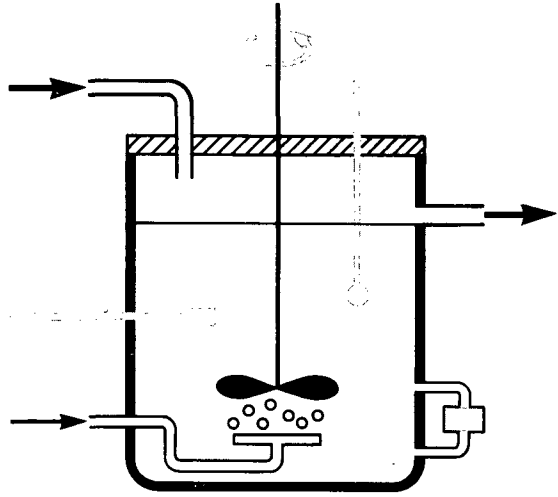


Thomas Scheper



BIOANALYTIK

Messung des Zellzustands und
der Zellumgebung in Bioreaktoren

Inhaltsverzeichnis

1.	Zielsetzung.....	1
2.	Biomassebestimmung und -charakterisierung.....	6
2.1.	Biomassebestimmung - Stand der Technik.....	6
2.1.1.	Biomassemodellierung.....	8
2.1.2.	Filtrationsmethoden.....	10
2.1.3.	Viskositätssensoren.....	13
2.1.4.	Kalorimetrische Methoden.....	13
2.1.5.	Elektrochemische Methoden.....	17
2.1.5.1.	Impedanzmessung.....	17
2.1.5.2.	Potentiometrische Sensoren.....	18
2.1.5.3.	Biomassensensoren nach dem Prinzip von Brennstoffzellen.....	19
2.1.5.4.	Amperometrische Sensoren.....	20
2.1.6.	Akustische Methoden.....	20
2.1.7.	Optische Sensoren.....	23
2.1.7.1.	Nephelometrische Methoden.....	23
2.1.7.2.	Fluoreszenzsensoren.....	30
2.2.	Stand der Technik - Biomassecharakterisierung.....	39
2.2.1.	Durchflußcytometrie.....	39
2.2.1.1.	Größenmessung.....	42
2.2.1.2.	Vitalität.....	44
2.2.1.3.	Intrazellulärer pH-Wert.....	44
2.2.1.4.	DNA- und RNA-Messungen.....	45
2.2.1.5.	Proteinfärbung.....	47
2.2.2.	NMR (Nuclear Magnetic Resonance)-Spektroskopie.....	48
2.2.2.1.	Allgemeine Anwendung.....	49
2.2.2.2.	Intrazellulärer pH-Wert.....	51
2.2.2.3.	Metabolische Intermediate.....	53
2.2.3.	Fluoreszenzsensoren zur NAD(P)(H)-Messung.....	53
2.3.	Biomassebestimmung und -charakterisierung - Experimenteller Teil.....	59
2.3.1.	Fluoreszenzsensoren.....	59
2.3.1.1.	Der kombinierte Streulicht-/Fluoreszenzsensor.....	59
2.3.1.2.	Der Lock-in-Verstärker.....	62
2.3.2.	Kulturfluoreszenzmessungen an Submerskulturen.....	65
2.3.2.1.	Messungen an <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
2.3.2.1.1.	Enzymatische Bestimmung von NADH.....	65
2.3.2.1.2.	Fluoreszenzmessungen an <i>S. cerevisiae</i> in einem Reaktor mit äußerer By-pass-Schleife.....	66
2.3.2.1.3.	Fluoreszenzmessungen an <i>S. cerevisiae</i> in einem Satzreaktor mit periodisch schwankenden Gelöstsauerstoffgehalten.....	73
2.3.2.1.4.	Fluoreszenzmessungen an <i>S. cerevisiae</i> in melassehaltigen Medien.....	74
2.3.2.2.	Messungen an rekombinanten <i>Escherichia coli</i>	76
2.3.2.2.1.	Messungen an <i>E. coli</i> K-12 Δ H1 Δ trp.....	77
2.3.2.3.	Messungen an <i>Bacillus licheniformis</i>	81
2.3.2.3.1.	Einsatz des kombinierten Streulicht-/Fluoreszenzsensors.....	86
2.3.2.4.	Messungen an <i>Zymomonas mobilis</i>	86

2.3.2.5.	Messungen an <i>Cephalosporium acremonium</i>	88
2.3.3.	Kulturfluoreszenzmessungen an immobilisierten Zellen	90
2.3.3.1.	Messungen an <i>Clostridium acetobutylicum</i>	93
2.3.3.1.1.	Immobilisierung in Calciumalginat	93
2.3.3.1.2.	Der Versuchsaufbau für Satzfermentationen mit immobilisierten <i>C. acetobutylicum</i>	96
2.3.3.1.3.	Satzkultivierungen mit suspendierten <i>C. acetobutylicum</i>	97
2.3.3.1.4.	Satzkultivierungen mit immobilisierten <i>C. acetobutylicum</i>	97
2.3.3.2.	Messungen an <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	104
2.3.3.2.1.	Der Versuchsaufbau für Satzfermentationen mit immobilisierten Hefen	105
2.3.3.2.2.	Versuchsaufbau für Pulsexperimente	107
2.3.3.2.3.	Immobilisierung	108
2.3.3.2.4.	Submerskultivierungen	108
2.3.3.2.5.	Kultivierungen mit in Calciumalginat immobilisierten Zellen	110
2.3.3.2.6.	Pulsexperimente	119
2.3.3.2.6.1.	Pulsexperimente im Meßreaktor	119
2.3.3.2.6.2.	Pulsversuche in der Durchflußzelle	119
2.3.3.2.7.	Messungen an in Hohlfasermodule immobilisierten Hefezellen	124
2.3.4.	Zusammenfassung	127
2.3.5.	Messung von Zelleigenschaften in Durchflußsystemen	129
2.3.5.1.	Bestimmung der intrazellulären Enzymaktivität mit einem Enzymthermistor	129
2.3.5.2.	Bestimmung der intrazellulären Enzymaktivität in einem Autoanalyzer	132
2.3.5.4.	Zusammenfassung	134
2.3.6.	Durchflußcytometrie	135
2.3.6.1.	Durchflußcytometrische Messungen an <i>Alcaligenes eutrophus</i> zur Bestimmung des intrazellulären PHB-Gehalts	136
2.3.6.2.	Entwicklung eines Fluoreszenzfärbeassays für PHB	136
2.3.6.3.	Färbeassay für PHB	138
2.3.6.4.	Durchflußcytometrische Untersuchungen	140
2.3.6.5.	Durchflußcytometrische Messungen des intrazellulären Lipid-Gehalts	142
2.3.6.6.	Entwicklung eines Fluoreszenzfärbeassays für Lipide	142
2.3.6.7.	Durchflußcytometrische Untersuchungen zur Lipidbestimmung in Hefen	146
2.3.6.8.	Vitalitätsmessungen	147
2.3.6.9.	Vitalitätsassay mit Fluoresceindiacetat und Ethidiumbromid	149
2.3.6.10.	Vitalitätsbestimmung über Größenmessung	151
2.3.6.11.	Zusammenfassung	152
3.	Biosensoren	156
3.1.	Biosensoren - Stand der Technik	156
3.1.1.	Biosensor - Eine Definition	157
3.1.2.	Immobilisierung der biologischen Komponenten	159
3.1.3.	Fließinjektionsanalyse (FIA)	161
3.1.4.	Fließinjektionsbiosensoren	166
3.1.4.1.	Biosensoren, eingebettet in Fließinjektionssysteme	166

3.1.4.2.	Eppendorf Variables Analysensystem (EVA)	167
3.1.5.	Thermistoren als Transducer	169
3.1.6.	Elektrochemische Biosensoren	175
3.1.6.1.	Potentiometrische Elektroden	176
3.1.6.2.	Potentiometrische Immunosenoren	180
3.1.6.3.	Amperometrische Elektroden	183
3.1.6.4.	"Zellverband"-Elektroden	186
3.1.6.5.	Bio-Elektroden in der Fermentationsüberwachung	189
3.1.7.	Piezokristalle	193
3.1.8.	Bio-Feldeffekttransistoren	196
3.1.9.	Optische Biosensoren	205
3.1.9.1.	Immuno-Optroden	214
3.1.9.2.	Innere Reflexionstechniken	217
3.1.10.	Zusammenfassung	224
3.2.	Experimenteller Teil - Biosensoren	227
3.2.1.	Die Fließinjektionsanalyse	227
3.2.2.	Meßdatenerfassung	229
3.2.3.	Bio-Optroden auf der Basis des Fluorosensors	230
3.2.3.1.	Die mikrobielle Optrode	230
3.2.3.1.1.	Glucosetestpulse während der Gifteinwirkung	232
3.2.3.1.2.	Glucosetestpulse nach der Gifteinwirkung	234
3.2.3.1.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse	234
3.2.3.2.	Die Enzymoptrode	237
3.2.3.2.1.	Sensoraufbau	238
3.2.3.2.2.	Der akkumulative Effekt	240
3.2.3.2.3.	Experimentelles	241
3.2.3.2.3.1.	Lactat-/Pyruvatnachweis	241
3.2.3.2.3.2.	Ethanolnachweis	244
3.2.3.2.3.3.	Ethanolbestimmung in Fermentationsmedien	246
3.2.3.2.3.4.	Formiatnachweis	246
3.2.3.2.3.5.	D-Mannitnachweis	249
3.2.3.2.3.6.	Phenylpyruvatnachweis	250
3.2.3.2.3.7.	Glucosenachweis	253
3.2.3.2.4.	Die Flüssigmembran-Enzymoptrode	253
3.2.3.2.5.	Zusammenfassung	257
3.2.4.	Enzymthermistor	258
3.2.4.1.	Aufbau der neuentwickelten Enzymthermistortypen	258
3.2.4.2.	Einzelmessungen	262
3.2.4.2.1.	Urease	262
3.2.4.2.2.	β -Galactosidase, Peroxidase	263
3.2.4.3.	Substratbestimmungen	266
3.2.4.3.1.	Enzymfixierung am Beispiel der Glucoseoxidase und der Einsatz zur Glucosebestimmung in Fermentationsmedien	266
3.2.4.3.2.	Immobilisierung	267
3.2.4.3.3.	Druckstabilität der Enzymkartuschen	268
3.2.4.3.4.	Die Glucosebestimmung	269
3.2.4.3.5.	Einsatz zur Fermentationsüberwachung	271
3.2.4.3.6.	Glucosebestimmung mit immobilisierten Mikroorganismen	274

3.2.4.3.7.	Bestimmung von Saccharose, Lactose und Maltose	274
3.2.4.3.8.	Bestimmung von Harnstoff.....	276
3.2.4.3.9.	Bestimmung von Wasserstoffperoxid	276
3.2.5.	Biofeldeffekttransistoren (BioFETs).....	282
3.2.5.1.	Die Charakterisierung der Enzymmembranen	282
3.2.5.2.	Der Penicillin-FET.....	285
3.2.5.3.	Der Harnstoff-FET	291
3.2.5.4.	Glucose-FET	295
3.2.5.5.	Einsatz von Metalloxidhalbleiterschichten als Sensorelement.....	297
3.2.5.6.	Zusammenfassung.....	302
3.2.6.	Immunosysteme.....	303
3.2.6.1.	Die Analysensysteme.....	303
3.2.6.2.	Turbidometrischer Assay (TIA)	305
3.2.6.3.	Fluoreszenzenergietransfer-Immunoassay (FETIA).....	305
3.2.6.4.	Heterogener Assay.....	308
3.2.6.5.	Die simulierte Fermentation.....	311
3.2.6.6.	Einsatz an Fermentationsprozessen	314
3.2.6.7.	Zusammenfassung.....	315
4.	Zusammenfassung.....	316
5.	Symbol-/Abkürzungsverzeichnis	317
6.	Literaturverzeichnis	318