

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

Ausgewählte Probleme der Biosensorapplikation in der Lebensmittelproduktion und Beiträge zu deren Lösung

Birgit Schulz¹, Alexander Schwock², Peter U. Abel^{1,3}, Ulrich Guth¹

¹Forschungszentrum Sensorik Greifswald e.V., Brandteichstraße 19, 17489 Greifswald

²BCS Bio- und ChemoSensoren GmbH, Brandteichstraße 19, 17489 Greifswald

³Institut für Pathophysiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Greifswalder Straße 11 a, 17495 Karlsburg

Registriernummer der Online-Anmeldung: 159

Poster

Einleitung

In zahlreichen Bereichen der Lebensmittelherstellung sind solche Parameter für die Prozeßüberwachung und / oder die Qualitätskontrolle von Bedeutung, die mit Hilfe enzymatischer Biosensoren rasch und zuverlässig erfaßt werden können. Eine besondere Rolle spielt dabei die Milchsäure (Lactat), die als mikrobielles Stoffwechselprodukt einen Marker für die Keimbelastung verschiedener Lebensmittel, z.B. Milch, Fruchtsaft, Wurstprodukte, darstellt. Bei der Kultivierung von Milchsäurebakterienstämmen für die Produktion fermentierter Milchprodukte hingegen dient die Lactatkonzentration als Indikator für die Stoffwechselaktivität der Bakterien und damit für den optimalen Erntezeitpunkt. Für die Bestimmung der Konzentration anderer enzymatisch-elektrochemisch detektierbarer Substanzen wie Glucose, Ethanol oder Sulfit besteht ebenfalls Bedarf in einzelnen Produktionslinien zur Produkt- oder Prozeßüberwachung.

Da in jedem einzelnen Anwendungsgebiet individuelle und spezifische Untersuchungsbedingungen vorliegen, müssen Probemedium und Sensor fallspezifisch aufeinander abgestimmt werden. Das gelingt entweder durch Probenaufbereitung, was jedoch die Analysenzeiten verlängert, das Verfahren verteuert und eine on line - Bestimmung erschwert, oder durch eine Anpassung des Biosensors an die besonderen Anforderungen jedes einzelnen Anwendungsgebietes.

Anpassung an hohe Konzentrationsbereiche

Häufig kommen die zu analysierenden Substanzen in Lebensmitteln in so hohen Konzentrationen vor, daß alle Bindungsstellen eines auf der relativ kleinen Sensorfläche einer Chipelektrode immobilisierten Enzyms sofort mit Analyt gesättigt würden und der Sensorstrom demnach nicht mehr analytkonzentrationsabhängig wäre. Durch Bedeckung des Enzymimmobilisates mit

diffusionslimitierenden Membranen oder Membransystemen wird der Zustrom des Analyten zum Enzym proportional zu seiner Konzentration limitiert und auf diese Weise der lineare Meßbereich erweitert. Die Analytdiffusion kann entweder durch die Fläche der Perforation(en) in einer an sich analytundurchlässigen Membran [1] oder durch Bereiche in einer inhomogen permeablen Membran, z.B. durch Poren erfolgen. Im ersten Fall ist der Meßbereich von der Fläche der Perforation(en), im zweiten Fall von der Dicke der Polymerschicht abhängig. Für niedrige Konzentrationsbereiche werden Sensoren mit hoher Sensitivität geschaffen, bei Ausdehnung des Meßbereiches sinkt die Sensitivität. Während ein Glucose- oder Lactatsensor ohne Diffusionslimitierung bis maximal 2 mM linear arbeitet, ist mit den genannten Verfahren eine Meßbereichserweiterung auf mindestens 100 mM möglich. In Vorbereitung von Lactatsensoren für die Fermentationskontrolle von Starterkulturen wurden sogar Meßbereiche bis zu 300 mM realisiert.

Anpassung an interferierende Substanzen

Mit dem klassischen enzymatisch-amperometrischen Biosensor wird das bei der enzymatischen Umsetzung gebildete Wasserstoffperoxid bei einer Polarisationsspannung der Elektrode von 700 mV detektiert. Diese Betriebsweise ist nur eingeschränkt anwendbar, wenn in dem Untersuchungsmedium Substanzen enthalten sind, die unter diesen Bedingungen ebenfalls an der Elektrode umgesetzt werden. Diese Erscheinung ist bei einer Vielzahl von Lebensmitteln zu beobachten, beispielsweise in Fruchtsäften, im Zuckerrübenrohsaft oder im Prozeßwasser der Produktion von Pommes frites. In einzelnen Fällen genügt die Applikation eines geeigneten Polymerfilmes auf der Arbeitselektrode, um den Interferenzeinfluß zurückzudrängen, wie am Beispiel von Glucosesensoren für die Überwachung des Prozesses der Pommes frites - Produktion gezeigt werden konnte. Auch der Einfluß elektroaktiver Verbindungen aus dem Zuckerrübenrohsaft konnte auf diese Weise reduziert werden. Da in diesem Medium zusätzlich ein instabiler und geringer Sauerstoffpartialdruck vorliegt, ist die Anwendung eines Mediators indiziert. Liegt ausreichend gelöster Sauerstoff vor, kann durch Messung der Signaldifferenz bei -700 mV zwischen einem enzymfreien und einem enzymbeladenen Sauerstoffsensor, der den Sauerstoffverbrauch der enzymatischen Reaktion erfaßt, die Analytkonzentration bestimmt werden. Auf diese Weise konnten im neutralisierten Fruchtsaft die relevanten Lactatkonzentrationen von 0,1 bis 1,0 mM zuverlässig analysiert werden.

Anpassung an Sauerstoffmangelbedingungen

Mediatoren übernehmen bei Fehlen von Sauerstoff dessen Funktion und übertragen die vom Analyten an das Enzym abgegebenen Elektronen vom Enzym zur Elektrode. Die dafür erforderliche Polarisationsspannung liegt weit unterhalb 700 mV, bei Ferrocen und Ferrocenderivaten im Bereich von 200 bis 400 mV. Diese Meßsituation hat nicht nur den Vorteil, vom Sauerstoff unabhängig zu sein, sie verringert auch das Risiko unspezifischer Elektrodenreaktionen, da die meisten Substanzen erst bei höheren Spannungen oxidiert werden.

Für viele Anwendungen im Bereich der Lebensmittelanalytik ist die Arbeit unter sauerstoffarmen oder -freien Bedingungen von großer Bedeutung. So erfolgt beispielsweise die Fermentation von Milchsäurebakterien, die als Starterkulturen genutzt werden, unter Schutzgasatmosphäre. Die Sauerstoffsättigung in Zuckerrübenrohsaft beträgt gerade 5 % von der in Pufferlösung, im unbehandelten Fruchtsaft ist kein Sauerstoff gelöst. In Fleisch- und Wurstprodukten, deren Güte mit Hilfe von Lactatsensoren eingeschätzt werden kann, stets ebenfalls kein Sauerstoff zur Verfügung.

Das Beispiel der Modifizierung von Biosensoren für eine kontinuierliche Glucosebestimmung in Zuckerrübenrohsaft zeigt die Probleme der Immobilisierung des aktiven Mediators, seiner Stabilität im Immobilisat und seiner wirksamen Wechselwirkung mit der immobilisierten Glucoseoxidase. Lösungsvarianten werden vorgestellt und Vergleiche mit Lactatsensoren analoger Präparationen vorgenommen.

Zusammenfassung

Um Biosensoren als reagenzienfreie Vor-Ort-Analysatoren in der Lebensmittelanalytik und -produktion einsetzen zu können, sind diese in ihrem Aufbau an die individuellen Eigenschaften des Mediums und die Bedingungen seiner Untersuchung anzupassen. Hohe Analytkonzentrationen, die Gegenwart interferierender Substanzen sowie ein mangelndes Sauerstoffangebot können durch Anwendung geeigneter technologischer Maßnahmen bei der Sensorgestaltung in gewissen Grenzen kompensiert werden.

Literatur

- [1] P. U. Abel, W. Kautek, Th. von Woedtke, J. Krüger; Membran und Anordnung für definierten Analyt-Transfer; DE 195 47 923 A1, Offenlegung 25.11.1999