

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	5
2.1	Enzymatische Reaktionssysteme	5
2.1.1	Cytochrom P450	5
2.1.1.1	Katalysezyklus.....	5
2.1.1.2	Anwendungsbereiche	7
2.1.1.3	Cytochrom P450 _{BMP}	7
2.1.1.4	9,10-Dihydroxystearinsäure als Produkt der Fettsäurekatalyse	9
2.1.2	Enzyme für Vorstudien und Enzymkaskade	10
2.1.2.1	Laccase.....	10
2.1.2.2	Enzymkaskadenreaktion (β -Glucosidase, Glucose-Oxidase und Peroxidase)	11
2.1.3	Enzymimmobilisierung	14
2.1.4	Denaturierung von Enzymen	18
2.2	Magnetische Partikelsysteme	21
2.2.1	Magnetismus und Kraftberechnung	21
2.2.2	Synthese magnetischer Partikel.....	24
2.2.3	Magnetische Aufarbeitung (HGMS)	26
2.3	Mikrofluidiksysteme	28
2.3.1	Mikrofluidiksysteme mit Kanälen.....	29
2.3.2	<i>Liquid marbles - Lab-in-a-Drop</i>	29
2.3.2.1	Herstellung von <i>liquid marbles</i>	32
2.3.2.2	Mikroreaktoren mit magnetischer Hülle.....	32
2.3.2.3	Anwendungen	33
2.3.2.4	Bewegungsgeschwindigkeit und Dynamik von <i>liquid marbles</i>	35
2.3.2.5	Parameter der <i>liquid marbles</i>	36
2.3.2.6	Automatisierte magnetische Aktuation.....	37
2.3.3	Evaporation von <i>liquid marbles</i>	39
2.3.4	Superhydrophobizität	40
3	Reaktionsführung mit Cytochrom P450_{BMP}	43
3.1	Einleitung und Zielsetzung	43
3.2	Aufarbeitung von Cytochrom P450_{BMP}	44
3.2.1	Affinitätschromatografie (FPLC).....	44

3.2.2	Affinitätsadsorption mittels magnetischer <i>IDA-2</i> -Partikel	46
3.2.3	Vergleich des Downstreamprozesses mittels <i>IDA-2</i> -Partikeln und FPLC	47
3.3	Vergleich verschiedener Verfahren der Aktivitätsbestimmung	53
3.3.1	<i>Russig's-Blue</i> -Assay	53
3.3.2	Amplex [®] Red.....	55
3.4	Denaturierungsstudien mit CYP450_{BMP}	58
3.4.1	Einfluss verschiedener Denaturierungsmethoden auf die Aktivität ...	58
3.4.2	Aktivierungsenergie des nativen und des hitzebehandelten CYP450 _{BMP}	62
3.4.3	Absorptionsverhalten der denaturierten Hämproteine mittels UV/Vis	63
3.5	Immobilisierungsstudien mit CYP450_{BMP}	66
3.5.1	Auf <i>IDA-2</i> -Partikel	66
3.5.2	In Abhängigkeit der Denaturierung sowie des Partikelsystems.....	68
3.6	Lagerstabilität von CYP45_{BMP}.....	72
3.6.1	Natives Cytochrom P450 _{BMP}	73
3.6.2	Denaturiertes Cytochrom P450 _{BMP}	75
3.6.3	Immobilisiertes Cytochrom P450 _{BMP}	77
3.7	Synthese von 9,10-Dihydroxystearinsäure mittels CYP450_{BMP}	80
3.7.1	Chemische Synthese	80
3.7.2	Enzymatische Synthese mittels Cytochrom P450 _{BMP}	82
3.7.3	Charakterisierung des enzymatisch hergestellten Produkts	84
3.8	Integrierte Aufarbeitung und Reaktionsführung mittels Mini-HGMS ..	94
3.8.1	Entwicklung der Mini-HGMS	94
3.8.2	Simulation der Mini-HGMS	96
3.8.3	Durchbruchexperiment der Mini-HGMS	101
3.8.4	Kapazität und Reinigung in Anwesenheit von Biomasse (<i>S. cerevisiae</i>)	104
3.8.5	Anwendung der Mini-HGMS	106
3.9	Zusammenfassung.....	111
4	Entwicklung der Aktuatorplattform.....	115
4.1	Einleitung und Zielsetzung.....	115
4.2	Mikroreaktoren	116
4.2.1	Hüllenmaterial	116

4.2.1.1	Synthese der hydrophoben Hüllenpartikel	116
4.2.1.2	Evaporation im Mikroreaktor in Abhängigkeit der Partikelsynthese	119
4.2.1.3	Evaporation im Mikroreaktor in Abhängigkeit des verwendeten Silans	121
4.2.2	Einfluss organischer Lösungsmittel und Volumenabhängigkeit der Mikroreaktoren	124
4.2.3	Abrollvorrichtung als neue Charakterisierungsmethode für die Mikroreaktoren	128
4.2.3.1	Aufbau und Funktionsweise	129
4.2.3.2	Rolldauer der Mikroreaktoren in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration	130
4.2.3.3	Rolldauer organischer Lösungsmittel in Abhängigkeit der Konzentration (Ethanol)	132
4.2.3.4	Rollverhalten der Mikroreaktoren in Abhängigkeit der Partikelgröße	134
4.2.4	Kreuzkontamination durch Mikroreaktoren	140
4.3	Aktuatorplattform	143
4.3.1	Funktionalisierung der Glasoberfläche	143
4.3.1.1	Hydrophobisierung	143
4.3.1.2	Partielle Hydrophobisierung	145
4.3.2	Modellierung der magnetischen Krafteinwirkung auf die Mikroreaktoren	150
4.3.2.1	Gravimetrische Bestimmung der Partikelmasse des Hüllenmaterials	151
4.3.2.2	Ermittlung der zur Bewegung benötigten Magnetkraft	152
4.3.2.3	Ermittlung der zur Bewegung benötigten Hangabtriebskraft	155
4.3.2.4	Ermittlung der zum Öffnen benötigten Magnetkraft	157
4.3.2.5	Ermittlung der zum Heben benötigten Magnetkraft im Vergleich zur Gewichtskraft	159
4.3.2.6	Simulative Kraftbestimmung eines in der Aktuatorplattform befindlichen Magneten auf einen Mikroreaktor oberhalb der Plattformoberfläche	161
4.3.2.7	Zusammenfassung	164
4.3.3	Spulenentwicklung mittels FEM und 3D-Druck	164
4.3.4	Simulation und Kräfteberechnung der Magnetmatrix mittels FEM	165
4.3.5	Optimierung von Windungszahl, Strom, Kühlung und Design	170
4.3.6	Steuerung und Software	175
4.3.7	Funktionsfähigkeit der Aktuatorplattform	176
4.4	Reaktionen in Mikroreaktoren	182
4.4.1	Einfluss des Hüllenmaterial	182

4.4.1.1	Diffusion in Abhängigkeit der Umhüllung mittels <i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> (FRAP).....	182
4.4.1.2	Enzymstabilität in Abhängigkeit der Umhüllung	185
4.4.2	Reaktion im μ l-Maßstab mittels immobilisierter HRP auf Quarzglasplatten.....	188
4.4.2.1	Immobilisierungsmethode.....	189
4.4.2.2	Reaktionskinetik von auf Plättchen immobilisierter Enzyme im μ l-Maßstab am Beispiel der HRP	189
4.4.2.3	Wiederverwendbarkeit des Immobilisats am Beispiel der HRP	195
4.4.3	Durchführbarkeit einer Reaktion im Mikroreaktor mittels auf Quarzglasstab immobilisiertem Enzym	197
4.4.4	Reaktion im Mikroreaktor mittels Immobilisaten auf Quarzglaspartikeln	200
4.4.4.1	Einzelschritte der Enzymkaskade	200
4.4.4.2	Gesamte Enzymkaskade mittels Fusionierung	202
4.4.5	Onlinedetektion der Reaktion zweier Mikroreaktoren mittels Fusionierung	204
4.5	Zusammenfassung.....	206
5	Abschließende Diskussion und Ausblick	209
6	Literatur.....	213
7	Anhänge	233
	Anhang A Materialien und Chemikalien.....	233
	Anhang B Puffer und Lösungen	236
	Anhang C Geräte.....	239
	Anhang D Spektren.....	240
	Anhang E Analytikmethoden	243
	Anhang E.1 HPLC-MS-Methode.....	243
	Anhang E.2 GC-MS-Methode.....	244
	Anhang E.3 Mini-HGMS	245
	Anhang E.4 Bradford-Assay	245
	Anhang E.5 SDS-PAGE	246
	Anhang E.6 Ferrozin-Assay.....	246
	Anhang E.7 pNCA-Assay	247
	Anhang F Kalibriergeraden	248
	Anhang G Weitere Ergebnisse.....	249

Anhang G.1 CYP450 _{BMP}	249
Anhang G.2 FRAP	250
Anhang G.3 Immobilisierung	251
Anhang G.4 Magnetisierungskurven der hydrophoben Magnetitpartikel (Suszeptibilität)	252
Anhang G.5 Kaskadenreaktion	253
Anhang G.6 Ableitung ($\nabla\mathbf{B}$) der Kalibriergeraden der magnetischen Flussdichte experimentell und simulativ	254
Anhang G.7 FEM-Simulationen	255
Anhang G.8 Fermentative Herstellung von CYP450 _{BMP}	256
Anhang G.9 Kontaktwinkelmessung	258
Anhang H Abbildungsverzeichnis	259
Anhang I Tabellenverzeichnis	268
Anhang J Angaben zur Person	269
Anhang J.1 Abschlussarbeiten und Praktika, die zu dieser Arbeit beigetragen haben	269
Anhang J.2 Weitere betreute Abschlussarbeiten und Praktika	270
Anhang J.3 Veröffentlichungen, in denen Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wiedergegeben sind	270
Anhang J.4 Tagungsbeiträge	271
Anhang J.5 Preise und Förderungen	273
Anhang J.6 Lebenslauf	274