

Optische Sensoren zum Nachweis von Penicillin G in der Prozess- und Umweltanalytik

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Patricia Weber
aus Ulm

Tübingen
2017

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

05.02.2018

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Günter Gauglitz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Udo Weimar

Meiner Familie

„Ich habe gelernt, dass der Weg des Fortschritts
weder kurz noch unbeschwerlich ist“

Marie Curie

Danksagung

Am Ende meiner Doktorandenzeit möchte ich nun all denjenigen danken, die in den letzten Jahren zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz herzlich bedanken, der mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit unter optimalen Bedingungen und sehr vielen Freiheiten in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Ich danke Ihnen Herr Gauglitz nicht nur für Ihre Unterstützung und Ihr großes Vertrauen, sondern auch dafür, dass ich in den letzten Jahren, im Namen ihrer Arbeitsgruppe, acht verschiedene Länder bereisen durfte und mich nicht nur wissenschaftlich, sondern auch kulturell weiterbilden konnte.

Herrn Prof. Dr. Udo Weimar danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie die herzliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe während der famosen VG-Zeit.

Ein großer Dank gilt auch meinen Projektpartnern aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Günter Tovar von der Universität Stuttgart. Hier möchte ich mich vor allem bei Benjamin Riegger bedanken, der mir unermüdlich MIPs und NIPs synthetisiert und charakterisiert hat. Danke auch für die gute, offene und unkomplizierte Zusammenarbeit, die wissenschaftlichen Diskussionen, sowie die unzähligen und aufmunternden Telefongespräche.

Bei meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe möchte ich mich für die gemeinsame und spannende, aber auch nicht immer einfache Zeit bedanken. Danke für Eure Freundschaft, die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen, die ereignisreichen (Geschäfts-) Reisen und all die Dinge, die wir zusammen außerhalb der Uni unternommen haben. Urs Hilbig danke ich nicht nur für die stetige Hilfe beim Anlagenbauen und -reparieren und sein Bestreben Museen aller Art mir schmackhaft zu machen, sondern auch für die Jahre lange und angenehme Bürogemeinschaft. Dr. Lothar Leidner danke ich für seine leckeren Backkünste und stets kompetenten Ratschläge und Antworten. Dr. Dominik Furin danke ich für die Hilfe beim Entwickeln des spektralen 2-Spots-RfS und viele feuchtfröhliche Diskussionen über die Wissenschaft und das Leben. Dr. Kathrin Freudenberger danke ich für die Einführung in die ITC und stundenlangen Gespräche. Julia Stäb danke ich für die Einführung in die AFM, sowie die Durchführung von AFM-Aufnahmen, ihr Engagement im Arbeitskreis und viele nicht zu vergessende Abenteuer. Johanna Hutterer danke ich für die Unterstützung und Motivation auf den letzten Metern bis zum Ziel. Johannes Riedt danke ich für die vielen bürokratischen Abwicklungen und den immer neuesten Tratsch und Klatsch. Dr. Sabrina Rau danke ich für ihr stets offenes Ohr, ihre Unterstützung, ihre fachliche Expertise und ihre tiefe Freundschaft.

Auch den Chicken-Boys, Dr. Martin Pattky und Dr. Daniel Sydes danke ich für viele gemeinsame Aktivitäten im und außerhalb des Instituts.

Den zahlreichen Hiwis, die das Labor in Schuss gehalten haben und uns stets bei unangenehmen Aufgaben unterstützt haben möchte ich sehr danken. Ihr habt mir das Leben oft leichter gemacht! Ein besonderer Dank gilt Julian Vogler, der auch bei der Entwicklung des Biosensors beteiligt war.

Ein besonderer Dank gilt meinen WG Mitbewohnern, allen voraus Eoin Butler und Marcel König. Ich danke euch allen für eure offenen Ohren, motivierenden Worte und kleine Ablenkungen und Freuden im Alltag.

Meinen Freundinnen Anja Häge und Lisa Redlingshöfer danke ich für die langjährigen Freundschaften und den unfassbaren Rückhalt den Ihr mir gebt.

Mein allergrößter Dank gilt meiner Familie. Meinen Eltern sowie meinen Schwestern Isabella und Carolin danke ich für die grenzenlose Unterstützung und das Vertrauen, die zum Gelingen dieser Arbeit einen großen Beitrag hatten. Danke, dass Ihr immer für mich da seid!

Zuletzt und vom ganzen Herzen möchte ich Winfried Walter danken. Winn, ich danke Dir für deine unendliche Unterstützung, deinem großen Interesse an dieser Arbeit, obwohl du nicht vom Fach bist und dein unermüdliches Verständnis. Danke für die unzähligen Wochenenden, Feiertage und Abende, die wir zusammen mit meinem „Baby“ im Labor verbracht haben. Danke, dafür dass du in dieser oft nicht leichten Zeit an meiner Seite warst und mich gestützt hast.

Inhalt

1	EINLEITUNG	4
1.1	Motivation	4
1.2	Zielsetzung	6
2	THEORIE	7
2.1	Penicillin G	7
2.2	Fermentation	7
2.3	Optische Grundlagen	9
2.3.1	Elektromagnetische Strahlung	9
2.3.2	Brechung und Reflexion des Lichts	9
2.3.3	Reflexion an dünnen Schichten	11
2.3.4	Reflektometrische Interferenzspektroskopie	13
2.3.5	1-lambda Reflektometrie	14
2.3.6	Absorption von Strahlung.....	15
2.4	Erkennungsstrukturen.....	17
2.4.1	Affinitätsreaktionen an Grenzflächen	19
2.4.2	Molekulargeprägte Polymere.....	22
2.4.3	Antikörper	26
3	MATERIAL UND METHODEN	29
3.1	Material	29
3.1.1	Polymerpartikel.....	29
3.1.2	Antikörper	30
3.1.3	Analyte	30
3.1.4	Polymere.....	32
3.1.5	Standardchemikalien und Verbrauchsmaterialien	32
3.1.6	Lösungen und Puffer	33
3.2	Geräte.....	36
3.2.1	Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS).....	36
3.2.2	1-lambda-Reflektometrie	41
3.2.3	UV/Vis-Spektroskopie.....	43

3.2.4	Rasterkraftmikroskopie (AFM).....	44
3.2.5	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	45
3.2.6	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC).....	45
3.2.7	Weitere Geräte	46
3.3	Assay Formate.....	47
3.3.1	Assay-Format: Molekulargeprägte Polymere.....	47
3.3.2	Assay-Format: Antikörper	48
3.4	Oberflächenmodifikationen.....	50
3.4.1	Oberflächenmodifikationen: Molekulargeprägte Polymere	50
3.4.2	Oberflächenmodifikationen: Antikörper.....	52
3.5	Entnahme der Flusswasserproben	55
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	56
4.1	Stabilität von Penicillin G	56
4.2	Biomimetischer Sensor.....	61
4.2.1	Überprüfung der Oberflächenchemie auf unspezifische Wechselwirkungen	61
4.2.2	Übertragung von einem funktionierendem MIP-System von RfS auf die 1-lambda- Reflektometrie	63
4.2.3	Elektrostatische Immobilisierung der Polymerpartikel	65
4.2.3.1	Elektrostatische Immobilisierung mittels Carboxyethylsilantriol (CES).....	65
4.2.3.2	Elektrostatische Immobilisierung mittels Carboxy-PEG (DC-PEG).....	67
4.2.4	Kovalente Immobilisierung der Polymerpartikel	72
4.2.4.1	Untersuchungen der 1,3-dipolaren Cycloaddition.....	72
4.2.4.2	Azid-funktionalisierte NEAMA-Partikel: Charge 1	75
4.2.4.3	Azid-funktionalisierte NAEMA-Partikel: Charge 2	79
4.2.5	Zusammenfassung und Vergleich der verwendeten Polymerpartikel	84
4.2.6	Anwendung	87
4.2.6.1	Stufenmessungen.....	87
4.2.6.2	Querempfindlichkeit mit Edukten.....	89
4.2.6.3	Verschiedene Probenmatrices.....	91
4.3	Biosensor.....	99
4.3.1	Wahl der Oberfläche	99
4.3.2	Wahl der Antikörper	100
4.3.3	Konzentrationsabhängige Messungen.....	101
4.3.4	Bindungshemmtest	103
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	106

6	LITERATUR	110
7	ANHANG	118
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	118
7.2	Akademische Lehrer	123
7.3	Veröffentlichungen	124
7.3.1	Publikationen.....	124
7.3.2	Vorträge	124
7.3.3	Poster.....	125
7.4	Lebenslauf	127

1 Einleitung

1.1 Motivation

Sensoren werden heutzutage in den unterschiedlichsten Anwendungsfeldern eingesetzt. Sie haben ihren Platz nicht nur in der Medizin zur Point-of-Care Diagnostik [1], sondern auch in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik [2,3] sowie in der Industrie zur Prozessüberwachung [4] gefunden. Trotz ihrer unterschiedlichen Einsatzgebiete und Funktionsweisen haben Sensoren einiges gemeinsam. Sie sind leicht zu miniaturisieren, vor Ort ohne aufwendige Probenvorbereitung oder Fachpersonal einzusetzen und sie führen automatische, kostengünstige und schnelle Analysen durch.

Für viele industrielle Prozesse ist der Einsatz von Sensoren sehr attraktiv. Besonders in der weißen (industriellen) Biotechnologie, die einen immer größeren Einfluss auf unser tägliches Leben hat [5], spielen sie eine stetig größer werdende Rolle. Viele chemische Prozesse werden durch biotechnologische Verfahren optimiert oder sogar komplett durch sie ersetzt. Das meist verwendete Verfahren zur biotechnologischen Produktion ist die Fermentation. Sie wird zur Herstellung von Bioethanol, Nahrungsergänzungsmitteln wie Aminosäuren oder Vitamine und Medikamente wie Antibiotika eingesetzt. Aufgrund der stetig steigenden Nachfrage dieser Produkte ist die kontinuierliche Optimierung, hinsichtlich der Laufzeit und Ausbeute der Fermentationsprozesse, für die Industrie von großer Relevanz. Wichtig ist auch die Optimierung der Reproduzierbarkeit der einzelnen Batches. Die Qualität der unterschiedlichen Batches sollte möglichst nicht schwanken. Um dies zu erzielen, müssen verschiedene physikalische und chemische Parameter während des laufenden Prozesses möglichst im Fermenter (*in-line*) oder durch einen Bypass (*on-line*) überwacht werden. Diese Parameter sind üblicherweise Temperatur, pH, optische Dichte [6], Absorption [7] und Fluoreszenz [8]. Ein weiterer sehr relevanter Parameter ist die Produktkonzentration (Titer). Allerdings gibt es nur sehr wenige Publikationen zur Entwicklung eines solchen *in-line* Sensors [9].

Auch in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik sind immer mehr Sensoren zum Nachweis von Schadstoffen etabliert [10–12]. Eingesetzt werden diese Sensoren zum Nachweis von z.B. Pestiziden [13], Hormonen [14], Polychlorierte Biphenyle [15,16], Endokrine Disruptoren [17] oder Schmerzmitteln, die immer gehäuft in der Umwelt auftreten. Zu finden sind diese Substanzen in Oberflächengewässern. Zugrunde der Kontamination der Oberflächengewässer liegen die nicht sachgerechte Entsorgung von Medikamenten und Pestiziden, sowie menschliche und tierische Ausscheidungen. Diese Substanzen und ihre Metabolite können oftmals in Kläranlagen bei der Abwasserreinigung nicht vollständig aus dem Wasser extrahiert werden [18]. In unserer Umwelt sind allerdings nicht nur Gewässer mit diesen Schadstoffen belastet, sondern auch eine Vielzahl von tierischen Lebensmittel wie Milch, Käse, Eier und Fleisch. Der Grund für diese Belastung ist der massive, jedoch legale Gebrauch von Medikamenten bei der Nutztierhaltung und in der Lebensmittelindustrie. Dabei werden Medikamente wie Antibiotika oder nichtsteroidale Antirheumatika nicht nur in akuten Fällen

verabreicht, sondern auch in großen Mengen zur Vorbeugung. Zu beachten ist, dass nach der Verabreichung der Medikamente, Rückstände oder Metabolite im Tier bzw. seinen Produkten bleiben. Eine Vielzahl dieser Substanzen steht im Verdacht schädlich für Umwelt, Tier und Mensch zu sein. Konsequenzen dieser geringen aber kontinuierlichen Aufnahme sind z.B. im Falle des Antibiotika Resistenzen in der Umwelt und beim Menschen [19]. Deswegen müssen diese Schadstoffe schnell und preisgünstig auch in komplexen Matrices quantifizierbar nachgewiesen werden. Gängige Methoden um Schadstoffe in verschiedenen Matrices nachzuweisen sind momentan oftmals Gas- oder Flüssigchromatographie gekoppelt mit der Massenspektrometrie [20–22].

Da eine Probenvorbereitung bei den meisten Anwendungen nicht zu realisieren ist, ist eine markierungsfreie Detektion notwendig. Beispiele für markierungsfreie Methoden sind massensensitive Methoden [23–25] und elektrochemische Techniken [22], [23], sowie direkte optische Methoden [28–30]. Die bekannteste und am häufigsten angewendete markierungsfreie, direkt optische und zeitaufgelöste Technik ist die Oberflächenresonanzspektroskopie (SPR, engl. Surface Plasmon Resonance). Entscheidende Nachteile der SPR sind zum einen die Temperaturabhängigkeit und zum anderen die unverzichtbare Verwendung einer Metallschicht auf dem Transducer. Eine Methode die markierungsfrei, zeitaufgelöst und die beschriebenen Nachteile der SPR nicht aufweist, ist die in dieser Arbeit zur Detektion verwendete, Reflektometrische Interferenz Spektroskopie (RIFS). Aufgrund ihrer Temperaturunabhängigkeit und der Verwendung von Glas- oder Polymertransducern ist diese Technik simpler, flexibler und kostengünstiger als die SPR.

Das Antibiotikum Penicillin G wird jedes Jahr im Tonnenmaßstab durch Fermentation produziert. Die Nachfrage ist nicht nur in der Humanmedizin, sondern vor allem in der Tiernutzhaltung enorm. Da es folglich auch in immer höheren Konzentrationen in der Umwelt nachzuweisen ist, bietet es sich als relevanter Zielanalyt für die Entwicklung von optischen Sensoren an, die in unterschiedlichen Bereichen eingesetzt werden sollen. In der Literatur sind einige Beispiele an direkten optischen SPR Sensoren zum Nachweis von Penicillin G bereits zu finden [31–33]. Nicht nur die Detektionstechnik, sondern auch die Erkennungsstrukturen haben die dort entwickelten Sensoren gemeinsam. In aller bisherigen Veröffentlichung wurden Antikörper (Biosensoren) als sensitive Schicht verwendet. Dies bietet sich durchaus für Sensoren an, die ihren Einsatz in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik finden sollen. Soll der Sensor allerdings zur *in-line* oder *on-line* Überwachung bei Fermentationsprozessen eingesetzt werden, sind die Biosensoren nicht geeignet. Die Antikörper denaturieren bei den vorliegenden Bedingungen (pH, Temperatur) im Fermenter, sodass kein selektiver Nachweis des Penicillin Gs mehr möglich ist. Deswegen wurde in dieser Arbeit auf biomimetische Erkennungsstrukturen, die sogenannten Molekular geprägten Polymere (MIPs, engl. Molecularly Imprinted Polymers), zurückgegriffen.

1.2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es markierungsfreie und optische Sensoren zum Nachweis von Penicillin G zu entwickeln. Dabei sollen die Sensoren für unterschiedliche Fragestellungen eingesetzt werden können. Zum einen wird ein biomimetischer Sensor zur Prozessüberwachung des Titors bei der Penicillin G Fermentation und zum anderen ein Biosensor zur Spurenanalytik in der Umwelt entwickelt.

Die Herausforderungen dabei sind die verschiedenen Rahmenbedingungen, die nicht nur aufgrund der unterschiedlichen Matrices, sondern auch aufgrund der unterschiedlich vorkommenden Penicillin G Konzentrationen, vorliegen. Deshalb müssen verschiedene Erkennungsstrukturen als sensitive Schicht eingesetzt werden. Bei der Fermentation treten Penicillin G Konzentrationen bis zu 60 g/L auf [34]. In der Umwelt hingegen belaufen sich die auftretenden Konzentrationen in Oberflächengewässern auf nur bis zu 0,55 µg/L [19]. Da zwischen diesen Konzentrationsbereichen drei Größenordnungen liegen, ist es leicht nach zu vollziehen, dass die verwendeten Erkennungselemente unterschiedliche Bindungskapazitäten und Empfindlichkeiten aufweisen müssen. Aus diesem Grund ist die Arbeit in zwei große Abschnitte geteilt, die sich jeweils mit der betreffenden Problemstellung und Lösungsansätzen befassen.

Der erste Abschnitt befasst sich mit der Entwicklung des biomimetischen Sensors und ist zu großen Teilen im Rahmen des vom Land Baden-Württemberg geförderten Projektes „BioMIP - biomimetischer Sensor zur *in-line* Prozessanalytik“ (Förderkennzeichen 7533-7-11.6-5A) entstanden. Als Erkennungsstruktur werden dabei molekular geprägte Polymere (MIPs) verwendet, die auf ihre Bindungsfähigkeit mit Penicillin G, ihre Möglichkeiten der elektrostatischen und kovalenten Immobilisierung auf der Sensoroberfläche und auf die Stabilität der modifizierten Sensoroberfläche getestet werden. Zusätzlich werden auch Stufenmessungen zur Bestimmung der maximalen detektierbaren Penicillin G Konzentration durchgeführt und Kreuzreaktivitäten mit den strukturell sehr ähnlichen Edukten Phenyllessigsäure und 6-Aminopenicillansäure untersucht. Um den Sensor auf seine Tauglichkeit in komplexen Matrices zu testen, muss er zuvor in Puffer kalibriert und durch die Bestimmung von Wiederfindungsraten validiert werden. Da es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, Biomasse der Penicillin G Fermentation zu beschaffen und den Sensor in dieser zu testen, wird der Sensor in anderen komplexen Matrices wie Flusswasser und Milch untersucht und wenn möglich kalibriert und validiert.

Der zweite Abschnitt befasst sich mit der Entwicklung des Biosensors, bei dem Antikörper als Erkennungsstruktur eingesetzt werden. Hier werden passende Antikörper, sowie optimale Obeflächenmodifikationen untersucht und auf ihre Stabilität getestet. Dabei werden konzentrationsabhängige Messungen in Puffer durchgeführt.

2 Theorie

2.1 Penicillin G

Penicillin G besitzt eine antibakterielle Wirkung und ist auch unter dem Namen Benzylpenicillin bekannt. Entdeckt wurde es 1928 von Alexander Flemming, der zufällig beobachtete, dass der Schimmelpilz *Penicillium notatum* eine bakterizide Substanz produziert. Penicilline greifen in die Synthese der Bakterienzellwand durch Hemmung der DD-Transpeptidase (Penicillin-bindendes Protein (PBP)) ein [35]. Dabei wird die Quervernetzung der Peptidoglykane (Murein-Schutzschicht) verhindert. Die Zellwand kann nun leicht aufbrechen und es kommt zur Lysis [36]. Wirksam ist Penicillin G nur für gram-positive Bakterien wie *Staphylococcus* oder *Streptococcus*. Gram-negative Bakterien besitzen eine zusätzliche äußere Lipidmembran, die es dem Penicillin G nicht möglich macht, in die Synthese der darunterliegenden Murein-Schutzschicht einzugreifen.

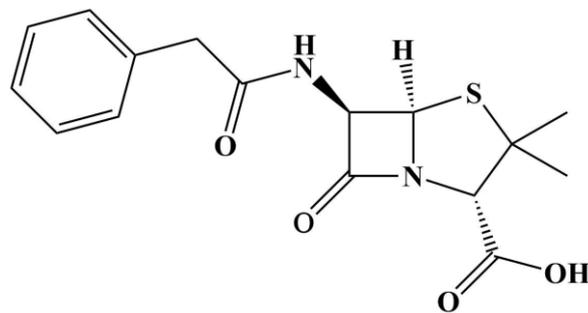


Abbildung 1: Strukturformal von Penicillin G.

2.2 Fermentation

Heutzutage wird Penicillin G mithilfe des Pilzes *Penicillium chrysogenum* durch Fermentation in großen Mengen gewonnen [34]. Die Fermentation wird in der Biotechnologie als die Umsetzung von biologischen Materialien mit Hilfe von Mikroorganismen wie Pilzen, Bakterien oder Enzymen bezeichnet. Diese Umsetzung findet in einem Bioreaktor, dem sogenannten Fermenter statt. Das Ziel einer Fermentation ist es, eine möglichst hohe Produktausbeute zu gewährleisten und somit möglichst wirtschaftlich zu sein. Hierfür müssen die Reaktionsbedingungen fein justiert und stets an die aktuellen Gegebenheiten angepasst werden. Somit ist das genaue Überwachen von prozessrelevanten Parametern wie pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffgehalt oder Nährstoffversorgung selbstverständlich. Umgesetzt werden kann dies entweder durch *off-line*, *at-line*, *on-line* oder *in-line* Prozessanalytik [37].

Im Falle der *off-line* Analytik werden Proben in regelmäßigen Abständen aus dem Fermenter gezogen und diese in einem Zentrallabor analysiert. Die *at-line* Analytik findet in räumlicher und zeitlicher Nähe zu dem Fermenter statt. Bei der *on-line* Analytik wird die Bestimmung des Parameters am Prozess durchgeführt z.B. mithilfe eines Bypass. Hier ist die Probennahme, Probenaufbereitung und der Transport der Probe zum Messgerät automatisiert. Ist die Messsonde direkt im Fermenter, wird dies als *in-line* Analytik bezeichnet.

Der große Vorteil der *on-line* bzw. *in-line* Analytik liegt darin, dass keine Probeentnahme erforderlich ist und man schnelle Informationen über prozessrelevante Parameter erhält. Dies hat eine einfachere und effektivere Regelung des Prozesses zur Folge, die zu einer erhöhten Ausbeute führt.

Die Kinetik der Penicillin G Fermentation mit dem Pilz *Penicillium chrysogenum* ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

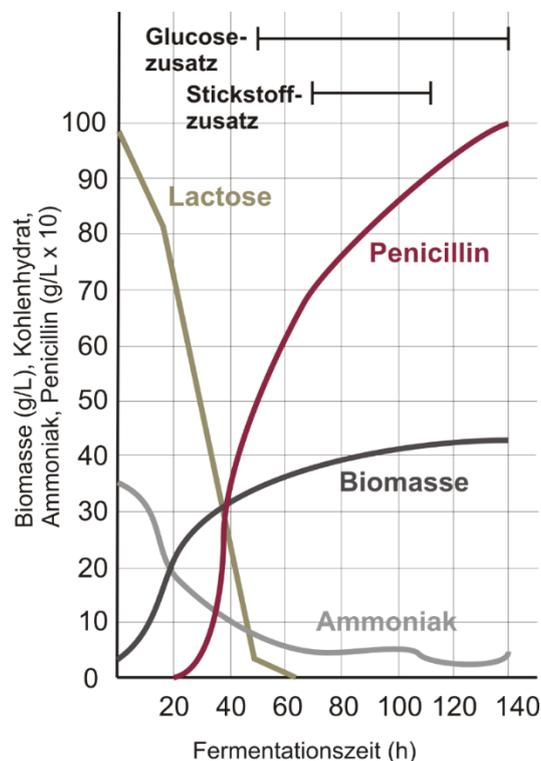


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Kinetik der Penicillin G Fermentation mit dem Pilz *Penicillium chrysogenum* (modifiziert nach [38]).

Der aerobe Prozess findet meist bei 26°C, über 5 Tage statt. Während der Wachstumsphase der Zellen, also des Pilzes (Biomasse), wird sehr wenig Penicillin G gebildet. Sobald die Kohlenstoffquelle (Lactose) fast erschöpft ist, setzt die Produktionsphase ein. Durch die Zugabe von Stickstoff kann diese auf mehrere Tage ausgedehnt werden. Anschließend wird die Biomasse durch Filtration von Penicillin G getrennt und der pH abgesenkt. Schließlich wird das Penicillin G mithilfe eines organischen Lösungsmittels wie Butanol oder Butylacetat extrahiert [39].

2.3 Optische Grundlagen

2.3.1 Elektromagnetische Strahlung

Die Theorie des Wellen-Teilchen Dualismus nach de Broglie sagt, dass Licht sowohl als Welle wie auch als Teilchen betrachtet werden kann. Wird Licht als Welle betrachtet, wird diese als elektromagnetische Welle beschrieben, die eine Transversalwelle ist.

Diese Transversalwelle setzt sich aus einem elektrischen und aus einem magnetischen Feld zusammen, die orthogonal zueinander und orthogonal zur Ausbreitungsrichtung stehen. Die Polarisation solch einer Welle beschreibt dabei die Richtung ihrer Schwingung. Linear polarisiertes Licht liegt vor, wenn der elektrische Feldvektor von mehreren Photonen in der gleichen Ebene schwingt und die Schwingungsknoten somit in Phase sind. Die Auslenkung des elektrischen Feldvektors ändert sich dabei aus der Ruhelage periodisch in Betrag und Vorzeichen der Amplitude. Resultiert eine Kreisbahn wird die Ausbreitungsrichtung des Lichtes als zirkulare Polarisation bezeichnet. Diese Kreisbahn kommt durch eine Phasenverschiebung von $\frac{\pi}{2}$ zustande. Die Amplituden bleiben dabei gleich. Bildet der resultierende Feldvektor durch unterschiedliche Amplituden und einer Auslenkung im Bereich von 0 bis $\frac{\pi}{2}$ eine Ellipse, bezeichnet man die Welle als elliptische Polarisation. Wird Energie durch diese elektromagnetischen Wellen übertragen, wird von elektromagnetischer Strahlung gesprochen.

Die Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie kann über den Brechungsindex n beschrieben werden. Dieser ist das Verhältnis aus der Phasengeschwindigkeit der elektromagnetischen Strahlung im Vakuum c_0 zur Phasengeschwindigkeit der elektromagnetischen Strahlung in der Materie c (Gl. 2-I).

$$n = \frac{c_0}{c} \quad \text{Gl. 2-I}$$

Berücksichtigt man die Absorption in einem Medium, kann der Brechungsindex als komplexe Größe angegeben werden, die dimensionlos und abhängig von der Wellenlänge ist. Diese Abhängigkeit von der Wellenlänge wird als Dispersion bezeichnet.

2.3.2 Brechung und Reflexion des Lichts

Trifft ein Lichtstrahl auf eine Grenzfläche zwischen zweier optisch unterschiedlichen transparenten Medien, so kann es zur Reflexion R und/oder zur Transmission T kommen. Dabei gilt:

$$R + T = 1$$

Gl. 2-II

Der Anteil der Transmission und Reflexion hängt von den stoffspezifischen Eigenschaften der Medien wie dem Brechungsindex n und dem Einfallswinkel α , mit dem der Lichtstrahl auf die Grenzfläche trifft, ab.

Wird der Lichtstrahl mit dem Einfallswinkel α auf der Grenzfläche von zwei unterschiedlich dichten Medien mit den Brechungsindices n_1 und n_2 teilweise reflektiert, dringt der nichtreflektierte Anteil mit einem Winkel von β in das Medium ein und wird dabei gebrochen. Für den reflektierten Anteil gilt dabei: Einfallswinkel α ist gleich Ausfallswinkel α' .

Nach dem Brechungsgesetz nach Snellius (Gl. 2-III) kann dies folgend beschrieben werden:

$$n_1 \cdot \sin \alpha = n_2 \cdot \sin \beta \quad \text{Gl. 2-III}$$

Demzufolge wird ein Lichtstrahl, der vom optisch dünneren in das optisch dichtere Medium dringt ($n_2 > n_1$) zum Lot hin gebrochen (Abbildung 3, links) und beim Übergang von einem optisch dichteren in ein dünneres Medium ($n_2 < n_1$) vom Lot weg gebrochen (Abbildung 3, rechts).

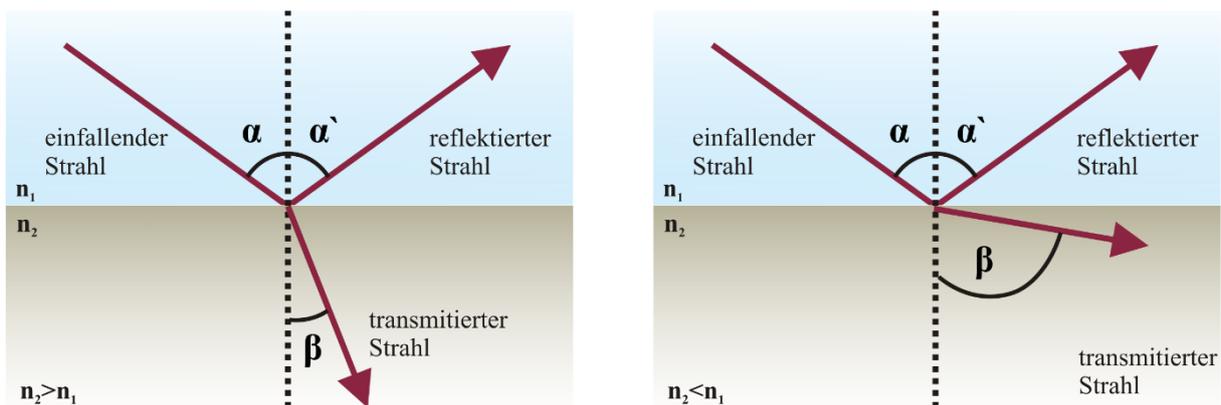


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Transmission und der Reflexion eines Lichtstrahls an einer Grenzfläche zweier homogener Medien mit den Brechungsindices n_1 und n_2 .

Die reflektierten bzw. transmittierten Anteile des Lichts lassen sich unter der Annahme idealer Dielektrika mit gleicher magnetischer Permeabilität und dem Einsatz von linear polarisiertem Licht durch die Fresnelschen Gleichungen beschreiben. Dazu wird der Reflexionskoeffizient r und der Transmissionskoeffizienten t verwendet. Diese Koeffizienten geben das Verhältnis der Amplitude des elektrischen Feldes des transmittierten ($A_{0,t}$) und des reflektierten Lichts ($A_{0,r}$) zur Amplitude des elektrischen Feldes des einfallenden Lichts ($A_{0,e}$) an. Das Verhalten von elektromagnetischen Wellen an Grenzflächen ist polarisationsabhängig. Somit beschreibt der Index p die elektrische Komponente des Lichts, die parallel zur Einfallsebene polarisiert ist und der Index s , die elektrische Komponente des Lichts, die senkrecht zur Einfallsebene polarisiert ist. Alle anderen Polarisationen lassen sich aufgrund der ungestörten Superposition aus diesen errechnen [40].

$$r_s = \left(\frac{A_{0,r,s}}{A_{0,e,s}} \right) = \frac{n_1 \cdot \cos \alpha - n_2 \cdot \cos \beta}{n_1 \cdot \cos \alpha + n_2 \cdot \cos \beta} \quad \text{Gl. 2-IV}$$

$$t_s = \left(\frac{A_{0,t,s}}{A_{0,e,s}} \right) = \frac{2n_1 \cdot \cos \alpha}{n_1 \cdot \cos \alpha + n_2 \cdot \cos \beta} \quad \text{Gl. 2-V}$$

$$r_p = \left(\frac{A_{0,r,p}}{A_{0,e,p}} \right) = \frac{n_2 \cdot \cos \alpha - n_1 \cdot \cos \beta}{n_2 \cdot \cos \alpha + n_1 \cdot \cos \beta} \quad \text{Gl. 2-VI}$$

$$t_p = \left(\frac{A_{0,t,p}}{A_{0,e,p}} \right) = \frac{2n_1 \cdot \cos \alpha}{n_2 \cdot \cos \alpha + n_1 \cdot \cos \beta} \quad \text{Gl. 2-VII}$$

Wird die Intensität des reflektierten Lichts unter senkrechtem Lichteinfall ($\alpha = 0$) betrachtet, so gilt für das Reflexionsvermögen der Grenzfläche folgendes:

$$R = \left(\frac{A_{0,r}}{A_{0,e}} \right)^2 = \frac{I_r}{I_e} = \left(\frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2} \right)^2 \quad \text{Gl. 2-VIII}$$

Daraus folgt für eine Luft-Glas Grenzfläche, bei der ein Lichtstrahl senkrecht einfällt, eine Reflektivität von 4% der einfallenden Intensität.

2.3.3 Reflexion an dünnen Schichten

Schichten werden dann als dünn bezeichnet, wenn ihre physikalische Schichtdicke im Bereich der Wellenlänge des verwendeten Lichts liegt. Somit dürfen die dünnen Schichten bei der Verwendung von Weißlicht (400-800 nm) eine Schichtdicke von einigen μm nicht überschreiten [41]. Wird Licht senkrecht auf ein System aus mehreren planparallelen dünnen Schichten eingestrahlt, tritt an jeder Phasengrenze Reflexion auf. Die Überlagerung dieser reflektierten Teilstrahlen nennt man Interferenz. Diese Prozesse können an einem exemplarischen Dreischichtaufbau gezeigt werden. Dabei ist eine dünne Schicht mit der physikalischen Schichtdicke d_2 und dem Brechungsindex n_2 umgeben von zwei Medien, die eine unendliche physikalische Schichtdicke und den Brechungsindices n_1 und n_3 aufweisen (Abbildung 4).

Der eindringende Lichtstrahl (1) wird an der Phasengrenze zwischen Medium 1 und 2 zum Teil transmittiert (3) und zum Teil reflektiert (2). Für den reflektierten Teilstrahl (2) gilt nach Gl. 2-IX:

$$r_1 = \frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2} \quad \text{Gl. 2-IX}$$

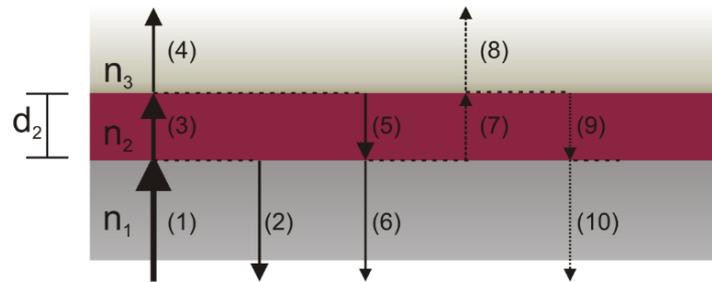


Abbildung 4: Mehrfachreflexion eines senkrecht eingestrahlichten Lichtstrahls an einer dünnen Schicht. Der Einfallende Lichtstrahl (1) tritt durch Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes (n_1 , n_2 , n_3).

Somit ergibt sich für die Amplitude des transmittierten Teilstrahls (3) eine Reduktion auf den Wert von $\sqrt{1 - r_1^2}$. Dieser transmittierte Teilstrahl wird an der Phasengrenze von Medium 2 zu Medium 3 erneut reflektiert (5) (Gl. 2-X).

$$r_2 = \frac{n_2 - n_3}{n_2 + n_3} \quad \text{Gl. 2-X}$$

Der transmittierte Teilstrahl (4) besitzt eine Amplitude von $r_2 \cdot (1 - r_1^2)$. Der reflektierte Teilstrahl (5) läuft dann mit einer Amplitude von $r_2 \cdot \sqrt{1 - r_1^2}$ auf die Phasengrenze von Medium 1 und Medium 2 zu und wird hier ein weiteres Mal zum Teil transmittiert (6) und zum Teil reflektiert (7). Die Amplitude des transmittierten Teilstrahls wird wiederum um den Faktor $\sqrt{1 - r_1^2}$ reduziert, d.h. er besitzt eine Amplitude von $r_2 \cdot (1 - r_1^2)$ und für den reflektierte Teilstrahl ergibt sich eine Amplitude von $-r_1 \cdot r_2 \sqrt{1 - r_1^2} \cdot e^{-i\Delta_1}$.

Da der Teilstrahl (5) zweimal das Medium 2 durchquert, hat dieser Teilstrahl im Vergleich zu dem Teilstrahl (2), der an der Phasengrenze von Medium 1 und Medium 2 transmittiert wird, und somit nur einmal das Medium 2 durchdringt, einen Gangunterschied von $2 \cdot n_2 \cdot d_2$. Daraus ergibt sich folgende Phase:

$$\Delta_1 = \frac{4\pi}{\lambda} \cdot n_1 \cdot d_1 \quad \text{Gl. 2-XI}$$

Für die Superposition dieser beiden Strahlen ergibt sich:

$$r_1 + r_2(1 - r_1^2) \cdot e^{-i\Delta_1} \quad \text{Gl. 2-XII}$$

Weil immer ein Teil der Teilstrahlen reflektiert und transmittiert wird, wird eine unendliche Zahl an mehrfachreflektierten Teilstrahlen, die sich überlagern, erhalten. Beschrieben wird die resultierende Welle mit Gl. 2-XIII.

$$r \cdot e^{i\varepsilon} = \frac{r_1 + r_2 \cdot e^{-i\frac{4\pi}{\alpha} \cdot n_2 \cdot d_2}}{1 + r_1 \cdot r_2 \cdot e^{-i\frac{4\pi}{\alpha} \cdot n_2 \cdot d_2}} \quad \text{Gl. 2-XIII}$$

Die messbare Reflektivität R kann durch Multiplikation von Gl. 2-XIII mit ihrem komplexkonjugierten Wert erhalten werden (Gl. 2-XIV).

$$R = |r \cdot e^{i \cdot \varepsilon}|^2 = \frac{r_1^2 + r_2^2 + 2 \cdot r_1 \cdot r_2 \cdot \cos \Delta_1}{1 + r_1^2 \cdot r_2^2 + 2 \cdot r_1 \cdot r_2 \cdot \cos \Delta_1} \quad \text{Gl. 2-XIV}$$

Die Intensität der reflektierten Teilstrahlen I_1 und I_2 können nach dem Interferieren in Abhängigkeit der Wellenlänge durch Gl. 2-XV beschrieben werden [42]. Die Anzahl der reflektierten Teilstrahlen erhöhen sich in Mehrschichtsystemen aufgrund der höheren Zahl der Phasengrenzen.

$$I_R = I_1 + I_2 + 2 \cdot \sqrt{I_1 \cdot I_2} \cdot \cos\left(\frac{4\pi \cdot n_2 \cdot d_2}{\lambda}\right) \quad \text{Gl. 2-XV}$$

2.3.4 Reflektometrische Interferenzspektroskopie

Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS) ist eine markierungsfreie und zeitaufgelöste Methode, die auf Mehrfachreflexion an dünnen Schichten basiert. Detektiert werden dabei Wechselwirkungen mit der sensitiven Schicht, die sich auf der Transduceroberfläche befindet. Diese Wechselwirkungen führen zu einer Schichtdickenänderung der optischen Schichtdicke nd , die das Produkt aus der physikalischen Schichtdicke d und des Brechungsindex n ist [43,44].

Weißlicht wird von der Unterseite eines optisch transparenten und planaren Transducers eingestrahlt. Dieses Licht wird an jeder Phasengrenze zum Teil reflektiert und zum Teil transmittiert. Die reflektierten Teilstrahlen überlagern sich und bilden ein Interferenzspektrum. Dieses Interferenzspektrum ist für jedes Schichtsystem aufgrund der verschiedenen physikalischen Schichtdicken d und den Brechungsindices n charakteristisch. Ändert sich nun diese optische Schichtdicke nd z.B. durch Anlagerung oder Bindung eines Moleküls an der sensitiven Schicht, verschiebt sich das charakteristische Interferenzspektrum zu höheren Wellenlängen. Wird diese zeitliche Änderung eines Extrempunktes im charakteristischen Interferenzspektrum beobachtet, kann auf die Änderung der optischen Schichtdicke nd rückgeschlossen werden, und somit Bindungsereignisse auf der Transduceroberfläche zeitaufgelöst beobachtet werden.

Ein beachtlicher Vorteil der RIfS im Vergleich zu konkurrierenden Methoden wie der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (engl. Surface Plasmon Resonance Spectroscopy; SPR) ist zum einem, dass keine dünne Metallschicht auf dem Transducer benötigt wird, um die Wechselwirkungen zu detektieren, und zum anderen, dass die RIfS nahezu temperaturunabhängig ist. Diese Temperaturunabhängigkeit resultiert daraus, dass in das detektierte Signal die physikalischen Schichtdicke d und der Brechungsindex n zu gleichen Anteilen einfließen und ihre entgegengesetzten Temperaturabhängigkeiten sich gegenseitig ungefähr aufheben [45].

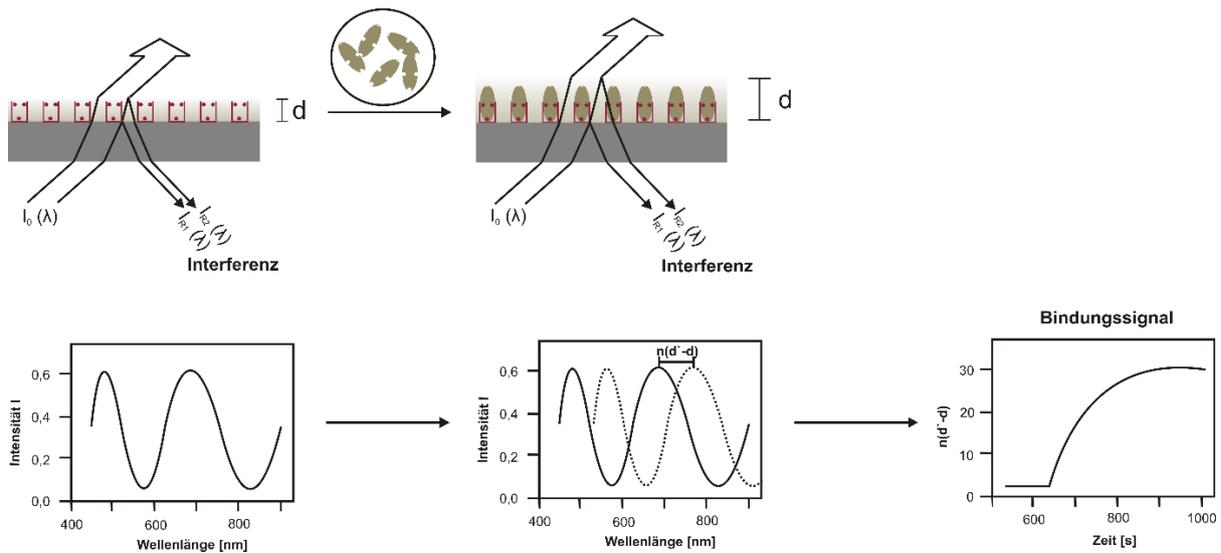


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Verschiebung des charakteristischen Interferenzspektrums bei Anlagerung von Molekülen an der Transduceroberfläche (links) und das daraus resultierende Bindungssignal (rechts).

2.3.5 1-lambda Reflektometrie

Eine kostengünstige und portable Alternative zu der in Abschnitt 2.3.4 beschriebenen RIFs ist die 1-lambda Reflektometrie. Um Messdaten zu generieren wird hier nicht die Änderung eines Extrempunktes im Interferenzspektrum beobachtet, sondern die Intensitätsänderung des Interferenzspektrums bei einer Wellenlänge (siehe Abbildung 6).

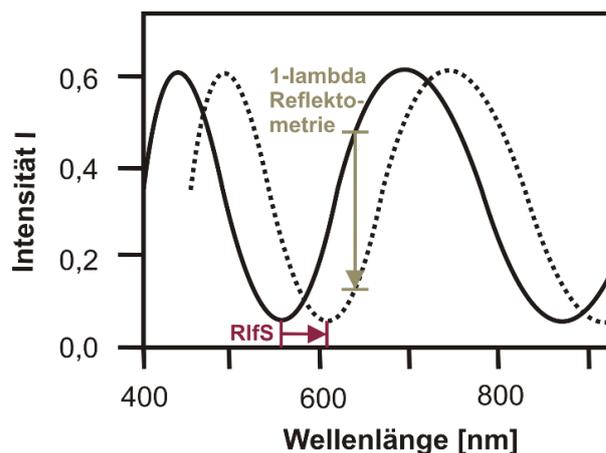


Abbildung 6: Detektionsprinzip für RIFs (rot, Verschiebung des Interferenzspektrums) und 1-lambda Reflektometrie (gold, Änderung der reflektierten Intensität bei einer Wellenlänge).

Um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen, muss eine Änderung der optischen Schichtdicke, eine maximale Änderung in der Reflektivität zeigen [46]. Dies kann durch die

Wahl des passenden Schichtsystems, der passenden Wellenlänge des Lichts und dessen Einfallswinkel gewährleistet werden. Es wurde allerdings gezeigt, dass für quantitative Fragestellungen wie z.B. Konzentrations- oder Affinitätsbestimmungen, von größerer Bedeutung ist, dass sich die Änderung im betrachteten Messbereich linear verhält [47]. Sind Wellenlänge des Lichts, dessen Einfallswinkel und das Schichtsystem für den nachzuweisenden Analyten optimal, so hat man keinen Informationsverlust bei der Detektion der reflektierten Intensität bei einer Wellenlänge im Vergleich zu der spektralen Methode.

2.3.6 Absorption von Strahlung

Wenn Strahlung auf ein Molekül trifft, wird ein Teil dieser Strahlung von dem Molekül absorbiert. Die Voraussetzung dafür ist die Resonanzbedingung. Diese lautet: die Energie der Strahlung muss der Energiedifferenz zwischen zwei Energieniveaus des Moleküls entsprechen. Dies entspricht im UV-Vis-Bereich der Energiedifferenz zwischen zwei unterschiedlichen elektronischen Zuständen.

Das makroskopische Grundgesetz für die Messung der Absorption von Strahlung im UV-Vis-Bereich ist das Lambert-Beersche-Gesetz. Dabei wird die Abschwächung eines monochromatischen Lichtstrahls mit der Anfangsintensität $I(0)$ auf die Intensität $I(d)$ beschrieben. Der Lichtstrahl durchquert eine Küvette mit einer absorbierenden Lösung. Die Abschwächung ist abhängig von einer stoffcharakteristischen Größe, dem Extinktionskoeffizienten ε_i , der Schichtdicke der Küvette d und der Stoffkonzentration c .

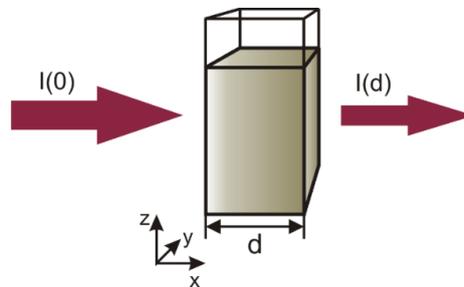


Abbildung 7: Schematische Darstellung einer mit einem Lichtstrahl durchleuchtenden Küvette.

Die Intensität I des Lichts nimmt beim Durchqueren einer Lösung proportional zur Wegstrecke x der durchquerten Schicht ab. Daraus lässt sich folgende Differentialgleichung ableiten:

$$dI(x) = -k \cdot I(x) \cdot dx \quad \text{Gl. 2-XVI}$$

Durch Integration der Wegstrecke x von 0 bis d erhält man folgende Gleichung:

$$\ln \frac{I(d)}{I(0)} = -k \cdot d \quad \text{Gl. 2-XVII}$$

Das Verhältnis $I(d)$ zu $I(0)$ wird auch als Transmission bezeichnet. Sie beschreibt welcher Anteil des Lichtstrahls die Probe unverändert passiert.

Durch Umformen und unter Verwendung des dekadischen Logarithmus folgt:

$$\lg \frac{I(0)}{I(d)} = -k' \cdot d \quad \text{Gl. 2-XVIII}$$

Die Proportionalitätskonstante k' wird nun durch den molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten ε und die Konzentration des gelösten Stoffes c ersetzt:

$$\lg \frac{I(0)}{I(d)} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad \text{Gl. 2-XIX}$$

Der erste Teil der Gleichung wird als Extinktion E und die gesamte Gleichung als Lambert-Beersches-Gesetz bezeichnet:

$$E = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad \text{Gl. 2-XX}$$

Das Lambert-Beersches-Gesetz gilt nur für monochromatisches Licht und gering konzentrierte Lösungen.

2.4 Erkennungsstrukturen

Erkennungsstrukturen sind Strukturen, die spezifische Wechselwirkungen mit einer Substanz eingehen und sie aufgrund dessen selektieren. Erkennungsstrukturen werden auch als sensitive Schicht bezeichnet und bilden zusammen mit dem Transducer den eigentlichen Sensor, der z.B. mithilfe der RfS ausgelesen werden kann.

Bei der Entwicklung eines Sensors spielt die affine und selektive Wechselwirkung zwischen der Erkennungsstruktur und dem Analyten eine bedeutende Rolle. Die Bindungsstärke zwischen Erkennungsstruktur und Ligand (Analyt) wird als Affinität bezeichnet. Für Biosensoren werden üblicherweise biologische Erkennungsstrukturen wie z.B. Antikörper, Enzyme oder Rezeptoren verwendet [48–50]. Diese haben den großen Vorteil einer sehr hohen Affinität (siehe Abbildung 8).

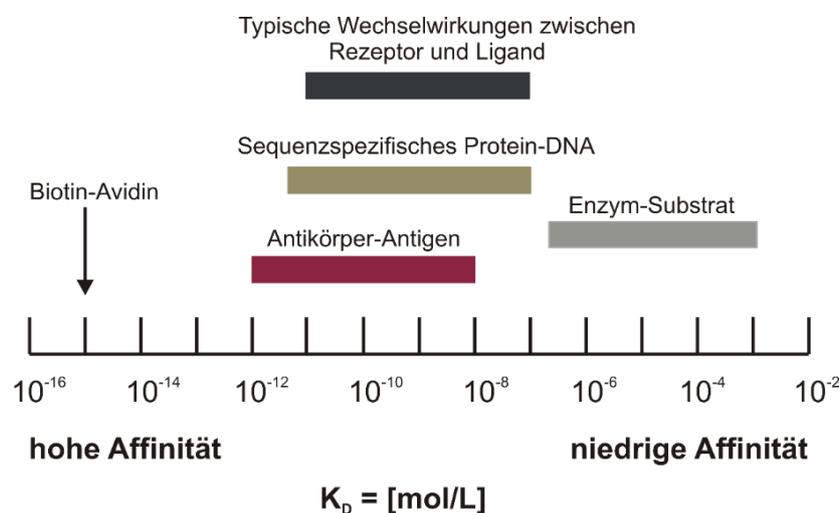


Abbildung 8: Darstellung der Affinitäten verschiedener biologischer Erkennungsstrukturen. (modifiziert nach [51]).

Ein großer Nachteil dieser biologischen Erkennungsstrukturen ist allerdings, dass sie sehr empfindlich gegen äußere Einflüsse wie Temperatur, nicht wässrige Matrices und pH-Änderungen sind. Diese Empfindlichkeit zeigt sich darin, dass sie ihre biologischen Aktivitäten verlieren und folglich nicht mehr im Stande sind, den Analyten zu binden. Somit kann dieser nicht mehr nachgewiesen werden. Um Biosensoren trotzdem unter anspruchsvollen Umgebungsbedingungen, wie sie bei der Wasseraufbereitung in Kläranlagen oder bei der Fermentation vorkommen, einzusetzen, wird dort auf biomimetische Erkennungsstrukturen wie molekular geprägte Polymere (MIPs) zurückgegriffen. Diese besitzen eine hohe thermische, chemische und mechanische Stabilität, sodass sie auch unter extremen Gegebenheiten ihre Funktion als Erkennungselement nicht verlieren. Neben der Robustheit ist ein weiterer großer Vorteil der biomimetischen Erkennungsstrukturen die kostengünstige und schnelle Synthese. Werden biomimetische Erkennungsstrukturen eingesetzt so spricht man von einem biomimetischen Sensor. Ein Nachteil dieser der Natur nach empfundenen

Erkennungsstrukturen liegt allerdings in ihrer Affinität ($K_d=10^{-6}$ mol/L) [52], die gerade im Vergleich zu Antikörpern ($K_d=10^{-12}$ - 10^{-8} mol/L) um ca. die Hälfte geringer ist. In der Literatur zeichnet sich ab, dass immer bessere Affinitäten der MIPs erreicht werden. Chienella et. al konnten durch Computerprogramme zur Optimierung der Monomierzusammensetzung schon Affinitäten im Bereich von polyklonalen Antikörpern erzielen ($K_d= 10^{-9}$ mol/L). In der breiten Masse ist es allerdings noch nicht gelungen, die von der Natur gegebenen Affinitäten zu erreichen. Ein weiterer Grund für geringere Affinitäten ist z.B. das sogenannte „template bleeding“. Der Affinitätsverlust kommt dabei durch Templatmoleküle (Molekül gegen das geprägt wird), die nach der Synthese der MIPs nicht vollkommen ausgewaschen werden, zustande. Diese Templatmoleküle können während der Anwendung der MIPs diese verlassen und bluten somit aus.

Eine Übersicht der verschiedenen Erkennungsstrukturen mit ihren Vor- und Nachteilen ist in Tabelle 1 dargestellt [53].

Tabelle 1: Zusammenfassung der verschiedenen Erkennungselemente mit ihren Vor- und Nachteilen nach [53–56].

Erkennungselement	Vorteile	Nachteile
Antikörper	<ul style="list-style-type: none"> • Spezifität • Hohe Affinität 	<ul style="list-style-type: none"> • Derivatisierung von kleinen Molekülen notwendig um Immunantwort zu erhalten • Aufwändige Produktion • Zum Teil Tierversuche notwendig • Mangelnde Stabilität • Limitation von Zielanalyten aufgrund von komplementäre Nukleinsäuren • Nur in wässrigen Medium anwendbar
Molekular geprägte Polymere	<ul style="list-style-type: none"> • Hohe thermische, chemische und mechanische Stabilität • Kostengünstig • Schnelle Produktion • Anwendung in nicht wässrigen Medium möglich 	<ul style="list-style-type: none"> • Geringere Affinität • Affinitätsverlust durch “template bleeding” • Heterogenität der Bindungstellen • Komplexe Herstellungsmethoden • Templatmoleküle müssen ausreichend bei der Synthese vorhanden sein

2.4.1 Affinitätsreaktionen an Grenzflächen

Affinitätsreaktionen beruhen auf Wechselwirkungen zwischen einem Rezeptor R und einem Liganden L . Der Rezeptor kann dabei eine beliebige Erkennungsstruktur sein wie z.B. Antikörper oder MIPs, bei denen das Antigen bzw. der Analyt als Ligand fungiert.

Intra- bzw. intermolekulare Wechselwirkung, sowie ihre Stärke und ihre Abstandsabhängigkeit, die bei einer solchen Rezeptor-Liganden Bindung auftreten, können sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Zwischenmolekulare Wechselwirkungen [57].

Wechselwirkung	Abstandsabhängigkeit	Stärke der Wechselwirkung [kJ/mol]	
Ionische (Coulomb) WW	r^{-3}	10-30	zwischen permanent geladenen Gruppen
Van der Waals WW	r^{-3} - r^{-7}	1-4	Dipol/Dipol, Dipol/Ion, induzierter Dipol
Wasserstoffbrückenbindung	r^{-6}	10-30	Bei Strukturen des Typs A-H...B
Hydrophobe WW	keine direkte Abhängigkeit	-	Ausschluss von Wasser aus der Bindungsstelle

Zur Beschreibung der Gleichgewichtsreaktion zwischen einem Rezeptors R und einem Liganden L dient Gl. 2-XXI.



Die Bildungsgeschwindigkeit des Rezeptor-Liganden-Komplexes wird durch die Assoziation des Komplexes mit der Assoziationsratenkonstante k_a und die Dissoziation des Komplexes mit der Dissoziationsrate k_d beschrieben. Durch die Gleichgewichtskonstante K kann die thermodynamische Stabilität des Komplexes charakterisiert werden. Die Gleichgewichtskonstante K ergibt sich zum einem aus dem Verhältnis der Ratenkonstanten und zum anderen aus dem Massenwirkungsgesetz. Beim Massenwirkungsgesetz wird sie als Verhältnis der Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes $[R-L]$ und der Konzentrationen des Rezeptors $[R]$ und des Ligands $[L]$ im Gleichgewicht beschrieben.

$$K = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[RL]}{[R][L]} \quad \text{Gl. 2-XXII}$$

Ist z.B. der Rezeptor R an der Oberfläche immobilisiert, liegt eine heterogene Affinitätsreaktion vor. In diesem Fall spielt nicht nur die Wechselwirkungskinetik, sondern auch die Diffusionskinetik, d.h. der Transport des Liganden L an die Oberfläche, eine entscheidende Rolle. Auch die Zugänglichkeit des Rezeptors R für den Liganden L ist zu beachten. Ist der Rezeptor R aus geometrischen Gründen für den Liganden L erschwert zu erreichen, führt dies auch zu einer Limitierung des Liganden L .

Bei einer heterogenen Affinitätsreaktion handelt es sich formal gesehen um eine Folgereaktion. Aus diesem Grund wird nur der geschwindigkeitsbestimmende, also der langsamste Schritt einer solchen Reaktion detektiert. Ob eine Reaktion diffusions- oder kinetisch kontrolliert verläuft, kann durch die Wahl von geeigneten Reaktionsbedingungen gesteuert werden.

Diffusionskontrollierte Reaktion

Bei diffusionskontrollierten Reaktionen ist die Diffusion des Liganden zur Oberfläche der langsamste und somit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Dies ist der Fall, wenn die Konzentration des Rezeptors an der Oberfläche hoch und die Konzentration des Liganden in der Lösung gering ist. Durch die hohe Konzentration des Rezeptors an der Oberfläche wird der Ligand, der zur Oberfläche diffundiert, direkt an dem Rezeptor gebunden und es bildet sich dort ein Rezeptor-Ligand-Komplex. Im Vergleich zu der großen Anzahl an freien Rezeptoren auf der Oberfläche können nicht schnell genug ausreichend Liganden aus dem Volumen nachgeliefert werden, um alle Rezeptoren abzusättigen. Zur Folge hat dieses Phänomen eine Verarmungszone in der Nähe der Oberfläche. Freie Liganden müssen nun erst durch diese Verarmungszone diffundieren, um mit den Rezeptoren in Wechselwirkung treten zu können (Abbildung 9).

In einem flüssigen System müssen dabei zwei Szenarien unterschieden werden: ein konstant fließendes System und ein ruhendes System. Es bildet sich zwar in beiden Fällen eine Nernst'sche Diffusionsschicht aus, aber diese zeigt bei einem konstant fließenden System keine zeitliche Änderung. Die Konzentration des Liganden im Volumen bleibt dabei konstant, da dieser kontinuierlich nachgeliefert wird. Durch die Bindung des Liganden an den auf der Oberfläche immobilisierten Rezeptor, entsteht in der Nernst'schen Diffusionsschicht ein linearer Konzentrationsgradient (dc/dx) entgegen der Diffusionsrichtung. Die Diffusion des Liganden an die Oberfläche kann durch das 1.Fickschen Gesetz beschrieben werden:

$$J_D = -D \frac{dc}{dx} = -D \cdot \frac{([L_{\text{Oberfläche}}] - [L_{\text{Volumen}}])}{\delta} \quad \text{Gl. 2-XXIII}$$

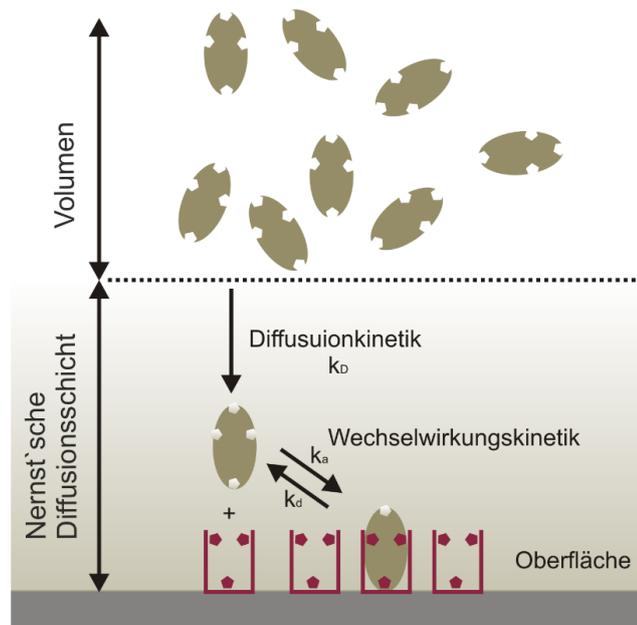


Abbildung 9: Wechselwirkungsprozesse an Oberflächen im Durchfluss.

Der Diffusionskoeffizient wird dabei mit D beschrieben und die Dicke der Diffusionsschicht mit δ [58]. Aufgrund des linearen Konzentrationsgradienten wird davon ausgegangen, dass die Konzentration des Liganden an der Oberfläche gleich Null ist (Gl. 2-XXIV). Dies bedeutet, dass sobald der Ligand an die Oberfläche diffundiert, er von einem Rezeptor gebunden wird.

$$\frac{dc}{dx} = \frac{([L_{\text{Oberfläche}}] - [L_{\text{Volumen}}])}{\delta} = - \frac{[L_{\text{Volumen}}]}{\delta} \quad \text{Gl. 2-XXIV}$$

Die Dicke der Diffusionsschicht δ setzt sich aus der Höhe h , aus der Breite b und aus der Länge l des Flusskanals, sowie aus der Fließgeschwindigkeit F zusammen (Gl. 2-XXV) [59].

$$\delta = \sqrt[3]{\frac{D \cdot h^2 \cdot b \cdot l}{F}} \quad \text{Gl. 2-XXV}$$

Folglich kann eine Erhöhung der Dicke der Diffusionsschicht durch eine niedrige Fließgeschwindigkeit und großzügig dimensionierten Flusskanal erzielt werden.

Kinetisch kontrollierte Reaktion

In diesem Falle ist die Konzentration des Liganden im Volumen sehr hoch und die Anzahl der Rezeptoren auf der Oberfläche gering. Dies hat zur Folge, dass die Konzentration des Liganden an der Oberfläche gleich der Konzentration des Liganden im Gesamtvolumen ist. Somit ist nicht wie bei der diffusionskontrollierten Reaktion die Diffusion der Liganden an die Oberfläche der langsamste und somit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, sondern der Vorgang der Assoziation mit dem Rezeptor. Diese Reaktion nennt man kinetisch kontrolliert.

Um kinetische Daten aus den erhaltenen Bindungssignalen zu bestimmen, muss die Diffusion an die Oberfläche ungefähr 10-mal schneller ablaufen als die Affinitätsreaktion an der Oberfläche [52]. Dies wird zum Problem bei Systemen mit schneller Wechselwirkungskinetik, die im Bereich von $10^5 \text{ mol/L}\cdot\text{s}$ liegen (Antikörper-Antigen-Komplexen). In diesem Fall muss die Oberflächenbeladung ausgedünnt werden. Systeme mit kleineren Assoziationsratenkonstanten (MIPs-Analyten-Komplex) können ohne Ausdünnung der Oberfläche kinetisch charakterisiert werden [52].

Für solch niedrig affine Systeme ergibt sich nach Gl. 2-XXI die Bindungsrate $d\Gamma(t)/dt$ aus der Anzahl der belegten Bindungsplätze $\Gamma(t)$, der Konzentration des Liganden $[L]$ und der Zahl der freien Bindungsplätze an der Oberfläche. Dabei lässt sich die Anzahl der freien Bindungsplätze durch die Differenz der maximal belegten Bindungsplätze Γ_{max} und der Anzahl der belegten Bindungsplätze $\Gamma(t)$ bestimmen.

$$\begin{aligned} \frac{d\Gamma(t)}{dt} &= k_a \cdot [L] \cdot \Gamma_{max} - (k_a \cdot [L] + k_d) \cdot \Gamma(t) \\ &= k_a \cdot [L] \cdot \Gamma_{max} - k_s \cdot \Gamma(t) \end{aligned} \quad \text{Gl. 2-XXVI}$$

Wird die Reaktion im Durchfluss betrachtet, bleibt die Konzentration des Liganden gleich und Gl. 2-XXVI kann als Reaktion mit einer Kinetik pseudo erster Ordnung betrachtet werden und nach der Anzahl der belegten Bindungsplätzen $\Gamma(t)$ aufgelöst werden.

$$\Gamma(t) = \Gamma_{GG} \cdot (1 - e^{-k_s t}) \quad \text{Gl. 2-XXVII}$$

Γ_{GG} beschreibt die Gleichgewichtsbeladung bei gegebener Rezeptorkonzentration und kann unter der Annahme, dass keine Wechselwirkungen der Liganden untereinander erfolgen, dass alle Rezeptoren auf der Oberfläche gleichermaßen zur Verfügung stehen und dass maximal eine Monolage an Ligand absorbiert wird, durch ein Langmuir Adsorptionsmodell beschrieben werden.

$$\Gamma_{GG} = \Gamma_{max} \cdot \frac{K \cdot [L]}{1 + K \cdot [L]} \quad \text{Gl. 2-XXVIII}$$

Die Zusammenhänge in Gl. 2-XXVII und Gl. 2-XXVIII zeigen, dass es möglich ist, durch die Analyse der Bindungskurven kinetische und thermodynamische Informationen über die Bindungskurve zu erhalten.

2.4.2 Molekulargeprägte Polymere

Molekular geprägte Polymere (engl. Molecularly Imprinted Polymers, MIPs) sind künstliche Erkennungsstrukturen, die für ein bestimmtes Templat (Analyt) „maßgeschneidert“ werden, d.h. das Polymer enthält Bindungsstellen für das Templatmolekül. Diese Bindungsstellen werden während des Polymerisationsprozesses durch Wechselwirkungen zwischen dem Templat und den Monomeren gebildet. Dieser Templat-Monomerkomplex polymerisiert in der Anwesenheit eines Crosslinkers, dessen Aufgabe die Quervernetzung der einzelnen Templat-

Monomerkomplexe ist. Das Templat kann anschließend extrahiert werden. Es hinterlässt eine dreidimensionale Struktur, deren Bindungsstellen komplementär zum Templatmolekül sind, und die somit eine spezifische Erkennung ermöglicht.

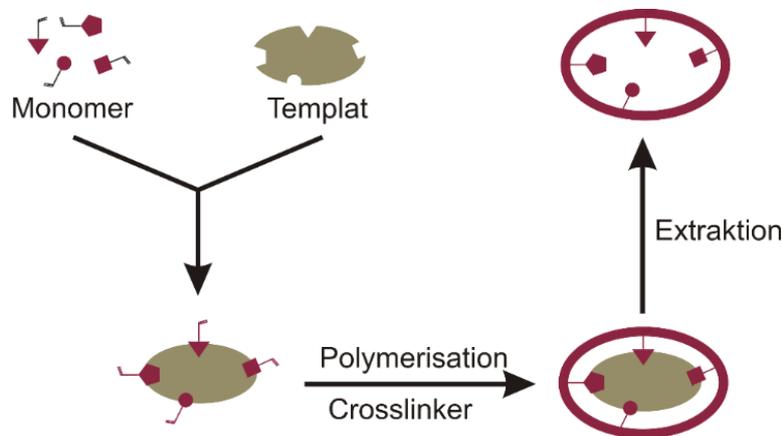


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Prägeprozesses.

Das Prägen von Polymeren (organischen) wurde zum ersten Mal 1972 von Wulff et. al. publiziert [60,61]. Bei dem Prägen der Polymere hängt es von der Wechselwirkung zwischen dem Templatmolekül und den Monomere ab, ob das Polymer kovalent oder nicht kovalent geprägt wird. Bei dem kovalente Prägen, dass von Wulff et. al. entwickelt wurde [60,61], bildet sich durch die kovalenten Wechselwirkungen zwischen dem Templat und dem Monomer ein sehr starker Templat-Monomer-Komplex. Daraus resultiert eine sehr homogene Verteilung der Bindungsstellen. Dies verhindert unspezifische Bindungen, hat aber den Nachteil einer langsamen Bindungskinetik, da die kovalente Bindung erst wieder hergestellt werden muss [62]. Da sowohl in der Sensorik als auch in der Chromatographie schnelle Prozesse beobachtet werden sollen, sind kovalent geprägte Polymere für diese Anwendungen eher nicht geeignet. Ein weiterer Nachteil liegt darin, dass nur Substanzklassen wie Alkohole, Aldehyde, Ketone und Carbonsäuren eingesetzt werden können [63].

Mosbach et al. entwickelte hingegen eine Prägungstechnik, die auf nicht-kovalenter Wechselwirkung zwischen Templatmolekül und Monomere basiert [64]. Da die Affinität zwischen dem Templatmolekül und den Monomeren meistens gering ist, muss ein hoher Überschuss an Monomeren bei der Polymerisierung hinzugefügt werden, um das Bindungsgleichgewicht möglichst weit auf die Seite des Templat-Monomer-Komplexes zu verschieben. Dies hat allerdings zur Folge, dass sich die Monomere nicht ausschließlich in den Bindungsstellen befinden, was zu verstärkten unspezifischen Wechselwirkungen führt [65]. Weitere Unterschiede zum kovalenten Prägen liegen in der heterogenen Verteilung der Bindungsstellen. Dies ist darauf zurück zu führen, dass die Bindungsstellen weniger komplementär zum Templat sind und somit eine schlechtere Selektivität und eine geringere Affinität aufweisen. Bei der Anwendung in der Sensorik werden häufig nicht nur MIPs, sondern zusätzlich auch nicht geprägte Polymere (NIPs) eingesetzt, die mithilfe desselben

Herstellungsprozess synthetisiert werden, allerdings in Abwesenheit des Templatmoleküls. Von dieser Maßnahme verspricht man sich, einen Vergleich zwischen den Wechselwirkungen mit den MIPs und dem Analyten und den NIPs und den Analyten zu ziehen und somit durch die Differenz der Signale unspezifische Wechselwirkung zwischen dem MIPs und dem Analyten herauszumitteln, d.h. zu referenzieren.

Als funktionelle Monomere werden hier vor allem vinylische und acrylische Monomere verwendet. Diese besitzen entweder basische (z.B. Vinylpirdin) oder azide (z.B. Methacrylsäure) Eigenschaften und bilden Wasserstoffbrückenbindungen (z.B. Acrylamid) oder hydrophobe Wechselwirkungen (z.B. Styrol) aus.

Um ein optimales Prägen zu garantieren, ist neben den funktionellen Monomeren auch der Crosslinker ein wichtiger Parameter. Dieser wird für die Vernetzung der Monomere eingesetzt und ist für das Erhalten der Struktur der Bindungsstelle zuständig. Der Crosslinker muss eine Struktur bauen, die nicht zu flexibel oder zu starr ist. Ist das Gerüst zu flexibel, würde es seine Struktur leicht verlieren und wäre es zu starr, würde dies ein schnelles Eindringen des Templatmoleküls in die Polymerstruktur erschweren. Außerdem sollte der Crosslinker eine möglichst geringe Wechselwirkung mit dem Templatmolekül aufweisen.

Aufgrund ihrer Einfachheit, findet die Synthese der MIPs konventionell mithilfe der Bulkpolymerisation statt. Dabei entstehen durch radikalische Polymerisation hochvernetzte Polymermonolithen. Initialisiert werden diese Reaktionen mittels Temperatur oder ultraviolettem Licht [66,67]. Nach der Polymerisation werden die Monolithe mechanisch zerkleinert. Dies hat zur Folge, dass die geprägten Polymere äußerst unregelmäßig geformt sind. Außerdem ist die Ausbeute für die gewünschte Größe der Partikel, die für verschiedene Anwendungen oftmals gleich und definiert sein muss, sehr gering. Somit hat man auch einen großen Verlust des Materials vorliegen. Ein weiterer Nachteil liegt darin, dass viele Templatmoleküle im inneren des Polymernetzwerkes eingeschlossen sind und folglich nicht extrahiert werden können.

Um homogene und sphärische Partikel zu synthetisieren, werden Methoden wie die Suspensionspolymerisation [68], Fällungspolymerisation [69] oder die Emulsionspolymerisation [70] verwendet. Eine besondere Anwendung der Emulsionspolymerisation ist die Mini-Emulsionspolymerisation. Dieses einstufige Verfahren besitzt den Vorteil, dass nanostrukturierte Partikel aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Monomeren hergestellt werden können und dass die aktive funktionelle Oberfläche der Partikel im Verhältnis zu den Partikeln aus der Bulkpolymerisation größer und leichter zugänglich für das Templat ist. Zusätzlich kann die Partikelgröße durch die Wahl der Reaktionsbedingungen gesteuert werden [71].

Die in dieser Arbeit verwendeten gegen Penicillin G (PenG) geprägten Polymere, wurden durch die inverse Mini-Emulsionspolymerisation hergestellt. Diese Polymerisation findet, im Gegensatz zu der typischen Mini-Emulsionspolymerisation, nicht in der wässrigen Phase, sondern in der öligen Phase statt. Dabei sind der Analyt (Penicillin G), das Monomer

2 Theorie

(NAEMA/HYMOPTA) und der Crosslinker (EBA) in der wässrigen Phase gelöst. Zusätzlich wird noch ein Tensid dazugegeben, das sich nach seiner Beschaffenheit als Emulgator zwischen der öligen und wässrigen Phase ausbildet. Diese Emulsion wird dann mit einem Ultraschallstab behandelt, wobei sich wässrige Mizellen in der öligen Phase bilden. Durch Temperaturerhöhung polymerisieren diese Mizellen aus (siehe Abbildung 12).

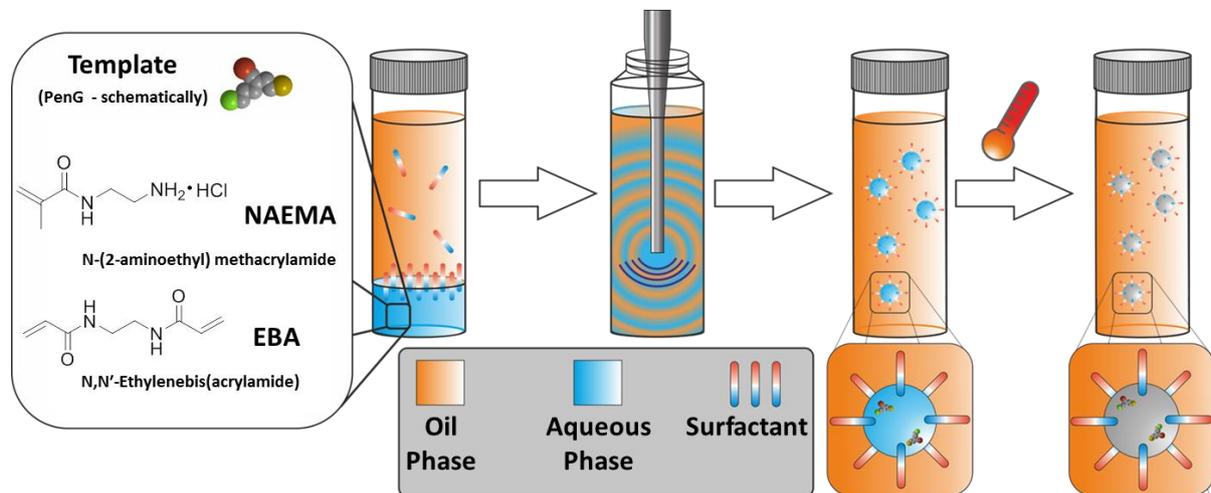


Abbildung 11: Schematische Darstellung der inversen Mini-Emulsionspolymerisation zur Synthese von Penicillin G (PenG) MIPs [72].

Zum Einsatz kommen Molekular geprägte Polymere mittlerweile in den unterschiedlichsten Bereiche, vor allem aber in der Analytischen Chemie [73]. Sie werden sowohl als feste Phase in der Festphasen-Extraktion (engl. Solid Phase Extraction, SPE) [74] als auch in der Chromatographie [75] verwendet. Außerdem finden sie ihre Anwendung als Katalysator für chemische Reaktionen [76] und als Erkennungsstrukturen in biomimetischen Immunoassays [77] und Sensoren.

In der Sensorik gibt es eine Vielzahl von verschiedenen Transduktionsmethoden, die in einem Übersichtsartikel von Haupt und Mosbach [78] zusammengestellt wurden. Beispiele für Transduktionsmethoden sind die Quarzkristall-Mikrowaage [79], Konduktometrie [80], sowie Amperometrie [81]. Optische Transduktionsmethoden spielen dabei auch eine bedeutende Rolle. Diese sind in den Übersichtsartikeln von Moreno-Bondi [82] et al. und von Henry et al. [83] zusammengefasst. Methoden sind dabei u.a. die SPR [84], Ramanspektroskopie [65] oder Fluoreszenzspektroskopie [81].

Die RIfS, die sich auch als optische Methode zur Transduktion eignet, wurde bereits in vorausgegangen Arbeiten mit MIPs kombiniert. Die ersten Arbeiten veröffentlichte Nopper [85]. Dabei wurden gegen den Analyten Phenyl- α -D-mannopyranosid kovalent geprägte Polymere, die als Polymerfilm aufgetragen wurden, untersucht. Erzielt wurden lange Ansprechzeiten (ca. einer Stunde) und teilweise irreversible Wechselwirkungen. Die nächste veröffentlichte Arbeit stammte ebenfalls von Nopper et al. [86]. Diesmal wurden nicht kovalent geprägte Polymere für den Analyten Di-*o*-Benzoylweinsäure charakterisiert. Die Ansprechzeiten wurden dabei um ungefähr die Hälfte reduziert (30 min), es konnte eine

Kalibrierkurve erhalten und Enantiomere unterschieden werden. MIPs als sphärische Partikel wurden zum ersten Mal von Jäger et al. [87] eingesetzt. Diese Partikel wurden nichtkovalent gegen Atrazin geprägt und durch elektrostatische Wechselwirkungen auf der Oberfläche immobilisiert. Eine Ansprechzeit von 30 min konnte hier allerdings trotz der nicht-kovalenten Prägung auch nicht unterschritten werden. Eine mehrfache Regeneration des Sensors war auch hier aufgrund von geringer Oberflächenstabilität schwierig. Kolarov [52] zeigte, dass sich durch eine kovalenten Immobilisierung der Partikel an der Sensoroberfläche, die durch funktionelle Gruppen der Polymerpartikel möglich war, ein stabiler Sensor entwickeln lässt. Der Sensor mit L-BFA geprägten Polymerpartikeln, zeigte schnelle Ansprechzeiten (ca. 100 s), eine gute Regeneration und stabile Bindungssignale. Er konnte sowohl kalibriert als auch validiert werden.

2.4.3 Antikörper

Die Aufgabe des Immunsystems ist es, eindringende Mikroorganismen wie Bakterien, Viren oder Pilze, körperfremde Substanzen, aber auch körpereigene Zellen, die fehlerhaft sind, abzuwehren. Dabei besteht das Immunsystem aus zwei verschiedenen Immunantworten. Zu einem aus der angeborene Immunantwort und zum anderen aus der erworbenen (adaptiven) Immunantwort. Die angeborene Immunantwort wird von Monozyten und Makrophagen dargestellt und besitzt die Aufgabe, die Standardoberflächenstruktur z.B. Glykosylierungsmuster von bakteriellen und viralen Krankheitserregern zu erkennen. Nach der erfolgreichen Erkennung können die Krankheitserreger von Makrophagen und Monozyten beseitigt werden. Das adaptive Immunsystem hingegen nutzt Antikörper (Immunglobuline, Ig) zur Bekämpfung von Erregern. Sie sind als Transmembranrezeptoren auf der Oberfläche von B-Lymphozyten vertreten. Diese B-Zellen können sich während einer Immunantwort zu Plasmazellen differenzieren, deren Aufgabe es ist, Antikörper in großen Mengen zu bilden. Produziert werden die Antikörper erst bei Kontakt mit dem Antigen. Antigene sind generell körperfremde Strukturen, die für gewöhnlich als Makromoleküle wie Proteine, Lipide oder Kohlenhydrate mit einem Molekulargewicht von größer 5000 Da auftreten. Antikörper zeigen allerdings nicht für das gesamte Antigen eine spezifische Affinität, sondern nur für eine gewisse Region, die sogenannte Bindungsdomäne bzw. das Epitop.

Antikörper sind wasserlösliche Proteine und werden beim Menschen in fünf Klassen aufgeteilt: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Sie unterscheiden sich in ihrer Verteilung im Organismus, ihrer Struktur und ihren Effektorfunktionen [88]. IgA befindet sich in Schleimhäuten und externen Körperflüssigkeiten wie Milch, Speichel, Schweiß und Tränen. Im Blutserum stellt es 15% der Immunglobuline dar. IgD und IgE sind nur in sehr geringen Mengen im Blutserum nachzuweisen. Sie kommen hauptsächlich auf Mastzell- und Lymphozyten Oberflächenmembranen vor. IgM ist als frühestes im Verlauf einer Immunantwort produziertes Immunoglobulin bekannt [89]. Es kommt fast ausschließlich im Blut vor und macht 7% der Serum-Immunglobuline aus. Die weitaus häufigste Klasse der Immunoglobuline sind die der IgG,

die in Blut, Lymphe und Darm vorkommen. Sie sind, wie in Abbildung 12 schematisch dargestellt, Y-förmig aufgebaut. Diese Y-Form wird aus einem Tetramer gebildet, das wiederum aus zwei schweren (engl. heavy chains, H, ca. 50 kDa) und zwei leichten Ketten (engl. light chains, L, ca. 25 kDa) aufgebaut ist, die beide glykosyliert sind. Diese leichten und schweren Ketten werden kovalent durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft und sind aus Immunglobulin-Domänen aufgebaut [90].

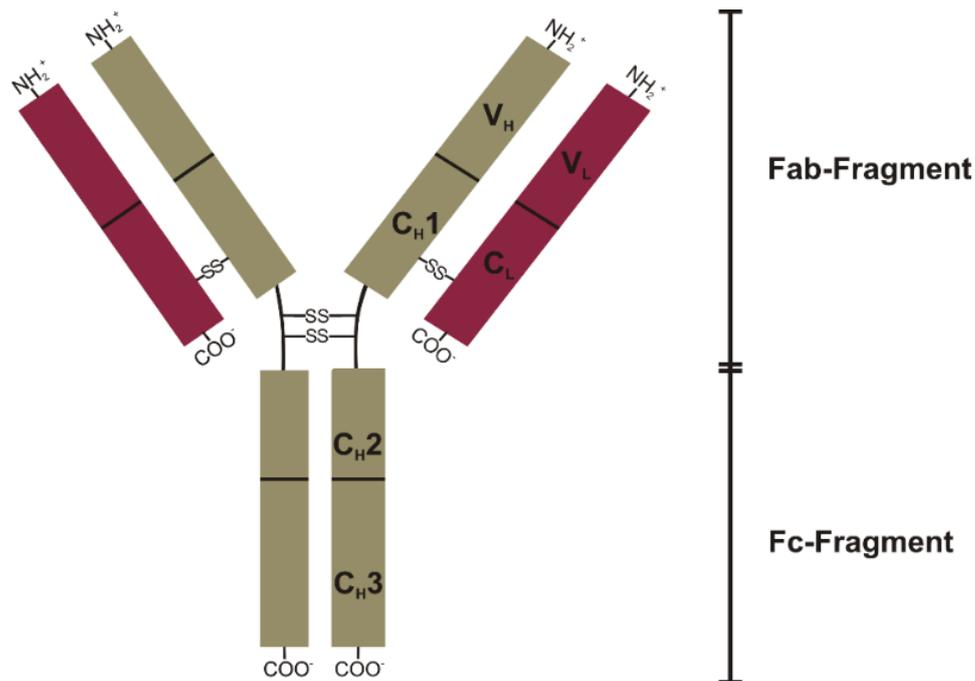


Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines IgG Antikörpers. Die schweren Ketten (H) bestehen aus einer variablen (v) und drei konstanten Domänen (c) und die leichte Kette (L) aus jeweils einer variablen (v) und einer konstanten (c).

Eine schwere Kette besitzt dabei eine variable Domäne (V_H) und drei konstante Domänen (C_{H1} , C_{H2} und C_{H3}). Eine leichte Kette hingegen besitzt nur eine variable (V_L) und eine konstante Domäne (C_L). Domänen werden definiert als Bereich des Proteins, die sich unabhängig voneinander falten und durch Disulfidbrücken stabilisiert sind. Das Fc-Fragment (engl. constant fragment) löst die biologische Funktion aus und das Fab-Fragment (engl. Fragment of antigen binding) ist für die hochaffine und spezifische Antigenkennung bzw. -bindung verantwortlich. Getrennt werden diese Bereiche durch die wenig strukturierte Gelenkregion, die für eine große räumliche Flexibilität der Bereiche sorgt. Im variablen Teil des Antikörpers befindet sich die Antigen-Bindungsstelle mit drei hypervariablen Aminosäuresequenzen, welche auch als CDR (engl. Complementarity Determining Region) bezeichnet werden. Diese sind für die große Diversität von mindestens 10^6 verschiedenen Antikörperstrukturen im menschlichen Organismus zuständig [91,92]. Die variablen Domänen der leichten und schweren Kette bilden am N-terminalen Ende jeweils eine Antigenbindungsstelle (Paratop). Somit besitzt ein IgG-Antikörper zwei identische Paratope und ist folglich bivalent.

Des Weiteren wird zwischen monoklonalen und polyklonalen Antikörpern unterschieden. Polyklonale Antikörper werden aus Tieren, vor allem Ratten, Kaninchen, Ziegen, Schafe und Pferde, gewonnen [93]. Diese Tiere werden zuvor mit den entsprechenden Antigenen infiziert. Ihr Körper produziert als Immunantwort Antikörper gegen das Antigen. Da ein Antigen oft mehrere Bindungsstellen (Epitope) besitzt, erhält man verschiedene Antikörper (polyklonale Antikörper). Monoklonale Antikörper hingegen binden an ein bestimmtes Epitop eines Antigens und besitzen damit alle das gleiche Paratop einer Spezifität und Bindungsaffinität. Sie werden aus Hybridomzellen gewonnen. Diese Hybridomzellen sind B-Zellen, die mit Myelomzellen fusioniert wurden. Folglich wachsen diese Hybridomzellen fast unbegrenzt und sind folglich zur Kultivierung geeignet [94].

Die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes beruht wie in Abschnitt 2.4.1 bereits schon erwähnt auf einer Affinitätsreaktion. Es werden keine kovalenten Bindungen ausgebildet, sondern verschiedene attraktive Wechselwirkungen (Tabelle 2). Eine der dominierenden Kräfte ist oftmals die hydrophobe Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper. Dies ist mit dem Entropiegewinn durch den Verlust der Ordnung der Wassermoleküle, die durch das Antigen verdrängt werden, zu begründen. Die Antigenbindungsstellen der Antikörper und die Epitope der Antigene können zudem leicht beweglich sein. So kann es bei der Wechselwirkung zwischen dem Paratop des Antikörpers und dem Epitop des Antigens zu einer Konformationsänderung kommen, welche die Wechselwirkung verstärkt. Dieser Mechanismus wird „induced fit“- Mechanismus genannt [95].

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Polymerpartikel

Die in dieser Arbeit verwendeten MIPs und NIPs wurden mittels der inversen Mini-Emulsionspolymerisation von Benjamin Riegger aus der Arbeitsgruppe Tovar (Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie/ Chemische und Physikalische Grenzflächen, Universität Stuttgart) synthetisiert und bereit gestellt.

Penicillin G geprägte MIPs/NIPs

In dieser Arbeit wurden Penicillin G MIPs/NIPs verwendet, die aus unterschiedlichen Monomeren polymerisiert wurden und somit unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Zum einen wurde das Monomer 2-Hydroxy-3-methacryloyloxy-propyltrimethyl-ammoniumchlorid (HYMOPTA) und zum anderen das Monomer N-(2-aminoethyl) methacrylamid hydrochlorid (NAEMA) verwendet. Beide wurden mit dem Crosslinker Ethylen-bis-acrylamid (EBA) kombiniert.

Die HYMOPTA Partikel wurden nicht weiter modifiziert und weisen nach der Polymerisation eine positiv geladene Partikeloberfläche auf. Durch diese positive Oberflächenladung können diese MIPs und NIPs mittels elektrostatischen Wechselwirkungen an die Sensoroberflächen immobilisiert werden.

Auch die NAEMA Polymerpartikel sind nach der Polymerisation positiv geladen und werden über diese Ladung elektrostatisch an die Transduceroberfläche gebunden. Zusätzlich wurde nach der Polymerisation eine Funktionalisierung der Partikel durchgeführt, um eine kovalente Immobilisierung an der Sensoroberfläche möglich zu machen. Da diese kovalente Immobilisierung durch eine kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition, die der klassischen Click-Chemie angehört, durchgeführt wurde, fungierten Alkin- und Azid-Gruppen als funktionelle Gruppen. Dabei wurde die Sensoroberfläche Alkin-funktionalisiert und die Polymerpartikel Azid-funktionalisiert.

Sowohl die HYMOPTA, als auch die NAEMA MIPs und NIPs lagen nach der Synthese in einer wässrigen Lösung vor. Bevor sie allerdings zur Präparation der Sensoroberfläche verwendet werden konnten, wurden sie 10 min mit dem Ultraschallbad, 1 min mit dem Ultraschallstab und weitere 5 min mit dem Ultraschallbad behandelt.

L-BFA geprägte MIPs/NIPs

Die L-BFA MIPs und NIPs wurden mit dem Monomer Methacrylsäure und dem Crosslinker Ethylenglycoldimethylacrylat polymerisiert und anschließend wie die HYMOPTA Pencillin G Partikel mit einer Azid-Gruppe funktionalisiert. Auch hier wird die Azid-Gruppe der Partikeloberfläche zur kovalenten Immobilisierung der Partikel auf der Alkin-mofidizierten Sensoroberfläche mittels kupferkatalysierten 1,3-dipolarer Cycloaddition genutzt.

Die L-BFA MIPs und NIPs liegen als Feststoff vor und werden in Methanol suspendiert. Die Suspendierung findet durch Behandlung mit dem Ultraschallbad (10 min), dem Ultraschallstab (1 min) und weiteren Behandlung im Ultraschallbad (5 min) statt.

3.1.2 Antikörper

In Tabelle 3 sind die als biologische Erkennungsstruktur verwendeten Antikörper aufgelistet.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.

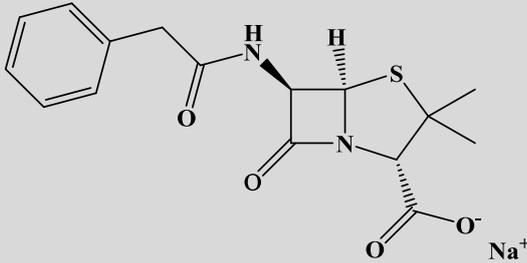
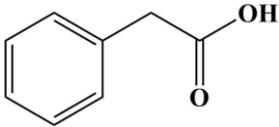
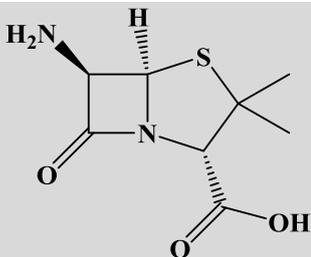
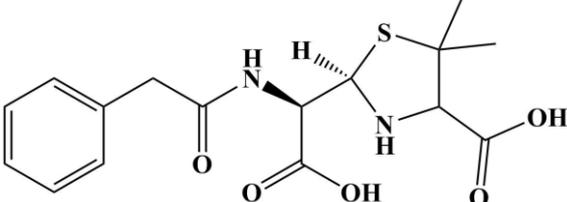
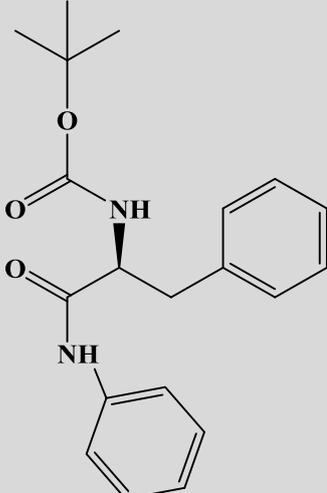
Antikörper	Beschreibung	Lieferant
Anti-Penicillin G Antikörper	Monoklonaler Antikörper gegen Penicillin G; Maus IgG1; clone pen-9	Acris Antibodies GmbH, Herford
Anti-Penicillin G Antikörper	Polyklonarer Antikörper gegen Penicillin G; Kaninchen	Antibodies-online, Atlanta

3.1.3 Analyte

Tabelle 4 zeigt die verschiedenen Analyte, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Penicillin G wurde dabei für Messungen mit den HYMOPTA und NAEMA Partikel eingesetzt. Phenyllessigsäure und 6-Aminopenicillansäure (6-APA), die Edukte des Penicillin G sind, wurden für Experimente zur Querempfindlichkeit der Azid-funktionalisierten NAEMA MIPs und NIPs herangezogen. Mithilfe der Penicillosäure wurden Vergleichstest zur Stabilität des Penicillin Gs in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht. Das L-BFA wurde als Analyt für die L-BFA geprägten und nicht geprägten Partikel genutzt, die zur Übertragung von der RfS auf die 1-lambda-Reflektometrie diente.

3 Material und Methoden

Tabelle 4: Verwendete Analyte.

Analyt	Strukturformel	Lieferant
Penicillin G- Natriumsalz $M = 356,2 \text{ g/mol}$		Sigma Aldrich, Steinheim
Phenyllessigsäure $M = 136,2 \text{ g/mol}$		Sigma Aldrich, Steinheim
6- Aminopenicillansäure (6-APA) $M = 216,3 \text{ g/mol}$		Sigma Aldrich, Steinheim
Penicillosäure		Sigma Aldrich, Steinheim
L-Boc-Phenylalanin- Anilid (L-BFA) $M = 340,4 \text{ g/mol}$		Bereitgestellt durch die Arbeitsgruppe Tovar, Universität Stuttgart

3.1.4 Polymere

Für die Oberflächenmodifizierung der RfS- bzw. Goethe-Transducer wurden die in Tabelle 5 dargestellten Polymere verwendet.

Tabelle 5: Zur Oberflächenmodifikation verwendete Polymere.

Polymere	Eigenschaften	Lieferant
Alkin-PEG	Alkin-Polyethylenglycol Alkin-PEG-NH ₂ M = 2000 g/mol	Rapp Polymere, Tübingen
DC-PEG	Dicarboxy-Polyethylenglycol COOH-PEG-COOH M = 2000 g/mol	Rapp Polymere, Tübingen
DA-PEG	Diamino-Polyethylenglycol NH ₂ -PEG-NH ₂ M = 2000 g/mol	Rapp Polymere, Tübingen
AMD 25%	Aminodextran 25 % Aminierung	Innovent e.V., Jena
AMD 50%	Aminodextran 50 % Aminierung	Innovent e.V., Jena

3.1.5 Standardchemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Standardchemikalien, Lösemittel und Verbrauchsmaterialien, die nicht näher spezifiziert und nicht in Tabelle 6 aufgelistet sind, wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim), Carl Roth (Karlsruhe), Merck Millipore (Darmstadt) oder Fluka (Buchs) bezogen.

Destilliertes und vollentsalztes Wasser wurde mittels der Filtrationsanlage Purelab classic, ELGA LabWater (Celle) erhalten.

3 Material und Methoden

Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Eigenschaften	Lieferant
Aquanal Ökotest	Aquanal™-Oekotest Water Laboratory (Ammonium, Nitrat, Nitrit, Phosphat, pH-Wert, Gesamthärte)	Sigma Aldrich, Steinheim
RIfS-Transducer (Glas)	1mm D 263 Glas, 10 nm Ta ₂ O ₅ , 330 nm SiO ₂	MICROS Optics GmbH & Co.KG, Schmiedefelde
RIfS-Referenztransducer (Glas)	1mm D 263, 10 nm Ta ₂ O ₅	MICROS Optics GmbH & Co.KG, Schmiedefelde
Goethe-Transducer (Glas)	1mm D 263, 45 nm Ta ₂ O ₅ , 30 nm SiO ₂	MICROS Optics GmbH & Co.KG, Schmiedefelde
H-Milch (1,5% Fett)	weißliche Emulsion	ALDI Süd Marke Milfina

3.1.6 Lösungen und Puffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete Lösungen und Puffer.

Verwendung	Bezeichnung	Zusammensetzung
Reinigung	Piranha	3:2 (v/v) konz. H ₂ SO ₄ und 30%ige H ₂ O ₂
	KOH	6 M in destilliertem entsalztem Wasser
pH-Wert Einstellungen	NaOH	1 M/ 6 M in destilliertem entsalztem Wasser
	HCl	1 M/ 6 M in destilliertem entsalztem Wasser
Oberflächen-modifikation	Huisgen-Reaktionslösung	20 g/L Ascorbinsäure, 10 g/L Cu(II)sulfat Pentahydrat gelöst in einer 1:4 Mischung aus DMSO und destilliertem entsalztem Wasser

		Wasser. Nach 10 min im Ultraschallbad wird eine klare Lösung erhalten, zu der 5 g/L MIP-/NIP-Suspension dazugegeben wird. Suspendierung für 1 min mit dem Ultraschallstab
	PEG-Lösung	4 mg/mL beliebiges PEG in wasserfreiem DCM
	AMD-Lösung	0,17 mg/mL AMD gelöst in destilliertem entsalztem Wasser
	Penicillin G MIP-Suspension	1 g/L MIPs in destilliertem entsalztem Wasser suspendiert
	Penicillin G NIP-Suspension	1 g/L NIPs in destilliertem entsalztem Wasser suspendiert
	Penicillin G MIP-Suspension in Methanol	1 g/L MIPs in Methanol suspendiert
	Penicillin G NIP-Suspension in Methanol	1 g/L NIPs in Methanol suspendiert
	L-BFA MIP-Suspension	1 g/L MIPs in Methanol suspendiert.
	L-BFA NIP-Suspension	1 g/L NIPs in Methanol suspendiert.
Puffer	PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 7,28 g NaCl, 1,28 g Natriumdihydrogenphosphat, 2,20 g Natriumhydrogenphosphat, 1 L destilliertes entsalztes Wasser, pH 7,4
	Citratpuffer	15 g Trinatriumcitrat, 7,5 g NaCl in 1,5 L destilliertes entsalztes Wasser, pH 7
	20 % MeOH	Mischung aus Methanol und destilliertem entsalztem Wasser im Verhältnis 1:4 (v/v)
Regeneration	0,5 % SDS	0,5 ige Natriumdodecylsulfat-Lösung in destilliertem entsalztem Wasser, pH 2,5

3 Material und Methoden

Proteinlösungen	OVA	10 g Ovalbumin in 1 L destilliertem entsalztem Wasser
	Ak-Stammlösung	20 µg Antikörper, 2 mg OVA, 20 mL PBS [1 µg/mL]

3.2 Geräte

3.2.1 Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS)

Die theoretischen Grundlagen der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS) wurden bereits in Abschnitt 2.3.4 erläutert. In diesem Abschnitt wird auf den Aufbau, sowie die Referenzierung und Auswertung der Messsignale des biomimetischen Sensors und des Biosensors eingegangen.

Aufbau

Die in dieser Arbeit verwendete RIfS-Anlage ist schematisch in Abbildung 13 dargestellt. In Abbildung 13 ist die dazugehörige Hamilton Fluidik nicht gezeigt. Diese ist für das Pumpen der Flüssigkeit über den Transducer zuständig. Der Transducer, der an einer Flusszelle anliegt, ist somit das Bindeglied zwischen dem Optik- dem Fluidiksystem.

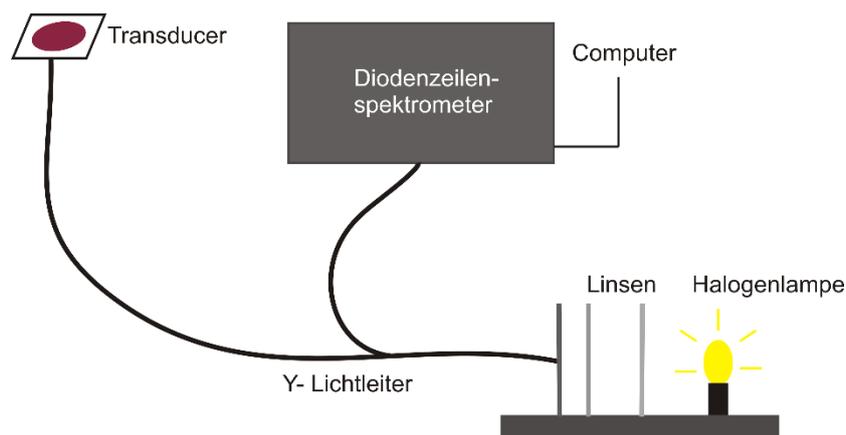


Abbildung 13: Schematische Darstellung der verwendeten RIfS-Anlage ohne Berücksichtigung der Fluidik.

Als Weißlichtquelle wurde eine 20 W/12 V Halogenlampe verwendet. Dieses Weißlicht wurde mittels eines Y-Lichtleiters aus PMAA mit einem Durchmesser von 1 mm zum RIfS-Transducer (1mm D 263 Glas, 10 nm Ta₂O₅, 330 nm SiO₂) hin bzw. weg geleitet. Die Intensität des reflektierten Lichts wird dann mit einem Diodenzeilenspektrometer detektiert [42,96,97]. Die Transducerfläche ist 1 x 1 cm. Eine detaillierte Beschreibung der verschiedenen Komponenten ist in Tabelle 8 zu finden.

3 Material und Methoden

Tabelle 8: Detaillierte Beschreibung der verwendeten RfS-Komponenten.

Komponente	Eigenschaften	Lieferant
Diodenzeilenspektrometer	Küvettenpektrometer SPEKOL 1100	Analytik Jena, Jena
Y-Lichtleiter	Polymer Lichtleiter (PMMA) 1 mm Durchmesser mit 1 auf 2 Faserkoppler	Laser Components, Olching
Weißlichtquelle	20 W/ 12V Halostar® Starlite 64425 S	Osram, Augsburg
Linsen und Positionieroptik		Spindler & Hoyer, Göttingen
Autosampler	Ismatec Remote mit ASIA Probenarm	Ismatec, Zürich
Flusszelle	Eigenkonstruktion des AK Gauglitz, gefertigt aus POM mit einem Flusskanal von 100 µm Tiefe	
Schläuche	Teflonschläuche Innendurchmesser 1,5 mm	Ismatec, Zürich
Spritzenpumpen	Microlab 540B Zweispritzen- Dispensor (100 µL Spritze)	Hamilton, Bonaduz
Ventil	Microlab MVP mit 4-Wege- Ventil Aufsatz	Hamilton, Bonaduz

Referenzierung von RfS-Messungen

Um RfS-Messungen auswerten zu können, müssen sie zuerst gemäß Gl. 3-I referenziert werden.

$$S_{ref} = \frac{S - R}{R - D} \quad \text{Gl. 3-I}$$

Dabei wird die Änderung der optischen Schichtdicke aus der Verschiebung des referenzierten Spektrums S_{ref} durch das Programm IFZ berechnet. Das referenzierte Spektrum S_{ref} wird aus den Reflexionsspektren S und den zuvor aufgenommenem Referenzspektrum R und Dunkelspektrum D mit dem Programm IFZ berechnet. Zu der Aufnahme des

Referenzspektrums R wurde ein Referenzplättchen verwendet. Das Dunkelspektrums D wurde durch Abdecken des Lichtleiters erzeugt.

Biomimetischer Sensor: Messsignale und Auswertungen

Der Messablauf einer RIfS-Messung kann in verschiedene Phasen eingeteilt werden (Abbildung 14). Er ist für alle in dieser Arbeit gemessenen Proben derselbe. Zu Beginn jeder Messung wird Puffer über den Transducer geleitet. Dies führt zu einer Baseline. Anschließend erfolgt die Probeninjektion, bei der zeitaufgelöst die Assoziation des Analyten an der Oberfläche beobachtet werden kann. Daraufhin wird die Sensoroberfläche ein weiteres Mal mit Puffer gespült. Diese sogenannte Dissoziationsphase zeigt mögliche Prozesse der Dissoziation des Analyten von der Oberfläche weg. Weiterhin werden hier Probenmatrixbestandteile des Flusswasser bzw. der Milch von der Oberfläche gespült. Anschließend folgt die Regeneration, die es ermöglicht Mehrfachmessungen auf einem Transducer durchzuführen. Zuletzt wird wieder Puffer über die Sensoroberfläche gepumpt, sodass eine weitere Baseline zu Stande kommt. Im idealen Fall befindet sich die letzte Baseline auf dem gleichen Niveau der Änderung der optischen Schichtdicke wie die ersten Baseline.

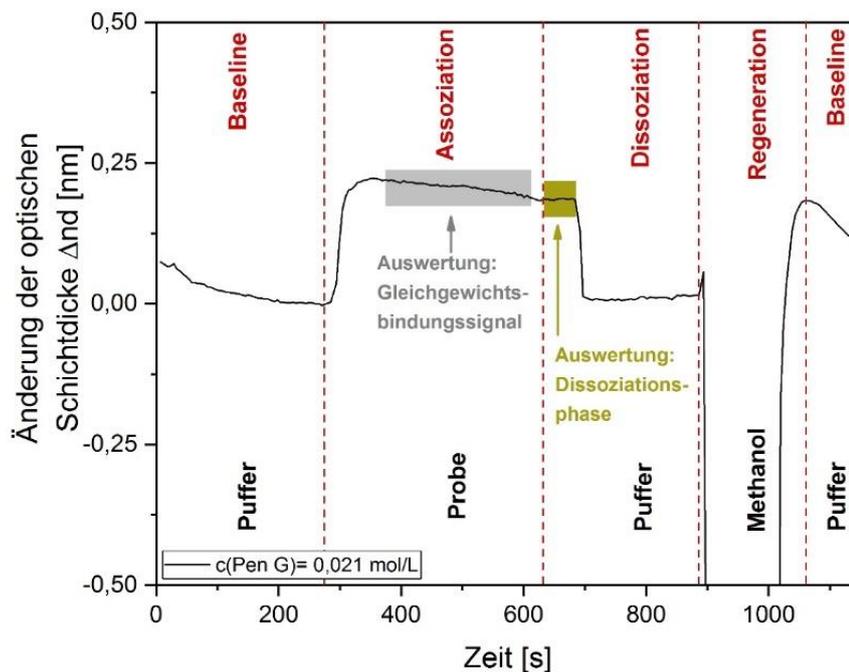


Abbildung 14: Darstellung der verschiedenen Phasen einer RIfS-Messung des biomimetischen Sensors: Baseline, Assoziation, Dissoziation, Regeneration und Baseline. Außerdem sind die verschiedenen Auswertemöglichkeiten (Gleichgewichtsbindungssignal oder Dissoziationsphase) für MIPs dargestellt.

Um die RIfS-Messungen auszuwerten, wird zuerst der Mittelwert der Messpunkte der ersten aufgenommenen Baseline gebildet. Dieser wird von allen Messwerten abgezogen, d.h. auf Null

referenziert. Ob zur Auswertung das gemittelte Signal die Gleichgewichtsbindung oder der Anfangsbereich der Dissoziationsphase verwendet wird, hängt von der Matrix ab, in der die Probe gemessen wird. In der Probenmatrix Puffer oder Flusswasser, wo kein bedeutender Brechungsindexsprung oder extreme unspezifische Bindungen von Matrixbestandteilen auftreten, kann das Gleichgewichtsbindungssignal herangezogen werden. Im Falle der Matrix Milch ist dies allerdings durch die vorkommende Tyndall-Streuung in der Assoziationsphase nicht möglich. Deswegen werden Messungen in Milch durch die Mittelung eines Bereiches am Anfang der Dissoziationsphase ausgewertet.

Um den Analyten zu quantifizieren, wird das erhaltene Signal (Gleichgewichtsbindungssignal bzw. Anfangsbereich der Dissoziationsphase) gegen die Konzentration aufgetragen und mit Hilfe einer Kalibrierfunktion, die einen Zusammenhang zwischen Signal und Konzentration darstellt, gefittet. Für beide Auswerteverfahren kann eine physikalische Kalibrierfunktion verwendet werden, die die Adsorptionseigenschaften des Systems beschreibt. Im Falle der MIPs wird häufig eine Langmuir-Freundlich Adsorptionsisotherme verwendet, die die Wechselwirkungen zwischen MIP und Analyt am ehesten beschreibt (siehe Gl. 3-II).

$$f(x) = \frac{abx^{1-c}}{1 + bx^{1-c}} \quad \text{Gl. 3-II}$$

Die totale Anzahl der Bindungsstellen wird durch den Parameter a , die mittlere Bindungsaktivität durch b und der freie Analyt, der zur Verfügung steht, wird durch x ausgedrückt. Der Term $1-c$, ist der Heterogenitätsindex, welcher einen Wert zwischen 1 und 0 einnehmen kann. Dabei bedeutet $(1-c) = 1$, dass die Partikel aus einem homogenen Material bestehen und bei $(1-c) < 1$, dass die Partikel aus heterogenem Material sind [98].

Diese Kalibrierfunktion wird dafür genutzt, analytische Parameter wie die Nachweisgrenze (engl. limit of detection, LOD) oder die Bestimmungsgrenze (engl. limit of quantification, LOQ) zu bestimmen. Für die Ermittlung des LOD bzw. LOQ wird die Standardabweichung des Signals bei Nullmessungen (Analytkonzentration ist gleich 0) errechnet. Die Standardabweichung wurde in dieser Arbeit mittels Dreifachmessungen bestimmt. Der LOD ist der Wert der Blindwert-Messung zuzüglich dreimal seiner Standardabweichung und der LOQ der Wert der Blindwert-Messung zuzüglich zehnmal seiner Standardabweichung.

Um die Kalibrierkurve zu validieren, werden Wiederfindungsraten bestimmt. Es werden Proben mit bekannten Analytkonzentrationen versetzt und gemessen. Mithilfe der Kalibrierkurve können die theoretisch zu erhaltenen Messwerte ermittelt und mit den gemessenen verglichen werden.

Bei der Aufnahme der Kalibrierkurve und der Wiederfindungsraten in Citratpuffer wird eine Penicillin G-Stammlösung (0,09 mol/L) hergestellt, die entsprechend verdünnt wird. Das Probenvolumen beträgt jeweils 1 mL. Im Falle der Matrices Flusswasser und Milch werden 800 μL Matrix und 200 μL Penicillin G in Citratpuffer vermessen.

Biosensor: Messsignale und Auswertung

Die Messphasen der Proben des Biosensors entsprechen denen des biomimetischen Sensors. Da bei dem Biosensor im Regelfall diffusionskontrollierte RI/S-Messungen beobachtet werden, wird die Steigung, die in der Phase der Probeninjektion (Assoziationsphase), auftritt ausgewertet (Abbildung 15).

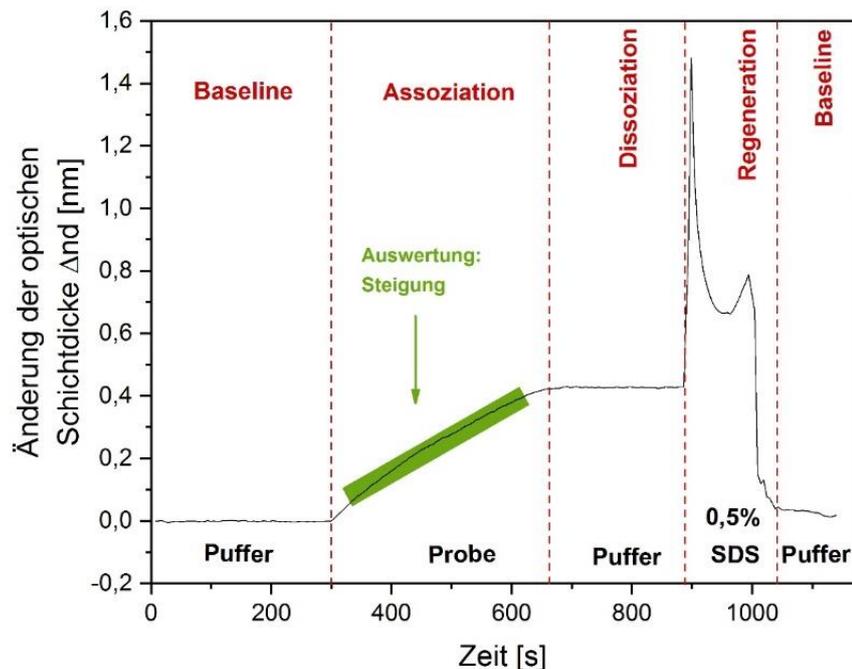


Abbildung 15: Darstellung der verschiedenen Phasen einer RI/S-Messung des Biosensors: Baseline, Assoziation, Dissoziation, Regeneration und Baseline. Außerdem ist die Auswertung über die Steigung des Bindungssignals während der Probeninjektion dargestellt.

Beim Bindungshemmtest, wo ein indirekter Nachweis des Analyten erfolgt, ist das Bindungssignal umgekehrt proportional zu der Analytkonzentration (Abschnitt 3.3.2). Zur Bestimmung der Kalibrierkurve, wird auf eine dreifach bestimmte Nullmessung (kein Analyt in der Probe) referenziert. Dieses erhaltene Signal wird gleich 100% gesetzt und alle anderen Messungen darauf bezogen. Als Kalibrierfunktion wird hier eine sigmoidal verlaufende 4-parametrischen Logistikkfunktion (Gl. 3-III) verwendet [99].

$$f(x) = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 - \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} \quad \text{Gl. 3-III}$$

Dabei beschreibt die obere Asymptote A_1 und die untere Asymptote A_2 . Der Bereich zwischen den beiden Asymptoten wird als dynamischer Signalbereich bezeichnet. Der Wendepunkt der Funktion wird durch den Parameter x_0 beschrieben, der die Analytkonzentration darstellt, die

bei der Signaländerung von 50% des dynamischen Signalbereichs beobachtet werden kann. Die Steigung der Tangente in diesem Punkt repräsentiert der Parameter p .

3.2.2 1-lambda-Reflektometrie

Die theoretischen Grundlagen der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS), auf der auch die 1-lambda Reflektometrie beruht, wurden bereits in Abschnitt 2.3.5 erläutert.

Aufbau

Die 1-lambda-Reflektometrie wurde in dieser Arbeit zur Charakterisierung des biomimetischen Sensors verwendet. Eine schematische Darstellung des Aufbaus ist in Abbildung 16 zu finden. Nicht in Abbildung 16 dargestellt ist die dazugehörige Hamilton Fluidik. Diese Fluidik wird benötigt, um Flüssigkeit über den Transducer, der sich an einer Flusszelle befindetet, zu pumpen.

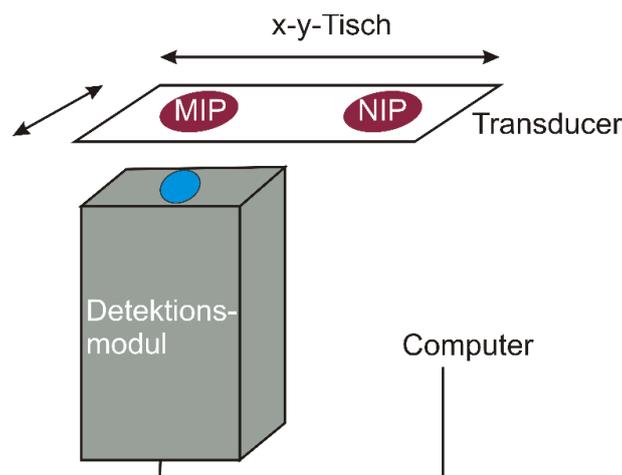


Abbildung 16: Schematische Darstellung des verwendeten 1-lambda-Reflektometrie-Aufbaus.

Im Falle der 1-lambda-Reflektometrie wird ein Freistrahlaufbau verwendet. Dies wird durch ein Detektionsmodul, in dem sowohl die Lichtquelle (LED, 470/520 nm) als auch eine Photodiode zur Detektion integriert sind, verwirklicht. Das Licht einer Wellenlänge trifft auf einen transparenten Goethe-Transducer (1mm D 263, 45 nm Ta_2O_5 , 30 nm SiO_2) und das reflektierte Licht wird von der Photodiode detektiert. Der Transducer mit einer Länge von 32 mm und einer Breite von 12 mm ist in einem x-y-Tisch, der die Kavität mit Flusszelle beinhaltet, eingebettet. Durch Hin- und Herverschieben in x-Richtung ist es möglich mehrere Spots quasi parallel auszulesen. Der Vorteil beim parallelen Auslesen von mehreren Spots ist es, dass verschiedene Analyte in einer Probe simultan detektiert werden können [100].

In dieser Arbeit wurden zwei Spots (MIP und NIP) auf dem Transducer immobilisiert und im 3 s Abstand jeweils abgerastert. Dieses parallele Auslesen dient hier nicht dazu, unterschiedliche Analyte in der Probe zu identifizieren, sondern dazu, unspezifische Wechselwirkungen mit dem Analyten oder Matrixbestandteile der Probe zu referenzieren. Diese unspezifischen Wechselwirkungen treten sowohl bei MIPs als auch bei NIPs gleichermaßen auf. Somit werden Messergebnisse erhalten, die eine Aussage über die spezifischen Wechselwirkungen zwischen MIPs und dem Analyten treffen können. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Komponenten des Aufbaus ist in Tabelle 9 zu finden.

Tabelle 9: Detaillierte Beschreibung der einzelnen Komponenten des 1-lambda-Reflektometrie Aufbaus.

Komponente	Eigenschaften	Lieferant
Detektionsmodul	ESE-LOG USB (ESM001-MB-1033) mit zwei Hochleistungs-Leuchtdioden (470 nm/ 520 nm) sowie zwei Low Noise Si-Photodioden mit Vorverstärker, System aus integrierten Linsen und Spiegeln in konfokaler Anordnung und Linsentubus mit Fokuslängen 6 mm mit Aluminiumgehäuse, integriert in umgebautem Mikrotiterplatten-reader /ESRE02-MB-0210) mit x-y-Verschiebeinheit	Qiagen lake Constance GmbH, Stockach
Weißlichtquelle	20 W/ 12V Halostar® Starlite 64425 S	Osram, Augsburg
Linsen und Positionieroptik		Spindler & Hoyer, Göttingen
Autosampler	CETAC ASX-130, 60 trays	CETAC Technologies, Omaha (USA)
Flusszelle	PDMS-Flusszelle mit einem Flusskanal von 100 µm Tiefe und Flusskanalbreite von 1mm	Biometrics GmbH, Tübingen
Schläuche	Teflonschläuche Innendurchmesser 1,5 mm	Ismatec, Zürich
Spritzenpumpen	Microlab 540B Zweispritzen-Dispensor (100 µL Spritze)	Hamilton, Bonaduz

Ventil	Microlab MVP mit 8-Wege-Ventil Aufsatz	Hamilton, Bonaduz
--------	----------------------------------------	-------------------

Messsignale und Auswertung

Die verschiedenen Phasen einer RfS-Messung mit der 1-lambda-Reflektometrie und die Auswertung der Bindungssignale sowie die Erstellung einer Kalibrierkurve entsprechen denen der bereits beschriebenen Methoden in Abschnitt 3.2.1. Je nachdem, ob die Änderung der reflektierten Intensität positiv oder negativ ist, kann ein positives Bindungssignal wie bei RfS oder ein negatives Bindungssignal auftreten. Ein Bindungssignal ist in der Regel für ein bestimmtes System entweder positiv oder negativ, sodass man negative Bindungskurven bei der Auswertung einfach in den Betrag setzen kann, um positive Bindungssignale zu erhalten.

Referenzierung der Messpunkte

Durch den 1-lambda-Reflektometrie-Aufbau ist es möglich, MIP- und NIP-Spot parallel auszulesen und unspezifische Wechselwirkungen des Polymers mit dem Analyten oder Matrixbestandteilen des Analyten herauszumittel, also zu referenzieren. Diese Referenzierungen (S_R) wird durch Subtraktion des NIP-Messsignals (S_{NIP}) von dem MIP-Messsignals (S_{MIP}) erhalten (Gl. 3-IV). Die Differenz, die sich daraus ergibt, spiegelt die spezifischen Wechselwirkungen zwischen dem MIP und dem Analyten wieder.

$$S_R = S_{MIP} - S_{NIP} \quad \text{Gl. 3-IV}$$

3.2.3 UV/Vis-Spektroskopie

Um die Stabilität von Penicillin G und dessen Edukte 6-Aminopenicillansäure und Phenyllessigsäure in verschiedenen Puffern zu untersuchen, wurden Absorptionsspektren mit dem UV/Vis/NIR Spektrometer lambda-9 (Perkin Elmer, Überlingen) durchgeführt. Zusätzlich wurden mit dem gleichen Gerät Absorptionsspektren des Hydrolyse Produkts des Penicillin Gs der Penicillosäure ermittelt. Die Theorie dieser Methode wurde bereits in Abschnitt 2.3.6 erläutert.

Die eingestellte Spaltbreite des Gerätes betrug 2 nm und die Registriergeschwindigkeit, mit der die Spektren aufgenommen wurden, 120 nm/min. Die verwendeten Quarzküvetten besaßen eine Schichtdicken von 1 cm. Das Probenvolumen lag bei 1000 µL. Zur Referenzierung wurden jeweils die reinen Lösungsmittel vermessen.

Untersucht wurden verschiedene Konzentrationen von Penicillin G, Penicillosäure, 6-Aminopenicilliansäure und Phenyllessigsäure (0,00299 mol/L, 0,00898 mol/L und 0,02096 mol/L) in destilliertem vollentsalzten Wasser, PBS und Citratpuffer. Spektren der

verschiedenen Lösungen wurden zum Zeitpunkt 0, nach 1 h, 3 h, 6 h, 12 h und 24 h aufgenommen.

Um zu ermitteln, ob die erhaltenen Spektren auch im tiefen UV-Bereich (< 300 nm) Absorption und nicht gerätespezifisches Rauschen aufnehmen, wurden Messungen durchgeführt, bei denen nur der Probenstrahlengang eine Küvette mit Lösungsmittel enthielt. Der Referenzkanal beinhaltete keine Küvette. Das einkanalige Spektrum liefert die Durchlässigkeitsgrenze („Kante“) des Lösungsmittels.

3.2.4 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Rasterkraftmikroskopie (engl. Atomic force microscopy, AFM) dient zur mechanischen Abtastung der Probenoberfläche, folglich werden Informationen über die Morphologie der Probenoberfläche erhalten. Die zur Abtastung verwendete nanoskopisch kleine Spitze, die am Cantilever befestigt ist, rastert in der xy-Ebene über einen festgelegten Bereich der Probe. Diese wird somit gescannt. Je nach zwischenmolekularen Wechselwirkungen der Spitze mit der Probenoberfläche wird der Cantilever unterschiedlich ausgelenkt. Die Verbiegung des Cantilever wird optisch mittels Laserstrahl, der auf die Oberfläche des Cantilevers gerichtet ist und dort auch reflektiert wird, beobachtet. Der reflektierte Strahl wird von einer Photodiode detektiert. Durch die Verwendung eines beweglichen Probenstischs kann mithilfe einer Feedbackschleife der Abstand von Spitze und Probenoberfläche geregelt werden.

Je nach Beschaffenheit der Probe können verschiedene Messmodi verwendet werden. Für glatte und harte Oberflächen wird der statische Modus, der sogenannte contact-mode verwendet. Dabei berührt die Spitze die Probenoberfläche, und der Cantilever verbiegt sich je nach Wechselwirkung mit der Probe zur Probe hin oder weg, um den vorgegeben Sollwert einzuhalten.

Der tapping-mode (dynamischer Modus) wird bei weichen Proben eingesetzt. Der Cantilever wird dabei über die piezoelektrische Platte, an die er befestigt ist, zu Schwingungen nahe seiner Resonanzfrequenz angeregt. Treten nun zwischen der Spitze und der Probenoberfläche Kräfte auf, ändert sich die Resonanzfrequenz, und es gibt eine Frequenzverschiebung. Diese Frequenzverschiebung ist ein Maß für die Kraftwechselwirkung und wird als Regelsignal beim Abtasten der Oberfläche genutzt.

Die in dieser Arbeit aufgenommen AFM-Bilder wurden im tapping-mode mit dem Gerät MultimodeTM SPM (Digital Instrument, Santa Barbara) aufgenommen und mit dem Programm NanoScope 6.13R1[®] (Digital Instruments, Veeco) ausgewertet.

3.2.5 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Um die Anbindung, die Verteilung und die Größe der Polymerpartikel an der Sensoroberfläche zu überprüfen, wurde nicht nur die AFM, sondern auch die REM verwendet. Ein Elektronenstrahl rastert dabei die zu untersuchende Probe ab. Die Vergrößerung der abgerasterten Probenoberfläche erhält man durch die Detektion der Wechselwirkungen der Elektronen mit der Probe. Um Wechselwirkungen mit Atomen und Molekülen aus der Luft zu vermeiden, werden die Messungen im Hochvakuum durchgeführt. Mittels Magnetspulen wird der Elektronenstrahl auf die Probe fokussiert. Je nachdem, wie der Elektronenstrahl auf die Probe trifft, sind verschiedene Wechselwirkungen, die mit verschiedenen Detektoren aufgenommen werden können, zu beobachten. Da Sekundärelektronen (SE) aus der obersten Schicht der Probenoberfläche stammen, geben sie Informationen über die Topographie der Oberfläche. Weitere Informationen wie Materialkontrast kann man über Rückstreuielektronen (engl. backscattered electrons, BSE), die im tieferen Bereich der Probe auftreten, erhalten. Rückschlüsse auf die Probenzusammensetzung können durch emittierte charakteristische Röntgenstrahlen, die bei einem noch tieferen Eindringen des Elektronenstrahls detektiert werden können, erzielt werden.

Die in dieser Arbeit aufgenommenen REM-Bilder wurden von Monika Riedl am Fraunhofer Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie in Stuttgart mit dem Gerät Leo 1530 VP (Zeiss, Jena) aufgenommen. Um elektrostatische Ladung zu vermeiden, wurden die Glastransducer nach der Immobilisierung der Polymerpartikel mit Platin besputtert.

3.2.6 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die ITC wurde verwendet, um die Affinitäten zwischen MIPs bzw. NIPs und Penicillin G zu detektieren. Bei der Kalorimetrie allgemein handelt es sich um Messungen von Wärmeänderungen. Diese Wärmeänderungen finden je nach ablaufender Reaktion in der Messzelle exotherm oder endotherm statt. Prinzipiell gibt es zwei verschiedene Typen von Kalorimetern: adiabatische Kalorimeter und Zwillingskalorimeter [101]. Bei dem adiabatischen Kalorimeter liegt kein Wärmeaustausch zwischen der Probe und der Umgebung vor, somit ist die Temperatur der Probe zu jedem Zeitpunkt gleich der der Umgebung. Läuft die Reaktion in der Probe endotherm ab, muss folglich die Umgebung gekühlt werden, ist die Reaktion in der Probe exotherm, muss die Umgebung erwärmt werden. Bei der Zwillingsbauweise hingegen liegen eine Mess- und eine Referenzzelle vor. Betrieben werden kann es isotherm, adiabatisch und isoperibol. Die in dieser Arbeit aufgenommenen Messungen wurden im Zwillingskalorimeter im isothermen Betriebsmodus aufgenommen, d.h. die Temperatur der Umgebung wird konstant gehalten und ist gleich der der Messzelle. Findet eine Reaktion in der Messzelle statt, so kommt es zu einem Wärmeaustausch zwischen der Probe und dem äußeren Wärmebad (Umgebung). Dies führt zu einer Wärmeänderung gegenüber der Referenzzelle. Gemessen wird dies durch eine thermoelektrische Kompensationsmessung. Dabei werden exotherm ablaufende Reaktionen durch ein Peltier-

Element und endotherm ablaufende Reaktion durch einen Heizwiderstand kompensiert. Diese Wärmeänderung generiert somit eine Spannung, aus der die ausgetauschte Wärmeleistung und letztendlich durch Integration der erhaltenen Peaks die Wärmemenge berechnet werden kann.

Verwendet wurde das Titrationskalorimeter Thermal Activity monitor TAM2277 (TA Instruments (ehemals Thermometric AB), Schweden). Die Messungen wurden in einem Mikroreaktionssystem mit einer Titrationseinheit (4 mL, Baureihe 2251-310) durchgeführt. Die Injektion der Probe fand mit einer Spritzenpumpe 6120 Lund Syringe pumpe (Thermometric AB, Schweden) statt. Als Injektionsspritze wurde eine Goldkanüle (100 μ L) bzw. Edelstahlkanülen (250 μ L, Hamilton, Schweiz) verwendet.

Um das System zu kalibrieren, wurde stets eine dynamische Kalibrierung vor dem Messen durchgeführt. In der Messzelle wurden die 2 mL Polymerpartikel-Citratpuffer Suspension ($c=25$ g/L) vorgelegt und die Referenzzelle wurde mit 2 mL Citratpuffer befüllt. In 5 Injektionen wurden jeweils 20 μ L einer Penicillin G-Citratpuffer-Lösung mit der Konzentration 1,1 g/L im Abstand von 15 min titriert.

3.2.7 Weitere Geräte

Die bisher noch nicht erläuterten Geräte sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Weitere verwendete Geräte die bisher noch nicht näher spezifiziert wurden.

Gerät	Eigenschaften	Lieferant
Ultraschallstab	UW70, Ultraschallstab mit GM70 Sonopulse Steuerungseinheit	Bandelin, Berlin
Ultraschallbad	Sonorex Super 10 P	Bandelin, Berlin

3.3 Assay Formate

Da in dieser Arbeit zwei Sensoren entwickelt wurden, die in unterschiedlichen Umgebungen eingesetzt werden sollen, sind auch die Anforderungen, wie z.B. Matrix, pH, Temperatur sowie Konzentrationsbereiche des Analyten sehr unterschiedlich. Auf diese Anforderungen kann u.a. mit der Wahl der Erkennungsstrukturen und der Oberflächenmodifikationen, der Anpassung der Messabläufe, aber auch mit dem verwendeten Assay Format eingegangen werden.

Da der gegen Temperatur- und pH-Änderungen inerte biomimetischer Sensor als *in-line* Sensor direkt im Fermenter eingesetzt werden soll, kann keine Probenvorbereitung stattfinden. Deswegen kommt hier nur das direkte Testformat infrage. Ein Vorteil bei der Umsetzung dieses direkten Formats ist, dass bei der Fermentation sehr hohe Konzentrationen an Penicillin G im g/L Bereich vorliegen.

Der Biosensor hingegen soll zur Spurenanalytik in der Umwelt eingesetzt werden. Da die Konzentrationen des Penicillin G in Fluss- und Abwässern, sowie in Milch nur im $\mu\text{g/L}$ Bereich liegen, ist hier eine besonders geringe Nachweisgrenze notwendig. Besonders geeignet ist dafür der Bindungshemmtest. Ein Problem, das bei dieser Anwendung des direkten Testformats auftreten würde, wäre, dass die Änderung der optischen Schichtdicke bei der Anlagerung der kleinen Penicillin G Moleküle an die immobilisierten Antikörper zu gering wäre, um ein deutliches Bindungssignal zu erhalten. Bei dem biomimetischen Sensor spielt dieses Problem keine Rolle, da sich die Änderung der optischen Schichtdicke vor allem durch das Quellen der Polymerpartikel verändert. Dieses Quellen kommt durch Einbettung des Penicillin Gs in die Partikel zu Stande.

3.3.1 Assay-Format: Molekulargeprägte Polymere

Für den biomimetischen Sensor wird das direkte Assay Format verwendet. Hier werden wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, die MIPs und NIPs elektrostatisch oder kovalent an der Sensoroberfläche immobilisiert. Anschließend wird die Probe, die den Analyten erhält, über die Sensoroberfläche geleitet. Der Analyt kann mit den immobilisierten MIPs bzw. NIPs wechselwirken. Um nicht gebundenen Analyt von der Sensoroberfläche zu entfernen, wird anschließend mit Puffer gespült.

Das mit dem direkten Assay-Format erhaltene Bindungssignal ist direkt proportional zur Analytkonzentration in der Probe, d.h. eine hohe Konzentration an Analyt in der Probe erzeugt auch ein hohes Bindungssignal und eine niedrige Konzentration ein niedriges Bindungssignal.

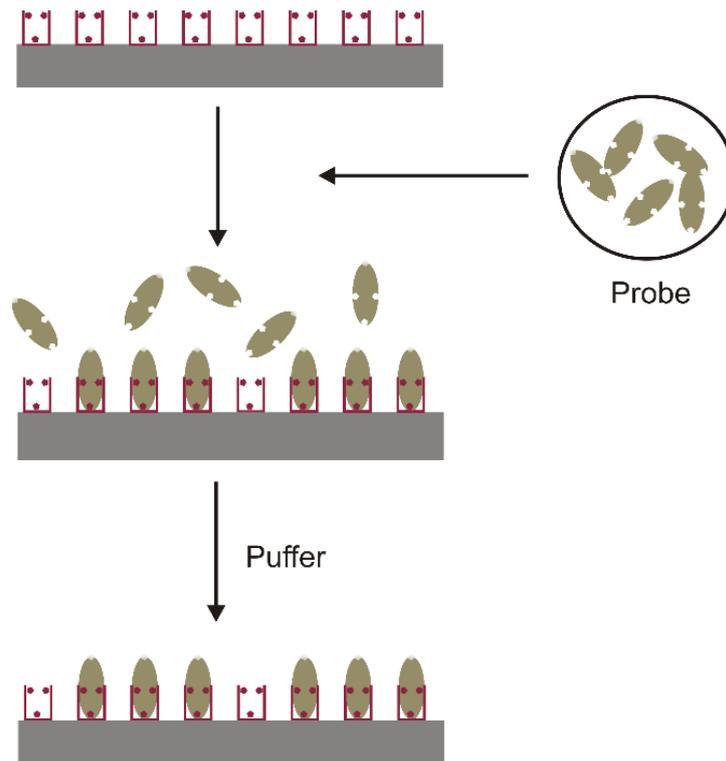


Abbildung 17: Schematische Darstellung des direkten Assay-Formats unter Verwendung von MIPs als Erkennungsstrukturen.

3.3.2 Assay-Format: Antikörper

Für den Biosensor wird der Bindungshemmtest als Assay Format verwendet. Dabei wird als immobilisierte Erkennungsstruktur auf der Sensoroberfläche das Antigen (Analyt) gebunden. Die Probe, die den Analyten enthält, wird mit einer definierten Menge an Antikörpern für 20 min inkubiert und danach über die Sensoroberfläche geleitet. Durch die Inkubation stellt sich in dem Antigen-Antikörper-Gemisch ein Gleichgewicht ein, und nur die Antikörper, die noch freie Bindungsstellen aufweisen, können an das immobilisierte Antigen binden.

Das beim Bindungshemmtest erhaltene Bindungssignal ist umgekehrt proportional zu der Analytkonzentration in der Probe. Somit erhält man für eine hohe Konzentration an Analyt ein niedriges und für eine niedrige Konzentration an Analyt ein hohes Bindungssignal.

Das direkte Format (s. Abschnitt 3.3.1) wird im Falle des in dieser Arbeit gezeigten Biosensors nicht zum Nachweis des Analyten verwendet, sondern zur Charakterisierung der verschiedenen modifizierten Transduceroberflächen. Hierbei wurde wie im Falle des Bindungshemmtests das Antigen an der Sensoroberfläche immobilisiert und anschließend Antikörper ohne Inkubation mit dem Analyten über die Sensoroberfläche geleitet.

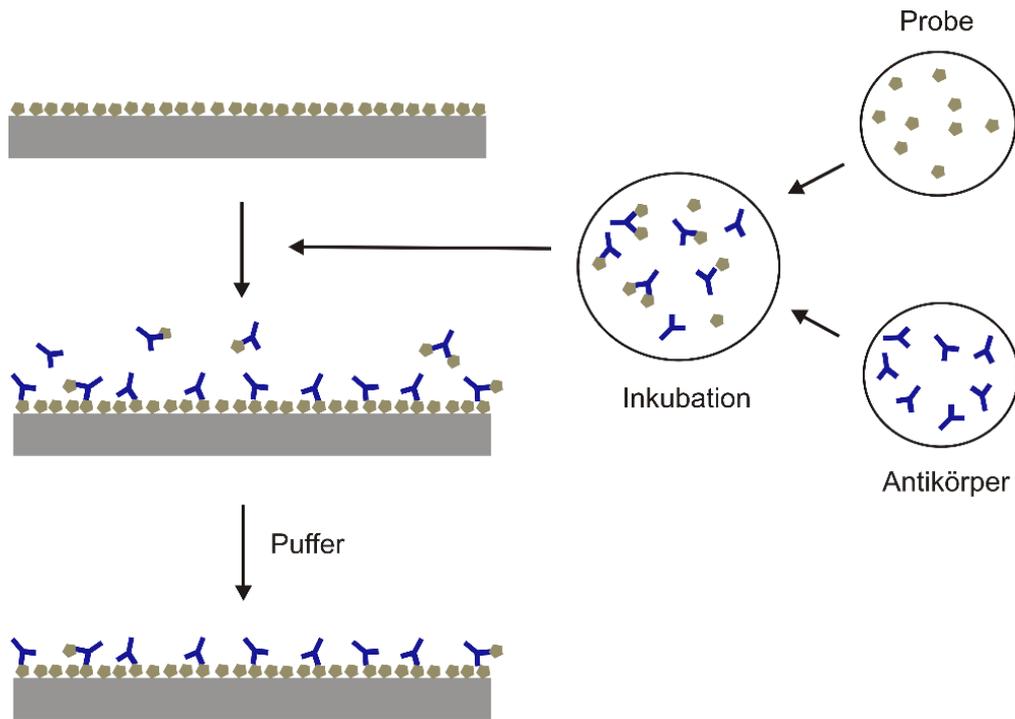


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Bindungshemmtests. Als immobilisierte Erkennungsstruktur auf der Sensoroberfläche wird der Analyt verwendet.

3.4 Oberflächenmodifikationen

Um die in dieser Arbeit verwendeten Erkennungsstrukturen auf den Glastransducern zu immobilisieren, wurden verschiedene Oberflächenmodifikationen untersucht. Der erste Schritt jeder Modifikation ist, die Oberfläche des Transducers zu reinigen, zu aktivieren und zu silanisieren. Um unspezifische Wechselwirkung der Sensoroberfläche mit Matrix- und Probenbestandteile zu reduzieren, wird meistens eine Polymerschicht auf der Sensoroberfläche immobilisiert. Anschließend werden dann die MIPS/NIPs (biomimetischen Sensor) bzw. das Penicillin G (Biosensor) als Erkennungsstrukturen auf den Transducer aufgebracht.

Reinigung und Aktivierung

Die Glastransducer werden 1 min in 6 M KOH eingelegt, mit destilliertem entsalztem Wasser gespült und anschließend 20 min lang in einem Becherglas mit 30 mL frisch hergestellter Piranha-Lösung in das Ultraschallbad gestellt. Nach dieser Zeit werden die Glastransducer mit Wasser abgespült und im Stickstoffstrom gründlich trockengeblasen.

3.4.1 Oberflächenmodifikationen: Molekulargeprägte Polymere

Silanisierung mit Carboxyethylsilanetriol Natriumsalz (CES)

Die gereinigten und aktivierten Transducer werden 2 h lang unter leichtem Schütteln in CES eingelegt.

Silanisierung mit 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan (GOTPS)

Die aktivierte SiO₂- Oberfläche der Glastransducer werden mit 12 µL GOTPS betropft und ein zweiter Transducer darüber gelegt (Sandwichmethode). Das Sandwich wird schließlich in einer trockenen geschlossenen Kammer 1 h lang inkubiert. Anschließend werden die Transducer mit wasserfreiem Aceton abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Modifikation mit Polyethylenglycol (PEG)

Zur Immobilisierung von PEG werden jeweils 20 µL einer PEG- Lösung auf einen Transducer gegeben und mindestens 24 h im Ofen bei 70°C inkubiert. Die Transducer werden anschließend in 70°C warmem destilliertem entsalztem Wasser geschwenkt und mit RT-warmen Wasser gespült. Getrocknet werden die Transducer im Stickstoffstrom. Für eine elektrostatische Anbindung der MIPS/NIPs wird DC-PEG und für eine kovalente Anbindung Alkin-PEG verwendet.

Elektrostatische Immobilisierung der HYMOPTA und funktionalisierten NAEMA-Partikel

Da bei den HYMOPTA- und den nicht-funktionalisierten NAEMA-MIPs/-NIPs keine funktionellen Gruppen an den Polymerpartikeln zur Verfügung standen, wurde versucht, diese Partikel elektrostatisch über die vorhandene positive Ladung der Partikel zu immobilisieren. Dazu wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen über eine Silanisierung mit CES und dann einer direkter Aufbringung der Partikel ohne Polymerschicht und zum anderen über eine Silanisierung mit GOPTS und anschließender DC-PEG Modifikation.

Auf die mit CES silanisierten Transducer werden jeweils 40 μL der MIP-/NIP- Suspension bzw. der MIP-/NIP-Suspension in Methanol pipettiert und 72 h lang in einer wasser- bzw. methanoldampfgesättigten Kammer inkubiert, anschließend mit dem jeweiligen Lösungsmittel gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Die mit DC-PEG modifizierten Transducer werden zunächst mit 1 M NaOH behandelt, um eine negative Ladung der Sensoroberfläche zu erzeugen (siehe Abbildung 19). Auf diese negative geladene Oberfläche werden dann 40 μL der MIP-/NIP- Suspension pipettiert und 72 h lang in einer wasserdampfgesättigten Kammer inkubiert. Nach der Inkubation werden die Transducer mit destilliertem entsalztem Wasser gespült. Die Trocknung findet im Stickstoffstrom statt.

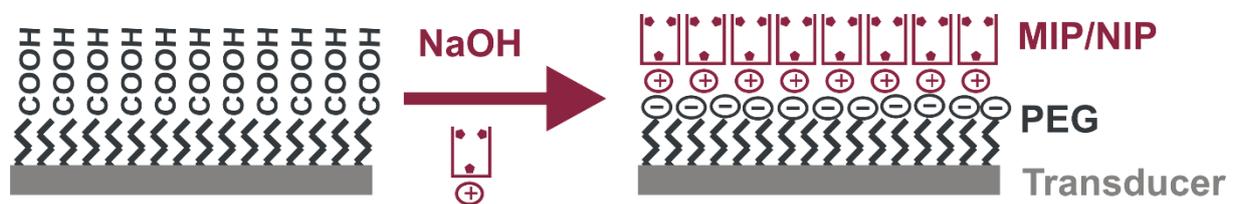


Abbildung 19: Schematische Darstellung der elektrostatischen Immobilisierung der positiv geladenen HYMOPTA-MIPs/-NIPs auf einem DC-PEG modifizierten Transducer.

Kovalente Immobilisierung NAEMA-MIPs/-NIPs

Da die NAEMA-Polymerpartikel nach ihrer Synthese mit Azidgruppen funktionalisiert wurden, ist es möglich, diese kovalent auf die Sensoroberfläche anzubringen. Diese Immobilisierung wurde in Anlehnung an Morawietz [102] und Kolarov [52] durchgeführt. Dabei werden die Alkin-PEG modifizierten Transducer in einem Wägeglas mit der Huisgen-Reaktionsmischung gut bedeckt und bei RT für 24 h leicht auf einem Schütteltisch geschüttelt. Danach werden sie mit DMSO und destilliertem vollentsalztem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

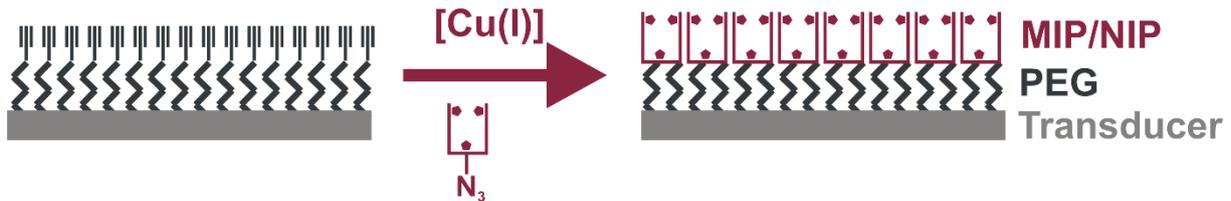


Abbildung 20: Schematische Darstellung der kovalenten Immobilisierung der Azid-funktionalisierten Polymerpartikel (NAEMA) auf einem Alkin-PEG modifiziertem Transducer.

Immobilisierung von MIPs und NIPs zur parallelen Auslesung

Für das parallele Auslesen der MIPs und NIPs werden Transducer verwendet, die eine 3,5-mal größere Fläche besitzen als die üblich verwendeten Transducer. Aus diesem Grund wird bei den Präparationen, die analog zu der elektrostatischen Immobilisierung mit DC-PEG und kovalenten Immobilisierung der Partikel stattgefunden haben, die 3,5-fache Menge der Chemikalien verwendet.

Bei der elektrostatischen Anbindung der Partikel mittels DC-PEG werden jeweils 30 μL MIP- bzw. NIP-Suspension räumlich voneinander getrennt aufgetragen und weiterhin wie bereits oben beschrieben behandelt.

Da die kovalente Anbindung der Azid-funktionalisierten Partikel in einem Reaktionsgemisch stattfindet, wurden die zwei verschiedenen zu beschichtenden Seiten getrennt voneinander mit MIPs- bzw. NIPs modifiziert. Hierzu wurde erst eine Seite senkrecht mit Parafilm fixiert 24 h lang in das Reaktionsgemisch bei leichtem Schütteln getaucht, mit DMSO und destilliertem vollentsalztem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend wurde die andere Seite ebenso behandelt.

3.4.2 Oberflächenmodifikationen: Antikörper

Bei der Entwicklung des Biosensors wurden verschiedene Oberflächenmodifikationen untersucht (Abbildung 21). Es wurden dabei nicht nur unterschiedliche Polymere als Schutzschicht verwendet, sondern zusätzlich auch noch ein Linker in die Oberflächenmodifikation eingebaut.

Silanisierung mit 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (GOPTS)

Die Silanisierung der Sensoroberfläche mit GOPTS für den Biosensor wurde wie die Silanisierung der Oberfläche für den biomimetischen Sensor (beschrieben bereits in Abschnitt 3.4.1) durchgeführt.

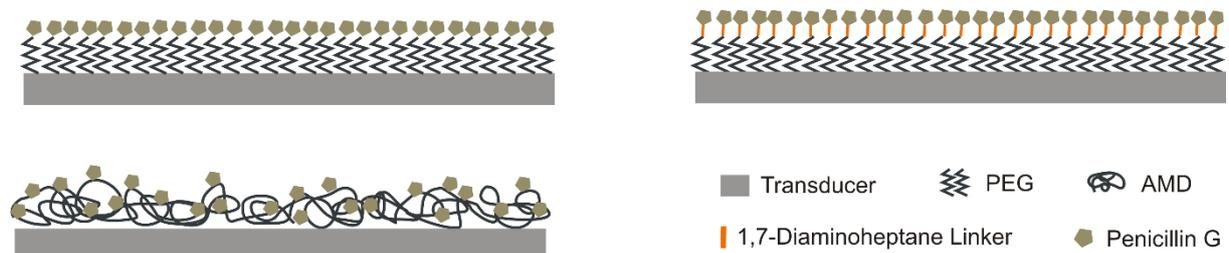


Abbildung 21: Schematische Darstellung der für den Biosensor verwendeten Oberflächenmodifikationen. Oben sind Modifikationen mit DA-PEG und Penicillin G bzw. DC-PEG, 1,7-Diaminoheptan Linker und Penicillin G und unten die Modifikation mit AMD und Penicillin G dargestellt.

Modifikation mit Aminodextran (AMD)

Es werden 12 μL einer AMD-Lösung auf die silanisierten Glastransducer pipettiert und mittels Sandwichtechnik über Nacht in einer wasserdampfgesättigten Kammer inkubiert. Danach werden die Transducer mit Wasser abgespült und im Stickstoffstrom trockengeblasen.

Modifikation mit Polyethylenglycol (PEG)

Für die PEG-Modifikation des Biosensors wird DA-PEG, bei der Verwendung des 1,7-Diaminoheptan Linkers wird DC-PEG benötigt. Die Aufbringung verläuft analog zu Abschnitt 3.3.1.

Modifikation mit 1,7 Diaminoheptan

Auf die DC-PEG modifiziertem Transducer werden 10 μL einer Lösung aus 5,7 mg NHS, 12 μL DIC und 38 μL DMF pipettiert und anschließend mithilfe der Sandwichmethode 4 h lang bei RT in einer DMF-dampfgesättigten Kammer aktiviert. Nach dem Spülen mit DMF und wasserfreiem Aceton erfolgt die Immobilisierung des 1,7-Diaminoheptan Linkers. Hierzu werden 6 mg 1,7-Diaminoheptan in 500 μL destilliertem vollentsalztem Wasser gelöst und die Transducer mit jeweils 10 μL dieser Lösung mittels Sandwichmethode in einer wasserdampfgesättigten Kammer 24 Stunden lang inkubiert und anschließend mit destilliertem vollentsalztem Wasser gespült. Getrocknet werden die Transducer im Stickstoffstrom.

Kovalente Immobilisierung von Penicillin G

Die kovalente Immobilisierung des Penicillin G erfolgt über die Carboxyfunktion des Moleküls. Hierfür werden 4 mg Penicillin G-Natriumsalz in 40 μL DMF gelöst und 6 μL DIC zur Aktivierung der Carboxyfunktion hinzugegeben. Die mit DA-PEG bzw. mit 1,7-

Diaminoheptan modifizierten Transducer werden im Sandwichverfahren mit je 10 μL dieser Lösung in einer DMF-dampfgesättigten Kammer 24 h inkubiert. Danach wurden die Transducer mit DMF und destilliertem vollentsalztem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

3.5 Entnahme der Flusswasserproben

Die Flusswasserproben wurden dem Fluss Neckar entnommen. Der Neckar ist ein 362 km langer Fluss in Baden-Württemberg. Seine Quelle befindet in Schwenningen und er durchquert u.a. die Städte Tübingen, Esslingen, Stuttgart, Heilbronn und Heidelberg, bis er schließlich in Mannheim in den Rhein mündet. Die Stellen der Probenentnahmen waren dabei Villingen-Schwenningen (0 km, Quelle), Tübingen (112 km) und Remseck am Neckar (190 km hinter Stuttgart).

Die Probenentnahme fand möglichst weit im Fluss und ca. 50 cm unter der Wasseroberfläche statt. Die entnommenen Proben wurden anschließend direkt kühl und unter Lichtausschluss gelagert. Untersucht wurden die Proben auf Nitrit-, Nitrat-, Ammonium- und Phosphat-Gehalt, sowie die Wasserhärte und den pH-Wert.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Stabilität von Penicillin G

Es ist bekannt, dass Penicillin G in Wasser nur begrenzt stabil ist [103]. In einer ungepufferten wässrigen Lösung bei einem pH-Wert von 1,8 - 2,5 bleibt Penicillin G sogar nur für wenige Sekunden stabil [39]. Penicillin G weist dabei die geringste Stabilität der Penicilline auf und wird hauptsächlich zu der nicht antibiotisch wirkenden Penicillolsäure abgebaut [104]. Bei dem Abbau wird durch Dissoziation der Carboxylgruppe der β -Lactamring geöffnet [105].

Um reproduzierbare und möglichst genaue Messungen auch über mehrere Stunden bzw. Tage durchführen zu können, muss gewährleistet sein, dass Penicillin G in der Probenlösung möglichst lange stabil bleibt und sich nicht zersetzt. Dafür wurden Langzeitmessungen über 24 Stunden in verschiedenen Lösungsmitteln wie destilliertem und vollentsalztem Wasser, PBS und Citratpuffer durchgeführt. Die Messungen wurden mittels UV-Vis-Spektrometer zu den Zeitpunkten $t = 0$ h, $t = 6$ h, und $t = 24$, über einen Wellenlängenbereich von 250-360 nm aufgenommen (Abbildung 22). Gelagert wurden die Proben zwischen den Messungen bei 4°C unter Lichtausschluss.

In allen UV-Vis-Spektren, die in Abbildung 22 zu sehen sind, ist das Maximum der Extinktion bei einer Wellenlänge von 322 nm charakteristisch. Je nach Penicillin G Konzentration und nach Lösungsmittel ist die Extinktion unterschiedlich hoch. Deutlich zu sehen ist, dass dieser Peak vor allem in vollentsalztem und destilliertem Wasser stark variiert und bei einer Penicillin G Konzentration von 7 g/L (0,021 mol/L) zum Zeitpunkt $t = 24$ h sogar eine Extinktion von 1,22 erreicht. Wird dieses Spektrum mit den Spektren, die in PBS bzw. Citratpuffer (Abbildung 22, unten) aufgenommen wurden, verglichen, so ist deutlich zu sehen, dass bei gleicher Konzentration und selben Zeitpunkt mit einer Extinktion von maximal 0,21 (PBS) bzw. 0,20 (Citratpuffer) eine wesentlich geringere Extinktion detektiert wird. Da bekannt ist, dass Penicillin G in wässriger Lösung nicht stabil ist, liegt es nahe, dass die Extinktion bei 322 nm mit dem Abbau des Penicillin Gs zusammen hängt. Herriott [106] zeigte bereits 1946, dass beim Erhitzen von einer Penicillin G-Lösung die Extinktion bei 322 nm stark ansteigt. Genutzt wurde dieses Phänomen damals, um Penicillin G in Lösung zu quantifizieren. Warum es bei der Erhitzung einer Penicillin G Lösung zu einem Anstieg der Extinktion bei einer Wellenlänge von 322 nm kommt, bzw. welches Produkt dadurch entsteht, ist in der Literatur nicht beschrieben. Weitere Literatur wie eine Publikation von Salois et al [107] beschreibt den Anstieg der Extinktion bei einer Wellenlänge von 350 nm, die durch die Ringöffnung des beta-Lactam-Ringes in wässriger Lösung entsteht. Das Produkt ist die nicht antibakteriell wirkende Penicillolsäure.

4 Ergebnisse und Diskussion

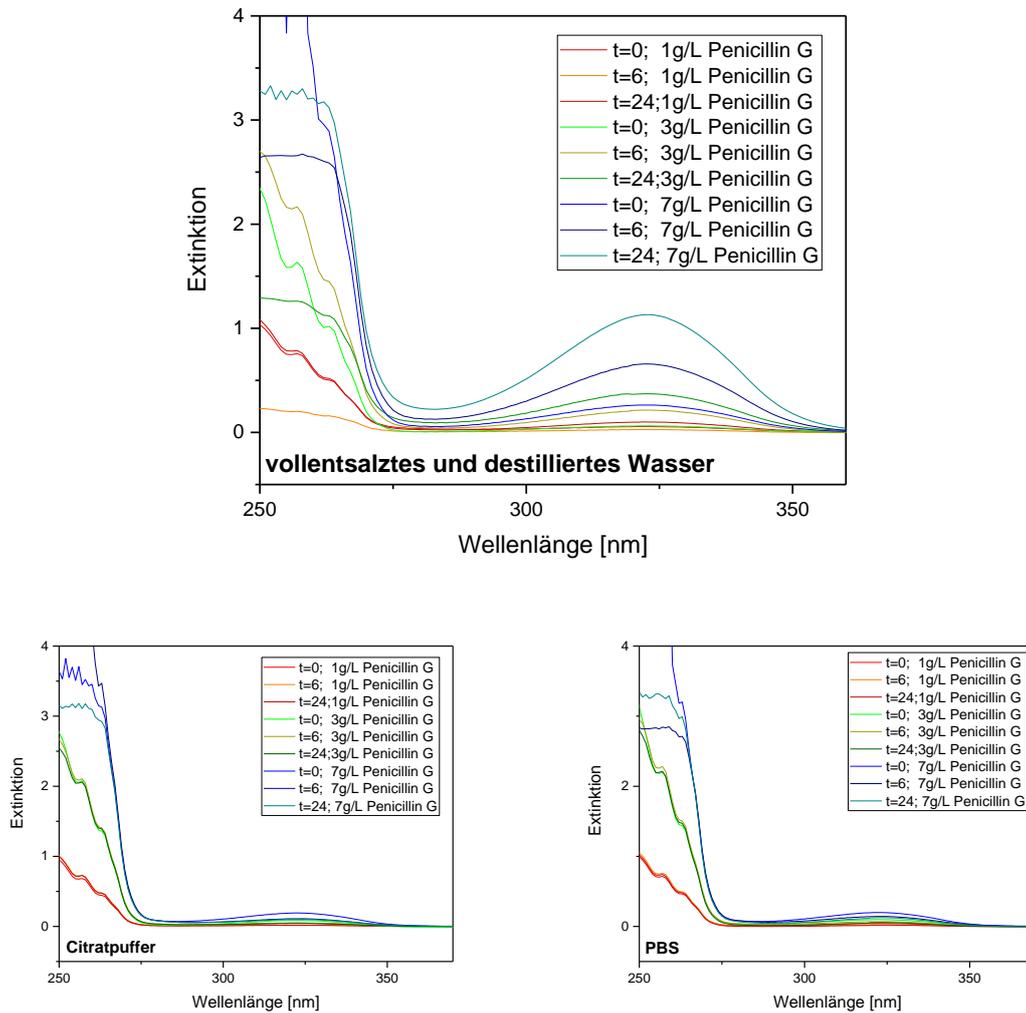


Abbildung 22: UV-Vis-Spektren von verschiedenen Penicillin G Konzentrationen (1 (rot), 3 (grün), 7 g/L (blau)) in verschiedenen Lösungsmittel zu den Zeitpunkten 0, 6 und 24 Stunden. Die verwendeten Lösungsmittel sind: Vollentsalztes und destilliertes Wasser (oben), Citratpuffer (unten, links) und PBS (unten, rechts).

Um das Maximum bei einer Extinktion von 322 nm interpretieren zu können, wurden die Edukte des Penicillin Gs, die 6-Aminopenicillansäure und die Phenyllessigsäure, sowie das Produkt der Lactamringöffnung, die Penicillolsäure, in den verschiedenen Lösungsmitteln im UV-Vis-Spektrometer untersucht.

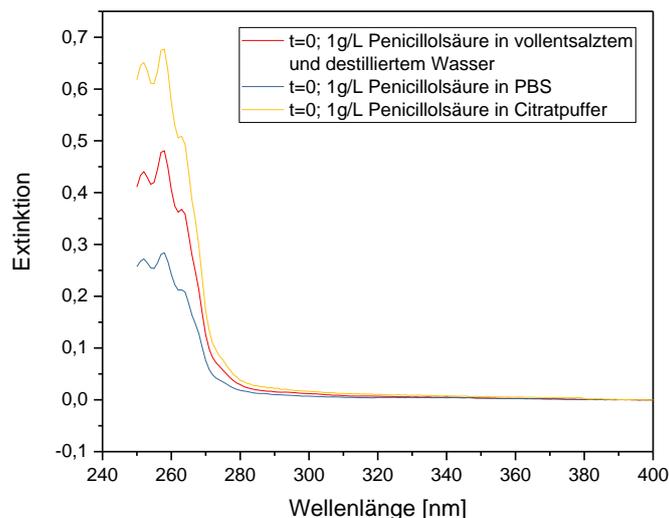


Abbildung 23: UV-Vis-Spektren der Penicillolsäure, aufgenommen in vollentsalztem und destilliertem Wasser (rot), PBS (blau) und Citratpuffer (gelb) zum Zeitpunkt $t=0$.

Die UV-Vis-Aufnahmen der Penicillolsäure (Abbildung 23) zeigen bei einer Wellenlänge von 323 nm keine signifikante Extinktion. Dies bedeutet, dass die vor allem in wässriger Lösung detektierte Extinktion bei 323 nm nicht von der Penicillolsäure stammen kann. Zu beachten ist auch, dass die Extinktion der Penicillolsäure bei einer Wellenlänge von 350 nm in der Literatur beschrieben wird. Sowohl in Abbildung 22, als auch in Abbildung 23 sind dort keine signifikanten Extinktionen zu beobachten.

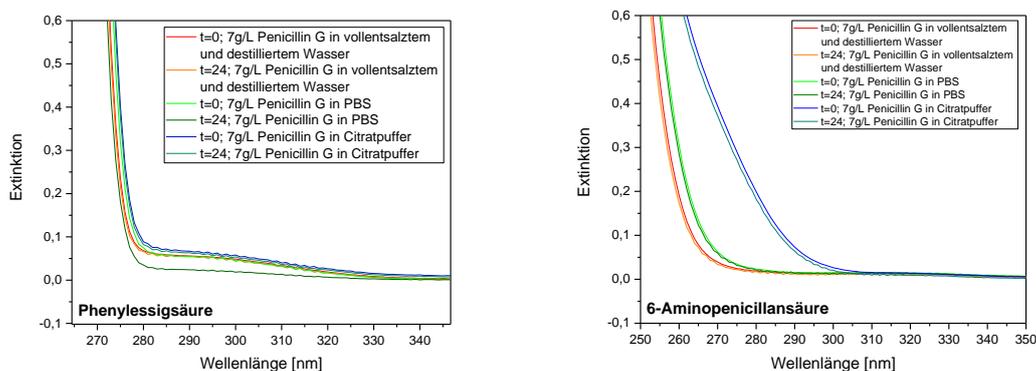


Abbildung 24: UV-Vis Aufnahmen von 7 g/L Phenyllessigsäure (links) und 7 g/L 6-Aminopenicillansäure in vollentsalztem und destilliertem Wasser, PBS und Citratpuffer zum Zeitpunkt $t = 0$ und $t = 24$.

Auch die UV-Vis-Spektren der Phenyllessigsäure (Abbildung 24, links) und der 6-Aminopenicillansäure (Abbildung 24, rechts) zeigen bei einer Konzentrationen von 7 g/L bei einer Wellenlänge von 323 nm keine signifikante Extinktion. Somit kann auch ausgeschlossen werden, dass das Penicillin G in wässriger Lösung in seine Edukte zerfällt.

4 Ergebnisse und Diskussion

Weiterhin sind in Abbildung 22, sowie in Abbildung 23 Maxima bei einer Wellenlänge von 257 bzw. 263 nm zu beobachten. Diese Maxima besitzen je nach Konzentration unterschiedlich hohe Extinktionen, sind aber bis auf die Aufnahmen in vollentsalztem und destilliertem Wasser nicht abhängig von der Zeit. Salois et al. [107] beschreibt, dass diese Maxima zu dem, sowohl in Penicillin G, als auch in der Penicillolsäure vorhanden Benzolring zugeordnet werden können. Damit gezeigt werden kann, dass diese Maxima auch bei den hier aufgenommen Spektren den Benzolring widerspiegeln, wurde getestet ob das verwendete UV-Vis-Spektrometer bei Benutzung der Lösungsmittel auch noch bei einer Wellenlänge von < 270 nm zuverlässig detektieren kann. Dazu wurden Spektren ohne Referenzküvette im Strahlengang aufgenommen. Die Küvette im Probenstrahlengang wurde mit dem jeweiligen Lösungsmittel befüllt.

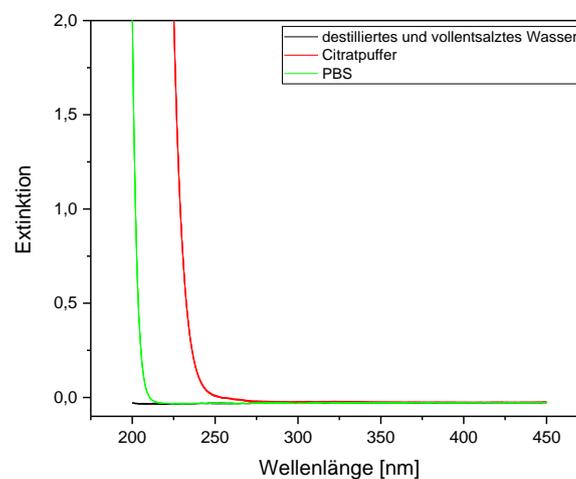


Abbildung 25: Bestimmung der Kanten der verschiedenen Lösungsmittel zur Detektion kleiner Wellenlängen. In rot ist die Aufnahme des Citratpuffers, in schwarz des destillierten und entsalzten Wassers und in grün des PBS zu sehen.

Aus Abbildung 25 geht hervor, dass alle drei Lösungsmittel unter einer Wellenlänge von 250 nm keine Substanzen mehr detektieren können. Der Citratpuffer zeigt dabei mit einer Wellenlänge von 243 nm eine Kante. Danach folgt der PBS mit einer Kantenwellenlänge von 203 nm. Die Kante von destilliertem und entsalztem Wasser liegt bei kleiner als 200 nm und ist in dem hier aufgenommenem Spektrum nicht zu sehen. Begründet werden kann diese Beobachtung durch die verschiedenen Salzgehalte in den Lösungsmitteln. Der Citratpuffer hat mit einem Gesamtsalzgehalt von 15 g/L (PBS enthält 10,76 g/L) am meisten Salz in der Lösung. Dadurch, dass das verwendete Wasser nicht nur destilliert, sondern auch vollentsalzt ist, sollten hier gar keine Salze vorliegen und somit sollte auch keine Kante im Spektrum zu sehen sein.

Für die hier, wie in der Literatur beobachteten Benzolringmaxima bedeutet dies, dass sie mit den hier verwendeten Lösungsmittel und dem verwendeten Spektrometer, durchaus

nachzuweisen sind. Penicillin G ist außerdem sowohl in PBS als auch in Citratpuffer über 24 h stabil.

Gezeigt wurde dies zusätzlich am Beispiel Citratpuffer. Es wurden Messungen mittels der 1-lambda-Reflektometrie durchgeführt. In Abbildung 26 sind Bindungssignale von Proben mit einer Penicillin G Konzentration von 0,015 mol/L (6 g/L) dargestellt. Es wurden 39 Proben hintereinander mithilfe eines Autosamplers vermessen. Da eine Messung eine Laufzeit von 20 min benötigt, beläuft sich die Gesamtmesszeit auf 13 h. Abbildung 26 zeigt, dass die Bindungssignale sehr reproduzierbar sind. Es liegt keine Abnahme des Bindungssignals vor. Somit kann daraus geschlossen werden, dass Penicillin G in Citratpuffer über 13 h stabil ist. Dies spielt eine besondere Rolle bei der Messung von Kalibrierkurven. Da sich mit jeder Herstellung einer ProbenstammLösung Fehler einschleichen können, wird empfohlen für eine Kalibrierkurve eine StammLösung zu verwenden, die dann auf weitere Konzentrationen verdünnt werden kann.

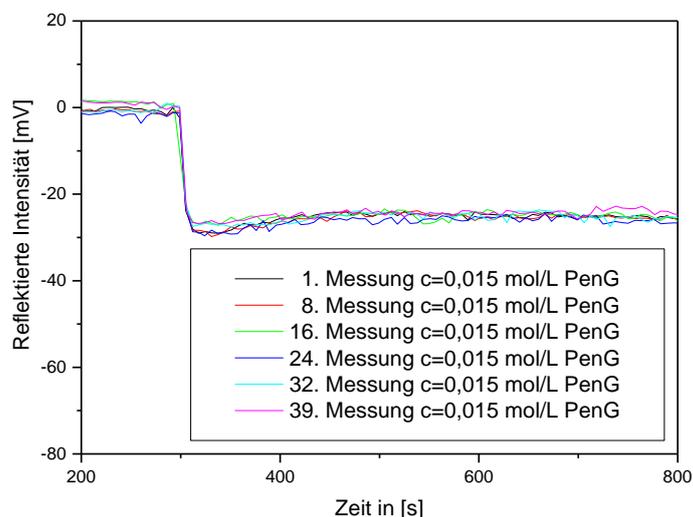


Abbildung 26: Langzeitstabilitätstest von Penicillin G gelöst in Citratpuffer mittels 1-lambda-Reflektometrie. Vermessen wurden 39 Proben mit einer Konzentration von 0,015 mol/L Penicillin G.

4.2 Biomimetischer Sensor

Der hier entwickelte biomimetische Sensor soll seinen Einsatz bei der Fermentation von Penicillin G finden. Die Randbedingungen hierfür sind, dass der Sensor stabil gegen pH- und Temperatureinflüsse, sterilisierbar und inert gegenüber Matrixeffekten ist. Ein weiterer sehr wichtiger Punkt ist auch, dass er die im Fermenter vorliegende Konzentrationen, die bis zu 60 g/L [34] erreichen können, detektieren kann. Für die Anwendung in einem Fermenter ist ein Biosensor nicht geeignet. Zum einen würden die biologischen Erkennungsstrukturen bei solch extremen Bedingungen schnell denaturieren und zum anderen ist es schwierig, den Biosensor auf die im Fermenter vorliegenden hohen Analytkonzentrationen zu optimieren.

Im folgendem Abschnitt wird die Entwicklung des biomimetischen Sensors dargestellt, d.h. es werden nicht nur die optimalen Polymerpartikel (Material, Immobilisierungsstrategie) ausgewählt, sondern auch gezeigt, dass der Sensor hinsichtlich seiner Querempfindlichkeit, seiner Bindungskapazität und seinem Verhalten in komplexen Matrices durchaus in einem Fermenter eingesetzt werden kann.

4.2.1 Überprüfung der Oberflächenchemie auf unspezifische Wechselwirkungen

Um zu zeigen, dass die im folgenden detektierten Bindungssignale auf Wechselwirkungen zwischen den Polymerpartikeln und Penicillin G und nicht zwischen der bloßen alkinfunktionalisierten Sensoroberflächen und Penicillin G beruhen, wurde die Wechselwirkungen zwischen Penicillin G und der alkinfunktionalisierten PEG Oberfläche (Schutzschicht) detektiert. Für dieses Experiment wurde eine alkinfunktionalisierte Sensoroberfläche, die zum einen mit MIPs und zum anderen ohne MIPs modifiziert war, untersucht. Auf den zwei unterschiedlich modifizierten Transducer wurde jeweils eine Probe gemessen, die eine Penicillin G Konzentration von 0,015 mol/L enthielt. Zur Detektion wurde die 1-lambda-Reflektometrie verwendet.

In Abbildung 27 ist deutlich zu sehen, dass die MIPs maßgeblich für das Bindungssignal verantwortlich sind (grün). Sind auf der Sensoroberfläche hingegen keine MIPs immobilisiert, wird auch kein Bindungssignal (schwarz) erhalten. Diese Gegebenheit ist wichtig, da dadurch auch ohne Bedenken Sensoroberflächen mit einer nicht flächigen und ungleichmäßigen Oberflächenbedeckung der Polymerpartikel durchaus für Messungen verwendet werden können. Dabei unterbindet die PEG-Schutzschicht sämtliche Wechselwirkungen mit der Sensoroberfläche.

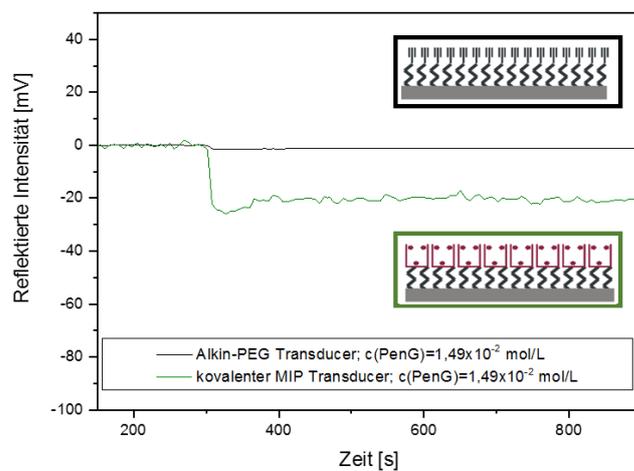


Abbildung 27: Bindungssignal zwischen Penicillin G ($c=0,015$ mol/L) und einer Sensoroberfläche mit MIPs als Erkennungsstruktur (grün) und Bindungssignal zwischen einer PEG-alkinfunktionalisierter Oberfläche und Penicillin G ($c=0,015$ mol/L) (schwarz).

4.2.2 Übertragung von einem funktionierendem MIP-System von RIfS auf die 1-lambda-Reflektometrie

Da der bewegliche x-y-Tisch des 1-lambda-Reflektometrie-Aufbaus im Vergleich zur spektralen RIfS für diese Arbeit den Vorteil des parallelen Auslesens der MIP- und der NIP-Spots erbringt, wurde dieses System bevorzugt eingesetzt.

Die 1-lambda-Reflektometrie fand ihren Einsatz zuvor nur bei biologischen Erkennungsstrukturen. Deswegen galt es zu überprüfen, ob sie sich auch für biomimetische Erkennungsstrukturen eignet. Dafür wurde zunächst ein schon charakterisiertes MIP-Analyt-System auf diesen Aufbau übertragen. Verwendet wurden L-BFA geprägte Azid-Polymerpartikel aus der Arbeit von Kolarov [52], die mittels einer kupferkatalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition auf Goethe-Transducer immobilisiert wurden. Bei der Beschichtung der Transducer mit den Polymerpartikeln musste vor allem darauf geachtet werden, dass der MIP- und der NIP-Spot räumlich getrennt auf der Sensoroberfläche aufgebracht wurden und nicht miteinander in Kontakt kamen bzw. bei der Immobilisierung ineinanderflossen. Aus dem ineinander Verlaufen der zwei Spots würden auf dem Transducer Bereiche resultieren, in denen sowohl MIPs als auch NIPs immobilisiert sind. Dies würde zu identischen Bindungskurven der zwei Spots führen. Um eine klarer Trennung der Spots zu gewährleisten, wurde die in Abschnitt 3.4.1 beschriebene Beschichtungsstrategie durchgeführt.

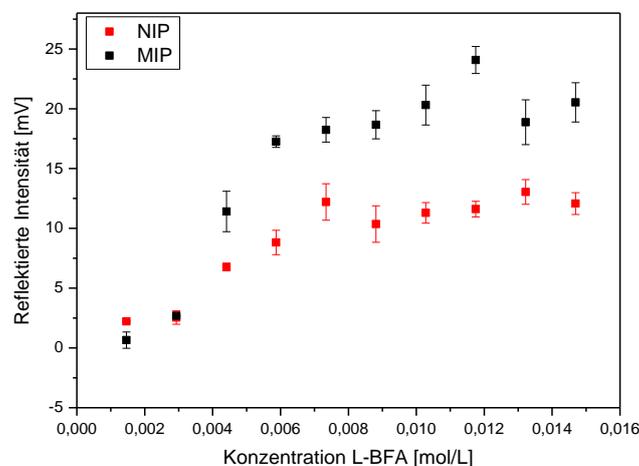


Abbildung 28: Messungen mit dem Testsystem L-BFA geprägte Azid-Polymerpartikel. In schwarz sind die Messungen für den MIP-Spot und in rot für den NIP-Spot zu sehen.

Gemessen wurden, bei einer Wellenlänge von 470 nm, zehn Konzentrationen (Dreifachmessungen) die im Bereich von $1,46 \cdot 10^{-3}$ mol/L bis $14,69 \cdot 10^{-3}$ mol/L lagen. Aus Abbildung 28 geht hervor, dass sich die hier verwendete 1-lambda-Reflektometrie durchaus als Detektionsmethode für die hier verwendeten Erkennungsstrukturen eignet. Man sieht, dass zwischen MIP und NIP-Spot ab einer Konzentration von $4,24 \cdot 10^{-3}$ mol/L deutlich unterschieden werden kann. Bei den darunterliegenden Konzentrationen ist dies nicht möglich. Grund für diese Beobachtung könnten die verwendeten L-BFA Konzentrationen sein, die zu

gering für eine spezifische Signalantwort sein könnten. Da aber bei höheren Konzentrationen eine klare Differenzierung zwischen MIP- und NIP-Spot vorliegt, kann davon abgeleitet werden, dass die räumlich getrennte Immobilisation der Polymerpartikel auf dem Transducer mit der entwickelten Beschichtungsstrategie (Abschnitt 3.4.1) erfolgreich war. Die deutlich höhere Änderung der optischen Schichtdicke für den MIP-Spot schließt auf eine spezifische Wechselwirkung zwischen dem Analyten und den MIP-Partikeln.

4.2.3 Elektrostatische Immobilisierung der Polymerpartikel

Eine elektrostatische Immobilisierung der Polymerpartikeln wurde im Falle der HYMOPTA- und der nichtfunktionalisierten NAEMA-Partikel durchgeführt. Da diese Polymerpartikel keine funktionelle Gruppe zur kovalenten Anbindung an die Oberfläche tragen, musste hier die nach der Polymerisation vorliegende Ladung zur Immobilisierung genutzt werden. Die Polymerpartikel sind aufgrund des verwendeten Monomeren positiv geladen. Folglich wird eine negativ geladene Sensoroberfläche benötigt. Diese kann zum einem mit Carboxyethylsilantriol (CES) und zum anderen mit Carboxy-PEG (DC-PEG) erzeugt werden. Beides Mal erhält man durch die Carboxy-Gruppe eine negative Ladung auf der Sensoroberfläche.

4.2.3.1 Elektrostatische Immobilisierung mittels Carboxyethylsilantriol (CES)

Bei der elektrostatischen Immobilisierung mit CES wurde kein PEG oder AMD als Schutzschicht verwendet. Die Partikel wurden direkt auf der mit CES silanisierten Glasoberfläche immobilisiert. Um eine optimale Immobilisierung der HYMOPTA-Polymerpartikel zu erreichen, wurden zur Aufbringen der Partikel Wasser bzw. Methanol als Lösungsmittel verwendet (Abschnitt 3.4.1). Bereits nach der Immobilisierung der Polymerpartikel wurde ein optischer Unterschied zwischen den unterschiedlich behandelten Transducern deutlich. Die in Methanol behandelten Transducer waren im trockenen Zustand trüb, was auf eine erfolgreiche Beschichtung hinweist. Die mit Wasser behandelten Transducer hingegen waren klar und durchsichtig. Um die Oberflächenmodifikation optisch zu überprüfen, wurden die Transducer mithilfe des AFMs untersucht.

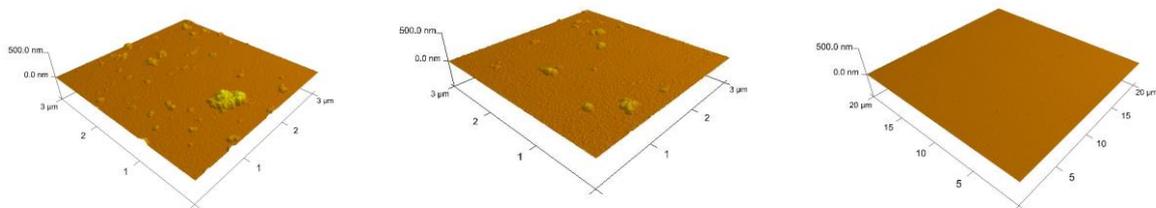


Abbildung 29: AFM-Aufnahmen der CES modifizierten Oberfläche mit elektrostatisch gebundenen MIPs in Methanol (links), mit elektrostatisch gebundenen NIPs in Methanol (Mitte) und mit elektrostatisch gebundenen MIPs in Wasser (rechts).

Wie in Abbildung 29 deutlich wird, wird der mit dem bloßen Auge schon vermutete Verdacht bestätigt. Die Transducer, die mit in Wasser gelösten Partikel behandelt wurden, zeigen keine Immobilisierung der Partikel (rechts). Die Oberflächen der Transducer, die mit in Methanol gelösten Partikel behandelt wurden, sind spärlich mit Polymerpartikeln bedeckt (links, Mitte). Auch wenn dies hier im ersten Moment nach keiner erfolgreichen Beschichtung aussieht, kann dieses Resultat auch zum Vorteil werden. Der Analyt kann auf einer Oberfläche, die spärlich mit Polymerpartikeln bedeckt ist, ungehindert zu den Partikeln diffundieren und mit ihnen in Wechselwirkung treten. Durch die Verwendung von PEG als Polymerschicht, sind unspezifische Wechselwirkungen zwischen der nicht mit Partikeln bedeckten Oberfläche und

dem Analyten nicht zu erwarten. Deutlich wird in Abbildung 29 auch, dass sowohl für die MIPs als auch für die NIPs, nicht einzelne sphärische Partikel auf der Oberfläche immobilisiert sind, sondern kleine und größere Agglomerate zusammengelagert sind.

Dass es sich auf den Transduceroberflächen um Agglomerate handelt, wird in Abbildung 30 deutlich. Dargestellt werden hier Querschnitte durch die Polymerpartikel, mit denen ein Höhenprofil der Agglomerate (Abbildung 30, links) bzw. des einzelnen Nanopartikels (Abbildung 30, rechts) erhalten wird. Aufgrund der Länge der einzelnen Partikel (ca. 100 nm), die in etwa mit den verschiedenen Hochpunkten des Agglomerats übereinstimmen, kann daraus geschlossen werden, dass die Polymerpartikel zusammengelagert vorliegen.

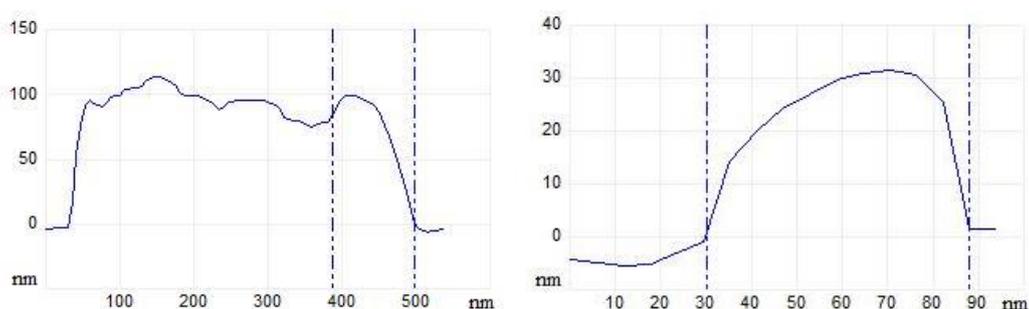


Abbildung 30: Querschnitt durch ein MIP Agglomerat (links) und durch einen einzelnen MIP. Beides elektrostatisch gebunden auf einer CES modifizierten Oberfläche. Erhalten wurden diese Querschnitte mithilfe des AFM.

Die Methanol behandelten Transducer, bei denen eine erfolgreiche Immobilisierung stattfand, wurden anschließend mittels 1-lambda-Reflektometrie vermessen. Durchgeführt wurden Dreifachmessungen in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,0015 mol/L und 0,015 mol/L. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt.

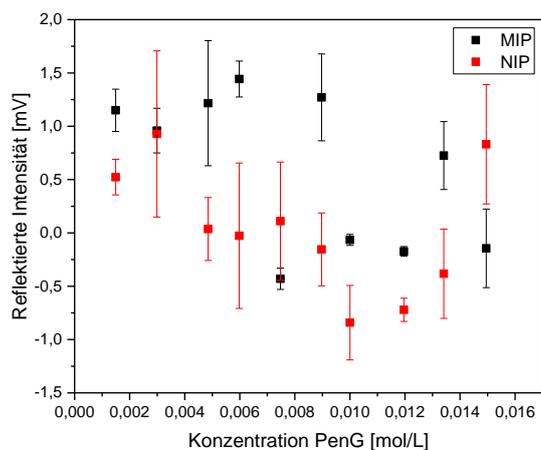


Abbildung 31: Dreifachmessungen auf einem CES-modifizierten Transducer. Die immobilisierten Partikel wurden vor der Anbindung in Methanol gelöst. In schwarz sind Messungen des MIP-Spots zu sehen und in rot Messungen des NIP-Spots.

Bei diesen Messungen wird schnell deutlich, dass keine Konzentrationsabhängigkeit für den MIP- als auch den NIP-Spot vorliegt. Es ist zwar leicht zu erahnen, dass der MIP-Spot höhere Signale als der NIP-Spot detektiert, allerdings sind die Standardabweichungen durch unspezifische Wechselwirkungen so hoch, dass keine Aussage darüber getroffen werden kann. Diese unspezifischen Wechselwirkungen kommen durch die fehlende Polymerschuttschicht zu Stande, was wiederum darauf hinweist, dass diese unumgänglich bei der Oberflächenmodifikation eines Sensors ist. Weiterhin ist zu sehen, dass eine sehr geringe Signaldynamik vorliegt, dies spricht dafür, dass nur wenige Polymerpartikel auf der Sensoroberfläche immobilisiert sind. Außerdem sieht es so aus, als ob die Bindungsstellen der Polymerpartikel durch das Agglomerieren nicht zugänglich für das Penicillin G sind und somit auch nur wenige Analytmoleküle detektiert werden können.

4.2.3.2 Elektrostatische Immobilisierung mittels Carboxy-PEG (DC-PEG)

Die elektrostatische Anbindung der HYMOPTA-Polymerpartikel auf einem DC-PEG beschichteten Transducer erfolgt, wie bei der Anbindung an eine CES-silanisierten Oberfläche, mittels negativ geladenen Carboxy-Gruppe. Der bedeutendste Unterschied der Immobilisierungsstrategie beruht allerdings auf der Verwendung einer PEG-Polymerschuttschicht. Auch diese modifizierten Transducer wurden mittels 1-lambda-Reflektometrie untersucht. Durchgeführt wurden Dreifachmessungen in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,0015 mol/L und 0,015 mol/L. Gemessen wurden die Proben willkürlich und nicht nach einer auf- oder absteigenden Konzentrationsreihe. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 32 zu sehen.

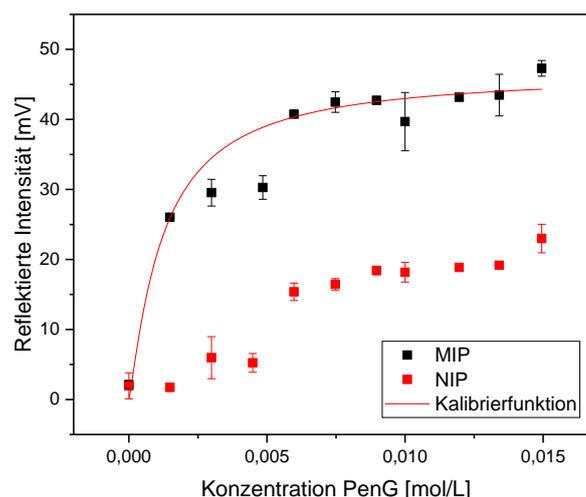


Abbildung 32: Dreifachmessungen auf einem DC-PEG modifiziertem Transducer mit Kalibrierfunktion der Messungen des MIP-Spots. Als Polymerpartikel wurden HYMOPTA-Partikel auf der modifizierten Oberfläche immobilisiert. In schwarz sind Messungen des MIP-Spots und in rot des NIP-Spots zu sehen.

In Abbildung 32 ist zu sehen, dass im Vergleich zu Abbildung 31 die Messsignale des MIP- und des NIP-Spots konzentrationsabhängig verlaufen. Auch die Standardabweichungen sind wesentlich geringer. Daraus lässt sich schließen, dass die Polymerschicht hier unspezifische Wechselwirkungen unterbindet. Zusätzlich liegt auch eine deutlich höhere reflektierte Intensität vor (0 - 48 mV anstatt 0 – 1,8 mV). Dies spricht dafür, dass zu einem mehr Partikel auf der Sensoroberfläche immobilisiert wurden und zum anderen die Bindungsstellen der Partikel wahrscheinlich leichter zugänglich für das Penicillin G sind. Da diese Transducer nach der Oberflächenmodifizierung nicht optisch mittels AFM oder REM überprüft wurden, kann hier über die Oberflächenbedeckung nur spekuliert werden. Die detektierten Signale des MIP-Spots wurden zusätzlich mit der Langmuir-Freundlich Absorptionsisotherme gefittet. Die Parameter der Kalibrierkurve sowie LOD und LOQ sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Parameter, sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Kalibrierkurve des MIP-Spots eines DC-HYMOPTA-Polymerpartikel modifizierten Transducers.

Parameter	Wert
a [%]	$46,703 \pm 2,656$
b [%]	$2516,051 \pm 493,091$
c [%]	$-0,1689 \pm 0,286$
LOD [mol/L]	3,78
LOQ [mol/L]	7,66

Die sehr hohe Nachweis bzw. Bestimmungsgrenze des Penicillin G zeigt, dass die hier als Erkennungsstruktur verwendeten HYMOPTA-Polymerpartikel für diese Anwendung nicht besonders gut geeignet sind. Ein weiter Grund für die Untersuchungen von Partikeln aus anderen Polymeren ist auch, dass diese Polymerpartikel nicht erfolgreich zu modifizieren sind. Eine Modifizierung der synthetisierten Polymerpartikel ist allerdings für die kovalente Anbindung der Partikel, die für die Anwendung eines Sensors, der für einen langen Zeitraum stabil und reproduzierbar misst, unumgänglich. Oft kommt es bei einer elektrostatischen Anbindung über die Zeit zu einem Verlust der Partikel. Dieser Verlust der Partikel auf der Sensoroberfläche hat mit der Zeit geringere Messsignale und somit keine reproduzierbaren Ergebnisse zur Folge.

NAEMA-Partikel

Auch bei den nichtfunktionalisierten NAEMA-Polymerpartikeln wurde zunächst eine elektrostatische Immobilisierung durch eine DC-PEG modifizierte Sensoroberfläche durchgeführt. Nach der Anbindung der Partikel wurden die Oberflächen im REM untersucht (Abbildung 33).

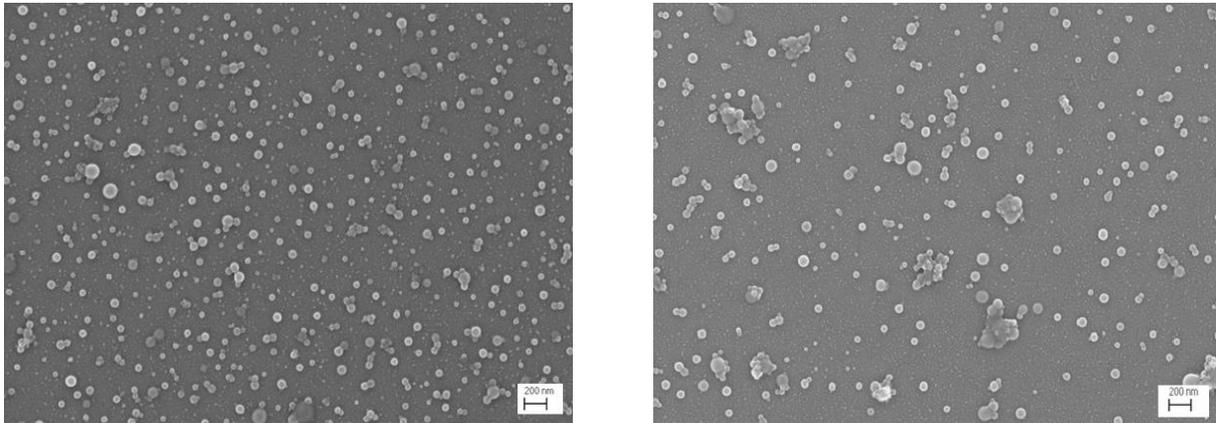


Abbildung 33: REM-Aufnahmen der DC-PEG beschichteten Oberflächen, auf denen zum einem nicht modifizierte NAEMA-MIP-Partikel (links) und zum anderen nicht modifizierte NAEMA-NIP-Partikel (rechts) immobilisiert sind.

Die Sensoroberflächen in Abbildung 33 sind gleichmäßig mit MIPs bzw. NIPs bedeckt. Agglomerate kommen vor allem auf dem mit NIPs beschichteten Transducer (rechts) vor. Der Bedeckungsgrad der MIP immobilisierten Oberfläche ist höher als jene der NIP. Vergleicht man diese Aufnahmen mit den AFM-Aufnahmen der NIPs und MIPs die auf CES-modifizierten Oberflächen immobilisiert wurden (Abbildung 29) ist eine deutliche Verbesserung der Anzahl und Größe der Agglomerate festzustellen.

Die Untersuchung der beschichteten Transducer mittels der 1-lambda-Reflektometrie ergab die in Abbildung 34 zu sehenden reflektierten Intensitäten und Kalibrierung. Durchgeführt wurden auch hier Dreifachmessungen in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,0015 mol/L und 0,015 mol/L. Gemessen wurden die Proben rein zufällig und nicht nach einer bestimmten Konzentrationsreihenfolge. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 34 zu sehen.

Die Messsignale der NIP-Spots (rot) sind im Verhältnis zu anderen gemessenen NIP-Signale sehr hoch. Dennoch sind sie gut von den MIP-Spot Messungen (schwarz) zu unterscheiden. Auffällig ist bei diesen Ergebnissen die große Standardabweichung der NIP-Spot Messungen. Da im Vergleich dazu die Standardabweichungen der MIP-Spot Messungen geringer sind, kann von einer hohen spezifischen Bindung zwischen MIP und Penicillin G ausgegangen werden. Weiterhin ist eine geringe Signaldynamik zu beobachten. Dies könnte daran liegen, dass die Bindungsstellen der Polymerpartikel für das Penicillin G nicht gut zugänglich sind. In diesem Fall würde man auf der Sensoroberfläche stark agglomerierte Partikel erwarten. Da in den REM-Aufnahmen allerdings hauptsächlich einzelne Partikel und wenige Agglomerate zu sehen sind, ist dies nicht zu vermuten. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die Prägung der MIPs während der Polymerisation nicht optimal verlaufen ist und somit die Bindungsstellen entweder

noch mit Templatmolekülen besetzt sind oder keine optimale Affinität zu Penicillin G aufweisen. Die Parameter der Kalibrierfunktion der MIP-Messsignale, die durch Fitten mit der Langmuir-Freundlich Adsorptionsisotherme erhalten wurden, sind in Tabelle 12 aufgelistet.

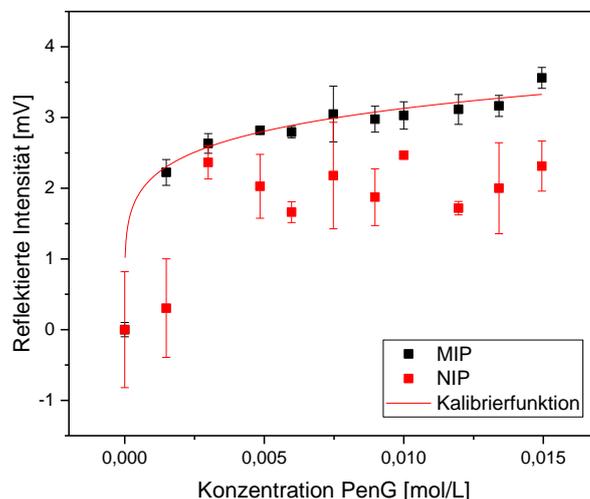


Abbildung 34: Dreifachmessungen auf einem DC-PEG modifiziertem Transducer und Kalibrierung der Messungen des MIP-Spots. Als Polymerpartikel wurden NAEMA-Partikel auf der modifizierten Oberfläche immobilisiert. In schwarz sind Messungen des MIP-Spots und in rot Messungen des NIP-Spots zu sehen.

Die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze des Penicillin Gs ist zwar im Vergleich zu den HYMOPTA-Partikeln niedriger, befinden sich aber noch nicht in einem für die Messungen sinnvollem Bereich, da die maximal vermessene Penicillin G Konzentration bei 0,015 mol/L lag. Folglich sind auch die nichtfunktionalisierten NEAMA-Partikel für die Anwendung in einem Sensorsystem nicht zu empfehlen.

Tabelle 12: Parameter, sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Kalibrierkurve des MIP-Spots eines DC-NAEMA-Polymerpartikel modifizierten Transducers.

Parameter	Wert
a [%]	13,493 ± 92,925
b [%]	0,763 ± 8,191
c [%]	0,799 ± 0,384
LOD [mol/L]	0,43
LOQ [mol/L]	1,03

4 Ergebnisse und Diskussion

Deswegen wurden die Partikel nach erneuter Polymerisation mit Azid-Gruppen weiter modifiziert um eine kovalente Immobilisierung möglich zu machen. Man versprach sich daraus, stabile und langlebige Sensoroberflächen, sowie reproduzierbarere Ergebnisse und das damit verbundene Herabsetzen der hohen Standardabweichungen. Da diese Standardabweichungen bei der Nullmessung auch einen Einfluss auf den LOD bzw. LOQ besitzen, erwartete man auch eine Verbesserung dieser. Die Ergebnisse der Azid-funktionalisierten NAEMA Polymerpartikel sind in Abschnitt 4.2.4 zu finden.

4.2.4 Kovalente Immobilisierung der Polymerpartikel

Für einen Sensor, der über Tage zur Überwachung eines laufenden Prozesses eingesetzt werden soll, ist es wichtig, dass die Stabilität über die Zeit gewährleistet ist. Würde dabei auf eine elektrostatische Immobilisierung der Polymerpartikel zurückgegriffen werden, wäre dies, durch die Abtragung der Partikel von der Sensoroberfläche über die Zeit nicht der Fall. Deswegen spielt die Möglichkeit der kovalenten Anbindung eine entscheidende Rolle, bei der Entwicklung eines Sensors.

Die kovalente Immobilisierung der Polymerpartikel auf der Sensoroberfläche verläuft über eine chemische Reaktion. Eine Voraussetzung dafür sind geeignete funktionelle Gruppen sowohl auf der Oberfläche der Polymerpartikel als auch auf der Sensoroberfläche. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine kovalente Anbindung über eine kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition, die als eine Reaktion der Click-Chemie bekannt ist, durchgeführt. Unter dem Begriff der Click-Chemie fallen Reaktionen, die stereospezifisch, mit einer hohen Ausbeute, unter einfachen Reaktionsbedingungen, ohne Nebenprodukte und mit einer hohen thermodynamischen Antriebskraft ablaufen. Diese Click-Chemie findet in diesem Fall zwischen einem Alkin und einem Azid statt. Dabei wurden die Polymerpartikel nach der Polymerisation mit Azid-Gruppen funktionalisiert und bei der Sensoroberfläche wurde als Polymerschicht ein alkinfunktionalisiertes PEG eingesetzt. Prinzipiell ist die Alkin-Funktionalisierung der Polymerpartikel und die Azid-Funktionalisierung der Sensoroberfläche auch möglich. Begründet aus der Arbeit von Kolarov [52], die zeigt, dass für L-BFA bei Azid-Funktionalisierung der Polymerpartikel und Alkin-Funktionalisierung der Sensoroberfläche höhere Messsignale erhalten werden, wurde entschieden, diese Kombination auch für die Penicillin G MIPs zu verwenden.

4.2.4.1 Untersuchungen der 1,3-dipolaren Cycloaddition

Bei der kovalenten Anbindung der Polymerpartikel durch eine 1,3-dipolare Cycloaddition wird die sogenannte Huisgen-Reaktionslösung verwendet. Diese auf dem Lösungsmittel DMSO basierenden Reaktionslösung enthält neben der wässrigen Polymerpartikellösung auch Kupfer(II)sulfat und Ascorbinsäure. Das Kupfer(II)sulfat fungiert als Katalysator und wird *in-situ* durch die Ascorbinsäure reduziert. Um die Auswirkung der verschiedenen Bestandteile der Huisgen-Reaktionslösung zu untersuchen, wurden verschiedene Reaktionslösungen angesetzt:

- (1) Huisgen-Reaktionslösung ohne Kupfer(II)sulfat, ohne Ascorbinsäure
- (2) Huisgen-Reaktionslösung ohne Kupfer(II)sulfat, mit Ascorbinsäure
- (3) Huisgen-Reaktionslösung behandelt ohne Ultraschallstab
- (4) Huisgen-Reaktionslösung

Die Ergebnisse der Beschichtungen mit diesen vier verschiedenen Reaktionslösungen, wurden mithilfe des REMs (Abbildung 35) untersucht. Immobilisiert wurden MIPs aus der zweiten Synthese Charge.

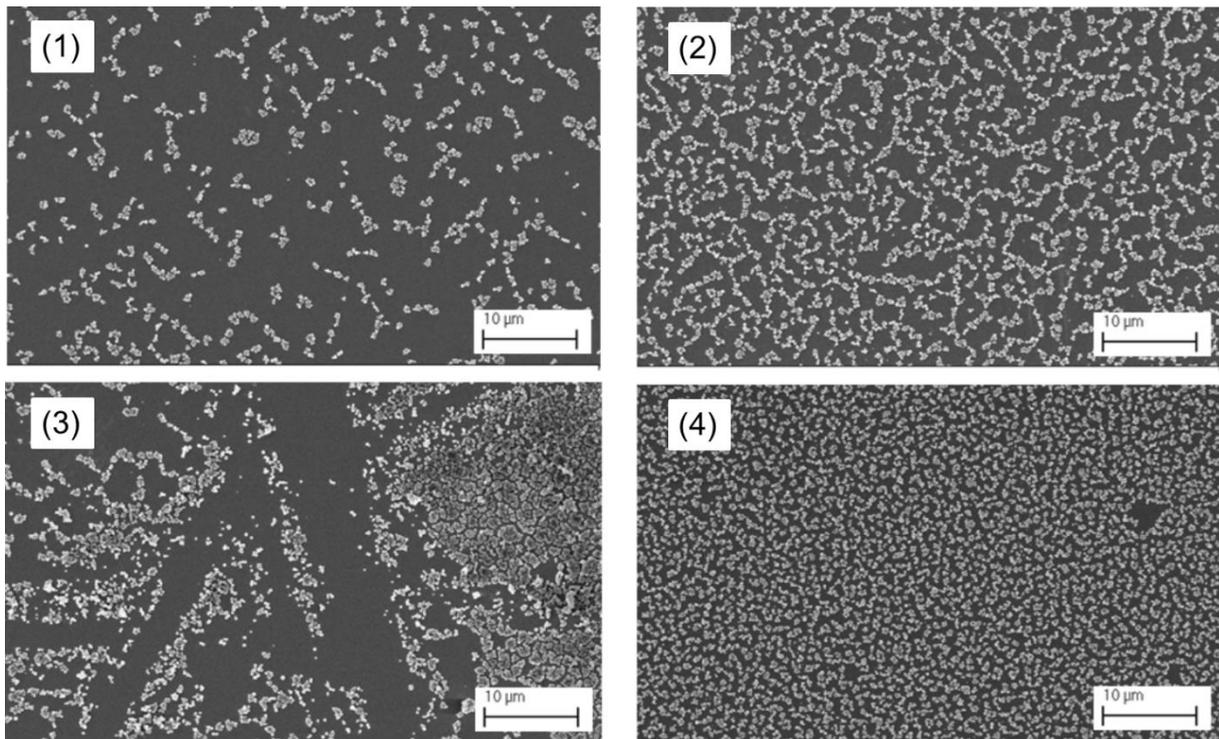


Abbildung 35: Immobilisierung von MIPS (Charge 2) mit verschiedenen Reaktionslösungen: (1) Huisgen-Reaktionslösung ohne Kupfer(II)sulfat, ohne Ascorbinsäure, (2) Huisgen-Reaktionslösung ohne Kupfer(II)sulfat, mit Ascorbinsäure, (3) Huisgen-Reaktionslösung behandelt ohne Ultraschallstab, (4) Huisgen-Reaktionslösung.

In den REM-Aufnahmen ist deutlich zu sehen, dass die unterschiedlichen Varianten der Huisgen-Reaktionslösungen auch unterschiedliche Immobilisierungsergebnisse ergeben. In Abbildung 35(4) ist die Immobilisierung mit dem Huisgen-Reaktionslösung zu sehen. Wie erwartet ist die Transduceroberfläche homogen mit MIPS bedeckt. In Abbildung 35(1) ist die Oberfläche sehr ungleichmäßig und im Vergleich zu Abbildung 35(2) und (4) auch nur sehr spärlich mit MIPS bedeckt, sodass man davon ausgehen kann, dass die Katalyse mit dem Kupfer(II)sulfat, sowie die Reduktion dieses Kupfer(II)sulfats mit der Ascorbinsäure, für eine erfolgreiche Immobilisierung unumgänglich ist. In Abbildung 35(2) ist die Oberflächenbedeckung durch Zugabe der Ascorbinsäure höher als in (1). Die MIPS lagern sich zu Agglomeraten zusammen, die aus einer Monolage der Partikel bestehen. Da die Ascorbinsäure lediglich zur Reduktion des Kupfer(II)sulfats fungiert, ist dieses Ergebnis nicht zu erklären. Abbildung 35(3) zeigt die Immobilisierung der Partikel mit Huisgen-Reaktionslösung. Hier wurde die Reaktionslösung allerdings nicht mit dem Ultraschallstab behandelt. Es wird deutlich, dass dieser Schritt der Immobilisierung aber auch ein entscheidender ist. Die MIPS liegen im Vergleich zu Abbildung 35(4) sehr ungleichmäßig und stark agglomeriert auf der Transduceroberfläche vor.

Um zu zeigen, dass die MIPS in Abbildung 35(1) und (2) durch Fehlen des Kupfer(II)sulfats bzw. der Ascorbinsäure, zum größten Teil nicht kovalent an der Sensoroberfläche immobilisiert wurden, wurden verschiedene Transducer untersucht (Abbildung 36). Auf den zu untersuchenden Transducern wurden zum einen MIPS mit der Huisgen-Reaktionslösung (4)

und zum anderen MIPs mit der Huisgen-Reaktionslösung ohne Kupfer(II)sulfat (1) immobilisiert und im spektralem RIfS gemessen. Bei diesen Messungen wurde 40 min lang Citratpuffer mit einer Geschwindigkeit von 1×10^{-6} L/s über die Sensoroberfläche gepumpt.

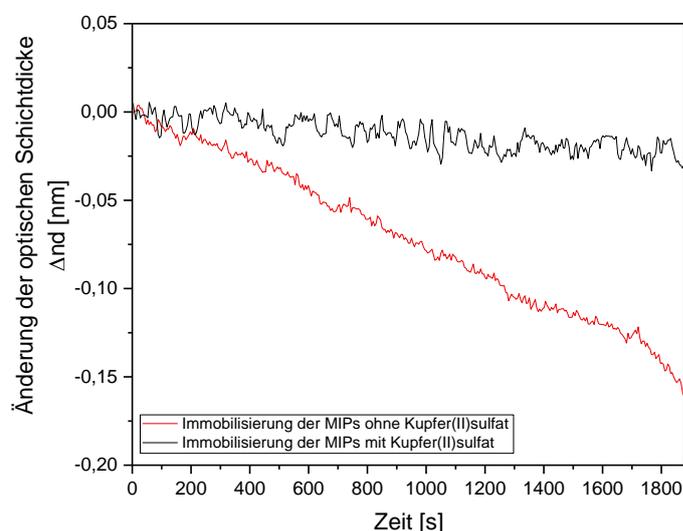


Abbildung 36: Baselinemessungen zweier verschiedener Transducer. In schwarz ist die Messung eines Transducers zu sehen, bei dem die Polymerpartikel mittels Huisgen-Reaktionslösung (4) stattfand und in rot die Baselinemessung eines Transducers bei dem die Polymerpartikel ohne Zusatz von Kupfer(II)sulfat (2) immobilisiert wurden.

In Abbildung 36 ist zum einen eine gerade Baseline (schwarz) und zum anderen ein kontinuierlich abfallendes Signal (rot) abgebildet. Die gerade Baseline stammt von einem Transducer auf dem mittels der üblichen Huisgen-Reaktionslösung (4) MIPs angebunden wurden. Die Baseline ist wie erwartet relativ stabil. Das abfallende Signal (rot) stammt von einem Transducer, auf dem ohne Kupfer(II)sulfat (2), MIPs immobilisiert wurden. Die MIPs die in den REM-Aufnahmen (siehe Abbildung 35(2)) auf der Oberfläche zu sehen sind, werden durch den Citratpuffer, der über den Transducer gepumpt wird, von der Oberfläche abgetragen. Dies spricht dafür, dass die MIPS nicht kovalent an der Oberfläche gebunden sind. Der kontinuierliche Abfall des Signals bedeutet das kontinuierliche Ablösen der MIPS von der Sensoroberfläche über die Zeit.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ohne den Katalysator Kupfer(II)sulfat und ohne die Ascorbinsäure, keine kovalente und homogene Beschichtung der Polymerpartikel möglich ist. Ein weiterer Punkt ist die Vorbehandlung der Huisgen-Reaktionslösung. Um hier ein optimales Ergebnis zu erhalten, muss die Reaktionslösung gewissenhaft mit dem Ultraschallbad und -stab nach dem vorliegenden Protokoll behandelt werden.

4.2.4.2 Azid-funktionalisierte NEAMA-Partikel: Charge 1

Die Affinität der Azid-funktionalisierten NAEMA-Polymerpartikel zu Penicillin G wurde zuerst mittels ITC untersucht. Dabei sollte herausgefunden werden, ob spezifische Wechselwirkungen zwischen den MIPs und dem Penicillin G vorliegen. Diese Eigenschaft ist ausschlaggebend für die Sensitivität und Selektivität des Sensors. Die Messungen wurden wie in Abschnitt 3.2.6 beschrieben durchgeführt.

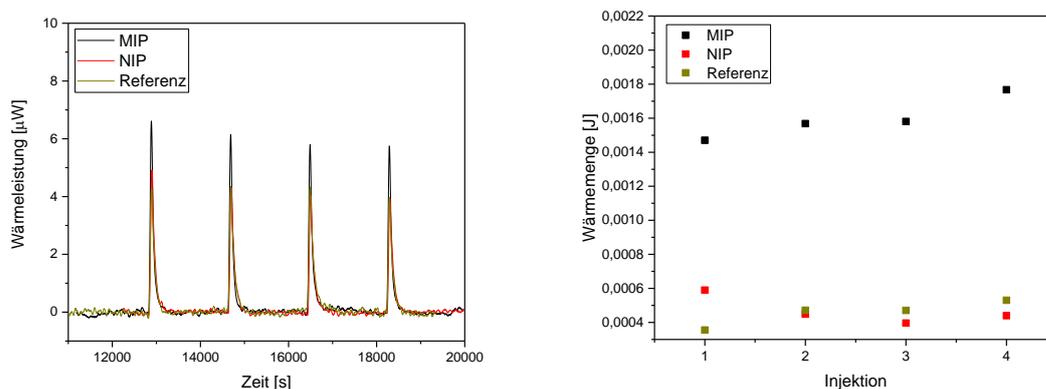


Abbildung 37: ITC Messungen der Azid-funktionalisierten NAEMA-Partikel (Charge 1). Links: Messung der freigesetzten Wärmeleistung. Rechts: Darstellung der Wärmemenge.

In Abbildung 37 ist die Wärmeleistung von vier Injektionen zu sehen (links). Alle Injektionen zeigen eine positive Wärmeleistung auf, d.h. hier liegen nur exotherme Reaktionen vor. Die größte Wärmeleistung mit ca. 6 μW zeigt die Titration von Penicillin G zu den MIPs. Die Wärmeleistung der Titrations von Penicillin G zu den NIPs bzw. von Citratpuffer zu den MIPs (Referenz) zeigt eine deutlich niedrigere Wärmeleistung. Werden die Peaks der Wärmeleistung integriert, erhält man die Wärmemenge, die bei den Reaktionen frei wird (Abbildung 37, rechts). Auch hier wird deutlich, dass die Titration von Penicillin G zu den MIPs mit einer Wärmemenge von ca. 0,0016 J die größte ist. Die Wärmemenge der Referenz und der NIPs sind ähnlich gering. Dies bedeutet, dass die MIPs spezifischere Wechselwirkungen mit Penicillin G eingehen als die NIPs. Durch das Messen der Referenz konnte ausgeschlossen werden, dass die freigesetzte Wärmeleistung bzw. die Wärmemenge aus einer Wechselwirkung mit dem verwendeten Citratpuffer stammt.

Da eine spezifische Wechselwirkung zwischen MIP und Penicillin G vorliegt, wurden die Partikel mittels 1,3-dipolaren Cycloaddition auf der Sensoroberfläche immobilisiert und anschließend der Bedeckungsgrad mithilfe vom REM untersucht.

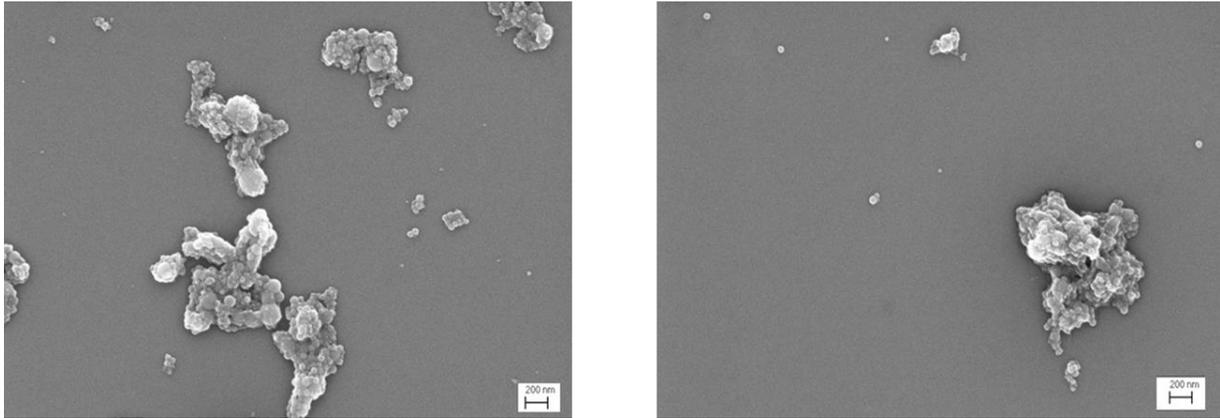


Abbildung 38: REM Aufnahmen der kovalent immobilisierten MIPs (links) und NIPs (rechts) aus der ersten Charge.

Abbildung 38 zeigt deutlich, dass die Polymerpartikel nach dem Immobilisieren auf der Sensoroberfläche nicht wie erhofft als einzelne sphärische Partikel homogen die Oberfläche bedecken, sondern als starke Agglomerate vorliegen. Diese Agglomerate basieren nicht nur auf einer Partikelmonolage, sondern sowohl für die MIPs als auch für die NIPs auf Polytagen. Durch die starke Agglomeration der Partikel wird die Diffusion der Penicillin G Moleküle an die Bindungsstellen stark erschwert und es werden schwache Sensorsignale mit einer geringen Signaldynamik erwartet. Einzelne sphärische Partikel sind auf der Oberfläche hingegen nur vereinzelt zu finden. Auffällig sind auch die großen nicht bedeckten Flächen auf dem Transducer. Dort sind keine Polymerpartikel immobilisiert. Einen Nachteil, dieser nicht bedeckten Flächen ist, wie in Abschnitt 4.2.1 bereits gezeigt, nicht zu erwarten. Da PEG als Polymerschicht verwendet wurde und somit unspezifische Wechselwirkungen zwischen der freien Sensoroberfläche und dem Penicillin G nicht auftreten können.

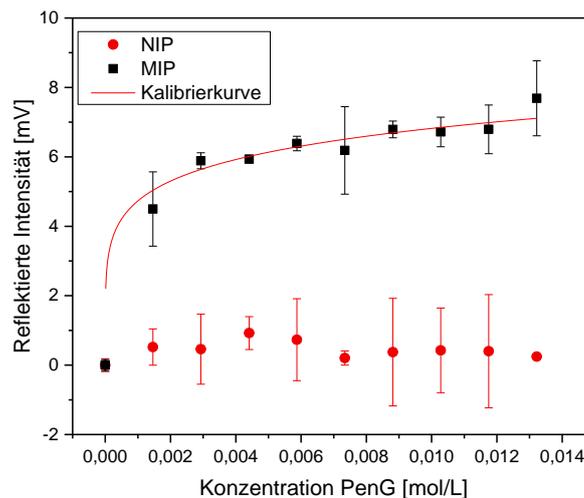


Abbildung 39: Dreifachmessungen eines Transducers auf dem kovalent gebundene NAEMA-Partikel immobilisiert wurden. In rot sind die Messsignale des NIP-Spots und in schwarz des MIP-Spots zu sehen. Die Signale des MIP-Spots wurden mittels Langmuir-Freundlich Adsorptionsisotherme zusätzlich gefittet um eine Kalibrierkurve zu erhalten.

4 Ergebnisse und Diskussion

Auch wenn die Immobilisierung der Partikel optimierbar ist, wurden Messungen mit der 1-lambda-Reflektometrie auf diesen Transducern durchgeführt. Es wurden neun Konzentrationen als Dreifachbestimmung im Bereich von 0,0015 bis 0,0132 mol/L durchgeführt. Die Konzentrationen wurden zufällig gemessen und nicht in einer auf- oder absteigenden Konzentrationsreihenfolge. Die reflektierte Intensität wurde wie in Abbildung 39 zu sehen, gegen die Konzentration des Penicillin Gs aufgetragen.

Trotz der ungleichmäßigen Bedeckung der Sensoroberfläche können in Abbildung 39 die Messungen auf dem MIP- (schwarz) und auf dem NIP-Spot (rot) deutlich unterschieden werden. Mit einer Reflektierten Intensität von bis zu 8 mV liegen die Signale des MIP-Spots weit über denen des NIP-Spots. Dies ist im Vergleich zu den elektrostatischen NAEMA-Partikeln (Abbildung 34), bei denen auch Messungen auf dem NIP-Spot eine deutliche Änderung der reflektierten Intensität zeigten, eine Verbesserung. Auch die Signaldynamik ist angestiegen. Die Standardabweichungen der NIP-Messungen, sind im Vergleich zu den Standardabweichungen der NIP-Messungen der elektrostatisch gebundenen Partikel, geringer. Erklärt kann dies dadurch werden, dass die Partikel der kovalenten Anbindung sich nicht wie die Partikel der elektrostatischen Anbindung mit der Zeit von der Sensoroberfläche ablösen. Somit können reproduzierbarere Ergebnisse erzeugt werden. Die Standardabweichungen der Messungen des NIP-Spots sind auch hier deutlich höher als die des MIP-Spots. Das spricht dafür, dass auch die MIPs durch die Modifikation mit den Azid-Gruppen nicht an ihrer Selektivität verloren haben. Die Parameter der Kalibrierfunktion der MIP-Messsignale, die durch Fitten mit der Langmuir-Freundlich Adsorptionsisotherme erhalten wurden, sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze, sind in Tabelle 13 zu sehen.

Tabelle 13: Parameter, sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Kalibrierkurve des MIP-Spots eines Transducers, der mit kovalent immobilisierten Polymerpartikel aus der Charge 1 modifiziert wurde.

Parameter	Wert
a [%]	$26,338 \pm 269,323$
b [%]	$0,889 \pm 14,911$
c [%]	$0,897 \pm 0,646$
LOD [mol/L]	0,47
LOQ [mol/L]	1,29

Der große Vorteil des 1-lambda-Reflektometrie-Aufbaus liegt in der Möglichkeit, zwei Spots parallel auslesen zu können. Dies wird genutzt, um unspezifische Wechselwirkungen, die zwischen dem Polymer und dem Penicillin G auftreten, herauszumitteln. Da diese unspezifischen Wechselwirkungen immer auftreten werden, ist dies notwendig, um falsch positive Ergebnisse zu eliminieren. Werden diese unspezifischen Wechselwirkungen, die auf

dem NIP-Spot gemessen werden, von den Messsignalen des MIP-Spots subtrahiert, so erhält man Messwerte, die für die spezifische Wechselwirkung zwischen den MIPs und dem Penicillin G stehen. Gezeigt wird dies in Abbildung 40.

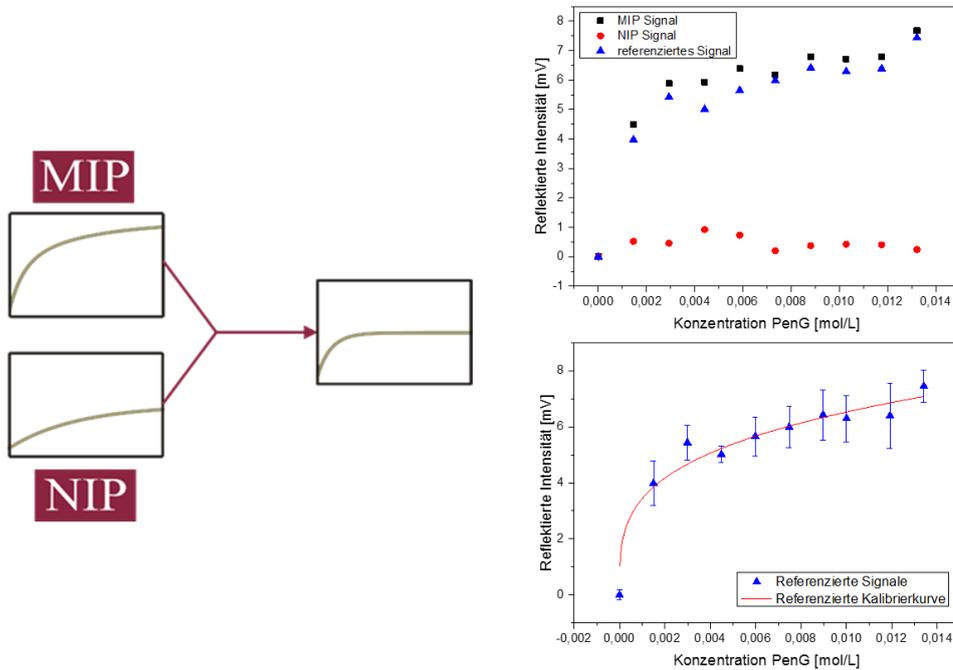


Abbildung 40: Links: Schematische Darstellung der Referenzierung der MIP-Bindungssignale. Links oben: Mittelwerte der Messsignale (Dreifachmessungen) MIP (schwarz), NIP (rot) und des referenzierten Signals (blau). Links unten: Kalibrierung des referenzierten Signals.

Man sieht in Abbildung 40, dass durch die Subtraktion der Messsignale des NIP-Spots nur eine geringe Intensitätsabnahme der MIP-Messungen vorliegt. Die auf den NIP-Spot referenzierten Messpunkte wurden mithilfe der Langmuir-Freundlich Adsorptionsisotherme gefittet. Die Parameter der Kalibrierkurve sind in Tabelle 14 zu finden.

Tabelle 14: Parameter der Kalibrierkurve der referenzierten Signale.

Parameter	Wert
a [%]	304,287 ± 2767,459
b [%]	0,081 ± 7,687
c [%]	0,717 ± 0,495

4.2.4.3 Azid-funktionalisierte NAEMA-Partikel: Charge 2

Da aus der ersten Charge der Azid-funktionalisierten NAEMA-Partikel nach der kovalenten Immobilisierung stets eine sehr ungleichmäßige Oberflächenbedeckung resultierte, die sich auch mit unterschiedlichen Optimierungsversuchen nicht verbesserte, wurde eine neue Charge der Partikel synthetisiert.

Auch die zweite Charge der Partikel wurde, bevor sie auf die Sensoroberfläche immobilisiert wurden, mittels ITC auf ihre Affinität zu Penicillin G untersucht. Durchgeführt wurden diese Messungen wie in Abschnitt 3.2.6 bereits beschrieben.

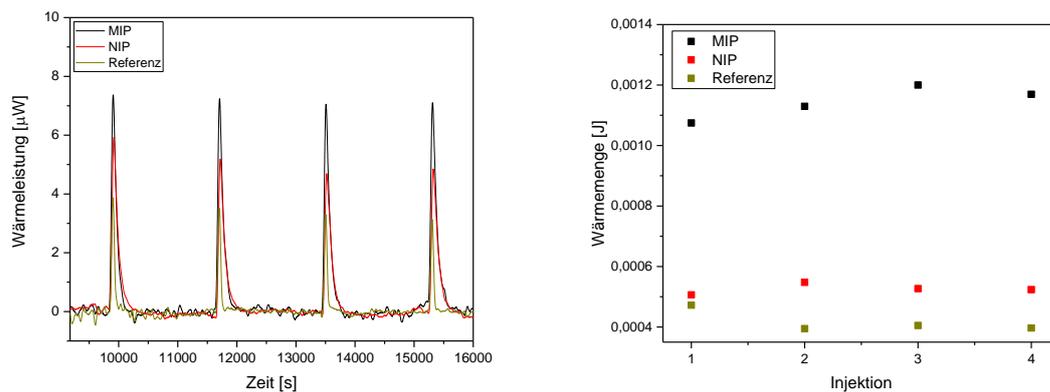


Abbildung 41: ITC Messungen der Azid-funktionalisierten NAEMA-Partikel (Charge 2). Links: Messung der freigesetzten Wärmeleistung. Rechts: Darstellung der Wärmemenge.

Auch die Wärmeleistung der hier gemessenen vier Injektionen (Abbildung 41, links) haben wie die Messungen der ersten Charge (Abbildung 37) eine positive Wärmeleistung. Folglich findet ebenfalls eine exotherme Reaktion statt. Die Wärmeleistung hat sich im Vergleich zur ersten Charge sogar etwas verbessert und ist von ca. $6 \mu\text{W}$ auf $7 \mu\text{W}$ gestiegen. Die Wärmeleistung der Titration von Penicillin G zu den NIPs bzw. von Citratpuffer zu den MIPs (Referenz) zeigt auch hier eine deutlich niedrigere Wärmeleistung. Die integrierten Peaks der Wärmeleistung zeigen allerdings, dass die Wärmeleistung in Charge 2 im Vergleich zur Charge 1 etwas geringer ist. Die Wärmemenge der Referenz und der NIPs sind ähnlich gering. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die MIPs spezifischere Wechselwirkungen mit Penicillin G als die NIPs aufweisen. Allgemein ist deutlich geworden, dass die erste und die zweite Charge sehr ähnliche Ergebnisse aufzeigen, sodass von einer, auf die Affinität bezogene, reproduzierbare Synthese gesprochen werden kann.

Die Partikel wurden mittels 1,3-dipolarer Cycloaddition auf der Sensoroberfläche immobilisiert und anschließend auf eine gleichmäßige Oberflächenbedeckung im REM untersucht.

Die in Abbildung 42 dargestellten REM-Aufnahmen zeigen sowohl für die Immobilisierung der MIPs (links) als auch für die NIPs (rechts) eine sehr homogene Bedeckung der Oberfläche. Die Partikel sind deutlich getrennt als sphärische Partikel auf der Oberfläche gebunden. Die

wenigen Agglomerate bestehen im Vergleich zu der ersten Charge (Abbildung 38) nicht aus Polylogen sondern aus Monolagen. Allgemein sind wesentlich weniger Partikel agglomeriert. Folglich hat sich die Immobilisierung durch die neue Synthese der Polymerpartikel deutlich verbessert.

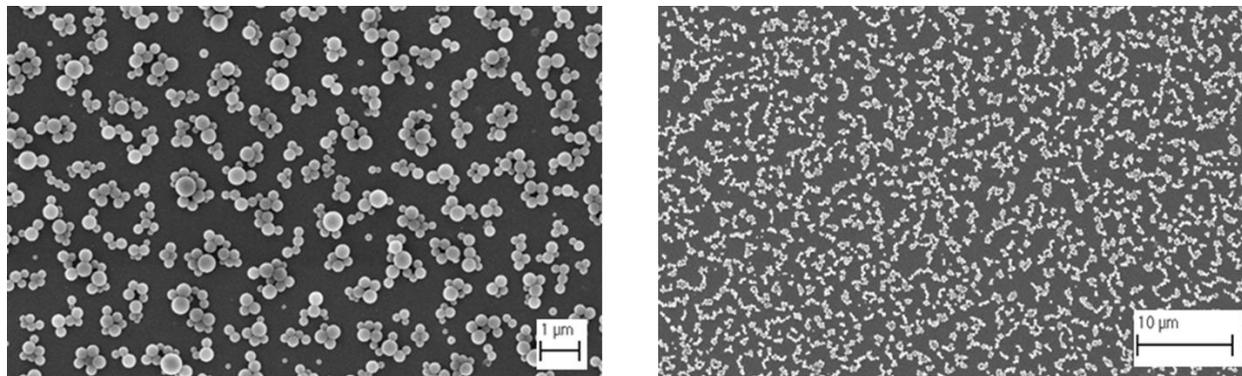


Abbildung 42: REM-Aufnahmen der kovalent immobilisierten MIPs (links) und NIPs (rechts) aus der zweiten Charge.

Nach der Immobilisierung der Polymerpartikel wurden die modifizierten Transducer mittels 1-lambda-Reflektometrie auf ihre Bindungsfähigkeiten untersucht. Schnell fiel dabei auf, dass für die LED mit einer Wellenlänge von 470 nm auch bei sehr hohen Penicillin G Konzentrationen keine Bindungssignale detektiert werden konnten. Nachdem sämtliche systematische Fehler am Messaufbau, sowie bei der Probenvorbereitung ausgeschlossen werden konnten, wurden die Transducer mit der zweiten zur Verfügung stehenden LED (520 nm) untersucht. Auch hier wurden keine Bindungssignale erhalten (Abbildung 43). Da der einzige Parameter, der im Vergleich zu den modifizierten Transducer der Charge eins verändert wurde, die Polymerpartikel waren, wurden diese genauer betrachtet. Dabei war auffällig, dass die Partikel aus Charge eins einen durchschnittlichen Durchmesser von ca. 160 nm sowohl für die MIPs als auch für die NIPs aufzeigten. Die Polymerpartikeldurchmesser der zweiten Charge, wiesen mehr als das doppelte auf. Für die MIPs lag der durchschnittliche Durchmesser bei 430 nm und für die NIPs bei 395 nm. Ermittelt wurden diese Daten durch die Dynamische Lichtstreuung (DLS), die an der Universität Stuttgart zur Charakterisierung der Partikel durchgeführt wurden. Dies bedeutete für das Mehrschichtsystem ein ganz neuer Schichtaufbau. Um bei der 1-lambda-Reflektometrie ein Bindungssignal zu erhalten, muss eine Wellenlänge verwendet werden, die zu dem verwendeten Mehrschichtsystem und dem Einfallswinkel passt. Deswegen liegt hier nahe, dass durch den größeren durchschnittlicher Durchmesser der Partikel, das Mehrschichtsystem so verändert wurde, dass dies nicht mehr der Fall war. Um Bindungssignale bei der 1-lambda-Reflektometrie zu erhalten, muss eine andere Wellenlänge des Lichts verwendet werden.

Prinzipiell kann unter Angabe der Dicke und des Brechungsindices der verschiedenen Schichten, durch Simulation mit dem entsprechenden Programm z.B. *Film Wizard* die optimale Wellenlänge ermittelt werden. Da es sich bei den Partikeln aber um keine homogene und durchgehende Schicht, sondern um einzelne sphärische Partikel handelt, die zusätzliche

4 Ergebnisse und Diskussion

Phänomene wie zum Beispiel Streuung hervorrufen, konnte in diesem Fall keine Simulation durchgeführt werden.

Um trotzdem die optimale Wellenlänge für das neue Schichtsystem zu bestimmen, musste dies experimentell durchgeführt werden. Die experimentelle Möglichkeit, die optimale Wellenlänge für ein Schichtsystem herauszufinden, ist die Messung der modifizierten Transducer im spektralen RfS. Hierbei wird das relative Signal einer Messung gegen die Wellenlänge aufgetragen (Abbildung 43, rechts). Die Wellenlänge, bei der die größte Änderung des Signals auftritt, entspricht der optimalen Wellenlänge des Schichtsystems. Im Falle der Partikel aus Charge zwei lag diese Wellenlänge bei 557 nm. Würde mit einer solchen LED eingestrahlt werden, könnte man das Bindungssignal wie zuvor gehabt auch mit der 1-lambda-Reflektometrie beobachten.

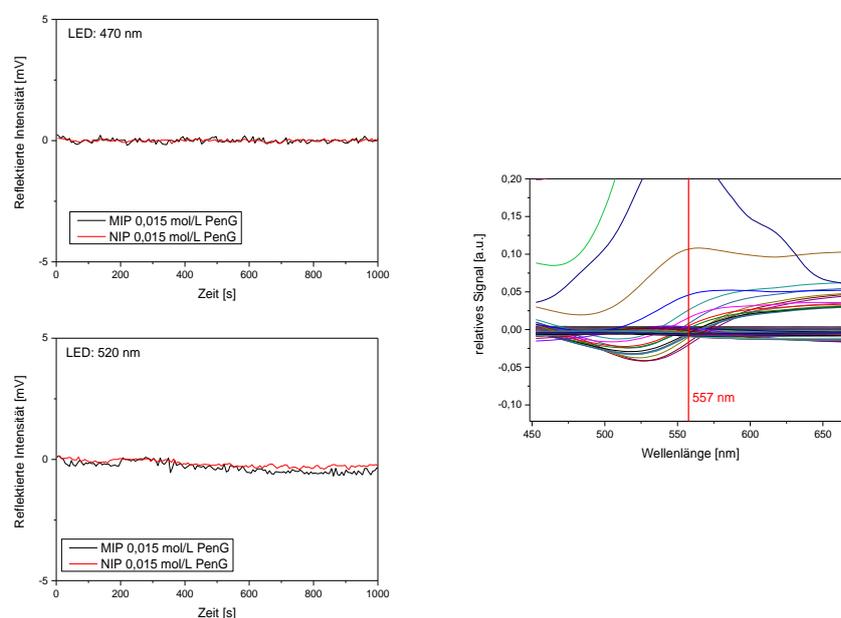


Abbildung 43: Messungen mit der 1-lambda-Reflektometrie. Links oben: $c(\text{PenG})=0,015$ mol/L, LED: 470 nm. Links unten: $c(\text{PenG})=0,015$ mol/L, LED: 520 nm. Rechts: Bestimmung der optimalen Wellenlänge des Schichtsystems mit der spektralen RfS.

Da es allerdings nicht möglich ist, für jede neue Charge von Polymerpartikeln in den ESE-Messkopf des 1-lambda-Reflektometrie-Aufbaus eine neue LED und der dazugehörigen Detektor einzubauen, wurden die folgenden Messungen mit dem spektralen RfS-Aufbau durchgeführt. Der Nachteil dabei ist, dass ein paralleles Auslesen des MIP- und des NIP-Spots nicht mehr möglich ist. Die Transducer müssen nacheinander untersucht werden. Somit finden die Messungen nicht bei gleichen Bedingungen statt (gleiche Probe gleicher Zeitpunkt), sodass ein direktes Referenzieren der Signale nicht möglich ist. Ein Vergleich der erhaltenen Messsignale des MIP- und NIP-Transducers kann allerdings erfolgen.

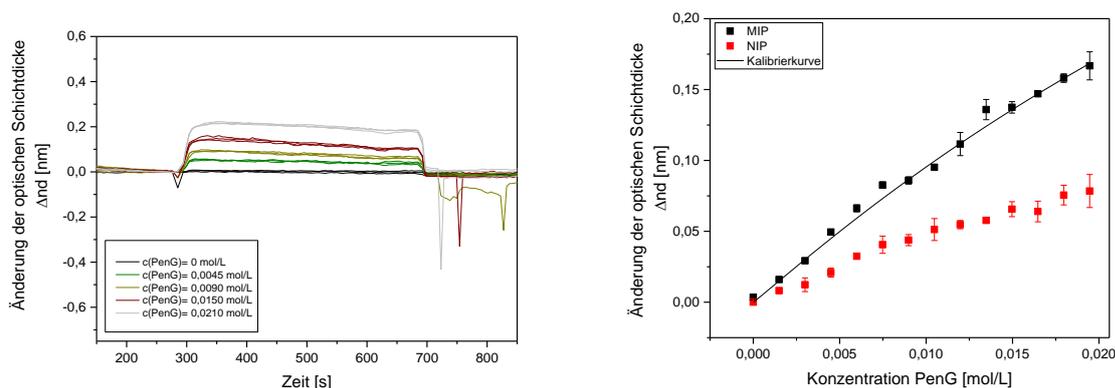


Abbildung 44: Links: Dreifachmessungen von Bindungskurven verschiedener Penicillin G Konzentrationen. Rechts: Kalibrierung mit verschiedenen Penicillin G Konzentration auf einem MIP-Transducer (schwarz) und einem NIP-Transducer (rot).

Zur Kalibrierung des Sensors (Abbildung 44) wurden dreizehn Penicillin G Konzentrationen im Bereich von 0,0015 und 0,020 mol/L zufällig, d.h. nicht nach auf- oder absteigender Konzentrationsreihenfolge gemessen. Die im REM zu beobachtenden homogen beschichteten Oberflächen spiegeln sich auch in den Ergebnissen der konzentrationsabhängigen Messungen mit der spektralen RIfS wieder. Wie in Abbildung 44 links zu sehen ist, sind die Messungen für die MIPs sehr reproduzierbar. Daraus folgen sehr geringe Standardabweichungen sowohl für die MIPs (schwarz), als auch für die NIPs (rot). Zusätzlich kann sehr gut zwischen den Messungen auf dem NIP- und auf dem MIP-Transducer differenziert werden. Die Änderung der optischen Schichtdicke für den MIP-Transducer ist ca. um die Hälfte höher als für den NIP-Transducer. Da die Kalibrierkurve fast einen linearen Verlauf besitzt, und im Vergleich zu der Kalibrierungen aus dem Abschnitt 4.2.3.2 keine Absättigung des Signals bei steigender Konzentration zeigt, kann daraus geschlossen werden, dass der Sensor seine Bindungskapazität noch nicht voll ausgeschüttet hat. Messungen mit wesentlich höheren Konzentrationen an Penicillin G stellen für den Sensor keine Probleme dar. Auch die analytischen Parameter, wie Nachweis- und Bestimmungsgrenze, die zusammen mit den Parametern der Kalibrierung in Tabelle 15 zusammengefasst sind, befinden sich hier in einem sinnvollen und zufriedenstellenden Bereich.

4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 15: Parameter, sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Kalibrierkurve des MIP-Transducers, der mit den Azid-funktionalisierten NAEMA-Partikel der Charge zwei modifiziert wurde.

Parameter	Wert
a [%]	$0,735 \pm 0,521$
b [%]	$17,537 \pm 22,415$
c [%]	$-0,035 \pm 0,097$
LOD [mol/L]	0,004
LOQ [mol/L]	0,006

Um die Kalibrierkurve zu validieren, wurden Wiederfindungsraten bestimmt. Dazu wurden Proben mit den Penicillin G Konzentrationen 0,005 mol/L, 0,010 mol/L und 0,018 mol/L versetzt, gemessen und mithilfe der erhaltenen Kalibrierkurve, wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, berechnet. Es wurden Dreifachmessungen der Konzentrationen auf einem Transducer durchgeführt. Dabei stammte jeder Transducer aus einem anderen Batch der Beschichtung und wurde an einem anderen Tag im RfS untersucht. Die Penicillin G Stammlösung wurde für jeden Tag neu angesetzt. Die Wiederfindungsraten sind in Abbildung 45 graphisch dargestellt.

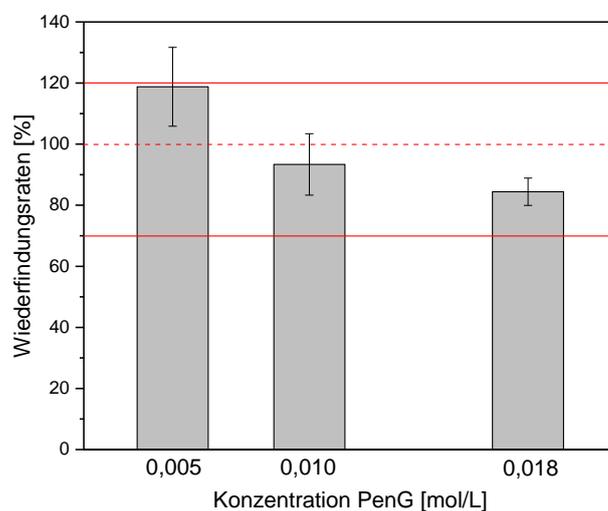


Abbildung 45: Wiederfindungsraten der Penicillin G Konzentrationen 0,005, 0,010 und 0,018 mol/L. Bestimmt wurden diese auf drei verschiedenen Transducern. Es wurden jeweils Dreifachmessungen durchgeführt.

In Tabelle 16 sind die ermittelten Wiederfindungsraten mit ihren Standardabweichungen zusammengefasst. Es wurden Wiederfindungsraten, in dem nach der AOAC International

empfohlenen Bereich 70 – 120 % erhalten. Auch die Standardabweichungen besitzen eine akzeptable Abweichung.

Tabelle 16: Wiederfindungsraten basierend auf der ermittelten Kalibrierkurve. Bestimmt wurden diese in Citratpuffer.

Konzentration [mol/L]	Wiederfin- dungsrate [%]	Standardab- weichung [%]
0,005	118,78	12,91
0,010	93,36	10,07
0,018	84,41	4,49

Durch die Verwendung von drei Transducern aus verschiedenen Beschichtungsbatchs, und jeweils frischen Stammlösungen, konnte nicht nur die Kalibrierkurve validiert werden, sondern es konnte auch gezeigt werden, dass der Beschichtungsprozess und die Herstellung, sowie das Ansetzen und die Verdünnung der Penicillin G Stammlösung reproduzierbar durchgeführt werden können.

4.2.5 Zusammenfassung und Vergleich der verwendeten Polymerpartikel

In diesem Abschnitt werden die in dieser Arbeit verwendeten Polymerpartikel zusammengefasst, miteinander verglichen und auf ihre Anwendung als sensitive Schicht eines Sensors überprüft.

Aus Tabelle 17 geht hervor, dass die HYMOPTA-Partikel als sensitive Schicht eines Sensors nicht geeignet sind. Dadurch, dass die Partikel nach der Polymerisierung nicht mit funktionellen Gruppen modifiziert werden können, ist nur eine elektrostatische Anbindung der Partikel möglich. Auch eine Bestimmung der Größe durch DLS war nicht erfolgreich. Als Methode wurde die 1-lambda-Reflektometrie durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Immobilisierungsstrategien angewendet. Im Falle der Immobilisierung mittels CES, war es zwar möglich Bindungssignale zu detektieren, allerdings waren diese nicht konzentrationsabhängig oder reproduzierbar, sodass die Aufnahme einer Kalibrierkurve nicht möglich war. Ein Grund dafür könnte das Fehlen der Polymerschuttschicht sein, das zu vielen unspezifischen Wechselwirkungen mit der Glasoberfläche führt. Bei der Immobilisierung über das carboxylierte PEG, konnte eine Kalibrierkurve erhalten werden. Allerdings sind LOD und LOQ mit 3,78 bzw. 7,66 mol/L, sehr hoch. Da für den Einsatz in einem Fermenter ein stabiler und robuster Sensor benötigt wird, der eine gute Reproduzierbarkeit der Messsignale garantiert, ist eine kovalente Immobilisierung der Polymerpartikel unumgänglich. Um die Partikel kovalent auf der Sensoroberfläche zu binden, müssen passende funktionelle Gruppen, die als

4 Ergebnisse und Diskussion

Ankergruppen fungieren, nach der Polymerisation eingeführt werden. Dies war bei den HYMOPTA-Partikeln nicht möglich, sodass sie nicht für den Einsatz als sensitive Schicht im Sensor geeignet sind.

Tabelle 17: Vergleich der verschiedenen Polymerpartikel hinsichtlich ihrer Funktionalisierung, Größe, Art der Immobilisierung, Oberflächenbedeckung, entstehender Wärmemenge bei der Reaktion mit Penicillin G, Möglichkeit der Detektion und des LOD/LOQ der aufgenommenen Kalibrierkurve.

Mono- mere der Partikel	Funktio- nalisier- ung	Größe (Ø) [nm]	Immobilisierungs- strategie	REM: Oberfl- ächenbe- deckung	ITC: Wärme- menge (Ø) [mJ]	Detektion	Kalibrier- kurve: LOD/ LOQ [mol/L]
HY- MOPTA	-	nicht möglich zu bestimmen	elektro- statisch: CES	spärlich heterogen	-	1-lambda- Reflektometrie	keine Kalibrier- kurve möglich
HY- MOPTA	-	nicht möglich zu bestimmen	elektro- statisch: COOH	-	-	1-lambda- Reflektometrie	LOD:3,78 LOD:7,66
NAEMA	-	157	elektro- statisch: COOH	homogen	-	1-lambda- Reflektometrie	LOD: 0,43 LOQ:1,03
NAEMA Charge 1	Azid	220	kovalent: Click- Chemie	heterogen starke Ag- glomerate	MIP: 1,7 NIP: 0,5	1-lambda- Reflektometrie	LOD: 0,47 LOQ:1,29
NAEMA Charge 2	Azid	400	kovalent: Click- Chemie	homogen	MIP: 1,2 NIP: 0,5	RfS	LOD:0,004 LOQ:0,006

Die nichtfunktionalisierten NAEMA-Partikel wurden ebenfalls elektrostatisch über Carboxy-Gruppen des PEGs an der Sensoroberfläche immobilisiert. Sie sind mit 157 nm die kleinsten hier verwendeten Partikel. Die Immobilisierung auf der Sensoroberfläche zeigte eine homogene Bedeckung und eine Auslesung mit der 1-lambda-Reflektometrie war problemlos möglich. Die geringe Differenz der MIP- und NIP-Messsignale, sowie ihre großen Standardabweichungen sind dabei allerdings nicht optimal. Beides konnte durch eine kovalente Anbindung der Polymerpartikel optimiert werden. Hierfür wurden die Partikel Azid-funktionalisiert und mittels 1,3-dipolaren Cycloaddition an die Alkin-PEG modifizierte Oberfläche gebunden. Wie erwartet sind die funktionalisierten Partikel (Charge 1) nach der Modifizierung mit Azid-Gruppen etwas größer als die nicht-funktionalisierten Partikel. Durch REM-Aufnahmen der Oberflächen wurde allerdings deutlich, dass die Immobilisierung der Partikel nicht homogen

gelang. Auf der Oberfläche waren starke Agglomerate zu finden, die auf Polylagen der Partikel basierten.

Wie der Tabelle 17 zu entnehmen ist, konnten zunächst keine Verbesserung des LOD bzw. LOQ im Vergleich zur elektrostatischen Anbindung erreicht werden. In beiden Fällen liegen diese so hoch, dass sie sich nicht im Bereich der gemessenen Konzentrationen befinden. Dies spricht zunächst auch nicht unbedingt für eine Eignung der Polymerpartikel als Erkennungselement. Die Charge 2 der Azid-funktionalisierten Polymerpartikel zeigt allerdings nicht nur eine homogene Oberflächenbedeckung im REM, sondern auch sinnvolle und zufriedenstellende Werte für LOD (0,004 mol/L) und LOQ (0,006 mol/L). Der einzige Nachteil der bei diesen Partikeln anzusprechen ist, ist dass es nicht möglich war diese mittels des hier zur Verwendung bevorzugten 1-lambda-Reflektometrie-Aufbaus zu detektieren. Somit wurde der spektrale RfS-Aufbau verwendet. Bei diesem Aufbau ist es nicht möglich, dass MIP- und NIP-Spot parallel, ausgelesen werden. Wenn man wie in Abschnitt 4.2.4.3 ermittelt, eine LED mit einer Wellenlänge von 557 nm einsetzen würde, würde man aber auch mit der 1-lambda-Reflektometrie erfolgreich Bindungssignale detektieren können. Da jede Charge der Partikel aber unterschiedliche Größen aufweisen kann, ist es nicht wirtschaftlich für jede Charge eine neue LED bzw. Photodiode in den Messkopf einzubauen.

Eine alternative Lösung um trotz allem spektral eine parallele Auslesung von MIP- und NIP-Spot zu erhalten, wäre ein spektrales 2-Spot RfS (Abbildung 46). Dieser Aufbau besitzt wie das spektrale RfS eine Halogenlampe als Lichtquelle, die mittels Y-Lichtleiter zu einem optischen Schalter führt. Von dem optischen Schalter weiter wird das Licht über zwei Lichtleiter an die Positionen des MIP-bzw. NIP-Spots geleitet. Das reflektierte Licht geht über den optischen Schalter mit einem weiteren Lichtleiter dann zum Diodenarrayspektrometer. Der optische Schalter wechselt alle 3 ms vom MIP- auf den NIP-Spot, sodass abwechselnd das reflektierte Licht der beiden Kanäle detektiert werden kann und somit ein spektrales und paralleles Auslesen der zwei Spots möglich ist. Aus zeitlichen Gründen war es leider nicht möglich, im Rahmen dieser Arbeit das spektrale 2-Spot-RfS vollständig in Betrieb zu nehmen.

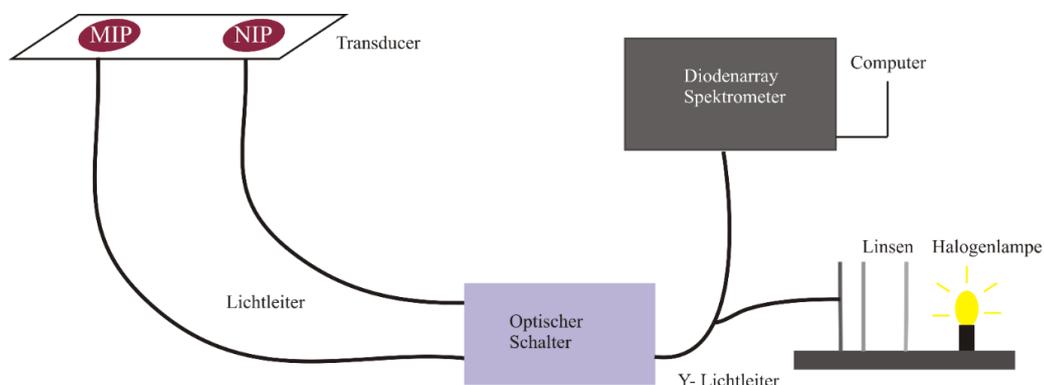


Abbildung 46: Schematischer Aufbau eines spektralen 2-Spot RfS.

4.2.6 Anwendung

Nachdem der Sensor in Citratpuffer kalibriert und validiert wurde, folgen nun die Schritte, die zur Anwendung des Sensors in einem Fermenter unumgänglich sind. Wichtige Schritte dabei sind: die Anwendung des Sensors in dem erforderlichen Konzentrationsbereich, das Detektieren einer stetig ansteigenden Penicillin G Konzentration, Querempfindlichkeiten mit im Prozess vorhandenen strukturell ähnlichen Molekülen und natürlich auch die Anwendung des Sensor in komplexen Matrices. Diese Schritte zur Anwendung des Sensors werden in diesem Kapitel beschrieben.

4.2.6.1 Stufenmessungen

Da bei der Fermentation der Titer von Penicillin G stetig mit der Zeit ansteigt, ist es möglich den Sensor ohne Regenerationsschritte einzusetzen. Dabei wird die steigende Penicillin G Konzentration durch eine aufsummierte Änderung der optischen Schichtdicke dargestellt. Um zu zeigen, dass der in dieser Arbeit entwickelter Sensor dieser Herausforderung gewachsen ist, wurden Stufenmessungen durchgeführt. Bei diesen Stufenmessungen wurde zwischen den sieben Probeninjektionen nicht regeneriert, um das permanente Steigen des Titers im Fermenter zu simulieren.

Bei modernen Fermentationsverfahren können Titer von bis zu 0,144 mol/L (entspricht 60 g/L) [34] Penicillin G erreicht werden. Solch hohe Konzentrationen zuverlässig nachzuweisen stellt eine Herausforderung dar. Um dies zu erreichen, muss gewährleistet werden, dass ausreichend freie Bindungsstellen der MIPs vorliegen, da es sonst zu einer Sättigung des Bindungssignals kommt und somit die Änderung der optischen Schichtdicke nicht mehr steigen kann. Da bei der Fermentation zum Teil sehr hohe Konzentrationen erreicht werden, wurde hinsichtlich des Chemikalienverbrauchs bisher nur ein Konzentrationsbereich von maximal 0,021 mol/L Penicillin G durchgeführt. Die Stufenmessungen in diesem Konzentrationsbereich (0,012 mol/L bis 0,021 mol/L) sind in Abbildung 47 zu finden.

Zu sehen sind in Abbildung 47 deutliche konzentrationsabhängige Stufen. Zusätzlich kann zwischen den Stufenmessungen des MIP- (schwarze Messung) und des NIP-Transducers (rote Messung) unterschieden werden. Auffällig ist bei beiden Messungen, dass das Bindungssignal (Stufe) zunächst abfällt. Dies bedeutet, dass sich das Bindungssignal noch nicht im Gleichgewicht befindet. Nach ca. 300 s befindet sich das Signal dann in einer Sättigung, d.h. das Gleichgewicht hat sich eingestellt. Bei niedrigen Konzentrationen ist dieses Phänomen nur schwach zu beobachten, bei höheren Konzentrationen stärker.

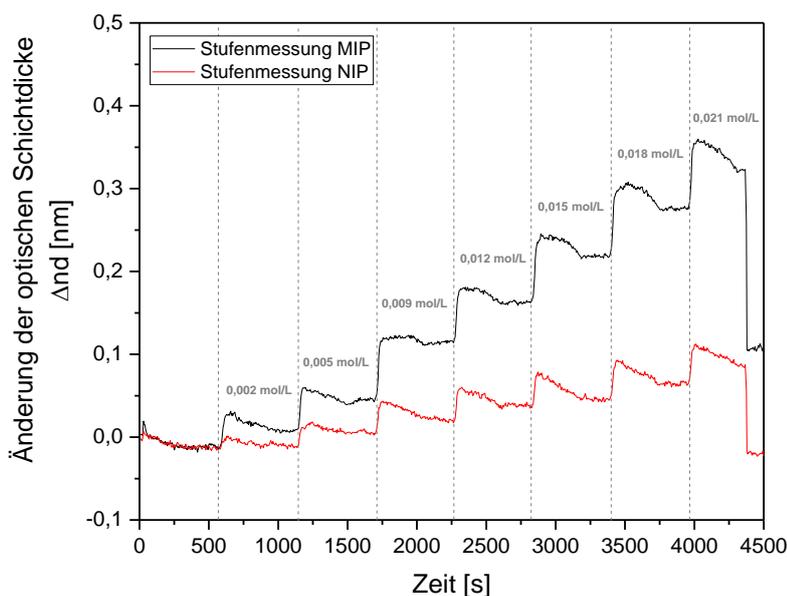


Abbildung 47: Stufenmessung in einem Konzentrationsbereich von 0,002 – 0,021 mol/L Penicillin G. Diese Stufenmessungen wurden sowohl auf einem MIP-Transducer (schwarz) als auch auf einem NIP-Transducer (rot) durchgeführt.

Um den Sensor auf seine Tauglichkeit bei einer Fermentation zu prüfen, wurden Penicillin G Konzentrationen verwendet, die bei der Fermentation im relevanten Bereich (0,012 – 0,144 mol/L) liegen (Abbildung 48). Die Messungen des MIP- (schwarz) bzw. des NIP-Transducers (rot) unterscheiden im Bindungssignalmuster nicht. Auch in diesem Konzentrationsbereich können die NIP- und MIP-Transducer deutlich voneinander unterschieden werden. Die Änderung der optische Schichtdicke, die von 0 – 0,35 nm (Abbildung 47) auf 0 – 1,3 nm deutlich gestiegen ist, lässt sich aufgrund der höheren Penicillin G Konzentrationen erklären.

Auch bei einer Injektion von 0,144 mol/L Penicillin G deutet noch nichts auf eine Absättigung des Signals hin. Somit ist gezeigt, dass der Sensor auch für diese sehr hohen Konzentrationen ausreichend Bindungsstellen besitzt. Dass die sensitive Schicht dieses Sensors eine hohe Bindungskapazität aufweist, wird auch schon bei der Kalibrierung in Abschnitt 4.2.4.3 deutlich. Zu sehen ist dort ein fast linearer Verlauf der gemessenen Kalibrierkurve der Partikel aus der Charge zwei. Eine Sättigung der Bindungsstellen, d.h. auch eine Sättigung der Kalibrierkurve, ist dort noch nicht erreicht, wie hier zusätzlich gezeigt wurde.

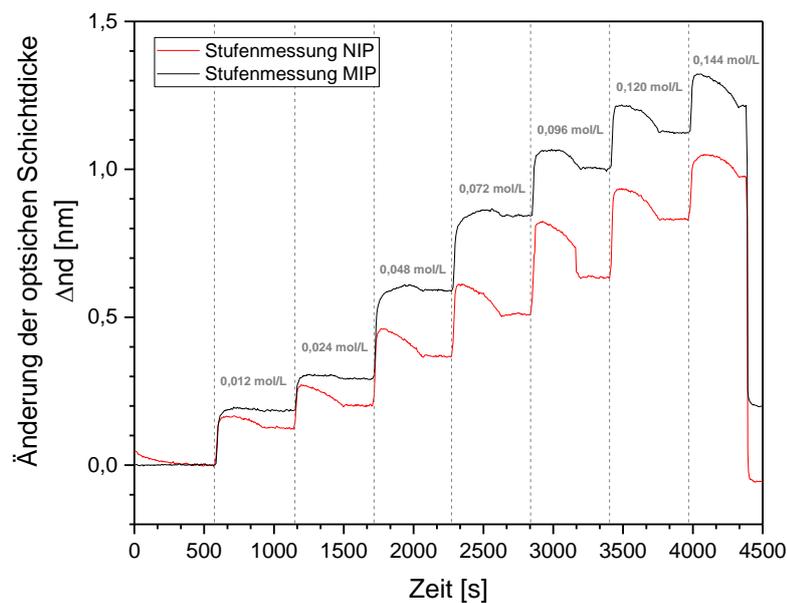


Abbildung 48: Stufenmessung in einem Konzentrationsbereich von 0,012 – 0,144 mol/L Penicillin G. Diese Stufenmessungen wurden sowohl auf einem MIP-Transducer (schwarz) als auch auf einem NIP-Transducer (rot) durchgeführt.

4.2.6.2 Querempfindlichkeit mit Edukten

Die Querempfindlichkeit eines Sensors zu strukturell ähnlichen Substanzen wie die Edukte oder Metaboliten des Analyten spielt eine entscheidende Rolle bei der Anwendung. Damit der Sensor auch in Proben eingesetzt werden kann, wo diese Substanzen vorliegen, dürfen keine störenden Wechselwirkungen zwischen der sensitiven Schicht des Sensors und den strukturell ähnlichen Substanzen vorliegen. Bei der Fermentation von Penicillin G liegen am Anfang nur die Edukte, die Phenyllessigsäure und die 6-Aminopenicillansäure (Abbildung 49), vor. Beide werden von einem Pilz zu Penicillin G umgesetzt. Folglich findet man sie in beachtlichen Konzentrationen im Fermenter. In diesem Abschnitt wird überprüft, ob diese Edukte störende Wechselwirkungen mit dem Sensor aufweisen.

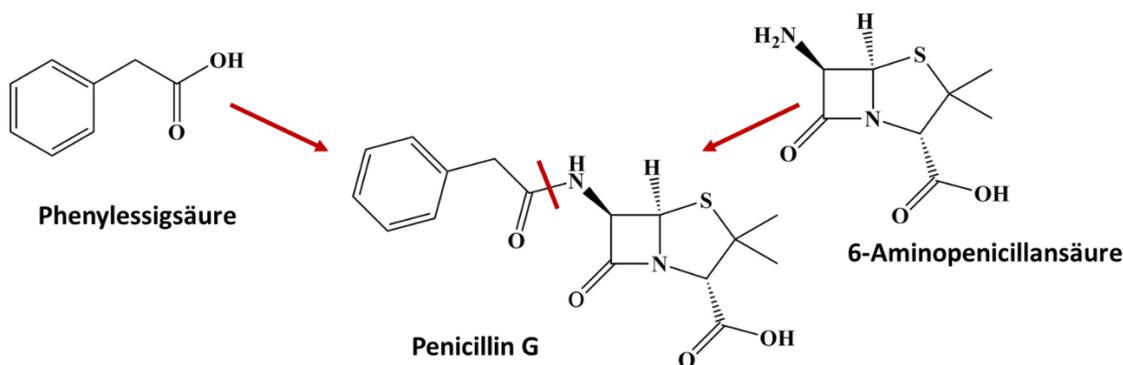


Abbildung 49: Strukturformeln der Edukte Phenyllessigsäure und 6-Aminopenicillansäure.

Um Wechselwirkung zwischen den Polymerpartikeln und den Edukten zu untersuchen, wurden Penicillin G MIPs- bzw. NIPs-Transducer verwendet. Allerdings wurde als Analyt in der Probe nicht Penicillin G, sondern Phenyllessigsäure bzw. 6-Aminopenicillansäure eingesetzt. Um die Ergebnisse bei verschiedenen Konzentrationen interpretieren zu können, wurde sie mit denen des Penicillins Gs verglichen.

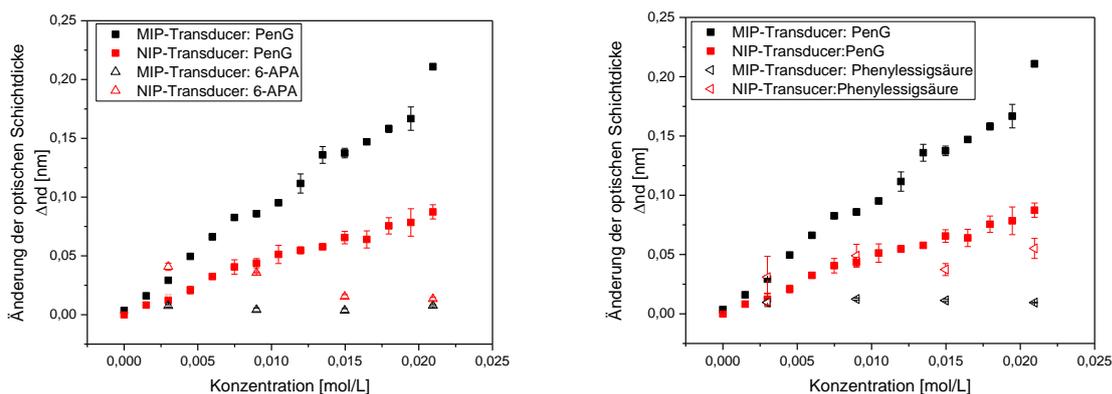


Abbildung 50: Vergleich der Änderung der optischen Schichtdicke von Penicillin G und der Edukte des Penicillin Gs, die Phenyllessigsäure (links) und die 6-Aminopenicillansäure (rechts) bei verschiedenen Konzentrationen.

Gemessen wurden Dreifachmessungen der Konzentrationen 0,003 mol/L, 0,009 mol/L, 0,015 mol/L und 0,021 mol/L der zwei verschiedenen Edukte. In Abbildung 50 ist zu sehen, dass nur eine geringe Änderung der optischen Schichtdicke sowohl für die Phenyllessigsäure, als auch für die 6-Aminopenicillansäure detektiert wird. Auffällig ist bei beiden Edukten, dass der NIP-Transducer eine größere Änderung der optischen Schichtdicke als der MIP-Transducer aufweist. Eine simple Erklärung für eine höhere Detektion mit dem NIP-Transducer als mit dem MIP-Transducer gibt es nicht. Eine Verwechslung der Partikel bei der Immobilisierung kann ausgeschlossen werden, da Transducer aus verschiedenen Immobilisierungschargen untersucht wurden. Alle zeigten dasselbe Ergebnis. Bei der Phenyllessigsäure ist die Änderung der optischen Schichtdicke für geringe Konzentrationen größer als für hohe Konzentrationen. Im Falle der 6-Aminopenicillansäure liegt für alle Konzentrationen eine ähnliche Änderung der

optischen Schichtdicke vor, obwohl bei der höchsten Konzentration sieben Mal so viel 6-Aminopenicillansäure in der Probe ist, als bei der mit der geringsten. Bei beiden Edukten wurde auf dem NIP-Transducer bei der geringsten Konzentration (0,003 mol/L) eine größere Änderung der optischen Schichtdicke detektiert, als sie bei dem MIP-Transducer für das Penicillin G detektiert wurde. Zu beachten ist, dass bei der Kalibrierung ein LOD von 0,004 mol/L ermittelt wurde. Dies bedeutet, dass unter dieser Konzentration der Sensor nicht zuverlässige Aussagen über Konzentrationen treffen kann.

Nichtsdestotrotz ist es deutlich, dass vor allem der MIP-Transducer keine bedeutenden Änderungen der optischen Schichtdicke aufzeigt. Das Ergebnis ist zunächst etwas unerwartet, da man sich durchaus vorstellen kann, dass die Edukte in die Bindungstaschen hinein diffundieren und dort wechselwirken. In den geprägten Bindungstaschen gibt es verschiedene Stellen, die gegen die funktionellen Gruppen des Penicillin G geprägt sind. Diffundieren in eine solche Bindungstasche nicht das komplette Penicillin G sondern die Edukte, wechselwirken diese weniger stark mit der Bindungsstelle als das Penicillin G, da die Edukte weniger funktionelle Gruppen zum Wechselwirken aufweisen. Deshalb diffundieren sie auch leichter aus der Bindungsstelle wieder hinaus und verweilen somit dort nicht so lange.

Ein weiterer Punkt ist die Größe der Moleküle. Gerade Phenylelessigsäure ist wesentlich kleiner als Penicillin G. Da die optische Schichtdicke im Falle der MIPs vor allem über das Quellen, das durch Diffusion des Analyten an die Bindungsstelle des Polymers initiiert wird, ändert sich diese bei kleineren Molekülen durchaus weniger.

Letztendlich wurde festgestellt, dass keine signifikanten und störenden Wechselwirkungen zwischen Penicillin G und den Edukten Phenylelessigsäure bzw. 6-Aminopenicillansäure vorliegen. Der Sensor weist also keine störende Querempfindlichkeit auf.

4.2.6.3 Verschiedene Probenmatrices

Da es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, den Sensor in einem Fermentationsprozess zur Herstellung von Penicillin G zu integrieren und ihn in Biomasse des Penicillin G zu validieren, wurde auf Matrices zurückgegriffen, die komplex aber trotzdem leicht heranzuschaffen sind. Die Wahl in dieser Arbeit fiel auf Flusswasser und Kuhmilch. Dadurch, dass es beim *in-line* Monitoring in einem Fermenter nicht möglich ist eine Probenvorbereitung durchzuführen, werden auch diese Matrices ohne Probenvorbereitung mit Penicillin G versetzt und anschließend mittels der RfS untersucht.

Flusswasser

Flusswasser wird als Oberflächenwasser bezeichnet. Bei Oberflächenwasser handelt es sich um Wasser, das sich offen und ungebunden auf der Erdoberfläche befindet. Meistens ist es sehr reichhaltig an gelösten Substanzen und Schwebstoffen. Diese können natürlich bei der

Detektion mit dem Sensor zu Matrixeffekten führen. Solche Substanzen sind zum Beispiel Huminsäuren. Sie sind hochmolekulare Verbindungen, die bei Abbauprozessen von biologischen Material entstehen. In der Literatur sind mehrere Arbeiten zu finden, die Schadstoffe mithilfe eines Immunoassays in Flusswasser detektieren und über Matrixeffekte der Huminsäuren berichten [108–110].

Um die Eignung des biomimetischen Sensors in der Matrix Flusswasser zu bestimmen, wurden Flusswasserproben von verschiedenen Abschnitten des Neckars entnommen (Abschnitt 3.5). Dabei wurden die Orte der Probennahme so gewählt, dass man möglichst reines Wasser sowie potenziell verschmutztes Wasser als Matrix wählt. In Abbildung 51 sind die drei verschiedenen Orte der Probenentnahme schematisch dargestellt.



Abbildung 51: Schematische Darstellung des Flussverlaufs des Neckars von seiner Quelle bis zur Mündung in den Rhein. Die roten Kreuze markieren die Orte der Probenentnahme (modifiziert nach [111]).

Das möglichst reine Wasser wurde in Villingen-Schwenningen aus der offiziellen Quelle des Neckars entnommen. Folglich sollte das Wasser so gut wie frei von störenden Matrixbestandteilen bzw. von Schadstoffen sein. Ein weiterer Ort der Probenentnahme war Tübingen. In diesem Wasser sollten sich schon Matrixbestandteile aber auch Schadstoffe angereichert haben. Die dritte Probenentnahme wurde nach Stuttgart in Remseck durchgeführt. Hier ist davon auszugehen, dass die Messungen in dieser Probe für den Sensor am herausforderndsten sind. Da hier wahrscheinlich nicht nur Schadstoffe aus der Landwirtschaft, sondern zusätzlich auch noch aus großen Kläranlagen und Krankenhäusern dazu kommen. Um die verschiedenen Flusswasser zu klassifizieren wurde bei den Proben zuerst der Gehalt von Ammonium, Nitrat, Nitrit und Phosphat bestimmt. Zusätzlich wurden die Proben auf ihren pH-

4 Ergebnisse und Diskussion

Wert sowie die Gesamthärte untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: Parameter der Flusswasserproben aus Villingen-Schwenningen, Tübingen und Remseck.

Parameter	Villingen-Schwenningen	Tübingen	Remseck
Ammonium [mg/L]	< 0,05	0,2	0,2
Nitrat [mg/L]	0	0	10
Nitrit [mg/L]	< 0,02	0,3	0,3
Phosphat [mg/L]	0,5	0,5	0,5-1,2
pH-Wert	7	8	7-7,5
Gesamthärte[°d]	19	16	13

Wie erwartet steigen die Werte des Phosphats, Nitrits, Nitrats und Ammoniums an, je weiter von der Quelle weg die Probe entnommen wurde. Aufgrund von landwirtschaftlichen Nutzflächen, die vor allem bis Tübingen vom Neckar durchquert werden, steigen der Ammonium- und der Nitritgehalt an. Erst in Remseck, wenn der Neckar die Großstadt Stuttgart durchquert hat, wird auch der Nitrat- und Phosphatgehalt höher. Dies hängt mit der verstärkten Zugabe von verschiedensten Abwässern zusammen. Die Härte die am Anfang mit 19°d (hartes Wasser) hoch ist, wird im Verlauf des Neckars schwächer, sodass mit 13°d mittelhartes Wasser in Remseck vorliegt. Der pH-Wert der Proben schwankt im neutralen Bereich zwischen 7 und 8.

Um den biomimetischen Sensor unabhängig von Matrixbestandteilen kalibrieren zu können und somit den Sensor für sämtliche Flusswasserproben gültig zu machen, wurde die Kalibrierung in destilliertem und vollentsalztem Wasser durchgeführt. Da aber Penicillin G in Wasser nicht lange stabil ist (Abschnitt 4.1) wurde jede Stunde eine neue Stammlösung hergestellt. Mit dieser stündlich erneut hergestellten Penicillin G Stammlösung, konnten drei Messungen à 20 min durchgeführt werden. Demzufolge wurden für eine Kalibrierkurve dreizehn Stammlösungen benötigt. Da bei jedem Herstellen der Stammlösung weitere Fehler eingehen, ist mit einer höheren Standardabweichung, als bei der Kalibrierung in Puffer (Abschnitt 4.2.4.3) zu rechnen.

Die in Abbildung 52 gezeigten Dreifachmessung von verschiedenen Penicillin G Konzentrationen wurden sowohl auf einem MIP- (schwarz) als auch auf einem NIP-Transducer (rot) detektiert. Die Messungen wurden nicht nach aufsteigender oder absteigender Konzentrationsreihenfolge gemessen, sondern zufällig.

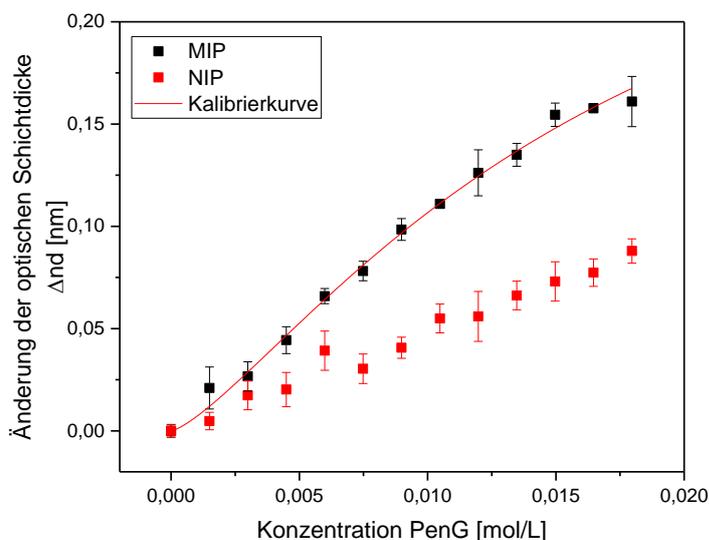


Abbildung 52: Dreifachmessungen für verschiedene Konzentrationen von Penicillin G auf einem NIP-Transducer (rot) und einem MIP-Transducer (schwarz) in destilliertem und vollentsalztem Wasser. Die Messungen des MIP-Transducers wurden zusätzlich mit dem Langmuir-Freundlich Adsorptionsisotherme gefittet, sodass eine Kalibrierkurve resultiert.

Obwohl diese Messungen nicht wie üblich in Citratpuffer, sondern in destilliertem und vollentsalztem Wasser aufgenommen wurden, liegt nicht nur eine Konzentrationsabhängigkeit, sondern auch eine deutliche Differenzierung zwischen den Messungen des MIP- bzw. des NIP-Transducers vor. Auch die Standardabweichungen sind vollkommen zufriedenstellend, obwohl insgesamt dreizehn neu angesetzte Stammlösungen verwendet wurden. Die vorliegende Konzentrationsabhängigkeit, sowie die geringen Standardabweichungen der Messungen, zeigen, dass das Penicillin G in vollentsalztem und destilliertem Wasser nach einer Stunde durchaus noch stabil ist.

Tabelle 19 zeigt die Parameter der Kalibrierung in Puffer, sowie in vollentsalztem und destilliertem Wasser. Aus ihr geht hervor, dass die erhaltenen Werte der Kalibrierung in Wasser durchaus vergleichbar mit denen aus der Kalibrierung in Puffer sind. Gerade der LOD gleicht mit 0,005 mol/L dem LOD in Puffer (0,004 mol/L) sehr. Auch der LOQ mit einem Wert von 0,016 mol/L befindet sich in einem Bereich der durchaus als realistisch eingestuft werden kann. Da die Penicillin G Konzentrationen in Flusswasser üblicherweise maximal 1,46 μmol/L betragen, kann davon ausgegangen werden, dass der Sensor das eventuell im Flusswasser enthaltene Penicillin G nicht nachweisen kann. Deswegen werden die Flusswasserproben mit Penicillin G zusätzlich versetzt. Wird Abbildung 44 (rechts) und Abbildung 52 direkt verglichen, fällt außerdem auf, dass sich die Änderung der optischen Schichtdicke sich im gleichen Bereich (zwischen 0 und 0,15 nm) abspielen.

4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 19: Vergleich der Kalibrierparameter, sowie des LOD und LOQ der Kalibrierung in Puffer und der Kalibrierung in vollentsalztem und destilliertem Wasser.

Parameter	Werte der Kalibrierung in Puffer	Werte der Kalibrierung in Wasser
a [%]	0,735 ± 0,521	0,319 ± 0,051
b [%]	17,537 ± 22,415	246,397 ± 202,738
c [%]	-0,035 ± 0,097	-0,345 ± 0,125
LOD [mol/L]	0,004	0,005
LOQ [mol/L]	0,006	0,016

Die verschiedenen Flusswasserproben wurden mit den Penicillin G Konzentrationen 0,005 mol/L, 0,010 mol/L, 0,016 mol/L versetzt. Diese Konzentrationen wurden auf drei verschiedenen MIP-Transducer als Dreifachmessungen gemessen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 53 dargestellt. Dabei zeigen die Proben des Quellwasser aus Villingen-Schwenningen die größte Änderung der optischen Schichtdicke, danach folgen die Proben aus Tübingen und dann aus Remseck. Bei allen drei Probenentnahmeorten ist eine Konzentrationsabhängigkeit der gemessenen Mengen an Penicillin G zu beobachten. Wie zu erwarten sind die Standardabweichungen des Quellwassers aus Villingen-Schwenningen am geringsten. Auch die Änderungen der optischen Schichtdicke befinden sich bei den Messungen im Quellwasser im gleichen nm-Bereich wie die Kalibrierung in vollentsalztem und destilliertem Wasser. Dies überrascht soweit nicht, da das Quellwasser das Wasser ist, das am wenigsten ungelöste Schwebstoffe sowie Schadstoffe aufweist. Zu erwarten wäre allerdings, dass die Änderung der optischen Schichtdicke der Messsignale mit dem Flussverlauf größer wird, da dort mehr von ungelösten Schwebstoffen sowie Schadstoffe im Wasser vorhanden sind. Anzudenken ist, dass diese sich gut an der Sensoroberfläche bzw. an den immobilisierten Polymerpartikeln adsorbieren. Wie in Abbildung 53 zu sehen ist, ist dies nicht der Fall, was auf eine gute Schutzschicht der Sensoroberfläche hinweist. In der Arbeit von Rau [112] wurden Huminsäuren und ihren Einfluss auf die Form und Intensität von Bindungssignalen, die mit RIfS erhalten wurden, beschrieben. Dabei werden stets eine Erhöhung und eine Krümmung des Bindungssignals erhalten. Da beides in den hier vorliegenden Ergebnissen nicht der Fall ist, ist es auszuschließen, dass die oft problematischen Huminsäuren für die mit dem Flussverlauf abnehmenden Messsignale verantwortlich sind. Vorzustellen ist, dass das Penicillin G an ungelösten Schwebstoffen adsorbiert und somit nicht mehr frei in der Probe vorliegt. Die Folge daraus ist, dass das Penicillin G nicht mehr zu den MIPs auf der Sensoroberfläche diffundiert bzw. mit den Bindungsstellen wechselwirken kann. Dies führt folglich zu einer geringeren Änderung der optischen Schichtdicke, wie sie in Abbildung 53 zu sehen ist.

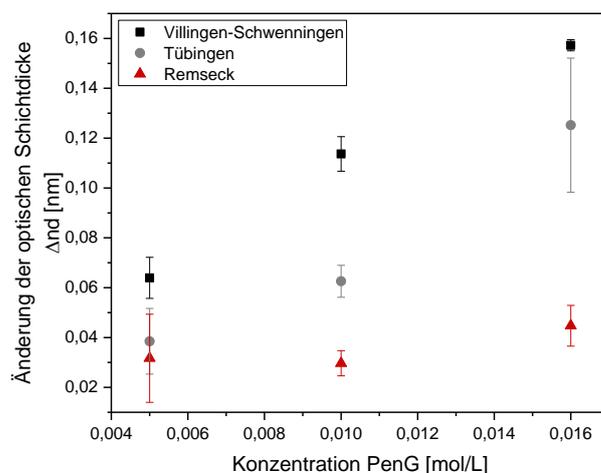


Abbildung 53: Mittelwerte der optischen Schichtdicke für verschiedene Konzentrationen, die auf drei MIP-Transducern mittels Dreifachmessungen ermittelt wurden.

Die abnehmende Änderung der optischen Schichtdicke der Proben mit dem Flussverlauf spiegelt sich auch in der Bestimmung der Wiederfindungsraten wieder (Tabelle 19). Die Proben aus Villingen-Schwenningen zeigen wie vermutet gute Wiederfindungsraten. Die Konzentrationen 0,010 mol/L bzw. 0,016 mol/L liegen im vorgeschriebenen Bereich von 70 – 120%. Aber auch die Konzentrationen 0,005 mol/L liegt nur knapp darüber. Die Proben aus Tübingen liegen im unteren Bereich dieser Vorgabe. Nur die Proben aus Remseck fallen eindeutig nicht in diesen Bereich. Die Wiederfindungsraten sind in Tabelle 20 aufgelistet.

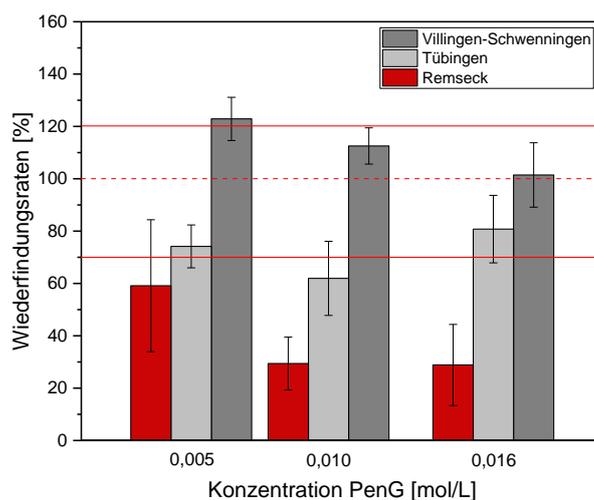


Abbildung 54: Wiederfindungsraten der Messungen von verschiedenen Penicillin G Konzentrationen in Wasserproben aus Villingen-Schwenningen, Tübingen und Remseck. Bestimmt wurden sie auf drei verschiedenen MIP-Transducer. Als Dreifachmessungen wurden Proben mit den Konzentrationen 0,005 mol/L, 0,010 mol/L und 0,016 mol/L gemessen.

4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 20: Wiederfindungsraten (WF) und die dazugehörigen Standardabweichungen (STABW) der Proben aus Villingen-Schwenningen, Tübingen und Remseck.

Konzentration [mol/L]	Villingen- Schwenningen		Tübingen		Remseck	
	WF [%]	STABW [%]	WF [%]	STABW [%]	WF [%]	STABW [%]
0,005	101,4	12,3	80,7	12,9	28,8	15,5
0,010	112,5	6,9	61,9	14,1	29,3	10,1
0,016	122,8	8,2	74,1	8,1	59,1	25,2

Es konnte gezeigt werden, dass der Sensor auch in der komplexen Matrix Flusswasser eingeschränkt einsetzbar ist. Je mehr das Wasser belastet ist, desto weniger eignet sich der Sensor zum Nachweis. Zurückzuführen ist dies wahrscheinlich nicht auf den Sensor, sondern darauf, dass das Penicillin G an ungelösten Schwebstoffen adsorbiert und somit nicht mehr in der Probe gelöst vorliegt.

Grundsätzlich ist der hier entwickelte biomimetische Sensor zwar in der Lage Penicillin G versetzte Proben zu detektieren, aber für einen Einsatz in der Umwelt ist er nicht geeignet. Die Nachweisgrenzen bei solch einer Spurenanalytik, liegen oftmals in einem maximalen Konzentrationsbereich von $0,55 \mu\text{g/L}$. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist der biomimetische Sensor in diesem Bereich nicht empfindlich genug. Er kann ohne Problem im g/L Bereich eingesetzt werden, darunter ist eine Detektion nicht möglich.

Milch

Um den biomimetischen Sensor in weiteren komplexen Matrices zu testen, wurde Kuhmilch herangezogen. Milch ist eine weiße Emulsion die aus Proteinen, Kohlenhydraten, Vitaminen, Fetten und Spurenelementen zusammengesetzt ist [113]. Durch diese verschiedenen Bestandteile der Milch sind Matrixeffekte unumgänglich. Die Matrixeffekte, die bei der RfS die bedeutendsten Rollen spielen sind zum einem der stark unterschiedliche Brechungsindex zwischen der Milchprobe und dem sonst in der RfS-Anlage verwendete Puffer und zum anderen der Tyndall-Effekt, der auf die in der Milch nicht löslichen Substanzen zurückzuführen ist. Beobachten kann man dies bei der Untersuchung der Milchproben mit RfS.

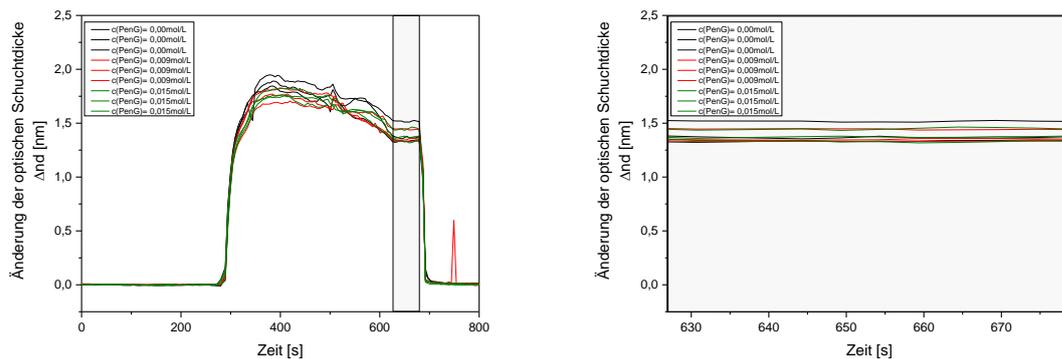


Abbildung 55: Links: Messung der Milchproben, die mit verschiedenen Konzentrationen Penicillin G versetzt sind. Rechts: Vergrößerung der Dissoziationsphasen der gemessenen Milchproben, die mit unterschiedlichen Penicillin G Konzentrationen versetzt sind.

Auch im Falle der Untersuchung des Sensors in der Matrix Milch wurden verschiedene Konzentrationen als Dreifachmessungen auf einem MIP- bzw. NIP-Transducer gemessen. In Abbildung 55 sind drei Konzentrationen in Dreifachmessungen dargestellt. Die gezeigten Messungen enthielten entweder 0 mol/L, 0,009 mol/L oder 0,015 mol/L Penicillin G. Es ist deutlich zu sehen, dass während der Probeninjektion eine große Änderung der optischen Schichtdicke zu beobachten ist. Diese enorme Änderung kommt durch den geänderten Brechungsindex, sowie den Tyndall-Effekt zu Stande. Dadurch wird das Bindungssignal überlagert und kann nicht zur Auswertung herangezogen werden. Der hier sinnvoll auszuwertende Bereich ist die Dissoziationsphase. In der Dissoziationsphase wird die Sensoroberfläche mit Puffer gespült. Somit wird die Milchprobe von der Sensoroberfläche weggepumpt. Detektiert werden können dann nur noch die Substanzen, die an der Sensoroberfläche, im idealen Fall nur das Penicillin G, gebunden haben. Bei Biosensoren wurde dieses Auswerten der Dissoziationsphase schon erfolgreich angewendet [112]. Bei biomimetischen Sensoren wurde dies hingegen noch nicht versucht. Wie in Abbildung 55 zu sehen ist, ist durch die geringe Affinität der MIPs zu dem Penicillin G, die Dissoziationsphase (gepunkteter Bereich) sehr kurz (ca. 50 s). D.h. das Penicillin G wird beim Spülen der Sensoroberfläche mit Puffer innerhalb von weniger als 1 min von der Sensoroberfläche, also den MIPs, weggespült. Folglich ist der auszuwertende Bereich sehr kurz. Auf der linken Seite der Abbildung 55 wurde die Dissoziationsphase vergrößert dargestellt, um die Konzentrationsabhängigkeit besser bestimmen zu können. Hier wird deutlich, dass keine Konzentrationsabhängigkeit der verschiedenen mit Penicillin G versetzten Milchproben vorliegt. Auch die Reproduzierbarkeit zwischen Proben mit der gleichen Penicillin G Konzentration ist nicht gegeben. Somit ist das Fazit dieser Experimente, dass der hier entwickelte biomimetische Sensor nicht für das Messen in Milch eingesetzt werden kann. Grund dafür liegt wahrscheinlich in der zu geringen Affinität zwischen den MIPs und Penicillin G.

4.3 Biosensor

Durch die Verwendung von Antikörpern als Erkennungselemente besitzt ein Biosensor in der Regel eine hohe Affinität gegenüber dem Analyten. Somit können niedrige Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erzielt werden. Aus diesem Grund werden Biosensoren auch oftmals in der Spurenanalytik eingesetzt. In diesem Abschnitt werden die ersten Schritte der Entwicklung eines solchen Biosensors für den Analyten Penicillin G zum Einsatz in der Umweltpurenanalytik gezeigt. Dazu gehören eine optimale Oberflächenmodifikation und ein geeigneter Antikörper, der möglichst hohe, sowie reproduzierbare und konzentrationsabhängige Bindungssignale hervorruft. Abschließend werden mit dem für den Nachweis von kleinen Molekülen besonders geeigneten Bindungshemmtest, verschiedene Penicillin G Konzentrationen nachgewiesen. Matrices, in der ein solcher Biosensor eingesetzt werden soll, sind z.B. Fluss- oder Abwasser, sowie Milch.

4.3.1 Wahl der Oberfläche

Die Wahl der optimalen Sensoroberfläche spielt für die Erzielung möglichst guter Resultate auch beim Biosensor eine große Rolle. Die Oberfläche darf keine unspezifischen Wechselwirkungen mit anderen Proteinen als dem Penicillin G Antikörper, mit dem die Probe beim Bindungshemmtest inkubiert wird, eingehen. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Zugänglichkeit der auf der Sensoroberfläche immobilisierten Erkennungsstruktur. Im Falle des Biosensors ist diese immobilisierte Erkennungsstruktur das Penicillin G. Das Penicillin G wird über seine Carboxy-Gruppe an den Amino-funktionalisierten Oberflächen kovalent immobilisiert. Wichtig dabei ist, dass der an der Carboxy-Gruppe nahe liegende beta-Lactamring für den Antikörper sehr gut zugänglich ist, da dieser als Epitop fungiert. Ist dieses Epitop für den Antikörper nicht zu erreichen, kann dieser nicht binden und folglich nicht detektiert werden. Weiterhin sollen die erhaltenen Messsignale möglichst hoch sein, damit man eine möglichst großen Signaldynamik erreicht. Mit einer großen Signaldynamik können auch geringe Konzentrationen, die nahe beieinander liegen optimal quantifiziert werden. Je mehr Penicillin G Moleküle auf der Sensoroberfläche immobilisiert sind, desto größer wird die Änderung der optischen Schichtdicke sein. Um die optimale Sensoroberflächenmodifikationen zu ermitteln, wurden zum einem PEG- und zum anderen AMD-Modifikationen, die als Polymerschuttschicht gegen unspezifische Wechselwirkungen eingesetzt werden, präpariert und im direkten Testformat mit einem monoklonalen Antikörper untersucht.

In Abbildung 56 sind diese verschiedenen PEG- (schwarz) und AMD-Modifikationen (rot) dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass die PEG-Modifikationen sehr unterschiedliche Ergebnisse aufzeigen. Für die Modifikation mit DA-PEG wird kein Bindungssignal erhalten. Dies liegt daran, dass die Penicillin G Moleküle auf dieser Oberfläche eng und starr nebeneinander liegen. Durch diese starre Geometrie gibt es keine Möglichkeit für die Antikörper an dem beta-Lactamring zu binden. Wird wie im Fall des DC-PEGs ein 1,7-

Diaminoheptan Linker dazwischen geschaltet, sind die Penicillin G Moleküle nicht mehr starr an der Sensoroberfläche immobilisiert, sondern aufgrund des Linkers flexibler. Somit können die Antikörper ohne Probleme an das Penicillin G binden und ein hohes Bindungssignal kann erreicht werden.

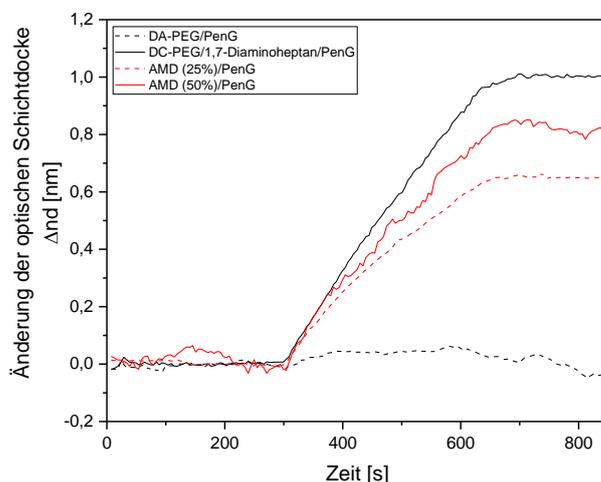


Abbildung 56: Untersuchung verschiedener Oberflächenmodifikationen. Das direkte Format wurde mit dem monoklonalen Antikörper auf verschiedenen PEG- (schwarz) und AMD- (rot) Modifikationen getestet.

Die AMD modifizierten Oberflächen weisen niedrigere Bindungssignale wie die PEG-Modifizierung mit dem Linker auf. Nichtsdestotrotz sind die Bindungssignale zufriedenstellend. Der Einsatz eines Linkers ist in diesem Fall überflüssig, da das AMD eine dreidimensionale Struktur, sowie hydrogele Eigenschaften aufweist, die den Antikörpern gute Möglichkeiten zum Wechselwirken bietet. Der Aminierungsgrad des AMD spielt dabei eine entscheidende Rolle. Je höher der Aminierungsgrad ist, desto mehr Amino-Gruppen stehen für die kovalente Bindung des Penicillin G zur Verfügung. Deswegen ist es auch nicht verwunderlich, dass das AMD mit einem Aminierungsgrad von 50% ein größeres Bindungssignal aufweist als das AMD mit einem Aminierungsgrad von 25%. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde entschieden, konzentrationsabhängige Messungen auf DC-PEG-Linker-Penicillin G und AMD (50%)-Penicillin G Transducer durchzuführen.

4.3.2 Wahl der Antikörper

Nicht nur die richtige Oberflächenmodifikation spielt eine entscheidende Rolle, sondern auch die Wahl des Antikörpers, der beim Bindungshemmtest eingesetzt werden soll, ist von Wichtigkeit. In dieser Arbeit lagen zwei verschiedene Antikörper zur Auswahl vor. Ein monoklonaler und ein polyklonaler Antikörper. Um die Bindungsfähigkeiten der Antikörper zu vergleichen, wurden sie im direkten Testformat untersucht.

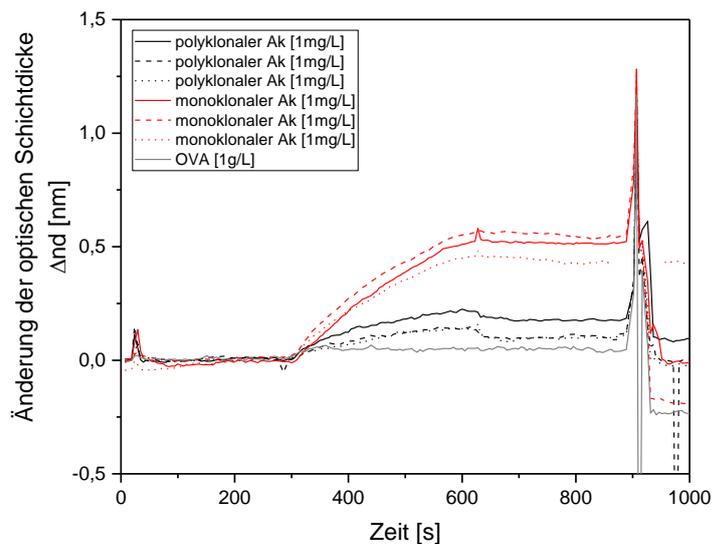


Abbildung 57: Vergleich der Bindungskurven des monoklonalen (rot) und polyklonalen Antikörpern (schwarz), sowie der Bindungskurve von OVA (grau) auf einer AMD (25%) modifizierten Oberfläche.

Abbildung 57 zeigt Bindungskurven des monoklonalen (rot) und des polyklonalen Antikörpern (schwarz) auf einer AMD (25%) modifizierten Oberfläche. Die Konzentrationen der verschiedenen Antikörpern lagen jeweils bei 1 mg/L. Für jeden Antikörper wurden Dreifachmessungen durchgeführt. Die Reproduzierbarkeit der Bindungssignale ist dabei für beide Antikörper sehr ähnlich. Der große Unterschied liegt in der Änderung der optischen Schichtdicke und somit in der Signalthöhe. Für die gleiche Konzentration an Antikörpern erhält man für den monoklonalen Antikörper ein mehr als doppelt so hohes Signal wie für den polyklonalen Antikörper. Aufgrund des deutlich höheren Signals wurde entschieden, dass der monoklonale Antikörper für die folgenden Experimente verwendet wird.

Zusätzlich wurde auf diesem Transducer im direkten Testformat die unspezifische Wechselwirkung mit anderen Proteinen getestet. Dafür wurde OVA herangezogen. Das wesentlich höher konzentrierte OVA (1 g/L) wies keine signifikanten Wechselwirkungen mit der AMD (25%)-Penicillin G modifizierten Oberfläche auf, sodass diese Oberflächenmodifikation für weitere Experimente geeignet ist.

4.3.3 Konzentrationsabhängige Messungen

Um zu überprüfen, ob auf den Oberflächenmodifikationen konzentrationsabhängige Messungen möglich sind, wurden im direkten Assayformat Proben mit verschiedenen Konzentrationen des monoklonalem Antikörpern getestet. Es wurden Dreifachmessungen mit den Antikörper Konzentrationen 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ und 4 $\mu\text{g/L}$ auf einer AMD (50%)-

Penicillin G modifizierten und DC-PEG-Linker-Penicillin G modifizierten Oberfläche durchgeführt.

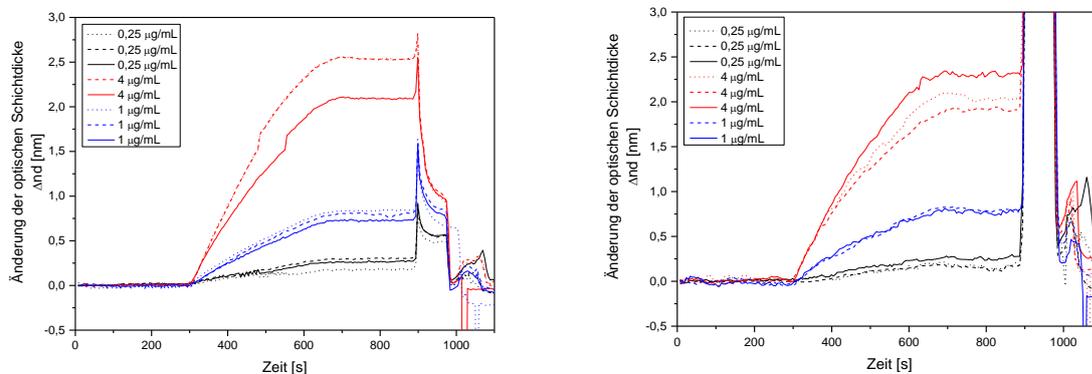


Abbildung 58: Konzentrationsabhängige Messungen auf einem DC-PEG-Linker-Penicillin G (links) und auf einem AMD(50%)-Penicillin G modifizierten Transducer (rechts). Es wurden Dreifachmessungen mit den Konzentrationen 0,25 µg/mL, 1 µg/mL und 4 µg/L an monoklonalem Antikörper im direkten Format gemessen.

Die Bindungssignale der beiden Transducer zeigen konzentrationsabhängige Messungen, die durchaus reproduzierbar sind. Beide weisen eine ähnliche Änderungen der optischen Schichtdicke auf, sodass zunächst dort kein großer Unterschied zu finden ist. Wird allerdings der Kurvenverlauf betrachtet und verglichen, fällt auf, dass die DC-PEG-Linker-Penicillin G modifizierte Oberfläche einen sehr geraden Anstieg der Bindungskurve zeigt. Werden die Bindungssignale auf dem AMD (50%)-Penicillin G modifizierten Transducer betrachtet, wird deutlich, dass diese Steigung des Bindungssignals gekrümmter erscheint. Diese zwei verschiedenen Bindungssignalformen stehen für verschiedene geschwindigkeitsbestimmende Schritte der Affinitätsreaktion, die an der Sensoroberfläche ablaufen. Im Falle des gerade ansteigenden Bindungssignals (PEG) kann von einer massen transportierten Affinitätsreaktion, bei der der Transport der Antikörper an die Sensoroberfläche der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, gesprochen werden. Im Falle des gekrümmten Bindungssignals (AMD), bei der die Bindung des Antikörpers an die Oberfläche der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, von einer kinetisch kontrollierten Affinitätsreaktion. Wenn dies auf der molekularen Ebene betrachtet wird, bedeutet das im Falle der massenkontrollierten Reaktion, dass mehr Penicillin G an der Oberfläche immobilisiert ist als Antikörper zur Sensoroberfläche pro Zeit hin diffundieren können. Im Falle der kinetisch kontrollierten Reaktion weist dies hingegen darauf, dass das Penicillin G an der Oberfläche limitiert vorliegt und die Anzahl der Antikörper an der Sensoroberfläche wesentlich größer ist. Für die weiteren Versuche werden massenkontrollierte Reaktionen bevorzugt. Um wie in Abschnitt 3.3.2 bereits erläutert auswerten zu können, fällt die Wahl der Oberfläche auf die PEG-Linker-Penicillin G Modifikation.

4.3.4 Bindungshemmtest

Da Penicillin G ein kleines Molekül ist, ist es nicht möglich es im direkten Assay Format, nachzuweisen. Würden die Antikörper auf der Sensoroberfläche immobilisiert und Penicillin G aus der Probe direkt nachgewiesen, wäre die Änderung der optischen Schichtdicke, durch die Anlagerung des Penicillin Gs an die Antikörper, so gering, dass keine Änderung zu detektieren wäre. Deswegen muss hier der Bindungshemmtest eingesetzt werden. Die Antikörper erzeugen durch Binden an die immobilisierten Penicillin G Moleküle eine deutliche Änderung der optischen Schichtdicke.

Der Bindungshemmtest wurde in PBS durchgeführt. Die Antikörper wurden mit den Penicillin G Konzentrationen 0, 12, 60, 120 und 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für 30 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Die durchgeführten Einfachmessungen zeigen eine Konzentrationsabhängigkeit der Bindungssignale. Deutlich wird auch, dass für die geringeren Konzentrationen ein höheres Bindungssignal als für die niedrigen Konzentrationen erhalten wird. Dies entspricht den Erwartungen eines Bindungshemmtests.

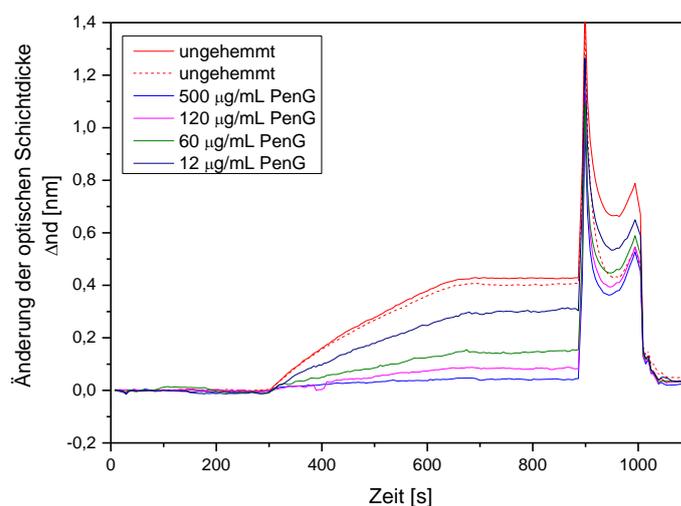


Abbildung 59: Konzentrationsabhängige Messungen von verschiedenen Proben, die auf einer DC-PEG-Linker-Penicillin G Transducer im Format des Bindungshemmtests getestet wurden.

Die Bindungssignale in Abbildung 59 wurden durch eine Geraden-Anpassung ihrer Steigung ausgewertet, normiert und gegen die Konzentration der Probe aufgetragen, um eine Kalibrierkurve zu erhalten (Abbildung 60). Da nur Einfachmessungen durchgeführt wurden, können keine analytischen Aussagen aus der Kalibrierung herausgezogen werden. Tendenzen können allerdings deutlich gemacht werden. Zu sehen ist eine Kalibrierkurve, die für einen Biosensor einen typischen sigmoidalen Verlauf aufzeigt. Zusätzlich sieht man an dem dynamischen Bereich der Kurve auch, dass man sich im Arbeitsbereich des Biosensors befindet.

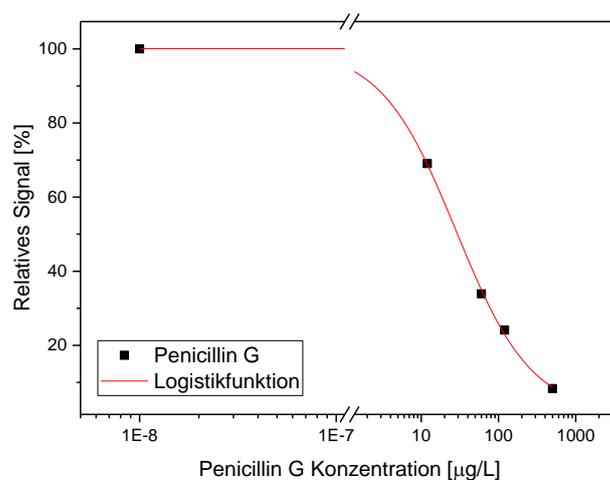


Abbildung 60: Kalibrierkurve des Biosensors für Penicillin G.

In Tabelle 21 sind die Parameter der Kalibrierkurve, die durch einen 4-Parameter-Logistikfit erhalten wurden, aufgelistet. Dieser Fit wurde zum Erhalten einer Kalibrierkurve durchgeführt.

Tabelle 21: Parameter des Logistikfits der Kalibrierkurve des Biosensors.

Parameter	Wert
A1 [%]	100,055 ± 1,670
A2 [%]	1,560 ± 3,292
x_0 [µg/L]	28,366 ± 3,329
p	0,889 ± 0,081

Bei diesen Ergebnissen ist allerdings zu beachten, dass die berechnete Menge an Penicillin G, die zur vollständigen Hemmung des Tests theoretisch notwendig ist, 2,4 ng Penicillin G ist. Dies bedeutet, dass eine vollständige Hemmung bei einem Penicillin G Lösung von 1 µg/L vorliegen sollte. In Abbildung 59 ist deutlich zu sehen, dass eine vollkommene Hemmung des Tests erst bei einer Menge von über 120 µg Penicillin G vorliegt. D.h. um den Test vollkommend zu hemmen, wird eine Menge benötigt, die 50.000 Mal so groß ist wie die berechnete.

Folglich ist der hier entwickelte Sensor nicht so sensitiv wie erhofft. Dies macht es auch schwer ihn in der Umwelt einzusetzen, da dort Penicillin G meistens im unteren µg/L-Bereich zu finden ist. Zurück zu führen ist dieses Ergebnis auf die verwendeten Antikörper. Es ist zu vermuten, dass die Affinität der Antikörper zum Penicillin G nicht ausreichend ist. Dies ist ein bekanntes Problem bei dem Einsatz von Antikörpern gegen kleine Moleküle. Da es sich um kleine Moleküle handelt, lösen diese beim Immunisieren der Tiere oftmals keine Immunantwort aus.

4 Ergebnisse und Diskussion

Deswegen müssen sie an ein größeres Protein wie z.B. BSA gekoppelt werden. Nur dann kann eine Immunantwort im Tier hervorgerufen werden. Diese Kopplung hat zur Folge, dass die Antikörper oft eine geringere Affinität gegenüber dem Zielanalyten aufweisen. Zusätzlich treten häufig Kreuzreaktivitäten mit den verwendeten Kopplungsmolekülen auf. Würde es gelingen, Antikörper mit einer höheren Affinität zu produzieren, sollte dem Einsatz des Sensors in der Umwelt nichts im Wege stehen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden markierungsfreie und optische Sensoren zum Nachweis von dem Antibiotikum Penicillin G entwickelt. Hierbei wurden zwei grundsätzlich unterschiedliche Problemstellungen berücksichtigt. Zum einen wurde ein Sensor zur Prozessüberwachung des Penicillin G Titer bei der Fermentation entwickelt und zum anderen die Entwicklungsschritte eines Sensors zur Spurenanalytik in der Umwelt gezeigt.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit (Abschnitt 4.2) wurde die Entwicklung des biomimetischen Sensors, der Molekular geprägte Polymere (MIPs) als Erkennungsstrukturen verwendet, dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass bei der verwendeten Oberflächenmodifikation mit Polyethylenglycol (PEG) als Schutzschicht keine unspezifischen Wechselwirkungen mit Penicillin G auftreten. Dies ist wichtig abzuklären, da bei der Immobilisierung der MIPs nicht gewährleistet werden kann, dass diese gleichmäßig die Sensoroberfläche bedecken. Als Detektionsmethode wurde die 1-lambda-Reflektometrie verwendet. Der hier genutzte Aufbau machte es durch simultanes Auslesen von zwei Spots möglich, unspezifische Wechselwirkungen zwischen den MIPs und dem Penicillin G durch kontinuierliches Referenzieren auf das Signal der nicht geprägten Polymere (NIPs) herauszurechnen. Da dieser Aufbau bisher nur zur Detektion von Biosensoren verwendet wurde, ist untersucht worden, ob sich dieses Konzept auch auf einen biomimetischen Sensor übertragen lässt. Hierfür wurden bereits charakterisierte gegen L-BFA geprägte und nicht geprägte Polymere eingesetzt. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass sich dieser Aufbau durchaus auch für Messungen mit MIPs als sensitive Schicht eignet.

Bei der Immobilisierung beider hier verwendeten Polymerpartikelsorten (HYMOPTA, NAEMA), wurden prinzipiell zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurden die Partikel elektrostatisch und zum anderen kovalent auf der Sensoroberfläche gebunden. Es konnte gezeigt werden, dass die elektrostatische Anbindung sowohl mit Carboxyethylsilanetriol (CES) als auch mit carboxylierten PEG, durch das Ablösen der Partikel mit der Zeit von der Sensoroberfläche, für die Anwendung im Fermenter nicht ausreichende stabil war. Um eine erhöhte Stabilität der Sensoroberfläche zu erreichen, wurden die Polymerpartikel kovalente an die Sensoroberfläche immobilisiert. Hierfür wurden bei den Partikeln nach der Polymerisierung Azid-Gruppen eingeführt. Mithilfe von Alkin-funktionalisiertem PEG konnte erfolgreich eine 1,3-dipolare Cycloaddition durchgeführt werden, sodass die Partikel kovalent an der Oberfläche immobilisiert wurden. Da die HYMOPTA-Partikel nach der Polymerisation nicht zu funktionalisieren waren, wurden sie als sensitive Schicht ausgeschlossen.

Bei den ersten kovalenten Immobilisierungsversuchen zeigten die REM-Aufnahmen eine heterogen bedeckte Sensoroberfläche, die Agglomerate aus Partikelpolylagen aufwies. Die Messungen mit der 1-lambda-Reflektometrie zeigten jedoch konzentrationsabhängige Ergebnisse, die zu einer Kalibrierung erfolgreich genutzt werden konnten. Bei der zweiten Charge dieser Partikel konnte mit REM-Aufnahmen eine sehr homogene Oberflächenbe-

deckung beobachtet werden. Messungen mit der 1-lambda-Reflektometrie ergaben allerdings keine Bindungssignale. Der Grund dafür konnte mit der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS) ermittelt werden: Die fast doppelt so großen NAEMA-Polymerpartikel (400 nm) aus der zweiten Charge benötigten eine Anregungswellenlänge von 557 nm, die im Laboraufbau nicht zur Verfügung stand. Folglich wurden weitere Untersuchungen der Partikel mittels RIfS durchgeführt. Dabei konnte der Sensor erfolgreich in Puffer kalibriert werden. Auch die Chip-zu-Chip-Reproduzierbarkeit war mit Wiederfindungsraten zwischen 84,41 und 118,78 % sehr gut. Beide Chargen der Azid-funktionalisierten NAEMA-Partikel wurden zusätzlich mit der Isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) auf spezifische Wechselwirkungen mit Penicillin G untersucht. Bei beiden Chargen wurde bei der Injektion des Penicillin Gs zu den MIPs wesentlich mehr Wärmemenge frei als bei der Injektion zu den NIPs oder der Referenz. Dies weist darauf hin, dass zusätzlich zur Mischungswärme die exotherme Bindung von Penicillin G an die Polymerpartikel stattgefunden hat.

Da der Sensor *in-line* angewendet werden soll, kann er während dem Fermentationsprozess nicht regeneriert werden. Deswegen wurde mithilfe von Stufenmessungen eine stetig höher werdende Penicillin G Konzentration simuliert. Es konnte erfolgreich demonstriert werden, dass Stufenmessungen des Sensors, sowohl in dem in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationsbereich, als auch in dem Konzentrationsbereich, der bei der Fermentation vorliegt, ohne Probleme durchzuführen sind. Da im Fermenter nicht nur das Produkt, sondern auch die Edukte, die von einem Pilz zu Penicillin G umgesetzt werden, vorliegen, ist es unumgänglich den Sensor auf Querempfindlichkeiten mit den Edukten (Phenyllessigsäure und 6-Aminopenicillinsäure) zu untersuchen. Hier konnte deutlich gezeigt werden, dass die gegen Penicillin G geprägten und nicht geprägten Polymerpartikel keine Wechselwirkungen mit den Edukten aufwiesen.

Um einen Sensor zu etablieren muss er nicht nur in Puffer, sondern auch in der komplexen Matrix kalibriert werden, in der er schließlich eingesetzt werden soll. Da es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war Biomasse aus einem Penicillin G Fermentationsprozess zu erhalten, wurde der Sensor in anderen komplexen aber leichtzugänglichen Matrices untersucht. Dabei fiel die Wahl zuerst auf die Matrix Flusswasser. Mit der Wahl des Flusswassers konnte zusätzlich auch geprüft werden, ob der Sensor eine Anwendung in der Umweltanalytik finden kann. Diese Wasserproben wurden dem Neckar an verschiedenen Orten (Villingen-Schwenningen, Tübingen, Remseck) entnommen und im Labor mit unterschiedlichen Penicillin G Konzentrationen versetzt. Es konnte gezeigt werden, dass in den Proben aus der Quelle (Villingen-Schwenningen) gute Wiederfindungsraten bestimmt werden konnten. Der biomimetische Sensor wurde zusätzlich noch in der Matrix Kuhmilch untersucht. Hier konnten keine erfolgreich auszuwertenden Messungen erhalten werden. In Milch konnte aufgrund von verschiedenen Phänomenen wie dem Tyndall-Effekt oder dem stark unterschiedlichen Brechungsindex, der zwischen der Milchprobe und dem sonst in der RIfS-Anlage verwendete Puffer vorliegt, nur die Dissoziationsphase zur Auswertung herangezogen werden. Da die

Affinität der MIPs zu Penicillin G im Vergleich zu Antikörpern gering war, war diese Dissoziationsphase sehr kurz und konnte nicht zur Auswertung verwendet werden.

Da ein *in-line* Sensor zur Überwachung des Produkttiters, den Fermentationsprozess effektiver und somit kostengünstiger macht, ist solch ein Sensor von großer wirtschaftlicher Relevanz. Der biomimetische Sensor sollte in weiteren Arbeiten auf die Anwendung in der Biomasse eines Penicillin G Fermentationsprozesses untersucht werden und in dieser Matrix auch kalibriert und validiert werden. Bei der Implementierung des *in-line* Sensors wird der Fokus auf der Detektion des Penicillin Gs im großen Fermenter Volumen liegen. Zudem muss die Synthese der Polymerpartikel reproduzierbar und zuverlässig ablaufen, sodass bei einem Freistrahlaufbau nur eine LED mit passendem Detektor in den Aufbau integriert werden muss. Für Laborversuche hingegen bietet sich die Umsetzung des in Abschnitt 4.2.5 beschriebenen spektralen 2-Spot-RIS an.

Abschnitt 4.3 zeigt die Entwicklung eines Biosensors. Um ein kleines Molekül wie Penicillin G mittels Antikörper nachweisen zu können, musste ein Bindungshemmtest durchgeführt werden. Zuerst wurde dafür eine passende Oberflächemodifikation bestimmt. Untersucht wurden dabei AMD und PEG modifizierte Oberflächen. Bei den AMD-funktionalisierten Oberflächen wurde 25%iges und 50%iges AMD verwendet, auf dem wiederum Penicillin G immobilisiert wurde. Es zeigte sich, dass ein höherer Aminierungsgrad des AMDs auch ein höheres Bindungssignal erzeugt. Bei der Modifikation mit PEG wurde das Penicillin G zum einen direkt auf diaminiertes PEG immobilisiert und zum anderen wurde zwischen PEG und Penicillin G ein 1,7-Diaminoheptan Linker eingebaut. Für die direkte Anbindung wurden keine Bindungssignale erhalten. Für die Immobilisierung mittels Linker jedoch sehr gute. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde entschieden, dass die PEG Immobilisierungsstrategie mit dem Linker weiter ausgeführt wird. Als Antikörper standen ein monoklonaler sowie ein polyklonaler Antikörper zur Auswahl. Die Messungen zeigten deutlich, dass der monoklonale Antikörper wesentlich größere Bindungssignale erzeugt und deswegen für weitere Versuche verwendet wurde. Als nächstes wurde im direkten Format gezeigt, dass unterschiedliche Konzentrationen an monoklonalem Antikörper erfolgreich konzentrationsabhängig und reproduzierbar detektiert werden können. Diese Versuche waren wichtig, um zu gewährleisten, dass der Antikörper prinzipiell selektiv mit dem immobilisierten Penicillin G wechselwirkt. Letztendlich wurden konzentrationsabhängige Messungen im Format des Bindungshemmtests durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine Konzentrationsabhängigkeit vorliegt und dass die verwendeten Konzentrationen im dynamischen Signalbereich liegen.

Da die Schadstoffbelastung in unserer Umwelt und in unseren Lebensmitteln immer mehr steigt und es momentan für manche Schadstoffe und ihre Metaboliten keinen Lösungsansatz zur Eliminierung aus der Umwelt gibt, ist die Entwicklung von schnellen, simpel zu bedienenden und kostengünstigen Nachweismethoden immer wichtiger. In dieser Arbeit wurden die Entwicklungsschritte eines solchen Biosensors gezeigt. In weiteren Arbeiten sollte der Biosensor noch vollständig kalibriert und validiert werden. Dies sollte nicht nur in Puffer durchgeführt werden, sondern auch in für die Umwelt- und Lebensmittelanalytik relevanten

Matrices wie Flusswasser oder Milch. Es sollte auch auf den relevanten Konzentrationsbereich in Realmatrices (momentan bis zu $0,55 \mu\text{g/L}$) geachtet werden. Kann dieser Konzentrationsbereich mit Antikörpern nicht erreicht werden, wären auch alternative Erkennungselemente wie z.B. Oligopeptide eine Option.

Letztendlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Anforderungen des Anwendungsumfeldes des Sensors entscheidend für die Wahl der Erkennungsstruktur ist. Da dabei nicht einmal die Methode, der Aufbau oder der Messablauf geändert werden muss, ist die Erkennungsstruktur der Schlüssel zu unterschiedlichen Anwendungen. Ist man sich über diese Anwendungen und die damit verbundenen Herausforderungen bewusst, so lässt sich mit einer überlegten Wahl der Erkennungsstrukturen, für jede Anwendung auch ein geeigneter Sensor finden.

6 Literatur

- [1] B.P. Luppá, H. Schlebusch, POCT-Patientennahe labordiagnostik, 2nd ed., Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 2012.
- [2] H.J. Kramer, Observation of the Earth and its Environment, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2002.
- [3] M. Lees, Food authenticity and traceability, Woodhead Publishinh Limited, Cambridge, 2003.
- [4] F. Klocke, Prozessüberwachung, in: Fertigungsverfahren, 2nd ed., Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2005.
- [5] L. Paula, F. Birrer, Including public perspectives in industrial biotechnology and the biobased economy, *J. Agric. Environ. Ethics.* 19 (2006) 253–267. doi:10.1007/s10806-005-6170-2.
- [6] N. Tohmola, J. Ahtinen, J.P. Pitkänen, V. Parviainen, S. Joenväärä, M. Hautamäki, P. Lindroos, J. Mäkinen, R. Renkonen, On-line high performance liquid chromatography measurements of extracellular metabolites in an aerobic batch yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 16 (2011) 264–272. doi:10.1007/s12257-010-0147-3.
- [7] B. Liebmann, A. Friedl, K. Varmuza, Determination of glucose and ethanol in bioethanol production by near infrared spectroscopy and chemometrics, *Anal. Chim. Acta.* 642 (2009) 171–178. doi:10.1016/j.aca.2008.10.069.
- [8] J.I. Rhee, T.H. Kang, On-line process monitoring and chemometric modeling with 2D fluorescence spectra obtained in recombinant *E. coli* fermentations, *Process Biochem.* 42 (2007) 1124–1134. doi:10.1016/j.procbio.2007.05.007.
- [9] C. Koch, A.E. Posch, H.C. Goicoechea, C. Herwig, B. Lendl, Multi-analyte quantification in bioprocesses by Fourier-transform-infrared spectroscopy by partial least squares regression and multivariate curve resolution, *Anal. Chim. Acta.* 807 (2014) 103–110. doi:10.1016/j.aca.2013.10.042.
- [10] J.C. Vidal, L. Bonel, A. Ezquerro, S. Hernández, J.R. Bertolín, C. Cubel, J.R. Castillo, Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review, *Biosens. Bioelectron.* 49 (2013) 146–158. doi:10.1016/j.bios.2013.05.008.
- [11] S. Rodriguez-Mozaz, M.J. Lopez De Alda, D. Barceló, Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1025–1041. doi:10.1007/s00216-006-0574-3.
- [12] N. Sharma, C. Petri, U. Jonas, M. Bach, G. Tovar, K. Mrkvová, M. Vala, J. Homola, W. Knoll, J. Dostálek, Molecularly Imprinted Polymer Waveguides for Direct Optical Detection of Low-Molecular-Weight Analytes, *Macromol. Chem. Phys.* 215 (2014) 2295–2304. doi:10.1002/macp.201400260.
- [13] V.S. Morozova, A.I. Levashova, S.A. Eremin, Determination of pesticides by enzyme immunoassay, *J. Anal. Chem.* 60 (2005) 202–217. doi:10.1007/s10809-005-0075-0.

- [14] J. Tschmelak, M. Kumpf, N. Käppel, G. Proll, G. Gauglitz, Total internal reflectance fluorescence (TIRF) biosensor for environmental monitoring of testosterone with commercially available immunochemistry: Antibody characterization, assay development and real sample measurements, *Talanta*. 69 (2006) 343–350. doi:10.1016/j.talanta.2005.09.048.
- [15] C. La Rocca, A. Mantovani, From environment to food: The case of PCB, *Ann. Ist. Super. Sanita*. 42 (2006) 410–416.
- [16] L. Turrio-Baldassarri, A. di Domenico, A.R. Fulgenzi, N. Iacovella, C. La Rocca, Differences in polychlorobiphenyl (PCB) contamination patterns in various environmental matrices, *Sci. Total Environ*. 134 (1993) 1439–1451. doi:10.1016/S0048-9697(05)80149-4.
- [17] J. Kozłowska-Tylingo, K. Namiesnik, T. Gorecki, Determination of Estrogenic Endocrine Disruptors in Environmental Samples: A Review of Chromatographic Methods, *Crit Rev Anal Chem*. 40 (2010) 194–201.
- [18] S. Wiegel, A. Aulinger, R. Brockmeyer, H. Harms, J. Löffler, H. Reincke, R. Schmidt, B. Stachel, W. Von Tümpling, A. Wanke, Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries, *Chemosphere*. 57 (2004) 107–126. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.05.017.
- [19] A. Küster, S. Lehmann, A. Hein, J. Schönfeld, Antibiotika in der Umwelt – Wirkung mit Nebenwirkung, *UMID Umwelt Und Mensch - Informationsd.* (2013) 18–28.
- [20] H.-S. Shin, J.-A. Oh, Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in river water by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 541–547. doi:10.1002/jssc.201100574.
- [21] W.W. Buchberger, Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge, *Anal. Chim. Acta*. 593 (2007) 129–139. doi:10.1016/j.aca.2007.05.006.
- [22] D. Fatta-Kassinos, S. Meric, A. Nikolaou, Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: Current state of knowledge and future research, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 251–275. doi:10.1007/s00216-010-4300-9.
- [23] M. Yang Thompson, M., Duncan-Hewitt, W. C., Interfacial properties and the response of the thickness shear-mode acoustic wave sensor in liquids., *Langmuir*. 9 (1993) 802–811.
- [24] B.A. Martin, H.E. Hager, Flow profile above a quartz crystal vibrating in liquid, *J. Appl. Phys.* 65 (1989) 2627–2629. doi:10.1063/1.342771.
- [25] R. Lucklum, P. Hauptmann, Acoustic microsensors-the challenge behind microgravimetry, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 667–682. doi:10.1007/s00216-005-0236-x.
- [26] J. Koryta, J. Dvorak, L. Kavan, *Principles of Electrochemistry*, John Wiley & Sons Ltd, 1993.
- [27] J. Janata, *Principles of Chemical Sensors*, Springer US, Boston, MA, 2009. doi:10.1007/b136378.

- [28] E. Kretschmann, H. Raether, Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light, *Zeitschrift Fur Naturforsch. - Sect. A J. Phys. Sci.* 23 (1968) 2135–2136. doi:10.1515/zna-1968-1247.
- [29] N.B. Colthup, L.H. Daly, S.E. Wiberley, VIBRATIONAL AND ROTATIONAL SPECTRA, in: *Introd. to Infrared Raman Spectrosc.*, Elsevier, 1990: pp. 1–73. doi:10.1016/B978-0-08-091740-5.50004-1.
- [30] A. Brandenburg, V. Hinkov, W. Konz, Integrated Optic Sensors, in: *Sensors*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, n.d.: pp. 399–420. doi:10.1002/9783527620173.ch16.
- [31] S.R. Raz, M. Bremer, W. Haasnoot, Label-free and multiplex detection of antibiotic residues in milk using imaging surface plasmon resonance-based immunosensor, *Chemistry (Easton)*. 81 (2009) 7743–7749. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac901230v>.
- [32] G. Cacciatore, M. Petz, S. Rachid, R. Hakenbeck, A.A. Bergwerff, Development of an optical biosensor assay for detection of β -lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2x*, *Anal. Chim. Acta.* 520 (2004) 105–115. doi:10.1016/j.aca.2004.06.060.
- [33] A. Pennacchio, A. Varriale, M.G. Esposito, A. Scala, V.M. Marzullo, M. Staiano, S. D’Auria, A Rapid and Sensitive Assay for the Detection of Benzylpenicillin (PenG) in Milk, *PLoS One*. 10 (2015) e0132396. doi:10.1371/journal.pone.0132396.
- [34] G. Ozcengiz, A.L. Demain, Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 287–311. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.12.001.
- [35] G. Schneider, *Pharmazeutische Biologie*, B.I.-Wissenschaftsverlag, Mannheim, 1985.
- [36] U. Gräfe, *Biochemie der Antibiotika*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1992.
- [37] R.W. Kessler, *Prozessanalytik: Strategien und Fallbeispiele aus der industriellen Praxis*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 2012.
- [38] R. Sahm, H., Antranikian, G., Stahmann, K.-P., Takors, *Industrielle Mikrobiologie*, Sringer Spectrum, Heidelberg, 2013.
- [39] A. Kheirloomoom, A. Kazemi-Vaysari, M. Ardjmand, A. Baradar-Khoshfetrat, The combined effects of pH and temperature on penicillin G decomposition and its stability modeling, *Process Biochem.* 35 (1999) 205–211. doi:10.1016/S0032-9592(99)00052-7.
- [40] W. Demtröder, *Experimental Physik 2: Elektrizität und Optik*, Springer Verlag, Berlin, 1995.
- [41] G. Gauglitz, *Opto-chemical and opto-immuno sensors in Baltes H, Göpel W, Hesse J, Sensors Update*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1996.
- [42] A. Brecht, *Interferometric measurements used in chemical an biochemical sensors*, Universität Tübingen, 1992.

- [43] E. Hecht, *Optic*, Addison-Wesley, Bonn, 1989.
- [44] G. Gauglitz, A. Brecht, G. Kraus, W. Nahm, Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-)layers, *Sensors Actuators B*. 11 (1993) 21–27. doi:10.1016/0925-4005(93)85234-2.
- [45] G. Proll, L. Steinle, F. Pröll, M. Kumpf, B. Moehrle, M. Mehlmann, G. Gauglitz, Potential of label-free detection in high-content-screening applications, *J. Chromatogr. A*. 1161 (2007) 2–8. doi:10.1016/j.chroma.2007.06.022.
- [46] R. Frank, *Reflektometrische und integriert optische Sensoren für die Bioanalytik*, Universität Tübingen, 2005.
- [47] G. Markovic, Einsatz von Nanopartikeln und optimierten Schichtsystemen für die Signalverstärkung in reflektometrischen Biosensoren, (2008) 119.
- [48] R. Taylor, I. Marenchic, R. Spencer, Antibody- and receptor-based biosensors for detection and process control, *Anal Chim Acta*. 249 (1991) 67–70.
- [49] E. Milkani, C.R. Lambert, W.G. McGimpsey, Direct detection of acetylcholinesterase inhibitor binding with an enzyme-based surface plasmon resonance sensor, *Anal. Biochem.* 408 (2011) 212–219. doi:10.1016/j.ab.2010.09.009.
- [50] W. Zhou, P.-J. Jimmy Huang, J. Ding, J. Liu, Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics, *Analyst*. 139 (2014) 2627. doi:10.1039/c4an00132j.
- [51] D. Nelson, *Lehninger Biochemie*, 4. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, 2009.
- [52] F. Kolarov, Molekular geprägte Nanopartikel als biomimetisches Erkennungselement in der optischen Sensorik, (2014).
- [53] C.I.L. Justino, A.C. Freitas, R. Pereira, A.C. Duarte, T.A.P. Rocha Santos, Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 68 (2015) 2–17. doi:10.1016/j.trac.2015.03.006.
- [54] N. Lavignac, C.J. Allender, K.R. Brain, Current status of molecularly imprinted polymers as alternatives to antibodies in sorbent assays, *Anal. Chim. Acta*. 510 (2004) 139–145. doi:10.1016/j.aca.2003.12.066.
- [55] K. Haupt, Imprinted polymers-tailor-made mimics of antibodies and receptors., *Chem. Commun.* 0 (2003) 171–178. doi:10.1039/b207596b.
- [56] M. Yan, Molecularly imprinted polymers as antibody mimics: Applications in immunoassays and recent developments, *J. Clin. Ligand Assay*. 25 (2002) 234–236.
- [57] G. und T.C. Gauglitz, Vorlesungsskript PCM4 WS16/17, in: 2016.
- [58] P. Atkins, *Physikalische Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1996.
- [59] L. Christensen, Theoretical analysis of protein concentration determination using biosensor technology under conditions of partial mass transport limitation., *Anal. Biochem.* 249 (1997) 153–164. doi:10.1006/abio.1997.2182.
- [60] A. Wulff, G., Sarhan, The Use of Polymers with Enzyme-Analogue Structures for the Resolution of Racemates, *Angew. Chemie., Internatio* (1972) 341.

- [61] K. Wulff, G., Sarhan, A., Zabrocki, Enzyme-Analogue Built Polymers and their Use for the Resolution of Racemates, *Tetrahedron Lett.* 14 (1973) 4329-4332.
- [62] G. Wulff, Molekulares Prägen (Imprinting) in vernetzten Materialien mit Hilfe von Matrizenmolekülen - auf dem Weg zu künstlichen Antikörpern, *Angew. Chemie.* 107 (1995) 1958-1979. doi:10.1002/ange.19951071705.
- [63] C. Alexander, H.S. Andersson, L.I. Andersson, R.J. Ansell, N. Kirsch, I.A. Nicholls, J. O'Mahony, M.J. Whitcombe, Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years up to and including 2003, *J. Mol. Recognit.* 19 (2006) 106-180. doi:10.1002/jmr.760.
- [64] R. Arshady, K. Mosbach, Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization, *Macromol. Chem. Physics-Makromolekulare Chemie.* 182 (1981) 687-692.
- [65] G. Kostrewa, S.; Emgenbroich, M.; Klockow, D.; Wulff, Surface-enhanced Raman scattering on molecularly imprinted polymers in water, *Macromol. Chem. Phys.* 204 (2003) 481-487.
- [66] H.S. Andersson, et al., Study of the nature of recognition in molecularly imprinted polymers, II [1] - Influence of monomer-template ratio and sample load on retention and selectivity, *J. Chromatogr. A.* 848 (1999) 39-49.
- [67] D.J. O'Shannessy, B. Ekberg, K. Mosbach, Molecular Imprinting of Amino Acid Derivatives Temperature (0 °C) Using Photolytic Homolysis of Azobisnitriles, *Anal. Biochem.* 177 (1989) 144-149.
- [68] T. Jing, X.D. Gao, P. Wang, Y. Wang, Y.F. Lin, X.Z. Hu, Q.L. Hao, Y.K. Zhou, S.R. Mei, Determination of trace tetracycline antibiotics in foodstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with selective molecular-imprinted solid-phase extraction, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 2009-2018. doi:10.1007/s00216-009-2641-z.
- [69] P.-C. Cacho C, Turiel E, Martin-Esteban A, C.C. e C, Characterisation and quality assessment of binding sites on a propazine- imprinted polymer prepared by precipitation polymerisation, *J. Chromatogr. B.* 802 (2004) 347-353.
- [70] C.J. Tan, Y.W. Tong, Preparation of superparamagnetic ribonuclease A surface-imprinted submicrometer particles for protein recognition in aqueous media, *Anal. Chem.* 79 (2007) 299-306. doi:10.1021/ac061364y.
- [71] H. Sedlacek, *Antibodies as Carriers of Cytotoxicity*, Karger, Basel, 1992.
- [72] P. Weber, B.R. Riegger, K. Niedergall, G.E.M. Tovar, M. Bach, G. Gauglitz, Nano-MIP based sensor for penicillin G: Sensitive layer and analytical validation, *Sensors Actuators, B Chem.* Submitted (2017).
- [73] L.I. Andersson, Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field, *J. Chromatogr. B.* 745 (2000) 3-13.
- [74] M.-C. Hennio, Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 856 (1999) 3-54. doi:10.1016/S0021-9673(99)00832-8.

- [75] M. Kempe, Antibody-mimicking polymers as chiral stationary phases in HPLC., *Anal. Chem.* 68 (1996) 1948–53. doi:10.1021/ac9512160.
- [76] E. Board, H.C.A.H.M.J. Krische, L.S. V Ley, M.O.J. Thiem, M.V.P. Vogel, W.H.W.H. Yamamoto, *Molecular Imprinting*, 2012. doi:10.1007/978-3-642-28421-2.
- [77] R.J. Ansell, Molecularly imprinted polymers in pseudoimmunoassay, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 804 (2004) 151–165. doi:10.1016/j.jchromb.2004.02.022.
- [78] K. Haupt, K. Mosbach, Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors, *Chem. Rev.* 100 (2000) 2495–2504. doi:10.1021/cr990099w.
- [79] M. Dickert, F. L.; Forth, P.; Lieberzeit, P.; Tortschanoff, Molecular imprinting in chemical sensing - detection of aromatic and halogenated hydrocarbons as well as polar solvent vapors, *Fresenius J. Anal. Chem.* 360 (1998).
- [80] A. V. Sergeeva, T. A.; Piletsky, S. A.; Brovko, A. A.; Slinchenko, E. A.; Sergeeva, L. M.; Panasyuk, T. L.; Elskaya, Conductometric sensor for atrazine detection based on molecularly imprinted polymer membranes, *Analyst.* 124 (1999) 331.
- [81] Kriz D., Mosbach, K., Competitive amperometric morphine sensor-based on an agarose immobilized molecularly imprinted polymer, *Anal. Chim. Acta.* 300 (1995) 71–75.
- [82] M.C. Moreno-bondi, F. Navarro-villoslada, E. Benito-peña, J.L. Urraca, Molecularly Imprinted Polymers as Selective Recognition Elements in Optical Sensing, *Anal. Chem.* 4 (2008) 316–340. doi:10.2174/157341108785914925.
- [83] O.Y.F. Henry, D.C. Cullen, S.A. Piletsky, Optical interrogation of molecularly imprinted polymers and development of MIP sensors: a review, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 947–956.
- [84] O. Slinchenko, A. Rachkov, H. Miyachi, M. Ogiso, N. Minoura, Imprinted polymer layer for recognizing double-stranded DNA, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2004) 1091–1097. doi:10.1016/j.bios.2004.06.027.
- [85] D.C. Nopper, Charakterisierung neuartiger sensitiver Materialien für optische Sensoren in flüssiger Phase, Universität Tübingen, 2000.
- [86] D. Nopper, O. Lammershop, G. Wulff, G. Gauglitz, Amidine-based molecularly imprinted polymers-new sensitive elements for chiral chemosensors, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 608–613. doi:10.1007/s00216-003-2145-1.
- [87] A.S. Belmont, S. Jaeger, D. Knopp, R. Niessner, G. Gauglitz, K. Haupt, Molecularly imprinted polymer films for reflectometric interference spectroscopic sensors, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 3267–3272. doi:10.1016/j.bios.2007.01.023.
- [88] A.G. Johnson, *Immunologie auf 70 Seiten*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2001.
- [89] L. Stryer, *Biochemie, Kapitel: Molekulare Immunologie*, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg, 1990.
- [90] B.G. Pezzutto A, Ulrichs T, *Taschenatlas der Immunologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2007.

- [91] F.W. Alt, T.K. Blackwell, G.D. Yancopoulos, Development of the primary antibody repertoire, *Science* (80-.). 238 (1987) 1079–1087.
- [92] B.B. Schütt C., *Grundwissen Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2011.
- [93] J. Engels, F. Lottspeich, *Bioanalytik*, Springer Spektrum, Heidelberg, 2012.
- [94] M.C. Köhler KG, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*. 256 (1975) 495–497.
- [95] D.E. Koshland, Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 44 (1958) 98–104. doi:10.1073/pnas.44.2.98.
- [96] J. Piehler, A. Brecht, M. Zerlin, C. Maul, R. Thiericke, S. Grabley, Label-Free Monitoring of DNA – Ligand Interactions, *Anal. Biochem.* 102 (1997) 94–102.
- [97] B.P. Möhrle, M. Kumpf, G. Gauglitz, Determination of affinity constants of locked nucleic acid (LNA) and DNA duplex formation using label free sensor technology, *Analyst*. 130 (2005) 1634. doi:10.1039/b507728a.
- [98] R.J. Umpleby, S.C. Baxter, Y. Chen, R.N. Shah, K.D. Shimizu, Characterization of molecularly imprinted polymers with the Langmuir-Freundlich isotherm., *Anal. Chem.* 73 (2001) 4584–4591. doi:10.1021/ac0105686.
- [99] R.A. Dudley, P. Edwards, R.P. Ekins, D.J. Finney, I.G. McKenzie, G.M. Raab, D. Rodbard, R.P. Rodgers, Guidelines for immunoassay data processing, *Clin. Chem.* 31 (1985) 1264–1271.
- [100] M. Ewald, *Entwicklung und Charakterisierung einer portablen Biosensorplattform zur markierungsfreien*, Universität Tübingen, 2014.
- [101] G. Hemminger, W. and G. Höhne, *Grundlagen der Kalorimetrie*, Verl. Chemie., Weinheim, Germany, 1979.
- [102] T. Morawietz, *Kovalente Immobilisierung von Acrylat-Copolymerpartikeln auf Glas und glasähnlichen Oberflächen mittels Klick Chemie für Sensoranwendungen*, Hochschule Esslingen / Hochschule Aalen, 2011.
- [103] M. Reschke K. Schügerl, Reactive extraction of penicillin I: Stability of penicillin G in the presence of carriers and relationships for distribution coefficients and degrees, *Chem. Eng. J.* 28 (1984) B1–B2.
- [104] J.P. Hou, J.W. Poole, β -lactam antibiotics: Their physicochemical properties and biological activities in relation to structure, *J. Pharm. Sci.* 60 (1971) 503–532. doi:10.1002/jps.2600600402.
- [105] V.D.P. Herschbach GJM, Van Der Beek CP, The penicillins: properties, biosynthesis, and fermentation., *Biotechnol. Ind. Antibiot.* (1984) 45–104.
- [106] M. Herriott, A SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION METHOD FOR THE OF PENICILLIN * A physicochemical method has been developed by which 5 to 75 y (8 to 120 Oxford units) of penicillin per ml . may be determined within an error of f5 per cent . The procedure requires abo, (1946) 725–737.

- [107] A. Salois, I. Perez, E. Palma, E. Goolish, Y. Griko, Evaluation of the Chemical Integrity of Beta-Lactam Antibiotics by Iodine-Based Assay, (2015) 91–99.
- [108] I. Toscano, J. Gascon, M.-P. Marco, J.C. Rocha, D. Barceló, Atrazine interaction with tropical humic substances by Enzyme Linked Immunosorbent Assay, *Analisis*. 26 (1998) 130–134. doi:10.1051/analisis:1998122.
- [109] K.D. Deng A, Zhu Q-Z, Frey S, Sengl M, Buchberger W, Niessner R, Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC-MS, *Env. Sci Technol*. 37 (2003) 3420–3429.
- [110] E.M. Brun, M. Garcés-García, M.J. Bañuls, J. a Gabaldón, R. Puchades, A. Maquieira, Evaluation of a novel malathion immunoassay for groundwater and surface water analysis., *Environ. Sci. Technol*. 39 (2005) 2786–2794. doi:10.1021/es048945u.
- [111] <http://www.fraktur-magazin.de/spots/publikationen/neckartalradweg/neckartalradweg.php>.
- [112] S. Rau, – Vom Antikörper zum Immunoassay – Nachweis und Quantifizierung des nichtsteroidalen Antirheumatikums Diclofenac in relevanten Matrices, Universität Tübingen, 2015.
- [113] T.N. Auldish MJ, Walsh BJ, Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand, *J Dairy Res*. 65 (1998) 401–411.

7 Anhang

7.1 Abkürzungverzeichnis

a	mittlere Bindungsaktivität
A₁	obere Asymptote
A₂	untere Asymptote
A_{0,t}	transmittiertes Licht
A_{0,r}	reflektiertes Licht
A_{0,e}	einfallendes Licht
Abb.	Abbildung
AFM	Rasterkraftmikroskop
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AMD	Aminodextran
6-APA	6-Aminopenicillansäure
APTES	Aminopropyltriethoxysilan
b	Breite des Flusskanals
BSA	Rinderserumalbumin (bovine seum albumin)
BSE	Rückstreuelektronen
c	Stoffkonzentration
c	Lichtgeschwindigkeit innerhalb von Materie
c₀	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum
C	konstante Domänen
CDR	Complementarity Determining Region
CES	Carboxyethylsilanetriol
d	Physikalischw Schichtdicke
D	Diffusionskoeffizienz

d.h.	das heißt
Da	Dalton
DA-PEG	Diamino-Polyethylenglycol
DC-PEG	Dicarboxy-Polyethylenglycol
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMF	N, N- Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Extinktion
EBA	Ethylen-bis-acrylamid
F	Fließgeschwindigkeit
Fab	fragment of antigen binding
Fc	Constant fragment
Gl.	Gleichung
GOPTS	Glycidylpropyl-trimethoxysilan
h	Höhe des Flusskanals
h	Stunde
H	Schwere Kette des Antikörpers
HYMOPTA	2-Hydroxy-3-methacryloyloxy-propyltrimethyl- ammoniumchlorid
H₂O	Wasser
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
H₂SO₄	Schwefelsäure
I	Intensität
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
Ig	Immunglobuline
J_D	Diffusionsfluss
K	Gleichgewichtskonstante
k_a	Assoziationsratenkonstante

k_d	Dissoziationsratenkonstante
K_{aff}	Affinitätskonstante
K_d	Dissoziationskonstante
l	Länge des Flusskanals
L	Ligand
L	leichte Kette
L-BFA	L-Boc-Phenylalaninanilid
LED	Leuchtdiode
LOD	Nachweisgrenze (limit of detection)
LOQ	Bestimmungsgrenze (limit of quantification)
M	molare Masse
M	mol/L
MeOH	Methanol
MIP	Molekular geprägtes Polymer
n	Brechungsindex
NAEMA	N-(2-aminoethyl) methacrylamid hydrochlorid
NIP	Nicht geprägtes Polymer
OVA	Ovalbumin
p	Steigung der Logistikkurve am Testmittelpunkt
PBP	Penicillin bindendes Protein
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEG	Polyethylenglycol
PenG	Penicillin G
pH	Stärke des Wasserstoffs (potentia hydrogenii)
PMMA	Polymethylmethacrylat
R	Reflexion
R	Rezeptor

RL	Rezeptor-Ligand-Komplex
r	Abstand
REM	Rasterelektronenmikroskop
RIfS	Reflektometrische Interferenz Spektroskopie
RT	Raumtemperatur
sdv	Standardabweichung
S_R	Referenzsignal
S_{MIP}	MIP-Messsignal
S_{NIP}	NIP-Messsignal
SE	Sekundärelektronen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPE	Festphasen-Extraktion (Solid Phase Extraction)
SPR	Oberflächenresonanzspektroskopie (Surface Plasmon Resonance)
T	Transmission
UV-Vis	Ultraviolett-visible
WF	Wiederfindungsrate
WW	Wechselwirkung
x	freier Analyt
x	Analytkonzentration
x₀	Analytkonzentration am Testmittelpunkt
Δnd	Änderung der optischen Schichtdicke
1-c	Heterogenitätsindex
α	Einfallswinkel
α'	Ausfallswinkel
δ	Dicke der Diffusionsschicht
ε	Elektrische Feldkonstante
Γ(t)	Oberflächenbelegung

Γ_{GG}	Gleichgewichtsbeladung der Oberfläche
Γ_{max}	Maximalbeladung der Oberfläche
[...]	Konzentration
$\partial c / \partial x$	Konzentrationsgradient in x-Richtung
°	Grad
°C	Grad Celsius

7.2 Akademische Lehrer

Prof. Dr. Klaus Albert, Prof. Dr. Reiner Anwander, Prof. Dr. Thomas Chassé, Prof. Dr. Dines Christen, Prof. Dr. Günter Gauglitz, Prof. Dr. Stephanie Grondt, Prof. Dr. Jörg Ihringer, Prof. Dr. Walter Jäger, Dr. Stefan Keppeler, Prof. Dr. Norbert Kuhn, Prof. Dr. Doris Kunz, PD Dr. Hans-Georg Mack, Prof. Dr. Hermann A. Mayer, Prof. Dr. Martin E. Maier, Prof. Dr. Alfred J. Meixner, Prof. Dr. Hans-Jürgen Meyer, Prof. Dr. Boris J. Nachtsheim, Prof. Dr. Ulrich Nagel, Prof. Dr. Christian Ochsenfeld, PD Dr. Heiko Peisert, Prof. Dr. Michael Schwarz, Prof. Dr. Eberhard Schweda, Prof. Dr. Bernd Speiser, Prof. Dr. Udo Weimar, Prof. Dr. Lars Wesemann, Dr. Dorothee Wistuba, Prof. Dr. Klaus-Peter Zeller, Prof. Dr. Thomas Ziegler

7.3 Veröffentlichungen

7.3.1 Publikationen

P. Fechner, P. Weber, et. Al. (2014) Size does matter! Label-free detection of small molecule–protein interaction, *Anal Bioanal Chem*, 406: 4033–4051, DOI: 10.1007/s00216-014-7834-4.

P. Weber, B. Riegger, M. Bach, G. Tovar, G. Gauglitz (2015) Markierungsfreie optische Detektion von Antibiotika zur in-line Prozessanalytik, Tagungsband 12. Dresdner Sensor-Symposium, 6.3 Biosensorik, 95-98, DOI:10.5162/12dss2015/6.3.

P. Weber, J. Vogler, G. Gauglitz (2017) Development of an optical biosensor for the detection of antibiotics in the environment, *Proc. SPIE, Optical Sensors 2017*, 102312L, DOI:10.1117/12.2267467.

F. Schenk, P. Weber, J. Vogler, L. Hecht, A. Dietzel, G. Gauglitz (2017) Development of a paper-based lateral flow immunoassay for simultaneous detection of lipopolysaccharides of *Salmonella* serovars, *Anal Bioanal Chem*, DOI: 10.1007/s00216-017-0643-9.

7.3.2 Vorträge

2013 P. Weber, U. Hilbig, G. Proll, G. Gauglitz: „Charakterisierung optischer Eigenschaften von Seren zur Detektion von Blutparameter mittels Fluoreszenzmarkern“, 7. Interdisziplinäres Doktorandenseminar der Arbeitskreise Prozessanalytik, Chemo- und Biosensoren, Elektrochemische Analysemethoden, Chemometrik und Qualitätssicherung der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Berlin, Deutschland.

2015 P. Weber, B. Riegger, M. Bach, G. Tovar, G. Gauglitz: „Markierungsfreie optische Detektion von Antibiotika zur in-line Prozessanalytik“, 12. Dresdner Sensor-Symposium, Dresden, Deutschland.

2016 P. Weber, B. Riegger, M. Bach, G. Tovar, G. Gauglitz: „Label-free optical detection of antibiotics for in-line process analytics“, XIII. EUROPT(R)ODE, Graz, Österreich.

P. Weber, B. Riegger, M. Bach, G. Tovar, G. Gauglitz: „Optical detection of antibiotics for in-line monitoring of fermentation processes“, Interdisziplinäres Doktorandenseminar des Deutschen Arbeitskreises für Analytische Spektroskopie (DAAS), Ulm, Deutschland.

P. Weber, B. Riegger, M. Bach, G. Tovar, G. Gauglitz: „Biomimetic sensor for optical detection of antibiotics for in-line process analysis“, 6th EuCheMS, Sevilla, Spanien.

- 2017 P. Weber, B. Riegger, M. Bach, G. Tovar, G. Gauglitz: „In-line monitoring of antibiotics in fermentation processes with a biomimetic optical sensor“, 1. European BioSensor Symposium, Potsdam, Deutschland.
- P. Weber, B. Riegger, M. Bach, G. Tovar, G. Gauglitz: „Biomimetischer Sensor für die optische Detektion von Antibiotika während Fermentationsprozessen“, ANAKON, Tübingen, Deutschland.
- P. Weber, B. Riegger, M. Bach, G. Tovar, G. Gauglitz: „In-line monitoring of antibiotics in fermentation processes with a biomimetic optical sensor“, XIX Euroanalysis, Stockholm, Schweden.

7.3.3 Poster

- 2013 P. Weber, U. Hilbig, G. Proll, G. Gauglitz: „Characterization of optical properties of human sera to detect laboratory parameters via fluorescence markers“, XIII. Euroanalysis, Warschau, Polen.
- 2014 P. Weber, U. Hilbig, G. Proll, G. Gauglitz: „A homogeneous Immunoassay in human serum to detect C-reactive protein via Förster-Resonance-Energy-Transfer“, XII. EUROPT(R)ODE, Athen, Griechenland.
- P. Weber, U. Hilbig, G. Proll, G. Gauglitz: „Development of a FRET Immunoassay for the detection CRP in human sera“, Analytika, München, Deutschland.
- 2015 P. Weber, U. Hilbig, G. Proll, G. Gauglitz: „Entwicklung eines FRET basierenden homogenen Immunoassays zur Detektion von CRP“, 9. Deutsches BioSensor Symposium, München, Deutschland.
- P. Weber, B. Riegger, M. Bach, G. Tovar, G. Gauglitz: „Entwicklung eines Biomimetischen Sensors zur inline Prozessanalytik“, ANAKON, Graz, Österreich.
- 2017 J. Adam, P. Weber, J. Vogler, G. Gauglitz: „Entwicklung eines multiparametrischen Lateral Flow Assays zum Nachweis von C-reaktivem Protein und Salmonellen-Lipopolysacchariden für die Point-of-Care-Diagnostik“, 3. Müncher Point-of-Care-Testing Symposium, München, Deutschland.
- J. Adam, P. Weber, J. Vogler, G. Gauglitz: „Paper-based detection of C-reactive protein for point-care diagnostics“, 1. European BioSensor Symposium, Potsdam, Deutschland.

J. Adam, P. Weber, J. Vogler, G. Gauglitz: „Multiparametrischer Lateral Flow Assay zum Nachweis von CRP neben verschiedenen Salmonellen-Lipopolysacchariden“, ANAKON, Tübingen, Deutschland.

P. Weber, J. Vogler, G. Gauglitz: „Development of an optical biosensor for the detection of antibiotics in environment“, SPIE Optics + Optoelectronics, Prag, Tschechische Republik.

P. Weber, J. Vogler, F. Schenk, L. Hecht, G. Gauglitz: „Multiparametric lateral flow assay for the detection of CRP and different *salmonella* lipopolysaccharides“, XIX Euroanalysis, Stockholm, Schweden.

7.4 Lebenslauf

Seit 06/2013	Doktorandin, Analytische Chemie, Eberhard Karls Universität Tübingen, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Günter Gauglitz Thema der Dissertation: “ Optische Sensoren zum Nachweis von Penicillin G in der Prozess- und Umweltanalytik“
10/2009 – 04/2013	Hauptstudium (Chemie), Eberhard Karls Universität Tübingen Thema der Diplomarbeit: „Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung von Humanseren und markierten Antikörper-Antigen Paaren zur Entwicklung eines FRET basierenden Immunoassays“
10/2007 – 09/2009	Grundstudium (Chemie), Eberhard Karls Universität Tübingen
09/2006 – 08/2007	Freiwilliges Ökologisches Jahr, Fernwärme Ulm GmbH
09/2003 – 06/2006	Biotechnologisches Gymnasium Valckenburgschule, Ulm
09/1997 – 06/2003	Friedrich-Schiller-Realschule, Langenau
12/1995 – 06/1997	Albecker-Tor-Grundschule, Langenau
08/1993 – 12/1995	Bodelschwingh Grundschule, Bendorf