

Inhaltsverzeichnis

<u>1. EINLEITUNG</u>	1
<u>2. AUFGABENSTELLUNG</u>	3
<u>3. CHEMO- UND BIOSENSOREN</u>	5
3.1. Definition von Chemo-und Biosensoren	5
3.2. Aufbau eines Biosensors	5
3.3. Auswahl möglicher Biokomponenten und Transducer	6
3.4. Vorteile und Nachteile von Biosensoren	7
<u>4. EINGESETZTE TRANSDUCER</u>	8
4.1. Verwendete fluoridsensitive Sensoren	8
4.1.2. Vergleich der drei Fluoridsensoren Elektrode, IS-Cap, FET	8
4.2. Theorie der idealen MIS-Struktur	11
4.2.1. Aufbau einer MIS-Struktur	11
4.2.2. Funktionsprinzip der idealen MIS-Struktur	12
4.2.3. C/U-Charakteristik der idealen MIS-Struktur (n-Silizium)	13
4.2.4. Einfluß der Meßfrequenz auf die Kapazitätskennlinie	16
4.3. Aufbau und Funktionsweise der eingesetzten Sensoren	18
4.3.1. Aufbau und Funktionsweise von EIS-Caps	18
4.3.1.1. Nomenklatur	18
4.3.1.2. Aufbau einer EIS-Struktur	18
4.3.1.3. Charakteristische Meßgröße	19
4.3.1.4. Beschreibung des Kleinsignalimpedanzmeßgeräts (C/U-Meßgerät)	21
4.3.1.5. Fertigungsprozeß der Sensoren	23
4.3.1.5.1. Schichtendarstellung der Chips	23
4.3.1.5.2. Anfertigung des Gesamtsensors	24
4.3.2. Aufbau und Funktionsweise eines Feldeffekttransistor	25
4.4. Theoretische Beschreibung der Sensorsignale: Single-Site Modell	28

5. DIE EINGESETZTEN BIODIVERSITÄTEN	32
5.1. Klassifizierung der Enzyme	32
5.1.1. Oxidasen	33
5.1.2. Glykoenzyme	34
5.2. Entwickelte Biosensoren auf der Basis der enzymatischen Fluorid-Freisetzung	34
5.2.1. Meßprinzip	35
5.3. Biosensoren für die Detektion der Substrate H₂O₂, Ethanol, Phosphat und Sulfid	36
5.3.1. Verwendete Enzyme	36
5.3.1.1. Peroxidase (EC 1.11.1.7)	36
5.3.1.2. Alkoholoxidase (EC 1.1.3.13)	37
5.3.1.3. Sulfitoxidase (EC 1.8.3.1)	37
5.3.1.4. Xanthinoxidase (EC 1.1.3.22)	38
5.4. Saccharidsensoren für die Detektion von Glucose, Stärke, Maltose und Saccharose	38
5.4.1. Enzymatische Sacchariddetektion	38
5.4.2. Verwendete Enzyme	40
5.4.2.1. Glucoseoxidase (EC 1.1.3.4)	40
5.4.2.2. β -Amylase (EC 3.2.1.2)	42
5.4.2.3. Amyloglucosidase (EC 1.10.3.3)	42
5.4.2.4. Invertase (EC 3.2.1.26)	43
5.5. Verwendete Immunchemikalien	44
6. IMMOBILISIERUNG VON ENZYMEN	45
6.1. Immobilisierungsmethoden	45
6.2. Präparation der Membranen	47
6.2.1. Schichtdicken der Membranen	47
6.2.2. Aktivitätsbestimmung der immobilisierten Enzyme	48
7. CHARAKTERISIERUNG DER BIOSENSOREN	49
7.1. Das Ansprechverhalten der Biosensoren	49
7.1.1. FED-Batch-Versuchsaufbau	50
7.1.2. Versuchsdurchführung	51
7.1.3. Kurvenverläufe	51

7.2. Entwickelte Biosensoren	51
7.2.1. Enzymkonzentration in der Biomembran	53
7.2.2. Charakterisierte Sensoren	55
7.3. Einfluß der Meßparameter	55
7.3.1. pH-Abhängigkeit des Sensorsignales	55
7.3.2. Abhängigkeit des Sensorsignales von der Pufferkapazität des Meßmediums	56
7.3.2.1. Abhängigkeit des Sensorsignals von der Pufferkapazität der zugegebenen Probe	59
7.3.3. Abhängigkeit des Sensorsignals von der Elektrolytsalzkonzentration	60
7.3.4. Reproduzierbarkeit	61
7.3.5. Langzeitstabilität	62
7.3.6. Abhängigkeit des Sensorsignals von der Rührgeschwindigkeit	63
7.3.7. Temperaturabhängigkeit des Sensorsignals	64
7.3.8. Inhibierung durch Fluorid-Ionen	64
7.3.9. Einfluß von p-Fluoroanilin	65
7.3.10. Differenzmessung mit einem Doppelsensor	66
7.4. Weitere Sensoren	67
7.4.1. Phosphat sensor	67
7.4.1.1. Hypoxanthinsensor	70
7.4.2. Ethanolsensor/Methanolsensor	70
7.4.3. Sulfit sensor	71
7.5. Saccharidsensoren	72
7.5.1. Stärkesensor	72
7.5.2. Saccharosesensor	74
<u>8. INTEGRATION DER SENSOREN IN DAS FIA-SYSTEM</u>	<u>75</u>
8.1. Theoretische Grundlage der Fließinjektionsanalyse	75
8.2. Aufbau des verwendeten FIA-Systems	76
8.3. Steuerung des FIA-Systems mit CAFCA	80
8.3.1. Eigenschaften von CAFCA	80
8.3.2. Durchführung von Kalibrationen	81
8.4. Integration der Sensoren in das FIA-System	82
8.4.1. Auswertung der FIA-Peaks	82
8.4.2. Aufnahme von Kalibrationskurven	83
8.4.3. Einfluß der Injektionszeit auf das Meßsignal	88

8.4.4. Einfluß der Fließgeschwindigkeit auf das Meßsignal	89
8.4.5. Langzeitstabilität	90
<u>9. EINSATZ DER FLUORIDSENSITIVEN SENSOREN IN DER BIOTECHNOLOGISCHEN PROZEßKONTROLLE</u>	91
9.1. Modifizierung des FIA-Systems für biotechnologische Prozeßkontrollen.....	91
9.1.1. Probenahme	92
9.2. On-line-Glucose- und Ethanolbestimmung bei einer Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> H 620 im 3 l-Batchreaktor	92
9.2.1. Grundlagen der Hefekultivierung.....	92
9.2.2. Kalibration des Sensorsystems	93
9.2.2. Querempfindlichkeit des Glucose-und Ethanolensors	95
9.2.3. Durchführung der Messung.....	95
9.3. On-line-Glucose- und Ethanolbestimmung bei einer Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> H 620 im 5 l Batch-Reaktor	97
9.4. On-line-Glucose und Phosphatbestimmung bei einer Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> H 620 im 3 l Batch-Reaktor	99
9.5. On-line-Glucosebestimmung bei kontinuierlichem Betrieb einer Kultivierung von adhärennten rekombinanten BHK-c13-Zellen.....	102
9.5.1. Grundlagen der Tierzellenkultivierung	102
9.5.2. Versuchsdurchführung	102
9.6. On-line-Glucose und Gesamtzuckerbestimmung bei einer Kultivierung von <i>Acremonium chrysogenum</i> in einem 10 l Rührkesselreaktor	104
9.6.1. Theoretische Grundlagen.....	104
9.6.2. Kalibration des Sensorsystems	104
9.6.3. Durchführung der Kultivierung	106
9.7. Zusammenfassung	109
<u>10. AFFINITÄTSSENSOREN</u>	110
10.1. Reversible Immobilisation.....	110
10.2. Lektine.....	111
10.2.1. Struktur und Eigenschaften von Concanavalin A	111

10.3. Untersuchungen an Affinitätssensoren.....	113
10.3.1. Sensorprinzip	113
10.3.2. Versuchsdurchführung	114
10.3.3. Einfluß von Con A auf den Kurvenverlauf eines Glucosesensors.....	114
10.3.4. Langzeitstabilität einer Membran mit Con A-Zusatz	115
10.3.5. Externe Kopplung von Glykoenzyme	116
10.3.5.1. Externe Kopplung von Glucoseoxidase an eine POD-ConA-Membran	117
10.3.5.2. Externe Kopplung von Amyloglucosidase und Invertase an eine POD-Con A-Membran	118
10.3.6. Reversible Kopplung von Glucoseoxidase	119
10.4. Zusammenfassung	120
<u>11. SUBSTRATRECYCLING AM BEISPIEL EINES GLUCOSESENSORS</u>	121
<u>12. IMMUNSENSOR AUF FLUORIDSENSITIVEN FELDEFFEKTTRANSISTOREN</u>	125
12.1. Immunologie.....	125
12.1.1. Struktur von IgG	125
12.2. Immunassays	126
12.3. Das System Mouse - Antimouse IgG-Peroxidase-Konjugat	126
12.3.1. Sensorprinzip	126
12.3.2. Verwendete Immunreagenzien	127
12.3.3. Präparation der Immunmembran.....	127
12.3.4. Festlegung der Versuchsparameter	128
12.3.4.1. pH-Einfluß auf den Immunsensor.....	129
12.3.5. Abhängigkeit des Sensorsignales eines Immunsensors von der eingesetzten Antigenkonzentration	129
12.3.6. Kompetitiver Immunassay (Konkurrenzreaktion).....	131
12.3.7. Sandwich-Immunassay	132
12.3.7.1. Sensorprinzip	132
12.3.7.2. Versuchsdurchführung.....	132
12.4. Zusammenfassung.....	133
<u>13. ZUSAMMENFASSUNG</u>	134
<u>14. AUSBLICK.....</u>	136
<u>15. ANHANG</u>	138

15.1. Herstellung der Puffer	138
15.1.1. Herstellung des TISAB-Puffers für FED-Batch-Versuche.....	138
15.1.2. Zusammensetzung des KPP-Puffers (Trägerstrom im FIA-System).....	138
15.2. Entsorgung der p-Fluoroanilinlösungen	138
15.3. Zusammensetzung der Kulturmedien	139
15.3.1. Synthetisches Medium für die Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	139
15.3.2. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME) für die Kultivierung von BHK-c 13-Zellen	139
15.3.3. Synthetisches Medium für die Kultivierung von <i>Acremonium chrysogenum</i> [124]	140
15.4. Photometrische Tests zur Substratbestimmung	142
15.4.1. Glucosebestimmung mit dem Yellow-Springs-Instruments (YSI).....	142
15.4.2. Glucosebestimmung nach der pHBAH-Methode	142
15.4.3. Gesamtzuckerbestimmung nach der pHBAH-Methode	142
15.4.4. Phosphatbestimmung (Merck Spektroquant)	143
15.5. Aktivitätstest für immobilisierte Enzyme	143
15.5.1. Aktivitätsbestimmung von immobilisierter Peroxidase (POD)	143
15.5.2. Aktivitätsbestimmung von immobilisierter Glucoseoxidase (GOD)	144
15.6. Herstellung der Concanavalin A -Lösung	145
15.7. Herstellung der Puffer für die Immunreaktionen	145
15.7.1. Kopplungspuffer	145
15.7.2. Glycin/HCl-Puffer	145
15.8. Chemikalienliste	146
15.8.1. Immunchemikalien	146
15.9. Geräteliste	146
15.9.1. Daten des ECS-Meters.....	147
15.10. Abkürzungsverzeichnis	147
15.11. Blockschaltbild des Meßverstärkers (nicht invertierend)	148
15.12. Blockschaltbild des verwendeten Vierkanal-Kapazitätsmeßgerätes [31]	149
<u>16. FOTOGRAFIEN-ANHANG</u>	150
<u>17. LITERATURVERZEICHNIS</u>	152