

*Schnelle enzymatische Analysen
durch Δ pH-Sensortechnik*

Darstellung des innovativen Messverfahrens

Dr. Lóránt Bucsis

SCHLAG

Ü B E R B L I C K

1. Δ pH-Sensortechnik bei Enzym/Substrat Umsetzungen eröffnet neuen analytischen Weg
 - 2.1 Allgemeines zum Messprinzip
 - 2.2 Messgerät Modell CL 10 Plus
 - 2.3 Messablauf am Beispiel der Harnstoff-Bestimmung
 - 2.4 Der Laborautomat MICROLAB[®] EFA

3. **Arbeitsmethoden für Milchuntersuchungen**
 - 3.1 Harnstoff
 - 3.2 Lactose
 - 3.3 Milchsäure (L-Lactat)

4. **Arbeitsmethoden für Wein-, Most-, und Fruchtsaftuntersuchungen**
 - 4.1 Der Combi-Test. Simultane Messung von D-Glucose + D-Fructose (Summe), Gesamtacidität und pH-Wert
 - 4.2 D-Glucose + D-Fructose (Summe)
 - 4.3 Milchsäure (L-Lactat)
 - 4.4 Äpfelsäure (L-Malat)
 - 4.5 Gesamtacidität
 - 4.6 Essigsäure (Acetat)
 - 4.7 Saccharose

5. Ausblick

6. **Vertrieb und Kontaktadresse**

1. Δ pH-Sensortechnik bei Enzym/Substrat Umsetzungen eröffnet neuen analytischen Weg

Enzymatische Arbeitsbestecke mit UV-Detektion als Messgröße sind weit verbreitet. Als markanter Nachteil hat sich jedoch die langwierige Probenvorbereitung, besonders in Laboratorien ohne Automaten, herausgestellt. Die Aufarbeitung ist zwingend, da die Lichtabsorption als Messgröße ermittelt wird.

Die handlichen Biosensoren mit immobilisierten Enzymen können, mit Hilfe ihres elektrochemischen Nachweises der Enzym/Substrat-Umsetzung, sehr schnell und direkt aus komplexen Matrices Substrate messen. Allerdings werden nur die gängigsten Substrate erfasst, da allein für eine geringe Anzahl von Messparametern enzymebelegte Membranen zur Verfügung stehen.

Ein breiteres Spektrum an messbaren Substraten und Enzymen ermöglicht die Methode, die mit der Enzym/Substrat-Umsetzung gekoppelten pH-Wert-Änderung als Messgröße erfasst. Die Vorgaben, Spezifität einer enzymatischen Umsetzung zur Analytik auszunützen, sowie Detektion dieser in stark matrixbelasteten Materialien ohne (oder mit minimaler) Probenvorbereitung, erfüllt die Methode der Δ pH-Sensortechnik.

Dieses Messprinzip wurde in den Modellen CL 10 und MICROLAB[®] EFA realisiert. Eine große Palette fertig konfektionierter Arbeitsbestecke ermöglicht die einfache und extrem schnelle Analyse von Flüssigkeiten wie z.B. Milch, Wein, Most, Fruchtsaft, Sauertunken etc. auf eine Vielzahl von praxisrelevanten Parametern.

2.1 Allgemeines zum Messprinzip

Enzym/Substrat-Umsetzungen sind meistens auch mit pH-Änderungen verbunden, wobei Produktion oder Verbrauch an H^+ für die Konzentration des zu bestimmenden Analyten in der Probe typisch ist. Ein mit Kapillar-pH-Elektroden ausgerüstetes Multiparameter-Messgerät bestimmt die pH-Werte vor und nach der Umsetzung. Aus der resultierenden pH-Differenz wird dann auf den fraglichen Probeninhaltsstoff oder auf das Enzym gefolgert. Praktisch bedeutet dies: mit ΔpH -Messungen können im Grunde genommen alle biochemischen Umsetzungen, die mit pH-Änderung einhergehen, nachgewiesen werden, z.B. besonders bei Übergängen wie:

$NADH + H^+ \leftrightarrow NAD^+$, $NADPH + H^+ \leftrightarrow NADP^+$, $ATP \leftrightarrow ADP + H^+$, Decarboxylierungen und Carboxylierungen (Abbau und Aufbau von Carbonsäuren), Abbau von Aminosäuren bzw. Proteinen (Entstehen von Ammoniak), Verseifungen (Lipolysen) oder Veresterungen (Verbrauch und Bildung von freien Fettsäuren) usw.

Der Zielanalyt kann, je nach Fragestellung, ein niedermolekulares Substrat oder die Aktivität eines Enzyms sein.

2.2 Messgerät Modell CL 10 Plus

Die praktische Realisierung des Messverfahrens wird am halb-automatischen Analysator Modell CL 10 der Firma Biocontrol Systems/Italien dargestellt. Die vollautomatische Variante wird im Kapitel 2.4 (MICROLAB[®] EFA) beschrieben.



Abb. 1: Enzymanalysator Modell CL 10 Plus

Das „Herzstück“ des innovativen Messinstrumentes CL 10 bilden die zwei Kapillar-Glas-Elektroden, die zur Messung von pH-Änderungen $< 0,0005$ pH-Einheiten (!) ausgelegt wurden. Zur Vermeidung von Missverständnissen sei darauf hingewiesen, dass zwischen den parallel geschalteten Elektroden pH-Differenzen und nicht absolute pH-Werte gemessen werden.

Über die serielle RS 232 Schnittstelle ist das CL 10 mit einem separaten PC verbunden, damit die systemeigene Windows Software die Substratkonzentrationen oder Enzymaktivitäten berechnen kann. Die Reaktion wird dabei parameterspezifisch durch eine geeignete Methode (kinetisch, Endpunkt oder Fixzeit) ausgewertet. Programmierbare Inkubation- und Ableseintervalle während des Reaktionsverlaufs bieten dem Anwender die Möglichkeit zur eigenen Messmethoden Entwicklung und Optimierung. Die typischen Messzeiten für Parameter aus der Lebensmittelanalytik liegen zwischen 1-2 Minuten. Der zeitliche Verlauf des Δ pH-Wertes ist dabei auf dem Bildschirm stets grafisch und numerisch nachvollziehbar. Die Analyse ist weitgehend matrixfrei, weil hier das Reaktionsgeschehen nicht durch Messung der UV-Absorption, sondern durch Messung von pH-Differenzen ermittelt wird. Trübe Lebensmittelproben und Partikel bis 0,3 mm Durchmesser stören den Messvorgang nicht.

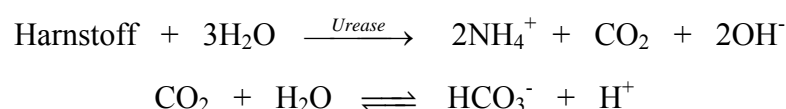
Aus diesem Grund ist der Einsatz des CL 10 auf dem weiten Feld der enzymatischen Lebensmittelanalytik, darunter Milch, Milchprodukte, Wein, trübe Fruchtsäfte, Most, Fermenterinhalte usw. extrem vorteilhaft.

2.3 Messablauf am Beispiel der Harnstoff-Bestimmung

Der Messablauf wird am Beispiel der Harnstoff Analyse in Milch exemplarisch und ausführlich besprochen.

Wie wichtig die Bestimmung von Harnstoff ist, zeigt die lange Liste von Versuchen, eine probate Bestimmungsmethode zu etablieren: chemische Messmethoden, enzymatische Messmethode, MIK-Methode, Segmented-flow-Analysator usw..

Die Δ pH-sensorische Harnstoff-Bestimmung in Milch erfolgt nach Urease-Zugabe (Starter) durch die pH-Änderung während der Hydrolyse :



Aus der Hydrolyse resultiert insgesamt eine pH-Erhöhung, Abb.2.

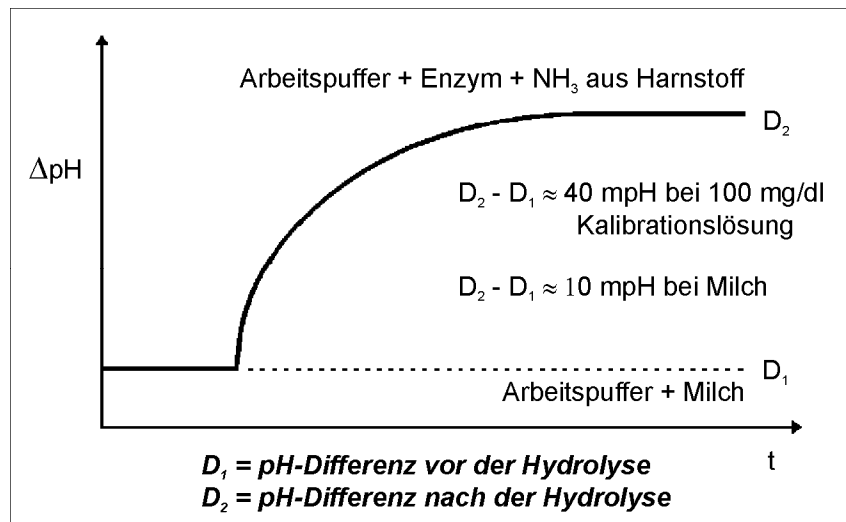
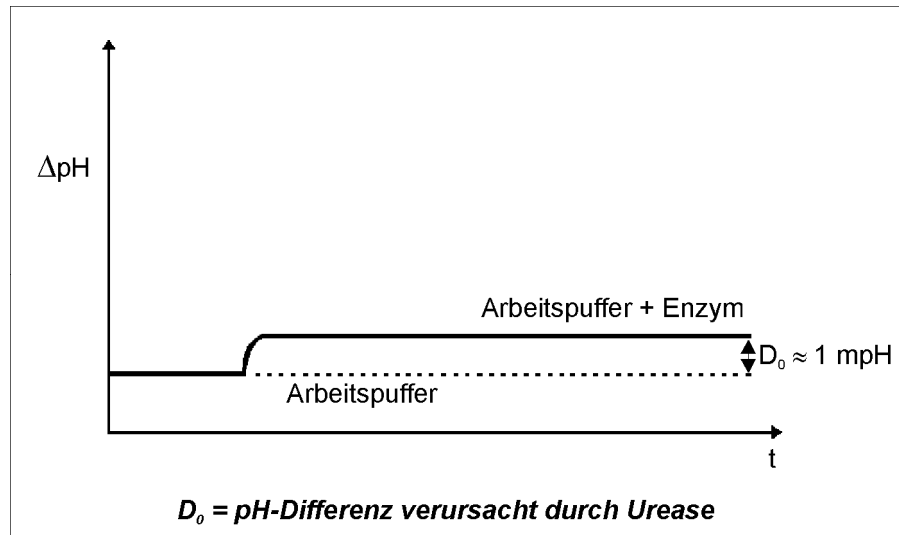


Abb. 2A und 2B: ΔpH -Messungen bei Harnstoff-Bestimmung

Wenn jetzt über „Arbeitspuffer“ gesprochen wird, so ist das folgendermaßen zu verstehen: der Arbeitspuffer hat nur eine minimale Pufferkapazität (mmol/l Bereich), um einerseits im Messgerät eine reproduzierbare Basislinie zu erzeugen. Andererseits ermöglicht die kleine Pufferkapazität pH-Differenzen während enzymatischer Umsetzungen zu monitoren.

Reagenzienleerwert

Hierzu füllt eine Pumpe die Reaktionskammer mit dem Arbeitspuffer. Mit der 1. Hälfte des Kammerinhalts werden beide Elektrodenräume geflutet. Nachfolgend wird die Differenz zwischen beiden Elektroden gemessen. Nachdem die Differenz einen konstanten Wert, etwa 20 ΔmpH , erreicht hat, wird dieser Wert gespeichert (Blankwert).

Dann fördert eine Pumpe das Enzym Urease - quasi als Probe - in die Reaktionskammer, aus der nach Mischen die 2. Hälfte des Kammerinhalts (Arbeitspuffer+Urease) nur in einen der beiden

Elektrodenräumen geleitet wird.

Nach ca. 30 s stellt sich die neue pH-Differenz ein, z.B. 21 ΔpH , d.h. der Urease-Leerwert beträgt 1 ΔpH . Dieser wird als Korrektur für die anschließenden Probenmessungen als D_0 gespeichert („Reagenzienleerwert“).

Kalibrationsvorgang

Beim Kalibrationsvorgang wird in die mit Arbeitspuffer gefüllte Reaktionskammer 25 μl einer 100 mg/dl Harnstoff-Standardlösung injiziert und nach Mischen die 1. Hälfte der Arbeitspuffer+Standard-Mischung in beide Elektrodenräume geleitet und die pH-Differenz erneut zu ca. 20 ΔpH gemessen (D_1).

Zu der restlichen 2. Hälfte wird Urease zugesetzt, gemischt und die Mischung – Arbeitspuffer+Standard+Urease – nur in einen der Elektrodenräume gepumpt. Dann beginnt der ΔpH -Wert zwischen den Elektroden zu wachsen und nimmt bis zu einem bestimmten, konstanten Endwert zu, etwa bis 60 ΔpH (D_2).

Aus der Differenz zwischen D_2 und Basiswert D_1 , vermindert um den Urease-Leerwert D_0 , resultiert der Eichwert, d.h. $(60-20-1) = 39 \Delta\text{pH}$. Berechnet wird die Steigung der Kalibrationsgerade zu:

100 mg/dl: 39 $\Delta\text{pH} = 2,6 \text{ mg/dl } \Delta\text{pH}$.

Messung

Bei Aufgabe von 25 μl Milch läuft das gleiche Muster ab wie bei der Kalibration. Abgelesen wird, nachdem die ΔpH -Messkurve keine Steigung mehr zeigt (Endpunktmethod).

Der Endwert bei einer normalphysiologischen Milchprobe liegt bei etwa 30 ΔpH . Die Differenz aus Probenendwert D_2 - Basiswert D_1 , vermindert um den Urease-Leerwert D_0 , ergibt den Probenwert D zu $(30-20-1) = 9 \Delta\text{pH}$.

Die Berechnung erfolgt nach der allgemeinen Formel:

$$C_{\text{Harnstoff}} = \Delta\text{pH-Probenwert} \times \text{Steigung}$$

$$\text{Milch: } 9 \Delta\text{pH} \times 2,6 \text{ mg/dl } \Delta\text{pH} = 23 \text{ mg/dl Harnstoff}$$

Die Auswertung und Menüführung erfolgt vollautomatisch über einen Rechner, sodass eine Harnstoff-Bestimmung standardmäßig 35 Sekunden dauert, wobei man routinemäßig nach 30-40 Proben eine Zwischenkalibrierung und Leerwertkontrolle vornimmt. Aus der Messzeit für eine Probe ergibt sich ein Probendurchsatz etwa 60 Milchproben/Stunde.

Nach Ablauf der Messungen können die Ergebnisse entweder direkt als Arbeitsliste oder nach Export in eine Excel Tabelle zusammengefasst ausgegeben werden.

Nach werkseigenen Spezifikationen umfasst der lineare Messbereich 3 - 400 mg/dl mit einer Standardabweichung von $\pm 1,5$ mg/dl bei 100 mg/dl. Zur Gerätekontrolle steht ein stabilisiertes Milchmaterial ohne Harnstoff zu Verfügung.

Methodenbedingt weist die Δ pH-Methode die folgenden wichtigen arbeitsökonomischen Vorteile auf:

1. keinerlei Probenvorbereitung erforderlich,
2. radikal verkürzte Messzeiten im Vergleich zu anderen Messmethoden,
3. die übliche Messung des NH_3 -Basiswertes (erforderlich bei der photometrischen Methode) entfällt gänzlich.

2.4 Der Laborautomat MICROLAB[®] EFA

Als nächstes wird der Laborautomat MICROLAB[®] EFA vorgestellt, zumal diese technische Weiterentwicklung des Grundgerätes Modell CL 10 maßgebende Gründe bei der FIL IDF zur Normierung der enzymatischen Δ pH-Methoden lieferte.

Laborroboter dienen in steigendem Maße der Qualitätserhöhung bei analytischen Arbeiten und ermöglichen größeres Probenaufkommen zu analysieren. Ziel bei der Entwicklung des hier dargestellten Laborautomaten MICROLAB[®] EFA war es, möglichst viele Arbeits- und Auswertungsschritte zu automatisieren. Dadurch wird die Notwendigkeit des menschlichen Eingreifens, als Quelle von Fehlern, weitgehend vermieden.

Das System basiert auf bewährte Automatisierungstechniken der Firma Hamilton, die über weitreichende Erfahrungen als Hersteller von Dosieranlagen auf dem Gebiet der Laborautomatisierung verfügt.

Insgesamt ist das System so konzipiert, dass es rund um die Uhr fehlerfrei durcharbeitet. Es handelt sich also um kein Gerät, das einer ständigen Kontrolle unterliegen muss, Abb. 3.



Abb. 3: Das vollautomatisierte MICROLAB[®] EFA

Der Laborautomat besteht aus drei miteinander verbundenen Einheiten: Δ pH-Messgerät als Messeinheit, Pipettiereinheit als Bedieneinheit und Registrierungseinheit (separater Computer mit spezieller Software) zur Methodensteuerung, Ergebnisdarstellung und Dokumentation.

Messeinheit

Die Messeinheit ist weitgehend identisch mit dem CL 10 Messgerät, sie führt die eigentliche Analyse aus. Die wichtigsten Merkmale wurden vorangehend bereits besprochen.

Pipettiereinheit

Die Pipettiereinheit kann alle Reagenzien und Proben, die zur enzymatischen Analyse notwendig sind, mit einer Dosiernadel automatisch ansteuern, sie aus den Vorratsbehältern ansaugen und in die Reaktionskammer hineinpipettieren. Die aktuellen Flüssigkeitsniveaus in den Behältern werden durch eine Induktionsschleife über die Leitfähigkeit der Proben und Reagenzien erkannt.

Die Pipettiereinheit kann durch die Dosiernadel sehr exakte Volumendosierungen ausführen, mitunter auch notwendige Probenverdünnungen herstellen. Darüber hinaus kann sie Mischungen herstellen, die außerhalb der Reaktionskammer, in einem anderen Behälter, vorbereitet werden müssen. Auch ein Reinigungsschritt vorhanden: Die Dosiernadel wird, um keine Kreuzkontamination zu verursachen, zwischen den einzelnen Schritten gewaschen. Positionierfehler, die bei manueller Ausführung von Serienuntersuchungen leicht unterlaufen, werden durch das automatische Pipettieren völlig vermieden.

Registriereinheit

Die Registriereinheit besteht aus einem externen Rechner und maßgeschneiderter Software. Die letztere ist für Methodensteuerung, Ergebnisdarstellung und Dokumentation zuständig.

Zur Methodensteuerung ruft der Anwender eine vordefinierte Arbeitsmethode auf. Die aktivierte Methode enthält alle grundlegenden Verfahrensparameter wie Reagenzienpositionen, auszuführende Verdünnungen, Inkubationszeiten, Reaktionsschema, Auswertemethode (Endpunkt, kinetische oder Fixzeit-Auswertung), Vorlauf- und Ableseintervalle und Messzeit. Eingblendete Hilfetexte erläutern kurz jeden möglichen Einstellpunkt der Methode.

Zwei generelle Verfahren zur Ausführung von Messungen gibt es: man entscheidet sich entweder für die Sofortanalyse, die sich für kleine Probenserien eignet, oder man erstellt sogenannte Arbeitsprofile. Hier lassen sich Proben auf verschiedene Parameter automatisch sequentiell abarbeiten.

Das vollautomatische MICROLAB[®] EFA wird durch einen externen Rechner mit einer speziellen Software gesteuert. Alle Daten während des Messprozesses werden sofort in eine Datenbank abgelegt. Ferner stehen diese Daten auch in der Microsoft Excel Tabellenkalkulation

zur Verfügung. Damit kann der Anwender individuelle Berechnungen und statistische Auswertungen vornehmen.

Dokumentation

Die Probenkenndaten werden vor der Messung erfasst und im Messreport dokumentiert. Der fertige Report kann je nach Wunsch gedruckt und/oder gespeichert werden. Da die Messdaten auch in eine Microsoft Excel Datei geschrieben werden, besteht dadurch die Möglichkeit, weitergehende Berechnungen oder eigendefinierte Einheiten vorzunehmen.

3. Arbeitsmethoden für Milchuntersuchungen

● Harnstoff	● Lactose (+ freie Glucose)
● L-Lactat	

Tab. 1: Arbeitsbestecke für Δ pH-Untersuchungen von Milch

3.1 Harnstoff-Bestimmung

Im Abschnitt 2.3 ist die Bestimmung von Harnstoff ausführlich dargestellt worden. Durch die Qualität der Messergebnisse sah sich die IDF-Arbeitsgruppe E 302 veranlasst, die Δ pH-sensorische Harnstoff-Bestimmung zu testen und danach als ISO- bzw. IDF-Standardmethode anzunehmen (ISO 14637 / IDF 195:2004).

Zu erwähnen wäre noch, dass der Harnstoffgehalt der Milch die Futtermittellage der Kühe widerspiegelt. Bei seiner Kenntnis kann die Fütterung optimiert werden.

Im Gegensatz zu den heutzutage verbreiteten NIR-Messgeräten ist das CL 10 eine wirtschaftlich preisgünstige (mit minimierten TCO), enzymatisch spezifische Alternative.

Potenzielle Anwendungen :

Milch, Milchprodukte, Fleischerzeugnisse, Düngemittel, Fermentationsproben, Zellkulturmedien.

3.2 Lactose-Bestimmung (*nur für MICROLAB[®] EFA*)

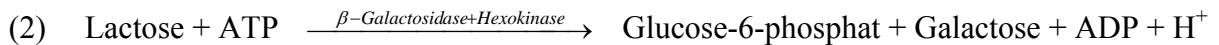
Die Lactose-Bestimmung mittels Δ pH-Sensortechnik ist 2000 von der IDF offiziell zur Methodenvalidierung unter der Leitung der Arbeitsgruppe E 401 angenommen.

Nach entsprechender Probenvorbereitung bedienen sich zwei Varianten der enzymatischen Lactose-Bestimmung mit UV-Detektion. Beide schließen eine externe, vorgelagerte Hydrolyse mit β -Galactosidase ein. Anschließend erfolgt die Quantifizierung der hydrolytisch entstandenen Galactose oder Glucose.

Die Bestimmung des Lactosegehalts in Milch durch die Δ pH-Sensortechnik nutzt die Be-

stimmung der hydrolytisch entstandenen Glucose aus.

Die lange Aufschlusszeit bei der Lactose-Bestimmung stellt einen großen Nachteil dar. Deshalb sind seitens des Geräteherstellers große finanzielle Anstrengungen unternommen worden, um diese Zeit wesentlich zu verkürzen.



Zu (1): Nach der Probenaufgabe wird durch Zuführung von Hexokinase die Reaktion gestartet. Das Enzym setzt die in der Probe vorhandene freie Glucose um. Durch die Reaktion (1) verursachte pH-Änderung korreliert mit der Konzentration der freien Glucose in der Probe.

Zu (2): Sobald die freie Glucose durch (1) verbraucht ist, wird durch Zugabe von β -Galactosidase die Lactose zu Glucose und Galactose hydrolysiert. Auch in der Folge entstandene Glucose wird durch die noch wirksame Hexokinase und ATP verestert. Durch die Reaktion (2) verursachte pH-Senkung korreliert mit der Lactose-Konzentration in der Probe.

Ein typischer Bildschirminhalt beim vollautomatischen Modell MICROLAB[®] EFA mit (von oben nach unten im Gitternetz dargestellt) Basislinien, Kalibrationskurven von 50 mmol/l Glucose und 100 mmol/l Lactose, Messkurvenverlauf von 2 Milchproben und Kurvenverlauf des Grundgehaltes an freier Glucose, Abb. 4.

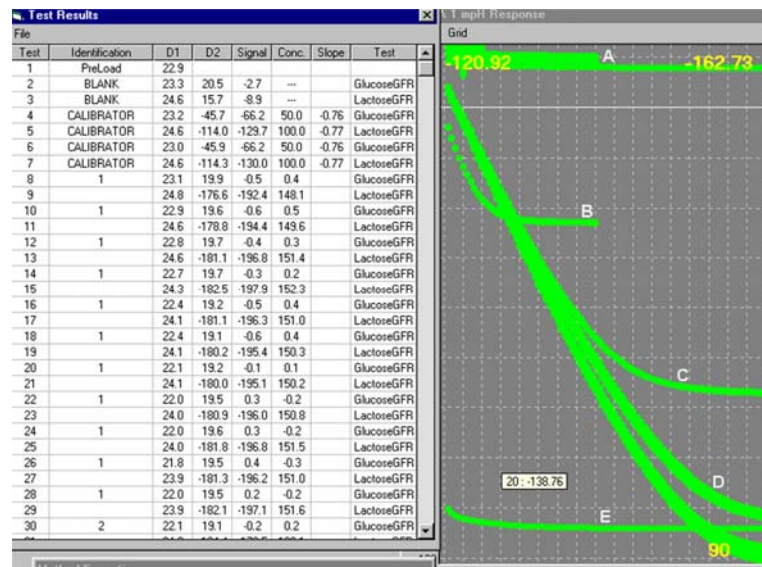


Abb. 4: Ein typischer Bildschirminhalt bei Bestimmung von Lactose (MICROLAB[®] EFA)

Die Innovationen bringen entscheidende Vorteile:

1. 145 Sekunden Messzeit, inklusive Bestimmung des Grundgehaltes an freier Glucose, Hydrolyse von Lactose und Messung des resultierenden Glucose-

gehalten.

- Die hydrolytische Spaltung wird nicht mehr extern, sondern direkt in der Reaktionskammer ausgeführt, d.h. die ganze Bestimmung läuft nach Prinzip der „Eintopfverfahren“ ab.

Als Ergebnis wird der Lactose- und der Glucose-Gehalt angezeigt, d.h. auch die freie Glucose, die aus diversen Quellen stammen kann, wird miterfasst. Ein Vergleich zwischen der bisherigen FIL IDF Methode und der Δ pH-sensorischen Lactose-Bestimmung ist der Tabelle 2 zu entnehmen.

	FIL IDF Methode	Δ pH-Sensortechnik
Probenvorbereitung	Zur Klärung: Zugabe von Carrez-I-Lösung (Kaliumhexacyanoferrat-II) Zugabe von Carrez-II-Lösung (Zinksulfat) Zugabe von NaOH-Lösung auffüllen 30 Minuten warten filtrieren	20 μ l Milch direkt einsetzen bzw. festes Material suspendieren und aufgeben
Hydrolyse	Pufferung mit Citratpuffer auf pH 6,6 Zugaben von β -Galactosidase 15 Minuten Hydrolyse bei 20 °C	entfällt
Pufferung	auf 7,6; TEA/NADP ⁺ /ATP	entfällt
Messung	Enzyme: Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	Enzym: Hexokinase
Messzeit	15 Minuten	2,5 Minuten inkl. Hydrolyse

Tab. 2: Lactose-Bestimmung - Vergleich zwischen der FIL IDF Methode und der Δ pH-sensorischen Lactose-Bestimmung

Der lineare Messbereich der neuen Lactose-Bestimmung erstreckt sich auf 1,7 – 68 g/l mit der Standardabweichung von $\pm 0,7$ g/l bei 34,2 g/l Lactose. Die dabei „mitgelaufene“ Glucose ist im 1 - 36 g/l Bereich messbar, mit der Standardabweichung von $\pm 0,4$ g/l bei 9 g/l.

Dass die neue Lactose-Bestimmung derartig enorme Zeitvorteile bietet, ist u.a. der eingesetzten hochreinen β -Galactosidase zu verdanken. Das verwendete Enzym hat bei Einhaltung der Arbeitsvorschrift, d.h. bei pH 7,9 in der Reaktionskammer und 37 °C die Michaelis-Konstante K_m von 15,50 mmol/l und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit 111,1 Δ pH/min.

Last but not least, es ist in die vergleichende Überlegungen einzubeziehen, dass das zeitraubende und lästige Reinigen von Glasgefäßen völlig entfällt!

Laut Gerätehersteller soll das Verfahren auch zur Kontrolle von Milchen mit niedrigem Lactose-Gehalt eingesetzt werden.

Die neue Lactose-Bestimmung ist ein hervorragendes Beispiel, den Unterschied zwischen

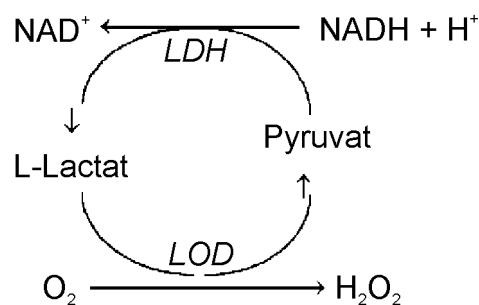
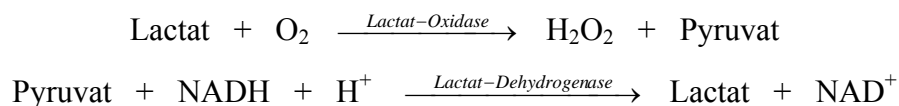
manuell konventioneller Lactose-Bestimmung und neuer, automatischer Probenverarbeitung zu dokumentieren.

Potenzielle Anwendungen :

Trinkmilch, Kondensmilch, Sauermilch, Hartkäse, Schmelzkäse, Kinderfertignahrung, Kinder-
aufbaunahrung, Speiseeis, Joghurt, Creme-, Milch-, Molkepulver, Fermentationsproben und
Zellkulturmedien.

3.3 Milchsäure (L-Lactat)-Bestimmung (*nur für CL-10 Plus*)

Dem Arbeitsprinzip der Δ pH-sensorischen Lactat-Bestimmung liegen zwei enzymatische Teil-
schritte zugrunde.



Zunächst wird das Lactat mit Lactat-Oxidase (LOD) schnell und vollständig in Pyruvat über-
führt. Nachfolgend wird in dem eigentlichen Bestimmungsschritt durch das zugesetzte Lactat-
Dehydrogenase/NADH/ H^+ -System Pyruvat in einer langsameren Folgereaktion wieder zu Lactat
umgesetzt. Gemessen wird der kinetische Verbrauch an H^+ am Anfang des zweiten Teilschrittes.
In dieser Phase liegt (noch) keine nennenswerte Menge an „in situ“ erzeugte Milchsäure vor, die
diese die Messung beeinflussen könnte.

Standardeinstellungen zur Bestimmung: 20 μl Probenaufgabe, Messdauer 45 s, davon 15 s Vor-
laufzeit und 30 s Messzeit (vergleichbare enzymatische Testkits ca. 8 bis 10 Minuten). Die
Linearität reicht von 2 bis 60 mg/l, die Wiederholpräzision liegt in den Grenzen von 1,5 mg/l bei
40 mg/l. Milch kann direkt, Joghurt bereits nach 1:10 bis 1:20-facher Verdünnung, Käse nach
Heißwasserextraktion (1:10 bis 1:20) aufgegeben werden. Dadurch wird die Erfassung der Ge-

samtmilchsäure bzw. die Differenzierung beider Milchsäuren möglich.

Potenzielle Anwendungen :

Käse, Joghurt, Sauerkrautsaft, Bier, Fleisch, Fleischerzeugnisse, Milchsäure-haltige Flüssigkeiten, Frucht- und Gemüsesäfte, Fermentationsproben und Zellkulturmedien, Flüssig-Vollei.

4. Arbeitsmethoden für Wein-, Most-, und Fruchtsaftuntersuchungen

- Der Combi-Test: simultane Messung von D-Glucose + D-Fructose (Summe), Gesamtacidität und pH-Wert
- D-Glucose + D- Fructose (Summe)
- Milchsäure(L-Lactat)
- Äpfelsäure(L-Malat)
- Gesamtacidität
- Essigsäure
- Saccharose

Tab. 3: Arbeitsbestecke für Δ pH-Untersuchungen zu Wein-, Most-, und Fruchtsaftuntersuchungen

4.1 Der Combi-Test. Simultane Messung von D-Glucose + D-Fructose (Summe), Gesamtacidität und pH-Wert (*nur für Modell CL 10 Plus*)

Ein Paradebeispiel der Leistungsfähigkeit der Δ pH-sensorische Prinzipis wird in der Abb. 6 dokumentiert.

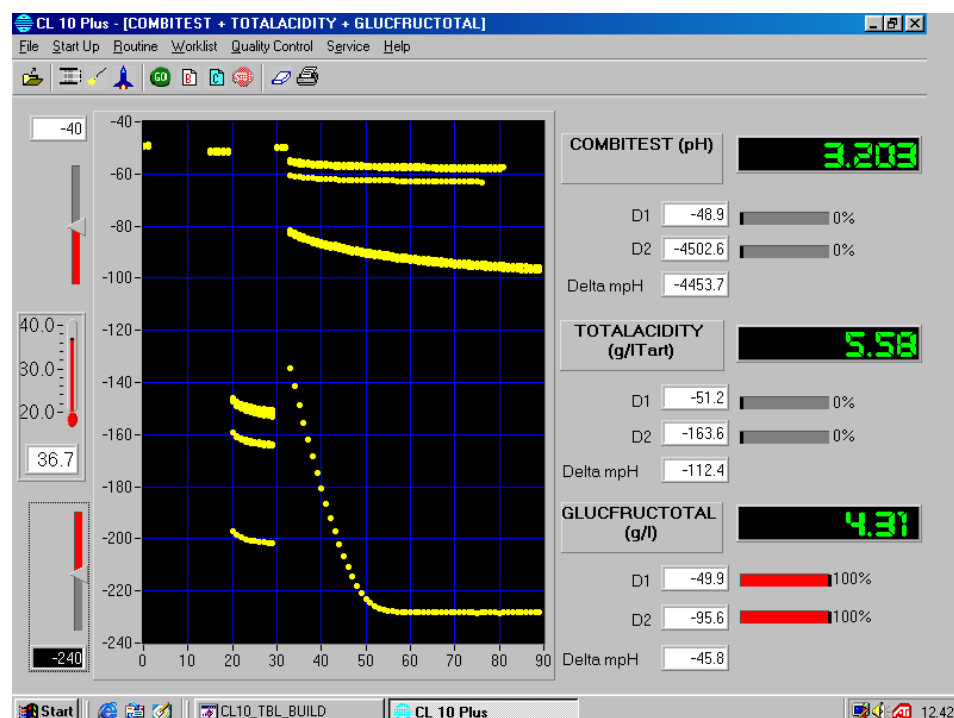
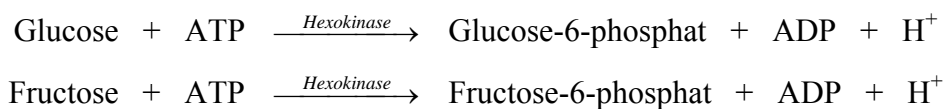


Abb. 6: Bildschirmausdruck nach simultaner Bestimmung von pH-Wert, Gesamtsäure und enzymatischer Messung von Glucose und Fructose (als Summe der beiden Zuckerarten).

Die Messzeit beträgt maximal 150 Sekunden. Zu Verfügung stehen zwei Testbestecke. Das ML Besteck ist für mittlere Konzentrationen von Glucose + Fructose, z.B. trockene und mittelsüße Weine, geeignet. Messbereich: 0,6 – 72 g/l; Acidität: 0,15 – 11,2 g/l (als Weinsäure); pH: 2 – 4,5. Das HL Besteck ist bei hohen Glucose + Fructose Gehalten einsetzbar wie z.B. in süßen Weinen und Mosten. Messbereich: 72 – 270 g/l, Acidität und pH wie vorangehend.

4.2 Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose (Summe)

Da sowohl Glucose wie Fructose durch Hexokinase und ATP zu entsprechendem Hexosephosphat unspezifisch umgesetzt wird, nützt dies das Arbeitsbesteck aus, um die beiden Zuckerarten in einem Arbeitsvorgang gleichzeitig und summarisch zu quantifizieren. Die resultierenden Hexose-phosphorsäureester und ADP sind insgesamt acider als die ATP vor der Umsetzung war. Die $[H^+]$ -Zunahme ist dem Hexosegehalt proportional. Messzeit um 120 Sekunden.



Bei einigen Probenmaterialien ist das Ergebnis mit dem „reduzierenden Zucker“ oder „vergärbarem Zucker“ bzw. „Restsüße“ gleichzusetzen.

Das Arbeitsbesteck wird für zwei Konzentrationsbereiche angeboten:

für sehr hohe Konzentrationen an Glucose und Fructose, d.h. ca. 60 – 270 g/l. In diesem Bereich liegt der Glucose- und Fructose-Gehalt in Mosten, Fruchtsäften. 0,5 – ca. 70 g/l für Weine und Fruchtsäfte.

Dort, wo in der Probe mit Abwesenheit von Glucose gerechnet werden kann, kann das Besteck zu alleiniger Fructose-Bestimmung dienen. Und auch umgekehrt.

Potenzielle Anwendungen :

Wein, Most, Süßwaren, Kuchen, Backwaren, Konfitüre, Diätkonfitüre, Pflaumenmus, Honig, Desserts, Speiseeis, Joghurt.

4.3 Milchsäure (L-Lactat)-Bestimmung

Das Reaktionsprinzip der Milchsäure-Bestimmung wurde bei der Milchsäure-Bestimmung in Milch- und Milchprodukten ausführlich dargestellt, (Abschnitt 3.3). Hier sei die Messzeit von 90 Sekunden und der Messbereich von 0,2 – 2,7 g/l erwähnt. In allgemeinen reicht es, das (trübe) Prüfmaterial 1+2 zu verdünnen.

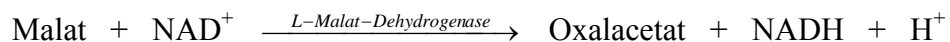
Lactat kommt in Wein in Gramm-Bereich vor, abhängig von Traubenart und Prozessführung.

Potenzielle Anwendungen :

Wein, Most, fermentierte Produkte, Frucht- und Gemüsesäften, Bier, Milchsäure-haltige Flüssigkeiten, Sauerkrautsaft.

4.4 Äpfelsäure (L-Malat)-Bestimmung

Äpfelsäure (Malat) wird durch Malat-Dehydrogenase nach folgender Reaktion umgesetzt :



Durch die Reaktion verursachte $[\text{H}^+]$ -Zunahme ist der Äpfelsäurekonzentration in der Probe proportional. Gemessen wird die Aciditätszunahme nach 90 Sekunden (Fixzeitmethode). Der lineare Bereich liegt zwischen 0,3 – 4,0 g/l Äpfelsäure.

Potenzielle Anwendungen :

Most, Wein, Fruchtsaftkonzentrat, Fruchtsaft, Fruchtsaftgetränke, Kontrolle der biologischen Säureabbaus, Infusionslösungen, Bier, feste Lebensmittel, biologische Proben, Säuerungsmittel.

4.5 Bestimmung der Gesamtacidität (*nur für MICROLAB[®] EFA*)

Obwohl bei der Analyse keine Enzyme verwendet werden, soll sie auf Grund der gleichen Arbeitsmethodik erwähnt werden. Hierbei wird das suspendierte Prüfmaterial einem pH 7,0 Systempuffer zugegeben und der resultierende ΔpH gemessen. Der ΔpH -Wert ist der Gesamtacidität proportional.

$$\Delta H^+ = \beta \times \Delta \text{pH}$$

β : Pufferwert des Systempuffers, ΔpH : pH-Differenz (vor - nach)

Die Methode zeichnet sich durch sehr hohe Genauigkeit und Richtigkeit aus. Die elektronisch-automatische Ergebnissicherung und die Schnelligkeit, 10 Sekunden, sind weitere bemerkenswerte Vorteile gegenüber den traditionell ausgeführten Titrationen. Die Methode kann, insbesondere in der Weinwirtschaft und bei Fruchtsaftherstellern, mit großem Nutzen angewendet werden.

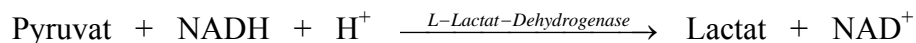
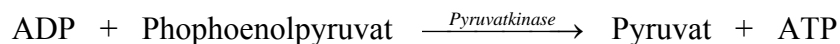
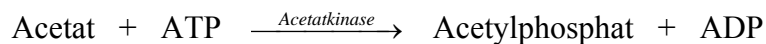
Messbereich : 0,15 – ca. 13 g/l (als Weinsäure)

Potenzielle Anwendungen :

Wein, Most, Fruchtsaft, Fermentationsprodukte, Starterkulturen.

4.6 Essigsäure (Acetat)-Bestimmung

Als Grundlage der Bestimmung dient eine dreistufige Reaktionskaskade.



Im ersten, eigentlichen Bestimmungsvorgang wird Acetat durch ATP und Acetatkinase in Acetylphosphat und ADP überführt. Im zweiten Teilschritt setzt die der Reaktionsmischung zugefügte energiereiche Phosphoenolpyruvat/Pyruvat-Kinase-Mischung ADP zu „Reagenz“ ATP und Pyruvat um. Der letztere wird in der Indikationsreaktion durch NADH/H^+ , in Gegenwart von LDH, zu NAD^+ und Lactat reduziert.

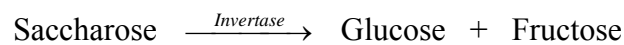
Diese Reaktionsfolge wurde speziell für die ΔpH -Technik ausgewählt und weicht erheblich vom konventionell verwendeten Reaktionsschema der UV-Technik ab. Die Auswertung erfolgt nach der Fixzeit-Methode. Die Messung bedarf etwa 90 Sekunden. Proben mit 0,1 – 1,2 g/l Gehalt können unverdünnt gemessen werden.

Potenzielle Anwendungen :

Most, Wein, Fruchtsäfte, Weinessig, Sauertunken, Soßen, Bier.

4.7 Saccharose-Bestimmung (Gesamtzucker)

Die „handwerkliche“ Leistungsfähigkeit der ΔpH Sensortechnik wird durch die neueste Technik der Saccharose-Bestimmung unter Beweis gestellt. Die normalerweise angewandte Sequenz: Hydrolyse und anschließende Hexose-Erfassung wird dahingehend wesentlich verändert, dass die Hydrolyse und die Indikation der entstandenen Hexosen gleichzeitig erfolgen. Nach dem Prinzip des Eintopfverfahrens wird der Probe eine Mischung von Invertase und Hexokinase zugesetzt. Vor-Ort in der Reaktionskammer erfolgt die Spaltung und Phosphorylierung. Durch die Veresterung produzierte $[\text{H}^+]$ ist der Summe der beiden Hexosen proportional, d.h. der Saccharosekonzentration.



Selbstverständlich muss bei der Berechnung die eventuell vorliegende freie Glucose und/oder Fructose (ermittelt z.B. durch separate Hexokinase/ATP- Reaktion) in Abzug gebracht werden.

Inbegriffen Hydrolyse und Veresterung beträgt die Messzeit fünf Minuten. Die Reaktionstemperatur ist $37\text{ }^\circ\text{C}$. Zeitraubendes Pipettieren und die Thermostatisierung entfallen. Die Linearität liegt im Bereich $3,4 - 256\text{ g/l}$ Saccharose. Der untere Wert stellt gleichzeitig die Nachweisgrenze dar.

Ergänzende Arbeitsvorteile zu dieser Reaktionsführung bietet der bereits erwähnte Laborautomat MICROLAB[®] EFA, z.B. bei der mechanisierten Probenzuführung.

Nach dem gleichen Reaktionsschema verläuft die bis jetzt übliche robuste Saccharose-Bestimmung. Hierzu muss die Hydrolyse in externen Gefäßen erfolgen. Der Aufschluss ist bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ nach 10 Minuten 100%.

Potenzielle Anwendungen :

Most, Fruchtsaft, Wein , Bier, Speiseeis, Schokolade, Röstkaffee, Konfitüre, Fermentationsproben, Zellkulturmedien, Melasse.

5. Ausblick

Die Möglichkeit, enzymatische Umsetzungen durch Messung von pH-Änderung während der Reaktion zu verfolgen, eröffnet für Forschung und Entwicklung aber auch für die routinemäßige QK vielfältige Möglichkeiten. Im Grunde genommen können alle biologischen Umsetzungen, bei denen die Reaktion mit pH-Veränderung verbunden ist, gemessen werden.

Es kann nicht genug betont werden, dass mit dem Δ pH-Messsystem auch eine Vielfalt an Enzymen in Lebensmitteln, Fermenterhalten, biotechnologischen Produkten zu analysieren möglich ist.

Da mit CL 10, die Messung einer pH-Änderung von 0,0005 Einheiten möglich ist, und damit die Δ pH-Sensortechnik um etwa 100fach empfindlicher ist als eine gewöhnliche pH-Messkette, könnte die Messzeit für Fermentationskulturen, auf Minuten reduziert werden.

Naheliegender wäre auch der Monitoring von lipolytischen Vorgängen wie z.B. bei Milchlagerung, Butterfettabbau, Käsureifung vorliegen, durch Quantifizierung von entstandenem, freien Fettsäuren über pH-Abnahme zu monitoren.

Naheliegender wäre noch über den Monitoring von lebensmitteleigenen oder biotechnologisch hergestellten Enzymen den Herstellungsprozess zu steuern.

Auch die Möglichkeit, Penicillin Rückstände in Milch nachzuweisen, ist ebenfalls realisierbar. Nachdem die Probe mit Penicillinase versetzt wird, entsteht Penicillinsäure. Durch die Säureentwicklung resultiert eine pH-Änderung zu Sauerem. Dies zu quantifizieren ist denkbar.

Auch an den Nachweis von Qualitätskontrolle-relevanten Keimen, direkt aus dem partikelhaften Probenmaterial, aufgrund ihrer spezifischen Stoffwechselleistungen ist zu denken.

6. Vertrieb und Kontaktadresse

Dr. Berthold G. Schlag Wissenschaftliche Messinstrumente
Nachf. Im- und Export GmbH
Am Mühlenberg 19
D-51465 Bergisch Gladbach
Tel.: 02202 - 3 50 50
Fax: 02202 - 3 96 36
E-Mail: info@schlag.de
Internet: www.schlag.de und www.deltaph.de

Stand der Angaben Oktober 2009
