Qmix V 2 to position: 2 - outlet
 - Dose Volume**
neMESYS Low Pressure 1 Volume: 1,630000 ml Flow: 0,050000 ml/s rtc
 - Delay**
0:0:1:0

Publikationen

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Heinzler, R., Fischöder, T., et al., Toward Automated Enzymatic Glycan Synthesis in a Compartmented Flow Microreactor System. *Adv. Synth. Catal.*, 2019 DOI:10.1002/adsc.201900709

Heinzler, R., Hübner J. et al., A Compartmented Flow Microreactor System for Automated Optimization of Bioprocesses Applying Immobilized Enzymes. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2018, 6, 189. DOI=10.3389/fbioe.2018.00189

Hübner, J., Heinzler, R. et al., An automated and compartmented fluidic reactor device for multi-step sample-to-answer-processes using magnetic particles. *React. Chem. Eng.*, 2017,2, 349-365. DOI: 10.1039/C6RE00219F

Paulus, A.S., Heinzler, R. et al., Temperature-Switchable Agglomeration of Magnetic Particles Designed for Continuous Separation Processes in Biotechnology. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(26), 14279-14287. DOI: 10.1021/acsami.5b02642

Fischöder, T., et al., Enzymatic Cascades for Tailored 13C6 and 15N Enriched Human Milk Oligosaccharides. 2019. 24(19): p. 3482. DOI: 10.3390/molecules24193482

Kügler, J.H., Muhle-Goll, C., Kühl, B. et al. Trehalose lipid biosurfactants produced by the actinomycetes *Tsukamurella spumae* and *T. pseudospumae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98: 8905. DOI:10.1007/s00253-014-5972-4

Konferenzbeiträge

- | | |
|--------------------------------|--|
| 05/2016
Poster Präsentation | Heinzler, R; Hübner, J; Franzreb, M.
<i>Compartmented microreactors for the oligosaccharide-synthesis by means of magnetic enzyme immobilisates.</i>
Dechema Himmelfahrtstagung: New Frontiers for Biotech-Processes, Koblenz |
| 07/2016
Poster Präsentation | Heinzler, R; Hübner, J; Franzreb, M.
<i>Compartmented microreactors for the oligosaccharide-synthesis by means of magnetic enzyme immobilisates.</i>
European Congress on Biotechnology, Krakau, veröffentlicht in <i>New Biotechnology</i> , 2016. 33, Supplement: p. S112. DOI: 10.1016/j.nbt.2016.06.1113 |
| 06/2017
Vortrag | Heinzler, R; Hübner, J; Elling, L; Franzreb, M.
<i>Enzymatic synthesis of glycans with immobilised Leloir-Glycosyltransferases in a microreactor system.</i> Biotech France 2017 - International Conference and Exhibition, Paris |