

Stefanie Meier

**Entwicklung eines Multianalysensensors
zur Bestimmung der Zucker Glucose, Fructose und Saccharose
für die Vor-Ort-Überwachung von Gärprozessen**

2002

Analytische Chemie

**Entwicklung eines Multianalysensors
zur Bestimmung der Zucker Glucose, Fructose und Saccharose
für die Vor-Ort-Überwachung von Gärprozessen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Stefanie Meier
aus Georgsmarienhütte

- 2002 -

| | |
|-------------------------------|----------------------|
| Dekan: | Prof. Dr. V. Leute |
| Erster Gutachter: | Prof. Dr. K. Cammann |
| Zweiter Gutachter: | Prof. Dr. M. Knoll |
| Tag der mündlichen Prüfungen: | 09., 16., 19.12.2002 |
| Tag der Promotion: | 19.12.2002 |

Inhalt

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Ziel der Arbeit..... | 3 |
| 3 | Theoretischer Teil..... | 4 |
| 3.1 | Biosensoren..... | 4 |
| 3.1.1 | Enzyme | 4 |
| 3.1.1.1 | Eigenschaften der verwendeten Enzyme..... | 6 |
| 3.1.1.2 | Enzymimmobilisierung | 8 |
| 3.1.1.3 | Enzymstabilisierung | 12 |
| 3.1.2 | Elektrochemische Enzymsensoren | 14 |
| 3.1.2.1 | Amperometrische Enzymsensoren | 15 |
| 3.1.2.2 | Mediatoren | 17 |
| 3.2 | Wein..... | 19 |
| 3.2.1 | Bedeutung von Zucker im Wein | 19 |
| 3.2.2 | Zuckeranalytik im Wein - Stand der Technik..... | 21 |
| 3.2.2.1 | Klassische Methoden | 22 |
| 3.2.2.2 | Enzymatische Methoden..... | 23 |
| 3.2.2.3 | Enzymsensoren | 24 |
| 4 | Material und Methoden..... | 27 |
| 4.1 | Geräte und Chemikalien | 27 |
| 4.2 | Lösungen | 29 |
| 4.3 | Enzymaktivitätstest..... | 30 |
| 4.4 | Transducer in Siebdrucktechnik..... | 31 |
| 4.4.1 | Herstellung der Einzelelektroden in Siebdrucktechnik | 33 |
| 4.4.2 | Herstellung der Vierarbeitselektrodensensoren in Siebdrucktechnik | 33 |
| 4.5 | Enzymimmobilisierung | 34 |
| 4.5.1 | Poly(carbamoylsulfonat)-Hydrogel als Immobilisierungsmatrix..... | 34 |
| 4.5.1.1 | Synthese des Poly(carbamoylsulfonat)-Hydrogels | 34 |
| 4.5.1.2 | Einschlussimmobilisierung im Poly(carbamoylsulfonat)-Hydrogel | 35 |
| 4.5.2 | Quervernetzung mit dem bifunktionalen Reagenz Glutaraldehyd..... | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 4.5.3 Immobilisierung mit Stabilisatoren..... | 36 |
| 4.5.4 Verwendung einer semipermeablen Membran | 36 |
| 4.6 Lagerung der Sensoren | 37 |
| 4.7 Durchführung der Messungen | 37 |
| 4.8 Eigenschaften der Vierkanalpotentiostaten..... | 38 |
| 4.9 Realproben..... | 39 |
| 4.9.1 Durchführung der Referenzanalytik..... | 39 |
| 4.9.2 Vergärung von Traubenmost..... | 40 |
| 4.10 Allgemeine Fehlerbetrachtung | 40 |
| 5 Ergebnisse | 42 |
| 5.1 Charakterisierung des Vierkanalpotentiostaten Vino multisens | 42 |
| 5.2 Charakterisierung der Transducer..... | 43 |
| 5.3 Entwicklung der Enzymsensoren | 44 |
| 5.3.1 Enzymsensoren zur Bestimmung von Glucose..... | 45 |
| 5.3.1.1 Charakterisierung der Glucosesensoren..... | 45 |
| 5.3.1.2 Einsatz verschiedener PCS-Hydrogele | 46 |
| 5.3.1.3 Einsatz verschiedener Glucoseoxidasen | 47 |
| 5.3.1.4 Variation und Optimierung der Enzymbeladung | 49 |
| 5.3.1.5 Arbeitsstabilität..... | 50 |
| 5.3.1.6 Lagerstabilität..... | 51 |
| 5.3.2 Enzymsensoren zur Bestimmung von Saccharose..... | 52 |
| 5.3.2.1 Charakterisierung der Saccharosesensoren..... | 52 |
| 5.3.2.2 Variation der Mutarotase..... | 53 |
| 5.3.2.3 Variation und Optimierung der Enzymbeladung | 54 |
| 5.3.2.4 Lagerstabilität..... | 54 |
| 5.3.3 Enzymsensoren zur Bestimmung von Fructose..... | 56 |
| 5.3.3.1 Bestimmung der Enzymaktivität..... | 56 |
| 5.3.3.2 Cyclovoltammetrische Untersuchungen von Kaliumhexacyanoferrat an Siebdruckelektroden..... | 58 |
| 5.3.3.3 FDH-Immobilisierung im PCS-Hydrogel..... | 59 |
| 5.3.3.4 FDH-Immobilisierung mit Glutaraldehyd | 61 |
| 5.3.3.5 Variation der Mediatorkonzentration | 65 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 5.3.3.6 | Einsatz verschiedener Fructosedehydrogenasen | 66 |
| 5.3.3.7 | Variation und Optimierung der Enzymbeladung | 67 |
| 5.3.3.8 | Verwendung von Phenazinmethosulfat als Mediator | 69 |
| 5.3.4 | Multianalysensoren | 71 |
| 5.3.4.1 | Querempfindlichkeit | 71 |
| 5.3.4.2 | Variation des Messpotentials | 74 |
| 5.3.4.3 | pH-Abhängigkeit..... | 76 |
| 5.3.4.4 | Eigenschaften der Multianalysensoren unter Standardbedingungen..... | 80 |
| 5.3.4.5 | Temperaturabhängigkeit | 81 |
| 5.3.4.6 | Arbeitsstabilität..... | 82 |
| 5.3.4.7 | Lagerstabilität..... | 83 |
| 5.3.4.8 | Immobilisierung mit Glutaraldehyd..... | 89 |
| 5.3.4.9 | Einfluss von Störsubstanzen..... | 90 |
| 5.3.4.10 | Wiederfindungsrate | 92 |
| 5.4 | Realproben..... | 94 |
| 5.4.1 | Bestimmung mit den Einzelsensoren | 95 |
| 5.4.2 | Bestimmung mit den Multianalysensoren..... | 96 |
| 5.4.2.1 | Bestimmung der Einzelzucker in Wein..... | 96 |
| 5.4.2.2 | Bestimmung der Einzelzucker in Sekt..... | 97 |
| 5.4.2.3 | Bestimmung des Gesamtzuckers in Wein | 99 |
| 5.4.2.4 | Charakterisierung eines Gärverlaufs..... | 100 |
| 6 | Diskussion..... | 105 |
| 6.1 | Entwicklung der Enzymsensoren | 105 |
| 6.2 | Charakterisierung der Multianalysensoren | 109 |
| 6.3 | Messungen in Realproben..... | 117 |
| 7 | Zusammenfassung | 123 |
| 8 | Literatur | 127 |

Abkürzungen

| | |
|----------|--|
| ADP | Adenosindiphosphat |
| APTS | 3-Aminopropyltriethoxysilan |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CV | Cyclovoltammogramm |
| DEAE | Diethylaminoethyl |
| FAD | Flavinadenindinucleotid |
| FDH | Fructosedehydrogenase |
| FMN | Flavinmononucleotid |
| GA | Glutaraldehyd |
| GOD | Glucoseoxidase |
| G6P-DH | Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase |
| HK | Hexokinase |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| ICB | Institut für Chemo- und Biosensorik |
| INV | Invertase |
| K_M | Michaelis-Menten-Konstante |
| MUT | Mutarotase |
| NAD^+ | Nicotinamidadenindinucleotid |
| $NADP^+$ | Nicotinamidadenindinucleotidphosphat |
| PCS | Poly(carbamoylsulfonat) |
| PEI | Polyethylenimin |
| PMS | Phenazinmethosulfat |
| PQQ | Pyrrlochinolinchinon |
| SCE | Standardkalomelektrode |
| SDS | Natriumlaurylsulfat |
| TCNQ | Tetracyanochinodimethan |
| TTF | Tetrathiafulvalen |

1 Einleitung

Die Lebensmittelanalytik bildet die Grundlage zur Beurteilung der Qualität und Sicherheit von Lebensmitteln [1]. In den letzten Jahren hat diese Wissenschaft eine enorme Entwicklung durchlaufen, bei der traditionelle Analysemethoden zunehmend durch moderne, zeit- und kostensparende Methoden ersetzt werden. Durch innovative, ständig verfeinerte Analysetechniken einerseits und ein gesteigertes Umweltbewusstsein und Sicherheitsbedürfnis der Verbraucher andererseits wird lebensmittelanalytischen Fragestellungen auch zukünftig eine ständig wachsende Bedeutung zukommen.

Bei der Weinbereitung ist eine Überwachung und Steuerung des Gärverlaufs durch eine schnelle und zuverlässige Vor-Ort-Analytik wünschenswert. Die wichtigsten zu überprüfenden Parameter sind die Konzentrationen der vergärbaren Zucker Glucose und Fructose sowie in geringerem Maße Saccharose, die alle im Verlauf der Gärung abnehmen. Dabei besteht eine Abhängigkeit des Glucose/Fructose-Verhältnisses vom Vergärungsgrad [2], wodurch das Fortschreiten der Gärung durch die simultane Bestimmung der einzelnen Zuckerkonzentrationen kontrolliert werden kann. Ein rechtzeitiges Abstoppen der Gärung ermöglicht die gezielte Einstellung der Restsüße, die einen wichtigen Qualitätsparameter der Weine darstellt, und somit die kontrollierte Produktion der gewünschten Weinqualität. Auch zum Nachweis einer nachträglichen Süßung ist die Kenntnis des Konzentrationsverhältnisses der einzelnen Zucker notwendig.

Bisher werden in der Weinanalytik zur Bestimmung der Zuckerkonzentration hauptsächlich nasschemische Methoden angewendet, die auf den reduzierenden Eigenschaften der Zucker beruhen [1, 3, 4]. Mit diesen Methoden ist jedoch keine getrennte Bestimmung der einzelnen Zucker möglich. Darüberhinaus sind sie zeitaufwendig, überwiegend an die Durchführung in Laboratorien gebunden und erfordern den Einsatz großer Mengen an schwermetallhaltigen Chemikalien, die bei nicht ordnungsgemäßer Entsorgung als bedenklich für die Umwelt eingestuft werden müssen. Gegenwärtig werden die nasschemischen Methoden zum Teil durch photometrische Tests ersetzt, deren Grundlage enzymatische Bestimmungsmethoden sind. Diese Methoden sind zwar spezifisch, sie erfordern jedoch in den meisten Fällen eine Probenvorbereitung und konnten sich bisher zwar in Laboratorien, nicht jedoch in der Vor-Ort-Analytik durchsetzen.

Enzymsensoren erfüllen dagegen die Anforderungen einer schnellen, zeit- und kostensparenden Analysemethode. Aufgrund ihrer geringen Größe und der einfachen Handhabung sind sie ideal zum Einsatz in der Vor-Ort-Analytik geeignet und können durch den Anwender auch ohne analytische Vorkenntnisse genutzt werden. Durch die Verwendung von Enzymen erfolgt eine spezifische Erkennung des zu detektierenden Analyten selbst in so

komplexen Medien wie Wein. Dadurch entfällt eine aufwendige Probenvorbereitung. Die Siebdrucktechnik ermöglicht die kostengünstige Herstellung solcher Sensoren in größeren Stückzahlen. Mit Hilfe von Multianalysensoren wird die simultane Bestimmung mehrerer Analyte möglich und so die Dauer des Analysenprozesses weiter verringert.

2 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Entwicklung eines amperometrischen Multianalysensors zur simultanen Bestimmung der Zucker Glucose, Fructose und Saccharose für die Überwachung von Gärprozessen. Die einzelnen Enzymsensoren sollten zunächst getrennt voneinander entwickelt, optimiert und charakterisiert und dann zu einem Multianalysensor kombiniert werden.

Es sollte zunächst ein neues Layout für die Transducer der Multianalysensoren entworfen werden. Für die einzelnen Sensoren sollten geeignete Enzyme sowie Immobilisierungsmethoden für die Enzyme ausgewählt werden. Für die Fructosebestimmung musste darüberhinaus ein passender Mediator gefunden werden.

Da zu erwarten war, dass die verschiedenen Enzymsensoren unterschiedliche optimale Arbeitsbedingungen besitzen würden, sollten für die Multianalysensoren Messbedingungen gefunden werden, bei denen alle Enzymsensoren eingesetzt werden können. Die verschiedenen Enzymsensoren des Multianalysensors waren auf ihre gegenseitige Beeinflussung hin zu untersuchen. Die Multianalysensoren sollten anhand der Größen Sensitivität, Nachweisgrenze, linearer Messbereich, Ansprechzeit, pH- und Temperaturabhängigkeit sowie Arbeits- und Lagerstabilität charakterisiert werden. Dabei wurde eine Verwendbarkeit der Sensoren einerseits für die Dauer eines Tages sowie andererseits nach mehrmonatiger Lagerung angestrebt. Bei der Untersuchung der Lagerstabilität sollte auch die in der Literatur beschriebene enzymstabilisierende Wirkung geeigneter Additive überprüft werden.

Die Multianalysensoren sollten zur simultanen Bestimmung der Zucker Glucose, Fructose und Saccharose in verschiedenen Weinen und Sekten eingesetzt werden. Dabei war die Problematik der im Wein vorliegenden Störstoffe Ascorbat und Sulfit zu berücksichtigen. Darüberhinaus sollte ein kompletter Gärverlauf mit den Multianalysensoren charakterisiert werden und so die Eignung der Sensoren für den Einsatz in der Vor-Ort-Analytik demonstriert werden.

3 Theoretischer Teil

3.1 Biosensoren

Biosensoren beruhen auf der direkten räumlichen Kopplung einer selektiven biologischen Komponente mit einem Transducer [5, 6, 7]. Während die biologische Komponente die Stofferkennung übernimmt, wandelt der Transducer die bei der Erkennung des Analyten entstehenden chemischen oder physikalischen Veränderungen in ein elektrisches Signal um. Den größten Anteil der bislang beschriebenen Biosensoren machen die Enzymsensoren aus. Bei dem ersten Enzymsensor, der 1962 von *Clark und Lyons* beschrieben wurde [8], handelte es sich um eine Enzymelektrode mit Glucoseoxidase als biologischer Komponente. Das Enzym wurde unmittelbar vor einer Sauerstoffelektrode mit Hilfe einer semipermeablen Membran fixiert. Neben Enzymen werden jedoch auch Antikörper, Nukleinsäuren, Rezeptoren, Mikroorganismen und ganze Zellen als biologische Komponente eingesetzt. Die verwendeten Transducer können elektrochemischer, optischer, piezoelektrischer, akustischer oder kalorimetrischer Natur sein [5].

Aufgrund der Selektivität der biologischen Komponente können Biosensoren zur Bestimmung einzelner Substanzen selbst in komplexen Medien wie z. B. Blut (bzw. Plasma oder Serum), Urin und Lebensmitteln herangezogen werden [9]. Die Vorteile der Biosensoren gegenüber klassischen Analysemethoden liegen in der minimalen Probenvorbereitung, der einfachen Handhabung, deutlich kürzeren Analysezeiten sowie wesentlich geringeren Anschaffungs- und Betriebskosten. Diese Eigenschaften führten dazu, dass der mögliche Einsatz von Biosensoren in den letzten Jahren in vielen Bereichen der Analytik untersucht wurde. Vor allem die medizinische Diagnostik, die Lebensmittelanalytik sowie die Prozess- und Umweltkontrolle stellen geeignete Anwendungsbereiche dar. Kommerziell erhältliche Biosensorsysteme sind bislang allerdings überwiegend zur Bestimmung von Glucose und Lactat in Blut und Serum entwickelt worden.

3.1.1 Enzyme

Enzyme sind Proteine, die biochemische Reaktionen katalysieren [10]. Entscheidend für ihre katalytische Aktivität sind die Aminosäuresequenz (Primärstruktur) und ihre räumliche Konformation (Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur). Enzyme sind für ihre Substrate hochspezifisch und arbeiten in der Regel in wässrigen Medien unter milden Temperatur- und pH-Bedingungen. Bei den meisten Enzymen handelt es sich um globuläre Proteine mit Molekülmassen zwischen 12.000 und über einer Million Dalton [11]. Das aktive Zentrum, an dem die eigentliche Reaktion stattfindet, wird durch ein Gerüst von Aminosäureseitenketten

gebildet. Es befindet sich in einer flexiblen Spalte oder Furche in der dreidimensionalen Enzymstruktur. Während der Reaktion wird das Substrat im aktiven Zentrum gebunden. Dabei kann es zu einer Konformationsänderung des Enzyms kommen (induced fit), bei der sich spezifische funktionelle Gruppen des Enzyms für die Katalyse passend ausrichten. Diese Konformationsänderung ermöglicht auch die Bildung zusätzlicher schwacher Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat, die den Übergangszustand stabilisieren. Dadurch wird die Aktivierungsenergie der Reaktion herabgesetzt und die Gleichgewichtseinstellung um den Faktor 10^5 bis 10^{17} gegenüber der nichtkatalysierten Reaktion beschleunigt.

Viele Enzyme benötigen für ihre katalytische Funktion Cofaktoren [11]. Dies können anorganische Ionen wie Fe^{2+} , Mg^{2+} oder Zn^{2+} oder komplexe organische oder metallorganische Moleküle, sogenannte Coenzyme, sein. Coenzyme übernehmen vom Substrat Redoxäquivalente, Protonen oder chemische Gruppen [7]. Ist das Coenzym fest an das Enzym gebunden, so spricht man von einer prosthetischen Gruppe, so z. B. bei der Hämgruppe oder den Flavinnucleotiden.

Die Klassifizierung der Enzyme erfolgt entsprechend dem Reaktionstyp, den sie katalysieren [6]. Man unterscheidet dabei sechs Hauptklassen, die in weitere Unterklassen unterteilt sind (Tab. 1).

Tab. 1: Klassifizierung von Enzymen.

| Klasse | Reaktionstyp |
|-------------------|-------------------------------------|
| 1 Oxidoreduktasen | Wasserstoff-, Elektronenübertragung |
| 2 Transferasen | Gruppenübertragung |
| 3 Hydrolasen | Hydrolytische Spaltung |
| 4 Lyasen | Eliminierung |
| 5 Isomerasen | Isomerisierung |
| 6 Ligasen | Bindungsbildung unter ATP-Verbrauch |

Die für die Biosensorik wichtigsten Enzymklassen stellen die Oxidoreduktasen und Hydrolasen dar [9]. Aus der Klasse der Oxidoreduktasen finden insbesondere Oxidasen und Dehydrogenasen vielfache Anwendung in Biosensorsystemen. Oxidasen übertragen Wasserstoff oder Elektronen vom Substrat auf molekularen Sauerstoff. Sie weisen den Vorteil auf, dass sie ihr Coenzym - häufig Flavinmononucleotid (FMN) oder Flavinadenin-nucleotid (FAD) - zumeist fest gebunden haben und für die Reaktion nur Sauerstoff als Cosubstrat benötigen. Bei der durch Dehydrogenasen katalysierten Oxidation wird dagegen

Wasserstoff vom Substrat auf einen Akzeptor übertragen, der als Coenzym dient. Die meisten Dehydrogenasen benötigen Nicotinamidadenindinucleotid (NAD^+) oder Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADP^+) als Coenzym [12]. Anfang der 80er Jahre deklarierten *Duine et al.* eine weitere Klasse der Dehydrogenasen, die sogenannten Chinoproteine [13]. Ihr Coenzym ist das Chinon 2,7,9-Tricarboxy-1H-pyrrolo[2,3-f]-chinolin-4,5-dion, kurz Pyrrolochinolinchinon (PQQ) (Abb. 1), das fest, aber nicht-kovalent an das Enzym gebunden ist. Als natürlicher Elektronenakzeptor zur Regenerierung des reduzierten Coenzym dient z. B. eine Cytochrom c-Einheit des Enzyms [14].

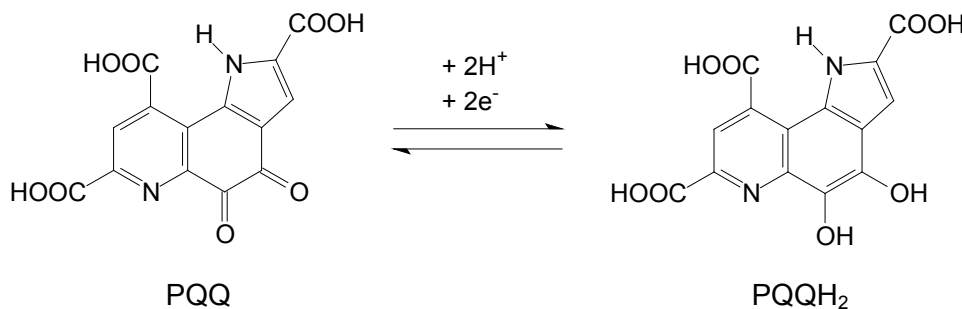


Abb. 1: Pyrrolochinolinchinon, oxidierte und reduzierte Form.

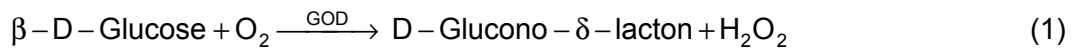
Das erste Enzym dieser Klasse, bei dem die Struktur der prosthetischen Gruppe von zwei Forschergruppen unabhängig voneinander aufgeklärt und als Pyrrolochinolinchinon charakterisiert wurde, war die Methanoldehydrogenase aus methylophilen Bakterien [15, 16]. Inzwischen sind mehr als 20 verschiedene Arten von Enzymen bekannt, die PQQ oder eine PQQ-ähnliche Gruppe als prosthetische Gruppe besitzen [17-21]. Chinoproteine weisen für den Einsatz in der Biosensorik zwei Vorteile gegenüber Oxidasen bzw. NAD(P)^+ -abhängigen Dehydrogenasen auf [22, 23]: Das Coenzym ist fest gebunden und muss bei der Reaktion nicht zugesetzt werden und die Reaktion ist sauerstoffunabhängig. Dadurch wird es möglich, in Lösungen mit einem Sauerstoff-Defizit sowie bei einem möglichst niedrigen Potential zu messen.

3.1.1.1 Eigenschaften der verwendeten Enzyme

Glucoseoxidase (EC 1.1.3.4)

Glucoseoxidase (GOD) gehört zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen und katalysiert die Oxidation von β -D-Glucose in Gegenwart von molekularem Sauerstoff zu D-Glucono- δ -lacton (Gl. 1). Das Enzym ist spezifisch für das β -Anomer, α -D-Glucose und andere Monosaccharide werden nur zu einem geringen Anteil (< 1%), 2-Deoxy-D-glucose zu ca. 6%

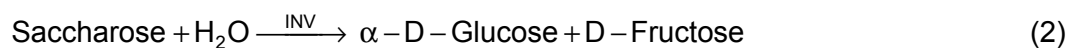
umgesetzt [24, 25].



Glucoseoxidase ist ein globuläres Glucoprotein mit einer Molekularmasse von etwa 160.000 Da, das aus zwei identischen Untereinheiten besteht, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede Untereinheit enthält ein FAD-Molekül als prosthetische Gruppe, das an den Redoxvorgängen des Enzyms beteiligt ist [7]. GOD aus *Aspergillus niger* besitzt ein pH-Optimum bei pH 5,6 und ein Temperaturoptimum zwischen 50 und 55 °C. Der K_M -Wert für Glucose beträgt 30 mM. Das Enzym wird durch Schwermetallionen wie Ag^+ , Hg^{2+} und Cu^{2+} inhibiert.

Invertase (EC 3.2.1.26)

Invertase (INV) wird in der Klasse der Hydrolasen in die Unterklasse der Glycosidasen eingeordnet, die die Hydrolyse glycosidischer Bindungen katalysieren. Saccharose besteht aus β -D-Fructose und α -D-Glucose, die über Hydroxylgruppen glycosidisch verknüpft sind. Die durch die Invertase katalysierte hydrolytische Spaltung der Saccharose in Glucose und Fructose wird auch als Inversion bezeichnet (Gl. 2). Außer Saccharose wird nur das Trisaccharid Raffinose durch Invertase gespalten [7, 24].



Invertase ist ein Glycoprotein mit einer Molekularmasse von etwa 270.000 Da. Das Hefeenzym besitzt ein pH-Optimum bei pH 4,5 und ein Temperaturoptimum zwischen 50 und 60 °C. Der K_M -Wert liegt bei 15 mM [26]. Das Enzym wird durch Schwermetallionen inhibiert, während Ionen der Erdalkalimetalle aktivierend wirken.

Mutarotase (EC 5.1.3.3)

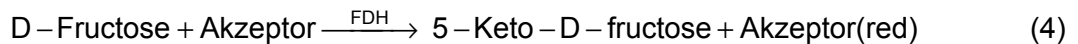
Das Enzym Mutarotase (MUT) gehört zur Klasse der Isomerasen. Es katalysiert die Einstellung des Mutarotationsgleichgewichtes zwischen den beiden Anomeren α -D-Glucose und β -D-Glucose (Gl. 3).



Mutarotase aus *Acinetobacter calcoaceticus* liegt als Monomer mit einer Molekularmasse von 40.000 Da vor. Das pH-Optimum liegt zwischen pH 6,5 und 7,5, das Temperaturoptimum zwischen 30 und 37 °C. Der K_M -Wert beträgt 19 mM [24]. Mutarotase wird durch Schwermetallionen gehemmt.

Fructosedehydrogenase (EC 1.1.99.11)

Fructosedehydrogenase (FDH) gehört zu der Klasse der Dehydrogenasen, die PQQ als prosthetische Gruppe besitzen. Das Enzym wurde erstmals 1966 von *Yamada et al.* in *Gluconobacter cerinus* entdeckt [27]. Sie beschrieben die durch FDH katalysierte Oxidation von D-Fructose zu 5-Keto-D-fructose in Gegenwart eines Akzeptors (Gl. 4). Später berichteten *Ameyama et al.* über die Aufreinigung und Charakterisierung der Fructosedehydrogenase aus *Gluconobacter industrius* [28].



Als künstliche Elektronenakzeptoren können in Gleichung 4 Kaliumhexacyanoferrat(III), Nitroblautetrazolium, Phenazinmethosulfat (PMS) und 2,6-Dichlorphenolindophenol eingesetzt werden, mit NAD(P)^+ und molekularem Sauerstoff findet dagegen keine Reaktion statt [24]. Das Enzym ist spezifisch für D-Fructose, andere Monosaccharide werden nur zu einem sehr geringen Anteil (< 0,5%), Disaccharide und Zuckeralkohole werden nicht umgesetzt [29]. Fructosedehydrogenase hat eine Molekularmasse von 140.000 Da. Das Enzym ist ein Trimer, das sich aus der eigentlichen Dehydrogenase (67.000 Da), einem Cytochrom c (50.800 Da) und einem Teil unbekannter Funktion (19.700 Da) zusammensetzt. Aufgrund des zusätzlichen Cytochroms c zur prosthetischen Gruppe PQQ wird Fructosedehydrogenase auch als Chinohämoprotein bezeichnet. FDH weist ein pH-Optimum bei pH 4,0 und ein Temperaturoptimum bei 37 °C auf. Der K_M -Wert beträgt 5 mM. Das Enzym wird durch Ag^+ , Hg^{2+} und Natriumlaurylsulfat (SDS) inhibiert.

3.1.1.2 Enzymimmobilisierung

Für die Verwendung der Enzyme als biologische Komponente der Biosensoren ist deren Fixierung auf dem Transducer notwendig. Hauptkriterium bei der Auswahl einer geeigneten, schonenden Immobilisierungsmethode ist neben dem Erhalt der katalytischen Aktivität des Enzyms eine möglichst einfache und automatisierbare Durchführung, die zu reproduzierbaren Ergebnissen führt. In der Literatur wird eine große Anzahl an unterschiedlichen Methoden beschrieben, die sich in vier Gruppen einteilen lassen [6, 7, 9] (Abb. 2).

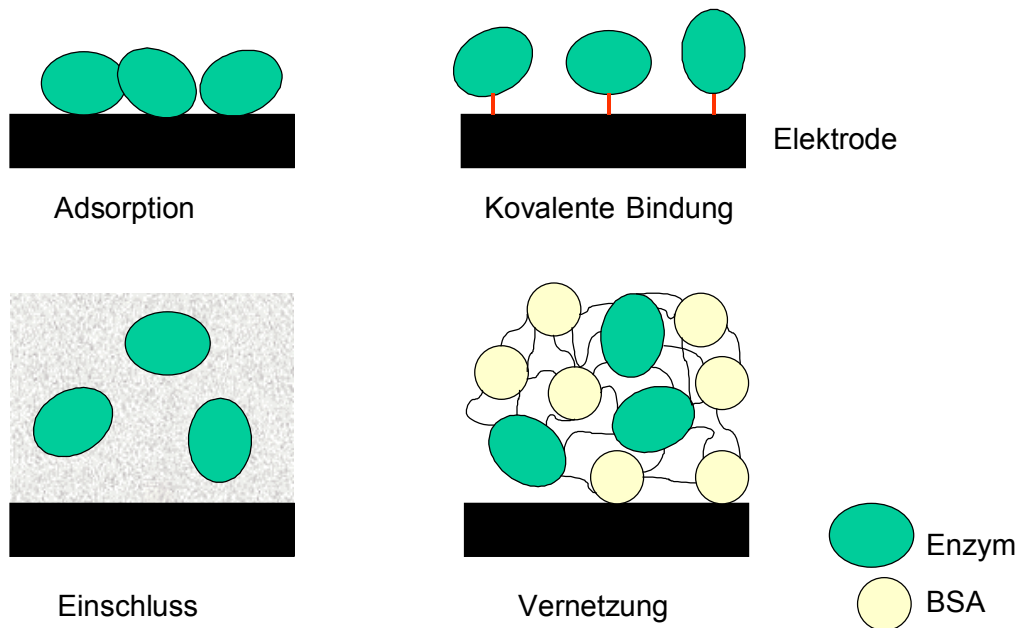


Abb. 2: Methoden zur Immobilisierung von Enzymen.

Adsorption

Bei der physikalischen Adsorption handelt es sich um die einfachste Immobilisierungsmethode. Eine wässrige Lösung der Biomoleküle wird für einige Zeit mit dem als Sensoroberfläche dienenden Träger in Kontakt gebracht. Anschließend werden die nicht adsorbierten Moleküle abgewaschen. Zwischen dem Träger und den Biomolekülen finden nur geringe Wechselwirkungen statt, die auf Van-der-Waals-Kräften, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen beruhen. Vorteilhaft ist neben der einfachen Anwendung, dass keine Chemikalien benötigt werden, die schädigend auf die Enzyme wirken könnten. Aktivitätsverluste treten deshalb bei dieser schonenden Methode kaum auf. Ein Nachteil der Methode besteht darin, dass sich die adsorbierten Moleküle aufgrund der Reversibilität des Prozesses bei Änderungen des pH-Wertes, der Temperatur, der Ionenstärke usw. ablösen können. Durch Adsorption von Alkoholdehydrogenase und NAD^+ auf Meldolablauf-modifizierten Graphitelektroden wurde ein Sensor zur Bestimmung von Alkohol in Getränken hergestellt [30]. Die Enzyme Lipase, β -Galactosidase und D-Aminosäureoxidase wurden auf Polyethylenimin-modifizierten Trägern adsorbiert [31]. Dabei wurde die mögliche Desorption der Enzyme durch Änderung des pH-Wertes und der Ionenstärke zur Wiederverwendung der Träger genutzt.

Kovalente Bindung

Die kovalente Bindung der Biomoleküle an einen Träger ist im allgemeinen irreversibel. Im wesentlichen handelt es sich bei den Techniken, die zur Anbindung eingesetzt werden, um

klassische Methoden der chemischen Kopplung, die häufig Mehrschrittreaktionen erfordern. Um Aktivitätsverluste zu verhindern, sollten an der Reaktion nur diejenigen Gruppen des Enzyms beteiligt sein, die nicht für das Zustandekommen seiner katalytischen Aktivität verantwortlich sind. Der verwendete Träger muss vor der Reaktion aktiviert werden. Die Enzyme Glucoseoxidase und L-Aminosäureoxidase wurden durch kovalente Bindung an Cyanursäurechlorid-modifizierte Graphitelektroden immobilisiert [32].

Vernetzung

Biomoleküle können durch bifunktionelle oder multifunktionelle Reagenzien intermolekular vernetzt werden. Bei dieser Methode verhindert die Coimmobilisierung von inerten Proteinen wie Albumin oder Gelatine eine zu hohe Beladung der Matrix mit Biomolekülen, die zu einer verminderten Aktivität durch eingeschränkte Diffusion und andere Inhibierungseffekte führen kann. Das am häufigsten eingesetzte Reagenz zur Vernetzung ist Glutaraldehyd. Es reagiert mit den Aminogruppen von Lysin im Enzym. Aber auch andere Reagenzien wie z. B. bis-Isocyanatderivate und bis-Diazobenzidin werden verwendet. Vorteile dieser Methode liegen in der einfachen Durchführung und der festen Bindung der Biomoleküle. Ein wesentlicher Nachteil besteht darin, dass Aktivitätsverluste durch chemische Veränderungen des aktiven Zentrums des Enzyms eintreten können. Die Arbeitsgruppe um *Bilitewski* immobilisierte die Enzyme Glucoseoxidase [33-35], Putrescinoxidase [33], Alkoholoxidase [34] und Fructosedehydrogenase [36] durch Vernetzung mit Rinderserumalbumin (BSA) und Glutaraldehyd. Durch Coimmobilisierung der Enzyme β -Galactosidase und Glucoseoxidase bzw. Invertase, Mutarotase und Glucoseoxidase wurden Sensoren zur Lactose- bzw. Saccharosebestimmung hergestellt [35]. Die entwickelten Sensoren wurden zur Bestimmung von Glucose, Fructose und Alkohol in Fruchtsaft und Wein, von Lactose in Milchprodukten sowie zur Bestimmung der Fischfrische eingesetzt. Lactatoxidase wurde in einer Polyvinylalkohol-Matrix durch chemische Vernetzung mit Triisocyanat immobilisiert und so ein Sensor zur Bestimmung von Lactat in Milchprodukten hergestellt [37]. In dieser Arbeit wurde die Vernetzung mit BSA und Glutaraldehyd hauptsächlich zur Immobilisierung des Enzyms Fructosedehydrogenase eingesetzt. Aber auch die anderen verwendeten Enzyme (Glucoseoxidase bzw. Invertase, Mutarotase und Glucoseoxidase) wurden nach dieser Methode immobilisiert.

Einschluss in eine Matrix

Bei der Immobilisierung durch Einschluss in eine polymere Matrix handelt es sich um eine sehr schonende Methode. Die Fixierung der Enzyme vor der Sensoroberfläche erfolgt durch die Polymerisation der Immobilisierungsmatrix. Aufgrund der Struktur der Matrix werden die

Enzymmoleküle am Hinausdiffundieren gehindert, während kleine Substrat- und Produktmoleküle leicht hinein- und hindurchdiffundieren können. Häufig verwendete Matrices sind unter anderem Polyvinylalkohol, Polyacrylamid und Polyurethane. *Bilitewski et al.* entwickelten eine UV-polymerisierbare Matrix [38], die sie zur Immobilisierung der Enzyme Glucoseoxidase [39], Lactatoxidase [40] sowie Fructosedehydrogenase [36] einsetzten. In der Arbeitsgruppe von *Hampp* wurden die Enzyme Glucoseoxidase, Glucoseoxidase und Invertase bzw. Ascorbatoxidase [41, 42] sowie Glucoseoxidase, Lactatoxidase bzw. Urease [43] durch Einschluss in Polyvinylacetat-Dispersionen immobilisiert. Enzyme können auch mittels Sol-Gel-Technik in eine Silikatglasmatrix [44] oder durch Elektropolymerisation in einen Polypyrrolfilm [45] eingeschlossen werden.

In dieser Arbeit wurde ein blockiertes Polyurethanpräpolymer zur Immobilisierung aller verwendeten Enzyme eingesetzt. Dieses Poly(carbamoylsulfonat)-Hydrogel (auch PCS-Hydrogel) ist ein Derivat des Polyurethans. Durch Reaktion mit Natriumhydrogensulfit werden die hochreaktiven Isocyanatgruppen des Polyurethanpräpolymers modifiziert und in weniger reaktive Carbamoylsulfonatgruppen umgewandelt (Abb. 3). Es entsteht das Poly(carbamoylsulfonat)-Präpolymer [46, 47]. Dieses Präpolymer ist gegenüber dem Edukt der Synthesereaktion wesentlich weniger reaktiv, so dass im sauren pH-Bereich zunächst keine Vernetzung auftritt.

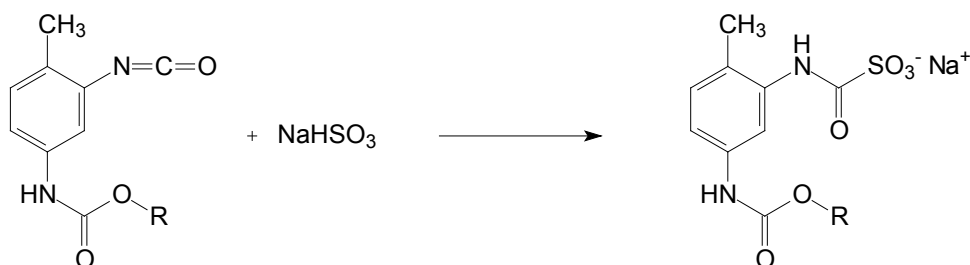


Abb. 3: Synthese des blockierten PCS-Präpolymers aus dem Polyurethanpräpolymer und Natriumhydrogensulfit.

Durch Erhöhung des pH-Wertes lässt sich die Polymerisation initiieren (Abb. 4). Besonders vorteilhaft ist die Verwendung von wässriger Polyethyleniminlösung als Base. Da Polyethylenimin seinerseits polymer vorliegt, kann es mit dem PCS-Präpolymer vernetzen, und es wird ein Copolymer mit einem hohen Wasseranteil von ca. 90% erhalten [48]. Durch geeignete Wahl des pH-Wertes bleibt das PCS-Gel einige Zeit verarbeitbar.

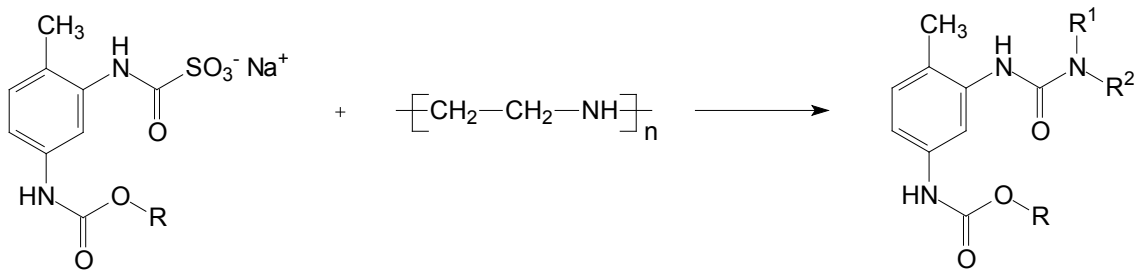


Abb. 4: Polymerisation des PCS-Präpolymers.

R^1 und R^2 sind polymere Reste des Polyethylenimins.

Das PCS-Präpolymer, das in wässriger Lösung vorliegt, zeichnet sich neben seiner einfachen Handhabung durch seine geringe Toxizität gegenüber biologischen Komponenten aus und hat seine Eignung als Immobilisierungsmatrix für Enzyme bereits mehrfach unter Beweis gestellt [49-54].

3.1.1.3 Enzymstabilisierung

Ein wesentliches Qualitätskriterium eines Enzymsensors stellt seine Arbeits- und Lagerstabilität dar. Während die Anforderungen an die Arbeitsstabilität unter Umständen - z. B. bei Einmalsensoren - stark begrenzt sein können, sollte die Lagerstabilität der Enzymsensoren für eine kommerzielle Anwendung mehrere Monate betragen. Die Stabilität eines Sensors hängt primär von der Aktivität der Enzyme in der Immobilisierungsmatrix ab und kann durch den Zusatz verschiedener Additive erhöht werden.

Eine wichtige Gruppe von Additiven zur Enzymstabilisierung stellen die sogenannten "kompatiblen Solute" dar. Es handelt sich dabei um neutrale, nichtionische, organische Moleküle mit niedrigem Molekulargewicht, die zur Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichtes von halophilen und halotoleranten Eubakterien in hohen Konzentrationen von 1 bis 2 M akkumuliert werden und mit dem Zellstoffwechsel kompatibel sind [55]. Neben ihrer osmotischen Funktion kommt diesen Soluten eine stabilisierende und schützende Funktion gegenüber den Zellproteinen bzw. Enzymen zu, indem sie ihre Hydratation und Löslichkeit, und damit ihre Funktionsfähigkeit auch bei geringer Wasseraktivität sichern. Der Gruppe der kompatiblen Solute lassen sich folgende Stoffklassen und deren Derivate zuordnen: Polyole, Zucker, Aminosäuren und Betaine. Besondere Bedeutung für die Enzymstabilisierung haben die Ectoine (Derivate der 2-Methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure) erlangt (Abb. 5), cyclische Aminosäurederivate, die erstmals von *Galinski et al.* entdeckt und beschrieben wurden [56].

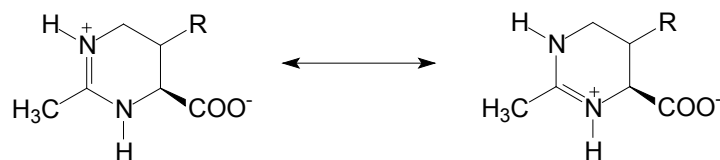


Abb. 5: L-Ectoin (R = H) und S,S- β -Hydroxyectoin (R = OH) (mesomere Formen).

Dieser Arbeitsgruppe gelang auch erstmals der Nachweis einer enzymstabilisierenden Wirkung der Ectoine [55, 57-59]. Dabei wurde bereits ihre Eignung als Stabilisatoren für die Enzyme Lactatdehydrogenase, Phosphofruktokinase, Isocitratdehydrogenase und β -Galactosidase gezeigt. Hydroxyectoin konnte darüberhinaus erfolgreich zur Stabilisierung von Rinderribonuclease A eingesetzt werden [60]. Neben den Ectoinen wies insbesondere das Disaccharid Trehalose (Abb. 6) eine enzymstabilisierende Wirkung auf [57, 58]. Der positive Einfluss von Trehalose auf die Stabilität der Phosphofruktokinase wurde zuvor bereits von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben [61, 62]. Eine stärker stabilisierende Wirkung auf β -Galactosidase als verschiedene Zucker und Aminosäuren wiesen Cyclodextrinderivate, u. a. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, auf [63]. In den bisher erwähnten Arbeiten wurde die stabilisierende Wirkung der kompatiblen Solute gegenüber Stressbedingungen wie Hitze, wiederholtes Einfrieren und Auftauen und Gefriertrocknung auf die gelösten Enzyme untersucht. Trehalose wurde jedoch auch zur Stabilisierung von immobilisierter Alkoholdehydrogenase eingesetzt [30]. Sowohl die Signale als auch die Lagerstabilität des beschriebenen Sensors konnten durch Zusatz des Zuckers stark erhöht werden.

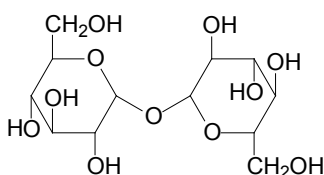


Abb. 6: Struktur der Trehalose, Disaccharid aus zwei Glucosemolekülen.

Über die Wirkungsweise der kompatiblen Solute existieren verschiedene Theorien, von denen die "preferential exclusion theory" von *Arakawa et al.* [64] bisher am wahrscheinlichsten scheint. Diese Theorie besagt, dass die Stabilisierung der Proteine auf einem Ausschluss der Solute von der Proteinoberfläche beruht. Da dieser Ausschluss thermodynamisch ungünstig ist, wird die native Proteinstruktur stabilisiert, um die Kontaktfläche zwischen dem Protein und der umgebenden Lösung zu minimieren.

Eine weitere Möglichkeit zur Stabilisierung von Enzymen bietet der kombinierte Zusatz von

DEAE-Dextran (Diethylaminoethyl-dextran) und Lactitol (4-O- β -D-Galactopyranosyl-D-glucitol). DEAE-Dextran ist ein kationischer Polyelektrolyt mit einer durchschnittlichen Molekularmasse von $5 \cdot 10^5$ Da. Das Dextranmolekül ist an der zweiten Position durch die kationische Diethylaminoethylgruppe substituiert. Lactitol ist ein Polyalkohol, der sich durch teilweise Reduktion von dem Disaccharid Lactose ableitet. *Gibson et al.* konnten durch Zugabe von DEAE-Dextran/Lactitol das Enzym Glucoseoxidase stabilisieren [65] sowie die Lagerstabilität von Alkohol- und L-Glutamatsensoren auf der Basis von Alkohol- bzw. L-Glutamatoxidase erhöhen [66]. Durch Zusatz von DEAE-Dextran wurde sowohl eine Aktivierung als auch eine Stabilisierung von gelöster Peroxidase erreicht [67]. Mehrfach wurde in der Literatur über eine Erhöhung der Stabilität von Glucose- und Lactatsensoren durch Zugabe von DEAE-Dextran bzw. DEAE-Dextran/Lactitol berichtet [67-69].

In dieser Arbeit wurde, nach einem Vorversuch mit weiteren Additiven, der Einfluss der Substanzen Hydroxyectoin, Trehalose und Hydroxypropyl- β -cyclodextrin auf die Lagerstabilität der Multianalysensoren untersucht.

3.1.2 Elektrochemische Enzymsensoren

Elektrochemische Analysenmethoden werden in Verfahren ohne Stromfluss und Verfahren mit Stromfluss unterteilt [5]. Verfahren ohne Stromfluss werden als potentiometrische Verfahren bezeichnet. Bei den Verfahren mit Stromfluss wird zwischen solchen mit praktisch vollständigem und solchen mit vernachlässigbarem Stoffumsatz unterschieden. Das bekannteste Verfahren mit vollständigem Stoffumsatz stellt die Coulometrie dar. Zu den Verfahren mit vernachlässigbarem Stoffumsatz zählen die Amperometrie, Voltammetrie und Konduktometrie. Als Messmethoden elektrochemischer Enzymsensoren sind vor allem die Potentiometrie und Amperometrie sowie in geringerem Maße die Konduktometrie von Bedeutung.

Die Potentiometrie beruht auf der Messung von Potentialdifferenzen zwischen zwei Elektroden. Enzymsensoren mit potentiometrischen Transducern können dann angewendet werden, wenn im Verlauf einer enzymatischen Reaktion Protonen entstehen oder verbraucht werden [70]. Sie basieren größtenteils auf einer ionenselektiven Elektrode. Ein wichtiges Beispiel eines potentiometrischen Sensors ist der Harnstoffsensor zur Überprüfung der Nierenfunktion [54]. Hier wird Harnstoff durch das Enzym Urease unter Bildung von Ammoniumionen hydrolysiert.

Bei der Amperometrie wird der Strom, der durch Oxidation oder Reduktion elektroaktiver Substanzen an der Elektrode beim Anlegen eines konstanten Potentials fließt, gemessen und daraus die Konzentration ermittelt. Die in dieser Arbeit beschriebenen Enzymsensoren beruhen auf dem amperometrischen Messprinzip, das im folgenden näher erläutert wird.

3.1.2.1 Amperometrische Enzymsensoren

Beim Anlegen eines Potentials kommt es durch die Umsetzung der elektroaktiven Substanz an der Arbeitselektrode zur Ausbildung der sogenannten Nernstschen Diffusionsschicht, deren Ausdehnung strömungsabhängig ist. Der Stofftransport in dieser Schicht erfolgt durch Diffusion. Wird die Lösung mit konstanter Geschwindigkeit gerührt (stationärer Fall), bildet sich eine Diffusionsschicht nahezu konstanter Dicke aus, an deren Grenze genügend elektroaktive Teilchen aus der Lösung nachgeliefert werden. Der größte Stofftransport liegt vor, wenn der Konzentrationsgradient maximal ist. Dies ist der Fall, wenn die Konzentration des elektroaktiven Stoffes an der Elektrodenoberfläche gleich Null ist, d. h. jedes Teilchen, das die Elektrode erreicht, sofort elektrochemisch umgesetzt wird. Der unter diesen Bedingungen gemessene, maximale Strom wird als Diffusionsgrenzstrom bezeichnet und ist proportional zur Analytkonzentration (Gl. 5).

$$I_D = \frac{zFAD}{\delta} \cdot c \quad (5)$$

mit

- z: Anzahl der an der Reaktion beteiligten Elektronen
- F: Faraday-Konstante
- A: Fläche der Arbeitselektrode
- D: Diffusionskoeffizient
- δ : Dicke der Diffusionsschicht
- c: Konzentration des Analyten

Zweielektrodensysteme, bestehend aus Arbeits- und Gegenelektrode, weisen den Nachteil auf, dass das angelegte Arbeitselektrodenpotential beeinflusst werden kann, wenn sich die Leitfähigkeit des Elektrolyten ändert oder der Stromfluss einen Spannungsabfall zwischen Arbeits- und Gegenelektrode hervorruft. Deshalb verwendet man üblicherweise eine Dreielektrodenanordnung, bei der das Potential zwischen der Arbeits- und der Referenzelektrode durch einen Potentiostaten vorgegeben wird, während der Strom über die Gegenelektrode abfließt. Der Vorteil gegenüber der Zweielektrodenanordnung besteht darin, dass die Referenzelektrode stromlos bleibt und sich ihr Potential nicht ändert [71]. Als Referenzelektrode werden meist Elektroden zweiter Art wie die Ag/AgCl- oder die Standardkalomelektrode verwendet, die leicht zu handhaben sind und unter definierten Bedingungen ein reproduzierbares Potential gegenüber der Normalwasserstoffelektrode besitzen. Das Standard-Elektrodenpotential der Ag/AgCl-Elektrode beträgt +0,2223 V, das der Kalomelektrode +0,2682 V [72].

Zur Herstellung amperometrischer Transducer hat sich die Dickschichttechnologie besonders bewährt [73]. Bei dieser Technologie werden geeignete Pasten in Siebdrucktechnik auf ein Substrat aufgebracht. Die Dickschichttechnologie ermöglicht die Produktion der Sensoren in großen Stückzahlen und mit hoher Reproduzierbarkeit und ist daher auch für die Herstellung kostengünstiger Einmalsensoren geeignet.

Wesentliche Vorteile der Amperometrie sind die niedrige Nachweisgrenze sowie ein über mehrere Konzentrationsdekaden linearer Messbereich. Bei vielen enzymatischen Reaktionen, z. B. bei denen der Oxidasen, wird Sauerstoff verbraucht und Wasserstoffperoxid gebildet, so dass entweder die Abnahme der Sauerstoff-Konzentration oder die Zunahme der Wasserstoffperoxid-Konzentration amperometrisch detektiert werden kann, aber auch die Umsetzung künstlicher Redoxmediatoren an der Elektrode ist möglich [70]. In dieser Arbeit wurde die Detektion des Wasserstoffperoxids an den Glucose- und Saccharosesensoren sowie die Detektion eines Redoxmediators am Fructosesensor als Nachweismethode gewählt.

Sowohl hinsichtlich der Anzahl der in der Literatur beschriebenen als auch der kommerziell erhältlichen Enzymsensoren machen die Glucosesensoren den größten Anteil aus. Auch der erste, von *Clark und Lyons* beschriebene Enzymsensor war ein Glucosesensor [8]. Das bei Glucosesensoren am häufigsten verwendete Enzym ist die Glucoseoxidase. Die wichtigste Anwendung der Glucosesensoren ist die Messung der Glucosekonzentration im Blut bei Diabetes mellitus-Patienten [74, 75]. Die Firma Yellow Springs Instruments (USA) entwickelte bereits 1975 basierend auf der Clark'schen Elektrode den ersten Glucoseanalysator zur Messung von Glucose in Vollblut (Modell 23 YSI). Im Jahr 1987 wurde mit dem ExacTech der Firma Medisense (USA) das erste Messgerät mit Einmalenzymensoren zur Blutzuckerselbstkontrolle von Diabetikern auf den Markt gebracht. Weitere wichtige Analyte, die mit Enzymsensoren bestimmt werden können, sind die Monosaccharide Galactose und Fructose und die Disaccharide Saccharose, Lactose und Maltose sowie die organischen Säuren Lactat, Pyruvat, Oxalat, Ascorbinsäure und Harnsäure. Außerdem sind u. a. Sensoren zur Bestimmung von Creatinin, Aminosäuren, biogenen Aminen, Alkoholen, Hypoxanthin, Phosphat und Phenolen beschrieben worden [5, 76, 77]. Für diese Analyte stehen entweder geeignete Oxidoreduktasen zur Verfügung oder aber die Bestimmung beruht nach einer vorgelagerten Umsetzung durch eine Hydrolase, bei der eines der Reaktionsprodukte Glucose ist, letztendlich auf der Glucosebestimmung durch GOD. Zu den wichtigsten Anwendungsbereichen zählen neben der medizinischen Diagnostik die Lebensmittelanalytik [78-80] sowie die Prozess- und Umweltkontrolle. *Cammann* [5] sowie *Alvaraz-Icaza et al.* [9] zeigen eine Auswahl kommerziell erhältlicher Enzymsensorsysteme.

3.1.2.2 Mediatoren

Bei der durch Dehydrogenasen katalysierten enzymatischen Reaktion wird anders als bei der Reaktion der Oxidasen (Abb. 7) kein Sauerstoff verbraucht bzw. Wasserstoffperoxid gebildet, das zur Detektion an der Elektrode elektrochemisch umgesetzt werden könnte. Eine direkte Reoxidation des reduzierten Coenzym an der Elektrode erfordert oft eine hohe Überspannung. Darüberhinaus befindet sich das redoxaktive Zentrum des Enzyms meist im Inneren des Moleküls und ist somit aufgrund des großen Abstandes zur Elektrode einer direkten elektrochemischen Umsetzung nur schwer zugänglich. Vorteilhafter ist die Verwendung eines künstlichen Redoxmediators zum Elektronentransfer zwischen Enzym und Elektrode, der zunächst das Coenzym reoxidiert und anschließend selbst an der Elektrode reoxidiert wird (Abb. 7). Dabei ist es wichtig, dass der Mediator frei zwischen Enzym und Elektrode diffundieren kann [81]. Die Reoxidation eines Mediators ist in der Regel bei einem niedrigeren Potential möglich als die des Wasserstoffperoxids.

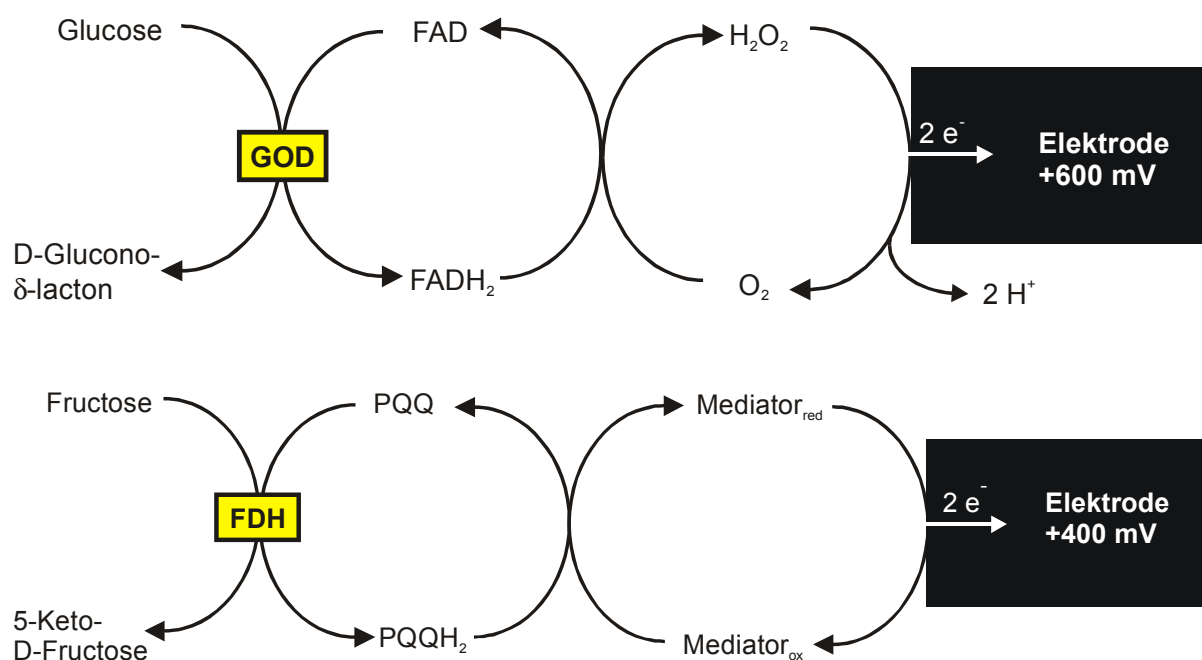


Abb. 7: Reaktionsschema der enzymatischen Glucose- und Fructosebestimmung.

Es sind die an der Reaktion beteiligten Enzyme Glucoseoxidase (GOD) und Fructosedehydrogenase (FDH) sowie deren Coenzyme gezeigt.

Ein Mediator sollte idealerweise folgende Eigenschaften aufweisen [6]:

- schnelle Kinetik des heterogenen Elektronentransfers
- schneller homogener Elektronentransfer mit dem Redoxprotein
- stabil in oxidierter und reduzierter Form
- keine Reaktion mit anderen Substanzen in der Lösung (insbesondere O_2)

Als Mediatoren werden vor allem Ferrocen-Derivate, Chinone, Hexacyanoferrat sowie organische Farbstoffe aus den Gruppen der Phenazine (z. B. Phenazinmethosulfat (PMS)), Phenoxazine (z. B. Meldolablau) und Phenothiazine (z. B. Thionin) eingesetzt. In dieser Arbeit wurde ein Mediator für die Fructosebestimmung mit dem Enzym Fructosedehydrogenase benötigt. In der Literatur wurde besonders häufig über die Verwendung von Hexacyanoferrat als Mediator für die Fructosebestimmung berichtet. In den meisten Fällen wurde das Hexacyanoferrat der Messlösung als löslicher Mediator in Konzentrationen von 2 bis 10 mM zugegeben [36, 82-89]. Jedoch wurde auch der Einschluss von Hexacyanoferrat in einen Polypyrrolfilm [90-92] sowie in einen Polymerfilm, bestehend aus 1,3-Phenylendiamin und Resorcinol [93], beschrieben. Das Arbeitselektrodenpotential lag im allgemeinen zwischen 380 und 400 mV vs. Ag/AgCl. Als Elektrodenmaterial wurde überwiegend Platin [36, 82, 85, 86, 90-92], seltener Graphit [83, 84] eingesetzt. Eine Immobilisierung des Mediators wird oftmals angestrebt, um einen reagenzlosen Sensor zu erhalten, bei dem der Messlösung keine Reagenzien zugesetzt werden müssen. Ein häufiges Problem stellt jedoch das Auswaschen des Mediators bei der Messung dar, das die Anwendbarkeit dieser Sensoren stark einschränkt.

Mehrere Arbeitsgruppen verwendeten Ferrocen [91, 94, 95] bzw. Hydroxymethylferrocen [94, 96] als Mediator für die Fructosebestimmung. Dabei wurden Graphitelektroden mit Ferrocen oder Hydroxymethylferrocen modifiziert [94], Ferrocen wurde in einen Polypyrrolfilm eingeschlossen [91] oder Celluloseacetat-Membranen wurden mit Ferrocen modifiziert [95]. Hydroxymethylferrocen wurde auch in gelöster Form dem Messpuffer zugesetzt [96]. Ferrocenpropionsäure-modifiziertes BSA wurde zum Elektronentransfer zwischen FDH und einer Zinnoxid-Elektrode verwendet [97]. Die Arbeitsgruppe von *Domínguez* setzte Osmium-Bipyridyl-Komplexe als Mediator ein [98-100]. Entweder wurden Graphitelektroden mit dem Mediator modifiziert [99, 100] oder der Osmium-Komplex wurde an ein Redoxpolymer gebunden [98]. Coenzym Q₆ wurde zum Elektronentransfer zwischen FDH und einer Goldelektrode verwendet [101]. *Matsumoto et al.* [102] setzten p-Benzochinon als löslichen Mediator ein. Außerdem wurde über die Modifizierung von Graphitelektroden mit p-Benzochinon [103], Meldolablau [104], Tetracyanochinodimethan (TCNQ) [93] sowie dem Tetrathiafulvalen-Tetracyanochinodimethan (TTF-TCNQ)-Komplex [105] berichtet. Der TTF-TCNQ-Komplex wurde auch in eine Polypyrrolmatrix eingeschlossen [106].

Neben Hexacyanoferrat wurde in dieser Arbeit die Eignung von Phenazinmethosulfat (PMS) als Mediator für den Fructosesensor getestet (Abb. 8). In der Literatur wurde der Einsatz von PMS für den Elektronentransfer zwischen Peroxidase und einer "glassy carbon"-Elektrode bei der Bestimmung von Wasserstoffperoxid beschrieben [107, 108]. Phenazinmethosulfat wurde entweder dem Messpuffer zugesetzt [107] oder durch Einschluss in einen Nafionfilm

auf der Elektrode immobilisiert [108]. Das Messpotential betrug in beiden Fällen -200 mV vs. SCE. Durch Coimmobilisierung von Peroxidase und GOD bzw. Peroxidase, GOD und β -Galactosidase wurden auf diese Weise Sensoren zur Glucose- bzw. Lactosebestimmung hergestellt [108]. PMS wurde auch zur Reoxidation von Glucoseoxidase eingesetzt [109]. Durch Modifizierung von Graphitelektroden mit GOD und PMS war eine erhebliche Reduktion des Messpotentials auf +200 mV vs. Ag/AgCl im Vergleich zu einer nicht medierten Glucosebestimmung bei einem Potential von +600 mV vs. Ag/AgCl möglich. In anderen Arbeiten wurde PMS ebenfalls für die Regenerierung der Glucoseoxidase eingesetzt, die Reoxidation des PMS wurde jedoch mit Hexacyanoferrat durchgeführt, das dann bei einem Potential von 360 mV vs. SCE [110] bzw. 260 mV vs. Ag/AgCl [111] an der Elektrode umgesetzt wurde. Die beiden Mediatoren wurden entweder in gelöster Form eingesetzt [110], oder es wurde ein Mikroreaktor verwendet, der das Enzym und die Mediatoren enthielt [111]. Bei einem Glycerinsensor, der zur Bestimmung von Glycerin in Wein eingesetzt wurde, diente PMS zur Regenerierung des Enzyms Glycerindehydrogenase, das - wie Fructosedehydrogenase - PQQ-abhängig ist [112]. Der Mediator wurde dem Messpuffer zugesetzt und bei +300 mV vs. Ag/AgCl an der Elektrode reoxidiert.

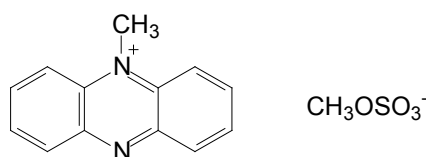


Abb. 8: Struktur des Redoxmediators Phenazinmethosulfat (PMS).

3.2 Wein

3.2.1 Bedeutung von Zucker im Wein

In Most und Wein spielen von den Kohlenhydraten nur die Zucker Glucose, Fructose und in geringerem Maße Saccharose eine Rolle. Die Beurteilung eines Mostes erfolgt anhand seines Zucker- und Säuregehaltes [113, 114]. Gute Traubenmoste enthalten 12-25% Zucker, der sich zu etwa gleichen Teilen in Glucose und Fructose aufteilt. In überreifen Beeren überwiegt Fructose. Saccharose ist im Most von Natur aus nur in geringen Mengen bis maximal 10-12 g/L vorhanden, ist aber insofern von Bedeutung, als sie bei der Anreicherung zugesetzt werden kann. Sie wird durch hefeeigene Invertase rasch in gärfähigen Invertzucker, ein Gemisch aus gleichen Teilen Glucose und Fructose, gespalten.

Die Zucker des Mostes werden bei der alkoholischen Gärung zu Ethanol und Kohlendioxid umgesetzt. Die Gärung erfolgt entweder spontan durch verschiedene, mosteigene Hefen, meist aber durch Zugabe von Reinzuchthefen, insbesondere der Art *Saccharomyces cerevisiae*, die weitgehend resistent sowohl gegen SO_2 als auch gegen die in roten Mosten enthaltenen Gerbsäuren sind. Da die meisten Zuchthefen glucophil sind, überwiegt nach der Reingärung die Fructose. Es besteht eine Abhängigkeit des Glucose/Fructose-Verhältnisses vom jeweiligen Vergärungsgrad [2]. Die Bestimmung der Abnahme der Zucker während der Gärung ermöglicht es, den Gärverlauf zu verfolgen, was vor allem bei Weinen hoher Qualität von Bedeutung ist.

Sowohl "QbA-Weine" (Qualitätsweine bestimmter Anbaugebiete) als auch Prädikatsweine unterliegen einer amtlichen Beurteilung. Die anerkannten Analysenvorschriften sind im Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften niedergelegt [115]. Prädikatsweine werden zusätzlich als Kabinett, Spätlese, Auslese, Beerenauslese oder Trockenbeerenauslese bezeichnet, wobei die Qualitätssteigerung mit Ausnahme des Kabinettweins auf spätere Lese, d. h. höhere Zuckergehalte zurückzuführen ist. Moste mit sehr hohen Zuckergehalten vergären nicht vollständig, sondern es verbleibt eine sogenannte Restsüße, so dass man in Weinen im allgemeinen von folgenden Zuckergehalten ausgehen kann [114]:

- Qualitätsweine: ca. 25 g/L
- Kabinettweine: ca. 30 g/L
- Spätlesen: ca. 40 g/L
- Auslesen: ca. 60 g/L

Zusätzlich dürfen folgende Geschmacksangaben zur Beschreibung der Weine verwendet werden: Weine mit einem Glucosegehalt unter 4 g/L, einem Saccharosegehalt unter 1 g/L und einem Gesamtzuckergehalt unter 20 g/L dürfen als "Diabetikerwein" bezeichnet werden. Als "trocken" gilt ein Wein, wenn sein Zuckergehalt niedriger als 9 g/L ist, wobei er nicht mehr als 2 g/L über dem Säuregehalt (in g/L) liegen darf. "Halbtrocken" sind Weine, deren Zuckergehalte nicht mehr als 18 g/L betragen, wobei sie höchstens 10 g/L über dem Säuregehalt liegen dürfen. Als "lieblich" werden Weine mit einem Restzuckergehalt von 18 bis 45 g/L und als "süß" mit einem Restzuckergehalt über 45 g/L bezeichnet [116, 117].

Da die meisten Weine durchgegoren sind, d. h. keinen vergärbaren Zucker mehr enthalten, kann zur Korrektur des Geschmacks eine Süßung vorgenommen werden. Die Süßung ist Teil des Herstellungsvorganges und gesetzlichen Regelungen unterworfen. Sie dient nicht der Erhöhung des Alkoholgehaltes, sondern der Einstellung der Restsüße des Weines. Die Süßung wird durch Zugabe von unvergorenem oder angegorenem Traubenmost, der sogenannten Süßreserve, durchgeführt.

Eine alternative Methode zur Einstellung der gewünschten Restsüße ist das Abstoppen der

alkoholischen Gärung. Dazu können aus technologischer Sicht folgende Verfahren angewendet werden [114]:

- Zugabe von mehr als 150 mg/L schwefliger Säure (SO₂)
- Zugabe von reinem Alkohol ("Sprit")
- Abkühlen
- Druckerhöhung mit Kohlendioxid auf über 8 bar

Weine, deren Restsüße aus einer gestoppten Gärung resultiert, weisen fast ausschließlich Fructose auf, da diese von den Hefen langsamer umgesetzt wird als Glucose. Mit Süßreserve abgerundete Weine zeigen dagegen ein charakteristisches Verhältnis aus Glucose und Fructose. Die Menge an Restzucker, insbesondere das Alkohol-Restzucker-Verhältnis, ist nicht willkürlich, sondern gesetzlich geregelt.

Ein weiterer Grund für den Zusatz von Zucker zu Weinen und auch zu Mosten ist ihre Anreicherung [116, 117]. In diesem Fall erfolgt noch ein (zweite) Gärung, bei der der Zucker zu Alkohol umgesetzt wird. Der Zweck der Anreicherung ist, einen von Natur aus vorhandenen, klimatisch begründeten Mangel an Zucker zu korrigieren. Daher ist das erlaubte Maß der Anreicherung von der jeweiligen Weinbauzone abhängig. Innerhalb der EU darf nur dann angereichert werden, wenn der für die jeweilige Weinbauzone festgelegte Mindestalkoholgehalt vorliegt. Andererseits darf ein bestimmter Höchstalkoholgehalt nicht überschritten werden. Zur Anreicherung kann reine Saccharose, konzentrierter Traubenmost (nur für Tafelwein) oder rektifiziertes Traubenmostkonzentrat verwendet werden. Letzteres wird aus Traubenmost hergestellt und besteht aus einer hochkonzentrierten Zuckerlösung (Glucose und Fructose), die so aufgearbeitet ist, dass Nichtzuckerstoffe weitgehend entfernt sind. Qualitätsweine mit Prädikat dürfen nicht angereichert werden. Um den Alkoholgehalt eines vergorenen Weines um 1 g/L anzuheben, müssen 2,2 g Saccharose je Liter Wein zugesetzt werden.

3.2.2 Zuckanalytik im Wein - Stand der Technik

Matissek et al. [1] geben einen Überblick über die Messprinzipien zur Zuckerbestimmung in Lebensmitteln. Sie nennen in erster Linie folgende Verfahren:

- Chromatographische Methoden
- Polarimetrie (Messung des optischen Drehvermögens)
- Nasschemische Methoden (Oxidation der Aldehyd-/Ketogruppe in alkalischer Lösung)
- Enzymatische Methoden

3.2.2.1 Klassische Methoden

Neben den oben genannten Methoden hat in der Weinanalytik die Refraktometrie zur Bestimmung des Zuckergehaltes einen hohen Stellenwert [115, 116]. Verschiedene Refraktometer sind bei der Leo Kübler GmbH erhältlich, dem Kooperationspartner des von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt geförderten Projektes, in dessen Rahmen diese Arbeit durchgeführt wurde, der sich auf dem Gebiet der Weinanalytik spezialisiert hat [118]. Die Methode beruht darauf, dass sich mit dem Gehalt einer Flüssigkeit an Extraktstoffen, in diesem Fall Zucker, die Lichtbrechung ändert. Besondere Bedeutung kommt der Refraktometrie bei der Reifeuntersuchung der Trauben vor der Lese und bei der Ermittlung des Mostgewichtes bei der Traubenannahme zu, um eine qualitätsbezogene Einstufung vornehmen zu können. Da Most und Wein jedoch auch Nichtzuckerstoffe enthalten und es sich somit nicht um ein reines Zweistoffsystem handelt, können mit der Refraktometrie nur angenäherte Werte erhalten werden. Darüberhinaus ist nur die Bestimmung des Gesamtzuckergehaltes möglich.

Chromatographische Methoden finden insbesondere dann Anwendung, wenn Gemische mehrerer Zucker zu trennen sind [1]. Dabei handelt es sich zum einen um die Dünnschichtchromatographie zur Identifizierung von Zuckern und zum anderen um die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), die sowohl eine Identifizierung als auch eine Quantifizierung der einzelnen Zucker erlaubt. Analysen mit der HPLC sind jedoch gerätetechnisch und zeitlich aufwendig und nur in Analysenlabors mit entsprechender Ausrüstung und qualifiziertem Personal durchzuführen. Am vorteilhaftesten werden freie Zucker verteilungschromatographisch an Ionenaustauscher-Phasen [119] oder modifizierten Silicagelen wie Amino-Phasen getrennt und bestimmt. Auch die gaschromatographische Bestimmung der einzelnen Zucker ist möglich [115, 120].

Polarimetrische Methoden haben den Vorteil, dass sie schnell durchgeführt werden können. Die Bestimmung erfolgt über die Messung des Winkels, um den die zu analysierende Lösung polarisiertes Licht dreht. Die Bestimmung von Saccharose neben Monosacchariden basiert darauf, dass eine rechtsdrehende Saccharoselösung nach Spaltung durch Invertase in ein linksdrehendes Gemisch aus Glucose und Fructose (Invertzucker) überführt wird. Diese Inversion des Drehwinkels ist auch für die enzymatische Reaktion namensgebend. Durch Differenzbildung zwischen dem Drehwert vor und nach der Inversion erhält man den Saccharosegehalt. Der Glucosegehalt kann aufgrund der Kenntnis der spezifischen Drehung der beteiligten Zucker ebenfalls berechnet werden. Als Nachteile dieser Methode sind anzusehen, dass die Lösungen hohe Zuckerkonzentrationen aufweisen müssen, nicht gefärbt sein dürfen und der zu bestimmende Zucker vor der Messung identifiziert worden sein muss. Erhebliche Verfälschungen der Analysenergebnisse können durch weitere in der Analytlösung vorhandene optisch aktive Verbindungen hervorgerufen werden.

Die in der Weinanalytik besonders häufig eingesetzten nasschemischen Methoden basieren auf den reduzierenden Eigenschaften der Zucker [1, 3, 4, 115, 120]. Sie arbeiten alle mit schwermetallhaltigen Reagenzien. Reduzierende Zucker wie Glucose und Fructose können direkt bestimmt werden, während Saccharose vor der Bestimmung durch saure Hydrolyse in die Bestandteile Glucose und Fructose gespalten werden muss. Mit diesen Methoden ist keine getrennte Bestimmung der einzelnen Zucker, sondern nur eine Unterscheidung zwischen direkt reduzierenden und nach Inversion reduzierenden Zuckern möglich. Es sind verschiedene Methoden beschrieben worden, die die Eigenschaft der Zucker nutzen, Kupfer(II)-Verbindungen in der Hitze im alkalischen Medium zu reduzieren. Entsprechend dem Gehalt an reduzierenden Zuckern fällt Kupfer(I)oxid aus. Die verbleibenden Kupfer(II)-Ionen werden titrimetrisch erfasst. Bei diesen Bestimmungen müssen die jeweiligen Versuchsbedingungen stets sehr genau eingehalten werden. Vor der eigentlichen Analyse ist immer eine Klärung der Probe mit Bleiacetat oder Zinkhexacyanoferrat notwendig.

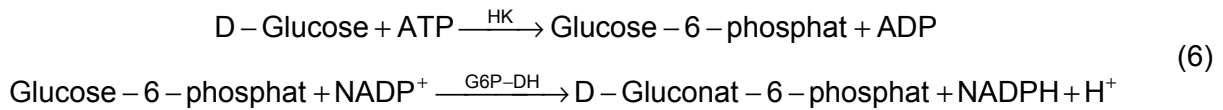
Bei der in Analysenlaboren durchgeführten Methode nach Luff-Schorl [115, 121] erfolgt die Klärung mit Carrez-Lösung (Zinkhexacyanoferrat). Ein Aliquot der geklärten Probe wird mit Luff'scher Lösung, bestehend aus Kupfersulfat, Citronensäure und Natriumcarbonat, versetzt und zum Sieden erhitzt. Nach schnellem Abkühlen, Zugabe von Kaliumjodid und Ansäuern mit Schwefelsäure werden die verbleibenden Kupfer(II)-Ionen jodometrisch mit Natriumthiosulfat titriert. Der Verbrauch an Thiosulfatlösung ist der Zuckerkonzentration nicht direkt proportional, sondern der Zusammenhang muss aus Tabellen entnommen werden.

Eine Abwandlung der Methode ist die Bestimmung der reduzierenden Zucker nach Dr. Rebelein [122]. Hier wird die geklärte Probe mit Kupfersulfat und Kalium-Natrium-Tartrat (Fehling'sche Lösung) versetzt. Aufgrund angepasster Konzentrations- und Erhitzungsbedingungen verläuft die Oxidation stöchiometrisch. Eine weitere Abwandlung beschreibt die Bestimmung der reduzierenden Zucker innerhalb der Alkoholbestimmung nach Dr. Jacob [123]. Die notwendigen Glasgeräte zur Destillation und Chemikalien sind als Combitest® im Weinfachhandel erhältlich. Eine einfache halbquantitative Methode, die mit Reagenztabletten arbeitet, wird unter dem Namen Clinitest® vertrieben [124].

3.2.2.2 Enzymatische Methoden

Photometrische Tests auf der Basis enzymatischer Bestimmungsmethoden, z. B. UV-spektrometrische Tests zur Bestimmung von Saccharose, D-Glucose und D-Fructose von Boehringer Mannheim (jetzt Roche) [125] zeichnen sie sich durch ein hohes Maß an Spezifität aus, wodurch die Erfassung einzelner Zuckerarten in Gemischen möglich ist. Aufgrund ihrer Handhabung konnten sie sich zwar in speziell ausgewiesenen Laboratorien, nicht jedoch in der Vor-Ort-Analytik durchsetzen. Ein weiterer Nachteil der Tests besteht

darin, dass trübe Flüssigkeiten vor der Bestimmung filtriert oder mit Carrez-Lösung geklärt werden müssen.



Bei diesen Tests wird die Phosphorylierung von D-Glucose mit ATP durch das Enzym Hexokinase (HK) katalysiert. Das entstehende D-Glucose-6-phosphat wird von dem Coenzym NADP^+ in Gegenwart des Enzyms Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) oxidiert, wobei die Menge des gleichzeitig gebildeten NADPH der ursprünglich vorhandenen Glucosemenge äquivalent ist (Gl. 6). Da NADPH im UV-Spektrum gegenüber NADP^+ eine zusätzliche Absorptionsbande mit einem Maximum bei 340 nm zeigt, kann aus deren Zunahme der Glucosegehalt berechnet werden. Der Saccharosegehalt ergibt sich aus der Differenz der Glucosemessungen vor und nach enzymatischer Behandlung der Probe mit dem Enzym Invertase. Fructose wird im Anschluss an die Glucosebestimmung gemessen. D-Fructose wird ebenfalls durch ATP in Gegenwart von Hexokinase phosphoryliert. Das entstehende Fructose-6-phosphat wird enzymatisch durch Phosphoglucose-Isomerase in Glucose-6-phosphat überführt, und die Bestimmung verläuft analog der Glucosebestimmung. Auf einer enzymatischen Methode basiert auch das Reflectoquant[®]-System der Firma Merck [126], das mit Teststäbchen arbeitet. Der gebildete unlösliche Farbstoff wird anschließend optisch detektiert.

3.2.2.3 Enzymsensoren

Durch die Immobilisierung der Enzyme in Enzymsensoren ist eine Vereinfachung der Handhabbarkeit und eine Kostenreduktion zu erwarten [80]. Einen guten Überblick über die mit Enzymsensoren bestimmbaren Parameter bei der Weinbereitung geben *Luque de Castro et al.* [127]. Neben reduzierenden Zuckern nennen sie vor allem Ethanol, organische Säuren wie Milch- und Äpfelsäure sowie Glycerin, Acetaldehyd und Sulfit.

Ein Hybrid-3-Kanal-Multibiosensor wurde zur simultanen Bestimmung des Glucose-, Fructose- und Ethanolgehaltes in Wein eingesetzt [84]. Der Sensor enthält drei Arbeitselektroden zur Bestimmung der drei Analyte und eine Referenzelektrode. Wässrige Lösungen der Enzyme Glucoseoxidase, Fructosedehydrogenase und Alkoholdehydrogenase wurden auf die verwendeten "solid binding matrix" Komposit-Transducer gesprüht, mit einer Dialysemembran bedeckt und mit einem O-Ring fixiert. Hexacyanoferrat diente als löslicher Mediator für die Fructose- und Alkoholbestimmung, für den Glucosesensor wurde eine Ferrocen-modifizierte Elektrode verwendet. Die einzelnen Sensoren beeinflussten sich nicht

gegenseitig und wiesen eine gute Stabilität auf. Die Weinproben wurden vor der Messung verdünnt. Bei der Messung in Most wird zusätzlich eine Filtration der Probe empfohlen. Die Abweichungen vom Referenzwert lagen bei 6 untersuchten Weinproben unter 4%. Das Biosensorsystem wird unter dem Namen Wine Checker "PerBacco 2000" kommerziell vertrieben [128]. Ein zweiter Hybrid-3-Kanal-Multibiosensor wurde von denselben Autoren zur Bestimmung der Analyte L-Lactat, L-Malat und Sulfid in Wein entwickelt [84]. In weiteren Arbeiten werden Variationen des Fructosesensors [83], des Glucosesensors [129] und des Malat- und Lactatsensors [130] beschrieben. Ein anderes Biosensorsystem, das für die Anwendung in der Weinanalytik geeignet ist und bereits kommerziell erhältlich ist, ist das Handmessgerät SensLab 1 der Firma SensLab (Leipzig) [131]. Hierbei handelt es sich um ein 1-Kanalmessgerät, bei dem die Sensoren zur Bestimmung verschiedener Analyte ausgetauscht werden müssen. Bisher sind Sensoren zur Bestimmung der Analyte Glucose, Saccharose, Lactat, Ethanol, Glutamat, Wasserstoffperoxid und Ascorbat erhältlich. Die Messung beinhaltet einen Verdünnungs- und einen Kalibrationsschritt.

Weitere Enzymsensoren, deren Anwendung in Wein in der Literatur beschrieben wurde, wurden hauptsächlich zur Glucosebestimmung entwickelt. In allen Fällen wurden die Proben vor der Messung verdünnt. Prinzipiell sind bei der Messung mit Enzymsensoren zwei verschiedene Verfahren möglich: Das Batch-Verfahren, bei dem in einer gerührten Messzelle mit verdünnten Proben gearbeitet wird, bietet sich bei einer kleineren bis mittleren Anzahl von Analysen an. Durchflusssysteme werden dagegen zur kontinuierlichen Messung eingesetzt. Bei der Fließinjektionsanalytik (FIA) wird ein kontinuierlicher Pufferstrom am Sensor vorbeigeleitet, in den die Probe injiziert wird. Neben Enzymsensoren, bei denen das Enzym in einer Membran vor der Elektrode immobilisiert ist, werden auch Enzymreaktoren verwendet, die der eigentlichen Elektrode vorgeschaltet und von dieser räumlich getrennt sind. Die Reaktoren enthalten eine hohe Konzentration des Enzyms, so dass eine fast quantitative Umsetzung des Analyten erfolgt und eine relativ lange Standzeit ermöglicht wird. Die Enzyme Glucoseoxidase [33] bzw. Glucose- und Alkoholoxidase [34] wurden durch Quervernetzung mit Glutaraldehyd oder durch Siebdruck einer enzymhaltigen Paste [33] auf Platindickschichtelektroden immobilisiert. Die auf diese Weise hergestellten Sensoren wurden zur Messung in Fruchtsäften und Wein eingesetzt. In einer anderen Arbeit wurde eine Graphit-Teflon-Komposit-Elektrode mit Peroxidase, Glucoseoxidase und Ferrocen modifiziert und zur Glucosebestimmung in Most und Wein eingesetzt [132]. Die Messungen wurden im Batch- und Durchfluss-Verfahren durchgeführt. Beide Methoden zeigten eine gute Übereinstimmung, wurden jedoch nicht mit einer anerkannten Referenzmethode verglichen. Siebgedruckte Graphitelektroden wurden mit 4-Ferrocenylphenol als Elektronenmediator und PQQ-abhängiger Glucose- bzw. Alkoholdehydrogenase modifiziert [133]. Der Glucosesensor wurde zur Messung in Limonade, der Alkoholsensor zur Messung in Wein eingesetzt. Bei der

Glucosebestimmung ergaben sich um 10% zu niedrige Werte im Vergleich zur refraktometrischen Referenzmethode. Durch Immobilisierung von Glucoseoxidase bzw. Alkoholoxidase wurden Enzymreaktoren zur Bestimmung des Glucose- und Ethanolgehaltes in Bier und Wein hergestellt [134]. Die Abweichungen von der photometrischen Referenzmethode betragen bei Proben mit niedrigem Zuckergehalt bis zu 50%. Enzymreaktoren wurden auch zur Bestimmung von Glucose und Fructose beschrieben [135]. Sollte nur Glucose bestimmt werden, wurde der Reaktor mit Glucoseoxidase beladen. Zur Bestimmung von Glucose und Fructose wurden zwei Reaktoren verwendet. Der erste enthielt die Enzyme Hexokinase und Glucose-6-phosphatdehydrogenase zur Glucosebestimmung, der zweite enthielt zusätzlich das Enzym Phosphoglucose-Isomerase und erfasste somit die Summe des Glucose- und Fructosegehaltes. Die Fructosekonzentration wurde durch Differenzbildung ermittelt. Die Reaktoren wurden zur Bestimmung des Zuckergehaltes in Bier, Wein und Fruchtsaft eingesetzt. Die durchschnittlichen Abweichungen von der Referenzmethode lagen bei 3,8% für Glucose und 4,6% für Fructose.

Neben den bisher beschriebenen amperometrischen Enzymsensoren wurde auch ein Biosensor, der auf einer Sauerstoff-Optode mit immobilisierter Glucoseoxidase basierte, zur Glucosemessung in Wein und Fruchtsaft eingesetzt [136]. Bei dieser Methode wird die Fluoreszenz eines Indikators durch molekularen Sauerstoff gequench und so der Sauerstoffverbrauch gemessen. Die Abweichungen von der Referenzmethode betragen bei der Messung in Wein bis zu 14%.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte und Chemikalien

Geräte

| | |
|--|---|
| Eintauchstabrührer | Knick, Berlin |
| pH-Elektrode | Metrohm, Filderstadt |
| pH-Meter 764 Multi-Calimatic | Knick, Berlin |
| Photometer UV/VIS Spectrometer Lambda 2 | Perkin Elmer, Düsseldorf |
| Pipette Multipette [®] plus | Eppendorf, Hamburg |
| Platinblechgegenelektrode, A = 0,5 cm ² | Metrohm, Filderstadt |
| Potentiostat AUTOLAB mit dem Modul PSTAT 10 bzw. PGSTAT 10 | ECO-Chemie, Utrecht, Niederlande |
| Potentiostat EP 30 | Biometra, Göttingen |
| Potentiostat VINO MULTISENS | ICB, Münster |
| Potentiostat Vinoquant Handmessgerät | ICB, Münster |
| Referenzelektrode Ag/AgCl/3 M KCl mit Doppelstromschlüssel | Metrohm, Filderstadt |
| Reinstwasseranlage Seralpur PRO 90 CN | Seral, Ransbach-Baumbach |
| Schüttler Vortex-Genie 2 | Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA |
| Siebdruckmaschine ESC-ATMA H/E | Europa-Siebdruckmaschinen-Centrum GmbH, Bad Salzuflen |
| Stereolupe Stemi SV 6 | Zeiss, Göttingen |
| Thermostat Lauda RCS/RC 6 | Lauda, Königshofen |

Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn im folgenden nicht besonders aufgeführt, von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Aldrich (Steinheim) und Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen und waren von höchstem Reinheitsgrad.

Siebdruckprozess

| | |
|--|------------------------------|
| Polyesterfolie Melinex Typ 505, 175 µM | Pütz, Taunusstein |
| Polyesterfolie Mylar A 300, 300 µM | Pütz, Taunusstein |
| Graphitpaste G-449 (I) | Ercon Inc., Wareham, MA, USA |
| Platinpaste R-474 (DPM-80) | Ercon Inc., Wareham, MA, USA |
| Silber/Silberchloridpaste R-414 (DPM-68), 1.25 | Ercon Inc., Wareham, MA, USA |
| Isolierpaste Seristar SX | Sericol, Essen |

Spezielle Chemikalien

| | |
|---|--|
| 3-Aminopropyltriethoxysilan | Fluka, Buchs, Schweiz |
| DEAE-Dextran, M = 500 000 g/mol (Diethylaminoethyl-Dextran) | Sigma, Deisenhofen |
| Ectoin ((S)-2-Methyl-1,4,5,6-tetrahydro- pyrimidine-4-carboxylic acid) | Bitop, Witten |
| Eisensulfat | Sigma, Deisenhofen |
| Glutaraldehyd, 50% in H ₂ O | Fluka, Buchs, Schweiz |
| Hydroxyectoin ((S)-2-Methyl-5-hydroxy-1,4,5,6- tetrahydropyrimidine-4-carboxylic acid) | Bitop, Witten |
| Hydroxypropyl-β-cyclodextrin | Aldrich, Steinheim |
| Kaliumhexacyanoferrat(III) | Riedel-de-Haën, Seelze und Sigma, Deisenhofen |
| Lactitol (4-O-β-D-Galactopyranosyl-D-glucitol) | Sigma, Deisenhofen |
| N-Methylphenazoniummethylsulfat (= Phenazinmethosulfat (PMS)) | Fluka, Buchs, Schweiz |
| Nafion [®] 117-Lösung, ~5% | Fluka, Buchs, Schweiz |
| Poly(carbamoylsulfonat)-Hydrogel | Senslab, Leipzig |
| Polyethylenimin, 50% (w/v) in H ₂ O | Sigma, Deisenhofen |
| Polyurethanpräpolymer Hypol [®] PreMA™ G-60 | Hampshire Chemical Corp., Owensboro, KY, USA |
| Rinderserumalbumin, Fraktion V | Sigma, Deisenhofen |
| D(+)-Trehalose (α-D-Glucopyranosyl α-D-glucopyranoside) | Sigma, Deisenhofen |
| Triton [®] X-100 | Serva, Heidelberg |

Enzyme

| | |
|--|--|
| Glucoseoxidase aus <i>Aspergillus niger</i> , G-7016, Typ VII-S, 181, 229,2 und 245,9 U/mg Feststoff | Sigma, Deisenhofen |
| Glucoseoxidase, 130 U/mg Feststoff | Diagnostikum, Ukraine |
| Glucoseoxidase aus <i>Penicillium sp.</i> , G 575 P, 200 U/mg Feststoff | Biocatalysts Ltd, Pontypridd, Großbritannien |
| Invertase aus Backhefe, I-4504, Grade VII, 500 U/mg Feststoff | Sigma, Deisenhofen |
| Mutarotase aus <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , 20 U/mg Feststoff | Merck, Darmstadt |
| Mutarotase aus Schweineniere, 1866 U/mg Feststoff | Biozyme Laboratories Ltd, Blaenavon, Großbritannien |
| Fructosedehydrogenase aus <i>Gluconobacter sp.</i> , FCD-301, 25,4, 28,3 und 34,2 U/mg Feststoff | Sorachim, Paris, Frankreich |
| Fructosedehydrogenase aus <i>Gluconobacter industrius</i> , 30 U/mg Feststoff | Fluka, Buchs, Schweiz |
| Fructosedehydrogenase aus <i>Gluconobacter sp.</i> , F-4892, 30 U/mg Feststoff | Sigma, Deisenhofen |
| Fructosedehydrogenase aus <i>Gluconobacter sp.</i> , F-5152, 112 U/mg Feststoff, 1,29 U/mg Protein | Sigma, Deisenhofen |

4.2 Lösungen

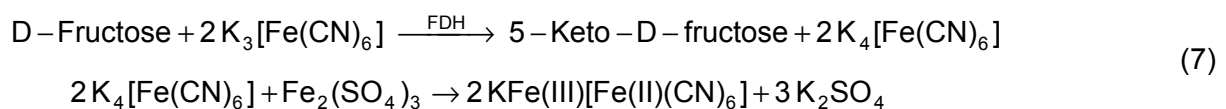
Alle Lösungen wurden in Reinstwasser (Seralpur PRO 90 CN, Seral, Ransbach-Baumbach) hergestellt. Die verwendeten Phosphatpuffer wurden durch Mischen von 0,067 mM Na_2HPO_4 und 0,067 mM KH_2PO_4 zum gewünschten pH-Wert erhalten. Die Herstellung der verwendeten Mc Ilvaine Puffer erfolgte durch Mischen von 0,1 M Citronensäure und 0,2 M K_2HPO_4 zum gewünschten pH-Wert. Der Mc Ilvaine Puffer für den Enzymaktivitätstest (vgl. Kap. 4.3) wurde aus 0,1 M Citronensäure und 0,2 M Na_2HPO_4 hergestellt. Für Messungen mit den Vierarbeitselektrodensensoren wurde den Puffern zusätzlich 0,1 M KCl zugesetzt.

Von den Zuckern Glucose, Fructose und Saccharose wurden 1 M, 0,1 M und 0,01 M Stammlösungen angesetzt. Zur gleichzeitigen Kalibrierung des Glucose- und Fructosesensors wurde eine Stammlösung, die 0,1 M Glucose und 0,1 M Fructose enthielt, hergestellt. Die Glucoselösungen wurden einen Tag vor ihrem Einsatz hergestellt, um eine vollständige Einstellung des Mutarotationsgleichgewichtes zu gewährleisten. Die

Zuckerlösungen wurden entweder bei 4 °C gelagert und maximal eine Woche verwendet, oder sie wurden direkt nach ihrer Herstellung in Portionen von 2 mL tiefgefroren und bis zu ihrem Einsatz bei -20 °C gelagert.

4.3 Enzymaktivitätstest

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der verschiedenen Fructosedehydrogenasen erfolgte durch Variation des vom Hersteller empfohlenen Standardassays [29, 137] nach *Ameyama et al.* [138, 139]. Bei der Umsetzung von D-Fructose zu 5-Keto-D-fructose dient Kaliumhexacyanoferrat(III) als Elektronenakzeptor für die Fructosedehydrogenase und als Produkt der enzymatischen Reaktion entsteht Kaliumhexacyanoferrat(II). Diese Reaktion wird durch eine Lösung, bestehend aus Eisensulfat, Natriumdodecylsulfat und Phosphorsäure, gestoppt, wobei Kaliumhexacyanoferrat(II) zu Preußisch Blau umgesetzt wird. Als Enzymaktivität (1 Unit) wird die Menge an Enzym definiert, die in 1 min 1 µmol Fructose umsetzt. Dabei entspricht 1 µmol umgesetzter Fructose 2 µmol gebildetem Preußisch Blau (Gl. 7).



Die Messungen wurden mit dem UV/VIS-Spektrometer Lambda 2 (Perkin Elmer, Düsseldorf) bei 25 °C durchgeführt. Das entstandene Preußisch Blau wurde bei 660 nm photometrisch detektiert.

Tab. 2: Durchführung des Aktivitätstests.

| Schritt | t [min] | Volumen [µL] | Reagenz |
|---------|---------|--------------|--|
| 1 | 5 | 350 | Mc Ilvaine Puffer pH 4,5 + 0,1% Triton® X-100 (Lösung A) |
| | | 50 | Fructoselösung (1 M in Lösung A) |
| | | 50 | Enzymlösung (3 U/mL in Lösung A) |
| 2 | 5 | 50 | Kaliumhexacyanoferrat (0,1 M in Lösung A) |
| 3 | 20 | 250 | Stopreagenz (5 g Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·H ₂ O, 3 g SDS, 95 mL 85% H ₃ PO ₄ /1 L H ₂ O) |
| 4 | 0 | 1750 | destilliertes Wasser |

Zur Bestimmung des Blindwertes wurde die Fructoselösung durch Mc Ilvaine Puffer (Lösung A) ersetzt. Für die Etablierung des Enzymtests wurde in Schritt 1 die Menge an Enzymlösung variiert und das Volumen entsprechend durch die Menge an Mc Ilvaine Puffer ausgeglichen. In Schritt 2 wurde die Inkubationszeit variiert. Im letztendlichen Enzymtest muss die Inkubationszeit von Schritt 2 exakt eingehalten werden, da es sich um eine Endpunktsbestimmung handelt.

Die Berechnung der Aktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$A = \frac{\Delta E \cdot V_{\text{ges}}}{\epsilon \cdot f \cdot t \cdot d \cdot V_{\text{Probe}}} \cdot D = \Delta E \cdot 2,5 \cdot D \quad (8)$$

mit A: Aktivität

ΔE : Differenz der Extinktion von Probe und Blindwert ($E_{\text{Probe}} - E_{\text{Blind}}$)

V_{ges} : Gesamtvolumen (2,5 mL)

V_{Probe} : Probevolumen (50 μL)

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient von Preußisch Blau unter Assaybedingungen (2,0 $\text{mM}^{-1}/\text{cm}^{-1}$)

f: Faktor, der brücksichtigt, dass die Oxidation von 1 mol D-Fructose 2 mol Preußisch Blau erzeugt (2)

t: Reaktionszeit (5 min)

d: Schichtdicke der durchstrahlten Lösung (1 cm)

D: Verdünnungsfaktor (Vorverdünnung)

Bei den anderen eingesetzten Enzymen wurden die Herstellerangaben bezüglich der Aktivität verwendet.

4.4 Transducer in Siebdrucktechnik

Die verwendeten Transducer wurden in Siebdrucktechnik hergestellt. Für die Herstellung der Siebe wurde zunächst am ICB mit Hilfe der Grafiksoftware Corel Draw™ (Coral, Dublin, Irland), Versionen 5,0 bzw. 7,0, das Layout entworfen. Die Herstellung der Siebe erfolgte bei der Farben-Frikell Produktions- und Dienstleistungsgesellschaft mbH (Berlin). Dort wurde aus dem Layout die Photovorlage und schließlich die Belichtungsmaske erstellt. Die Strukturierung der Siebe erfolgte in der Schablonentechnik. Dafür wurden die Siebe mit einem lichtempfindlichen Material gefüllt und anschließend durch die Maske mit UV-Licht belichtet. Die belichteten Stellen härten aus, während das Material an den nicht belichteten

Stellen ausgewaschen werden kann, so dass die Siebmaschen an diesen Stellen offen bleiben.

Die Bespannung der Siebe erfolgte mit dem monofilen Polyestergewebe Monolen PET 1000 77-55T go mit einer Maschenweite von $68\ \mu\text{m}$, einem Drahtdurchmesser von $62\ \mu\text{m}$ und einem Spannungswinkel von 0° . Für die Siebbeschichtung wurden die Materialien Murakami MS 30 und OnePotSol C2 verwendet.

Während des Druckprozesses wird die Paste mit Hilfe des Rakels durch das strukturierte Sieb gedrückt, wodurch die gewünschte Struktur entsteht (Abb. 9). In dieser Arbeit wurden spezielle Niedertemperaturpasten auf Polymerbasis verwendet. Diese weisen gegenüber den herkömmlichen Pasten der Dickschichttechnik, die bei hohen Temperaturen auf Keramiksubstrate eingebrannt werden, den Vorteil auf, dass sie bei Temperaturen zwischen 80 und $130\ ^\circ\text{C}$ aushärten, wodurch ein aufwendiger Brennprozess entfällt und die Verwendung flexibler Kunststoffsubstrate möglich ist.

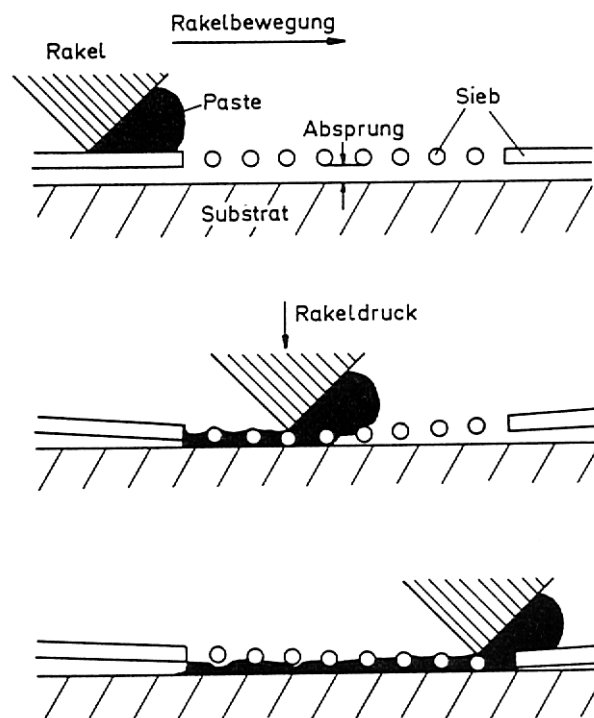


Abb. 9: Schematische Darstellung des Siebdruckverfahrens [140].

Alle Siebdruckprozesse wurden mit der halbautomatischen Siebdruckmaschine ESC-ATMA H/E (Europa-Siebdruckmaschinen-Centrum, Bad Salzuflen) durchgeführt. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, mussten während des Druckprozesses Parameter wie die Druckeigenschaft der Pasten, Siebbespannung und -beschichtung, Maschenzahl, Parallelität zwischen Rakel, Sieb und Substrat, Siebabsprung, Rakeldruck, -höhe, -härte und -geschwindigkeit sowie der Einstellwinkel des Rakels stets konstant gehalten werden.

4.4.1 Herstellung der Einzelelektroden in Siebdrucktechnik

Für die Einzelelektroden wurde die 175 µm dicke Polyesterfolie als Substrat benutzt. Die Folie wurde vor dem Druckprozess 5 h bei 130 °C in einem Trockenschrank getempert, um ein eventuelles Schrumpfen der Strukturen bei der Temperung nach dem Druckprozess zu vermeiden. Zwischen den einzelnen Druckschritten wurden die Transducer jeweils 10 min und nach dem letzten Druckschritt 5 h bei 130 °C getempert. Im ersten Schritt erfolgte der Druck der Elektrodenableitung mit der Graphitpaste. Darauf wurde die Arbeitselektrode mit der Platinpaste gedruckt. Bei der Herstellung der in einigen Experimenten verwendeten Graphitelektroden wurde auf diesen Schritt verzichtet. Die beiden ersten Druckschritte wurden einfach ausgeführt. Der abschließende Druck der Isolierung erfolgte doppelt, um einen ausreichenden Schutz der Elektrode vor dem Kontakt mit der Messlösung zu gewährleisten. Abb. 10 zeigt den schematischen Aufbau der Einzelsensoren. Die Fläche der Arbeitselektrode beträgt 3,14 mm², die Gesamtgröße des Sensors 3 cm x 1 cm.

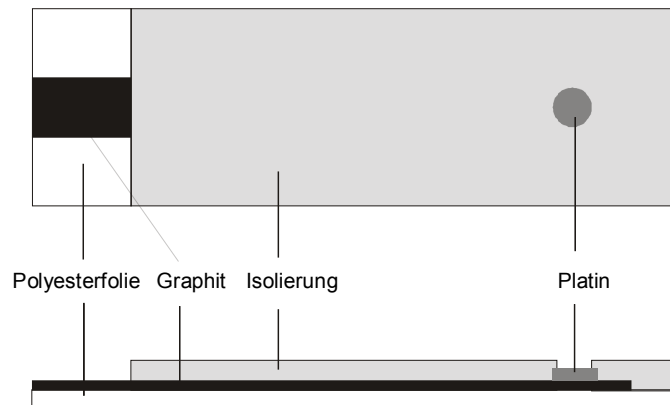


Abb. 10: Schematischer Aufbau der Einzelsensoren.

4.4.2 Herstellung der Vierarbeitselektrodensensoren in Siebdrucktechnik

Für die Vierarbeitselektrodensensoren wurde die 300 µm dicke Polyesterfolie als Substrat verwendet. Die Temperung der Folie vor dem Druckprozess sowie der Strukturen während und nach dem Druckprozess erfolgte wie unter Kap. 4.4.1 beschrieben. Im ersten Arbeitsschritt wurden die Elektrodenableitungen und die integrierte Gegenelektrode mit der Graphitpaste gedruckt. Im zweiten Schritt erfolgte der Druck der integrierten Referenzelektrode mit der Silber/Silberchloridpaste. Anschließend erfolgte der Druck der vier Arbeitselektroden mit der Platinpaste. Zur Herstellung von Graphitsensoren wurde auch hier dieser Schritt ausgelassen. Der abschließende Druck der Isolierung erfolgte wie bei den Einzelsensoren doppelt, die anderen Druckschritte wurden einfach ausgeführt. In Abb. 11 sind die vier Arbeitsschritte des Siebdruckprozesses dargestellt. Die Fläche jeder

Arbeitselektrode beträgt $3,14 \text{ mm}^2$, die Gesamtgröße des Sensors $5,8 \text{ cm} \times 2,3 \text{ cm}$.

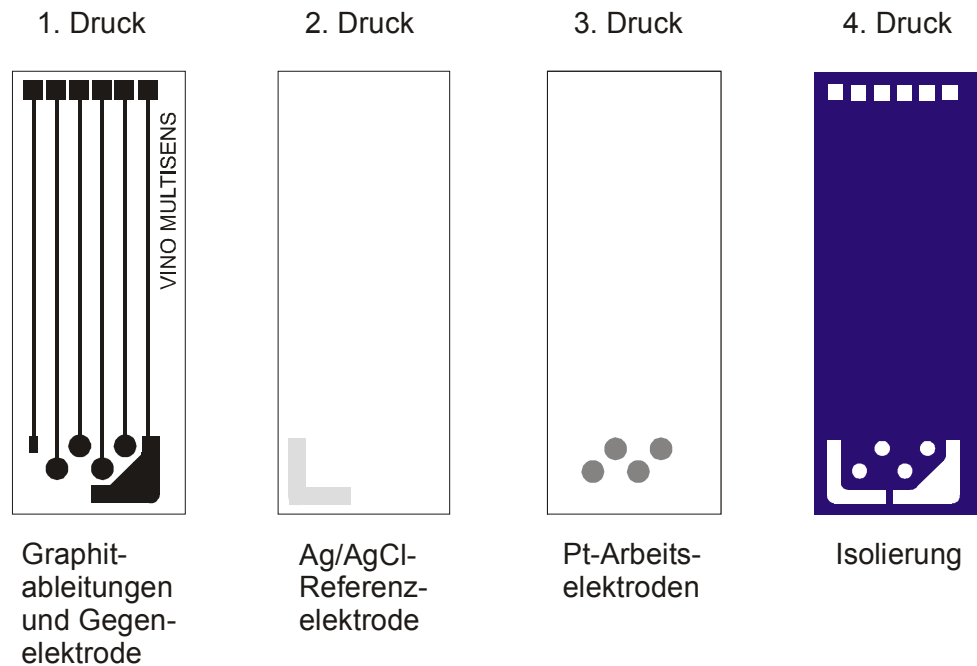


Abb. 11: Arbeitsschritte des Siebdruckprozesses zur Herstellung der Vierarbeits-elektrodensensoren.

Für die Unterstützung bei der Erstellung des Layouts der Vierarbeitselektrodensensoren danke ich Herrn Dr. Ansgar Erlenkötter.

4.5 Enzymimmobilisierung

Für die Immobilisierung wurden zwei verschiedene Methoden angewendet, die im Hinblick auf ihre Eignung für die verschiedenen Enzyme getestet und optimiert wurden.

4.5.1 Poly(carbamoylsulfonat)-Hydrogel als Immobilisierungsmatrix

Hauptsächlich wurde das PCS-Hydrogel der Firma Senslab zur Immobilisierung verwendet. Daneben wurde jedoch auch ein im Rahmen dieser Arbeit synthetisiertes PCS-Hydrogel eingesetzt.

4.5.1.1 Synthese des Poly(carbamoylsulfonat)-Hydrogels

In einem Becherglas wurden 40 g Polyurethanpräpolymer in 60 g 2-Propanol in 60 s unter starkem Rühren gelöst. Dann wurden 3,8 g Natriumpyrosulfit, gelöst in 69 g Wasser, zugefügt. Nach 15 min unter Rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von konzentrierter

Salzsäure (4-5 mL) abgebrochen. Der pH-Wert der Lösung sollte zwischen 1 und 2 liegen. Das Produkt wurde 8 h stengelassen. Danach wurden das 2-Propanol und ein Teil des Wassers am Rotationsverdampfer bei etwa 40 °C entfernt.

4.5.1.2 Einschlussimmobilisierung im Poly(carbamoylsulfonat)-Hydrogel

Zur Immobilisierung wurden 150 mg des PCS-Gels der Firma Senslab bzw. 100 mg des im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten PCS-Gels in 400 µL deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit wässriger, 2,5% (v/v) Polyethyleniminlösung (PEI) auf pH 6,0 eingestellt. Dazu wurden kleine Volumina der PEI-Lösung hinzugegeben und mit Hilfe des Schüttlers (Vortex-Genie 2, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA) sowie mit Rührstäbchen schnell vermischt, um eine lokale Polymerisation des Gels zu vermeiden. Der pH-Wert wurde mit pH-Indikatorpapier (Macherey-Nagel, Düren) überprüft. Nach Einstellen des pH-Wertes wurden gleiche Volumina Enzymlösung und PCS-Lösung zusammengegeben und mit Hilfe des Schüttlers und Rührstäbchen sorgfältig vermischt, bevor je 2 µL der Enzym-PCS-Lösung mit der Multipette® plus auf die Arbeitselektroden aufgetragen wurden. Es musste möglichst zügig gearbeitet werden, da die Verarbeitung der PCS-Lösung etwa 15 bis 30 min nach Einstellung des pH-Wertes durch eine zunehmende Viskosität der Lösung erschwert wurde. Die Sensoren wurden ca. 1 h, bis die Enzymmembranen angetrocknet waren, bei RT und anschließend zur vollständigen Polymerisation vor ihrem Einsatz für mindestens 12 h bei 4 °C gelagert. Diese Immobilisierungsmethode wurde für alle Enzyme angewendet und optimiert. Zur Herstellung der Enzymlösungen wurden die verschiedenen Enzyme in unterschiedlichen Konzentrationen in Puffer gelöst.

4.5.2 Quervernetzung mit dem bifunktionalen Reagenz Glutaraldehyd

Diese Immobilisierungsmethode wurde hauptsächlich für das Enzym Fructose-dehydrogenase verwendet, sie wurde jedoch auch auf die anderen Enzyme übertragen. Zur schonenden Immobilisierung wurde der Enzymlösung Rinderserumalbumin (BSA) zugesetzt. Es wurden gleiche Volumina wässriger Glutaraldehydlösung und Enzym-BSA-Lösung vermischt und je 2 µL mit einer Pipette auf die Arbeitselektroden aufgetragen. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen an Glutaraldehyd, BSA und Enzym getestet. Da die so erzeugten Enzymmembranen sehr porös waren und Risse zeigten, wurde die Glutaraldehydlösung im folgenden unter Zugabe von Glycerin angesetzt. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen an Glycerin getestet. Für die endgültige Immobilisierungsmischung wurde eine 5% (v/v) Glutaraldehydlösung, angesetzt in einer

10% (w/v) Glycerinlösung, verwendet. Der Enzymlösung wurden 10% (w/v) BSA zugesetzt. Die Lagerung der Sensoren vor ihrem Einsatz erfolgte wie unter Kap. 4.5.1.2 beschrieben.

Aufgrund von Haftungsproblemen wurden die Sensoren schließlich vor der Immobilisierung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTS) silanisiert, indem sie für 10 min in eine frisch angesetzte 10% (v/v) APTS-Lösung getaucht und anschließend gründlich mit destilliertem Wasser abgespült wurden.

4.5.3 Immobilisierung mit Stabilisatoren

Bei Untersuchungen zur Lagerstabilität der Multianalysensoren wurden verschiedene Additive eingesetzt, deren stabilisierende Wirkung auf Enzyme in der Literatur beschrieben wird [30, 55, 57-59, 61-63, 65-69]. Die Stabilisatoren wurden in Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst und die Stabilisatorlösung wurde mit der jeweiligen Enzymlösung im Verhältnis 1:1 gemischt. Anschließend wurden gleiche Volumina Enzym-Stabilisator-Lösung und PCS-Lösung bzw. Glutaraldehydlösung zusammengegeben, und die Immobilisierung erfolgte wie oben beschrieben. Die Enzymlösungen wurden so angesetzt, dass sich die gleichen Enzymbeladungen pro Arbeitselektrode wie bei der Immobilisierung ohne Stabilisatoren ergaben. Die Stabilisatorlösungen wurden so angesetzt, dass sich folgende Endkonzentrationen an Stabilisator auf der Arbeitselektrode ergaben:

- 0,2 M (2,8%) Ectoin
- 0,2 M (3,2%) Hydroxyectoin
- 0,2 M (7,6%) Trehalose
- 1% Hydroxypropyl- β -cyclodextrin
- 1% Gummi arabicum
- 1% DEAE-Dextran / 5% Lactitol
- 10% Glycerin

4.5.4 Verwendung einer semipermeablen Membran

Um elektrochemisch aktive Störsubstanzen auszuschließen, wurde das Nafion[®]-Polymer, ein Kationenaustauscherpolymer, verwendet. Zur Herstellung der Sensoren mit Nafion[®]-Membran wurden jeweils 0,5 μ L der 5% Polymerlösung auf die Arbeitselektroden pipettiert. Nach etwa 30 min, wenn die Nafion[®]-Schicht getrocknet war, erfolgte die Immobilisierung der Enzyme wie oben beschrieben.

4.6 Lagerung der Sensoren

Zur Untersuchung der Lagerstabilität der Glucose- und Saccharoseeinzelsensoren wurden 3 verschiedene Lagerbedingungen getestet: trockene Lagerung bei 4 °C, feuchte Lagerung bei 4 °C sowie trockene Lagerung bei Raumtemperatur. Für die feuchte Lagerung wurde eine Petrischale mit einem feuchten Filterpapier versehen und die Sensoren darin gelagert. Die Befeuchtung des Filterpapiers wurde in regelmäßigen Abständen erneuert. Zur Untersuchung der Lagerstabilität der Multianalysensoren wurde ausschließlich eine trockene Lagerung bei 4 °C durchgeführt.

4.7 Durchführung der Messungen

Alle Messungen wurden im Batchverfahren durchgeführt. Die Sensoren wurden dazu in ein Becherglas mit der Messlösung eingetaucht, die unter Verwendung eines Eintauchstabrührers mit konstanter Geschwindigkeit gerührt wurde. Vor Beginn der Messung wurde 10 bis 15 min gewartet, damit die Enzymmembranen quellen konnten. Bei Messungen mit den Glucose- und Saccharosesensoren wurde im allgemeinen ein Potential von +600 mV vs. Ag/AgCl angelegt, bei Messungen mit den Fructosesensoren betrug das Potential überwiegend +400 mV vs. Ag/AgCl. Bevor das eigentliche Messpotential angelegt wurde, wurde 4 min bei +1200 mV vorkonditioniert, wobei Platinoxid und -hydroxid an der Elektrodenoberfläche gebildet und dadurch die Sensitivität der Sensoren gesteigert wurde [141-143]. Nach Einstellen eines konstanten Grundstroms wurde der Analyt zur Messlösung pipettiert. Außer den Messungen zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Sensoren wurden alle Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die amperometrischen Messungen mit den Einzelelektroden wurden mit dem Einkanalpotentiostaten Autolab PSTAT 10 (ECO-Chemie, Utrecht, Niederlande) und mit dem Bipotentiostaten EP 30 (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Es wurden jeweils 20 mL Puffer als Messlösung verwendet. Die Messungen erfolgten in einer Dreielektrodenanordnung mit einer Ag/AgCl/3 M KCl-Referenzelektrode und einer Platinblechgegenelektrode.

Die amperometrischen Messungen mit den Vierarbeitselektrodensensoren wurden mit dem Vierkanalpotentiostaten Autolab PGSTAT 10, dem Vierkanalpotentiostaten Vino Multisens sowie mit dem Handmessgerät Vinoquant durchgeführt (vgl. Kap. 4.8). Es wurden jeweils 30 mL Puffer als Messlösung verwendet. Die cyclovoltammetrischen Untersuchungen an den Vierarbeitselektrodensensoren wurden ebenfalls mit dem Vierkanalpotentiostaten Autolab PGSTAT 10 durchgeführt. Bei der Cyclovoltammetrie wird das Arbeitselektrodenpotential in Form einer periodischen Dreiecksspannung variiert, so dass ein bestimmter Potentialbereich zyklisch durchfahren wird [144, 145]. Das aufgenommene Cyclovoltammogramm zeigt den

gemessenen Strom in Abhängigkeit von der Arbeitselektrodenspannung.

Die Daten der Autolab-Potentiostaten wurden mit dem Programm GPES (ECO-Chemie, Utrecht, Niederlande) aufgenommen, die Aufnahme der Daten der Potentiostaten EP 30, Vino Multisens und Vinoquant erfolgte mit dem Programm Fiabolo (ICB, Münster). Die weitere Verarbeitung der Daten wurde mit dem Programm Origin™ (Microcal, Northampton, MA, USA), Versionen 3,5 und 5,0, durchgeführt.

4.8 Eigenschaften der Vierkanalpotentiostaten



Abb. 12: Vierkanalpotentiostat Vino Multisens.

Auf der Frontplatte erkennt man das Display, die vier Bedientasten und die Anschlüsse für die Referenz- (RE), Gegen- (CE) und die vier Arbeitselektroden (W1-W4).

Die Vierkanalpotentiostaten Vino Multisens (Abb. 12) wurden am ICB von Herrn Dipl.-Ing. Michael Kießhauer speziell für die Messungen mit den Multianalysensoren entwickelt. Sie arbeiten nach dem Prinzip der spannungsgesteuerten Stromsenken. Durch das Zusammenwirken hochwertiger Digital-Analog-Wandler und Messverstärker ist eine individuelle, bipolare Potentialeinstellung an jeder der vier Arbeitselektroden gegen die gemeinsame Referenzelektrode möglich. Diese Potentiale sind im Bereich von $\pm 2,5$ V einstellbar und werden automatisch gespeichert. Der Strom wird über eine gemeinsame Gegenelektrode abgeleitet. Auch geringe Elektrodenströme von weniger als 1 nA können durch spezielle Multiplexer und Verstärkerstufen aufbereitet und mittels eines 16 Bit Analog-Digital-Wandlers konvertiert werden.

Der Datentransfer der einzelnen Wandler und Multiplexer wird im Potentiostaten durch einen

Controller nach Industrienorm geregelt. Außerdem steuert der Controller das vierzeilige Display, eine Tastaturabfrage und eine serielle Schnittstelle, die die Datenübertragung der Messwerte an einen PC erlaubt. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden die durch Zugabe der Analytlösung hervorgerufenen Stromänderungen in Abhängigkeit von der Zeit mit dem Datenaufnahmeprogramm Fiabolo (ICB, Münster) aufgezeichnet. Die Konzeptionierung des Controllers erfolgte derart, dass Programmupdates über die serielle Schnittstelle In-Circuit übernommen werden können. Die Bedienung der Potentiostaten erfolgte menügesteuert durch Tastendruck. Die Potentiostaten wurden so programmiert, dass der Anwender schnell und einfach die für ihn relevanten Parameter, insbesondere die individuellen Elektrodenpotentiale, einstellen kann. Eine Echtzeituhr erlaubt die zeitgesteuerte Vorbehandlung der Sensoren und die Aufnahme eines Zeitprotokolls.

Das Handmessgerät Vinoquant stellt eine Weiterentwicklung des Vino Multisens-Potentiostaten dar und wurde ebenfalls am ICB von Herrn Dipl.-Ing. Michael Kießhauer entwickelt. Das Vinoquant besitzt die gleichen Spezifikationen wie das Vino Multisens, aufgrund der kompakten Bauweise musste jedoch ein neues Layout entworfen werden. Dabei wurden einzelne Baugruppen durch gleichwertige Vierfach-Operationsverstärkerschaltungen ersetzt. An Stelle von mehreren Einzelwiderständen wurden Mehrfach-Widerstandsarrays eingesetzt. Die Messelektronik wurde in ein handelsübliches Handheld-Gehäuse integriert. NC-Akkus erlauben einen netzunabhängigen Betrieb des Handgerätes über mehrere Stunden. Zur Kontaktierung der Multianalysensoren wurde ein Adaptersystem entwickelt, das nach dem Prinzip eines Nullkraftsteckers (Zero Force Insertion) arbeitet und spritzwassergeschützt ist.

4.9 Realproben

4.9.1 Durchführung der Referenzanalytik

Als Realproben wurden Weine und Sekte untersucht, die von verschiedenen Untersuchungsämtern, bei denen auch die Referenzanalytik durchgeführt wurde, zur Verfügung gestellt wurden.

Beim Staatlichen Veterinär- und Chemischen Landesuntersuchungsamt in Münster erfolgte die Bestimmung der einzelnen Zucker photometrisch nach der enzymatischen Methode mit Hilfe verschiedener Boehringer Test-Kombinationen für Zucker. Es wurden die Originalvorschriften verwendet [125].

Beim Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt in Karlsruhe wurde die Bestimmung des Gesamtzuckers nasschemisch nach Luff-Schorl durchgeführt.

Beim Staatlichen Untersuchungsamt Hessen erfolgte die Bestimmung des Gesamtzuckers ebenfalls nasschemisch, es wurden jedoch verschiedene Methoden angewendet (Methode nach Luff-Schorl, Schnellmethode nach Dr. Rebelein). Die Konzentrationen der Einzelzucker wurden photometrisch nach der enzymatischen Methode bestimmt.

4.9.2 Vergärung von Traubenmost

Um Proben einer realen Gärung zu erhalten, wurden beim Projektpartner Leo Kübler GmbH 10 L Most ("Neuer Süßer") in einem Gärballon zur Gärung gebracht. Es wurden eine kleine Flasche VINA Reinzuchthefer (Schlag GmbH, Aalen), hier handelt es sich um eine Kaltgärhefe, sowie 4 g Hefenährsalz (Schlag GmbH, Aalen), das Stickstoffverbindungen und Ammoniumphosphat enthielt, zugesetzt. Das zu Beginn der Gärung aräometrisch festgestellte Mostgewicht betrug 80 bis 86 Oechsle. Da laut dem Kitzinger Weinbuch [146] ein Traubensaft ab einem Mostgewicht von 80 Oechsle naturrein vergoren werden kann, konnte auf den Zusatz von Zucker verzichtet werden. Die Gesamtsäure wurde vor der Gärung mit einem Säurezylinder zu 9,5 g/L bestimmt, bezogen auf Essigsäure, so dass es nicht notwendig war, Milchsäure zuzusetzen. Nach 11 Tagen war die Gärung abgeschlossen. Während der Gärung wurden einmal täglich mehrere Proben von 1,5 bis 2 mL Volumen genommen. Es wurden jeweils einige der Proben sterilfiltriert (Minisart-High-Flow single use syringe filter, sterile-EO, non-pyrogenic, Porengröße 0,2 µm, Sartorius, Göttingen). Alle Proben wurden bis zur Messung bei -20 °C tiefgekühlt gelagert. Die Referenzmessungen wurden vom Analytischen Labor Link GmbH (Weisenheim/Sand) mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt.

4.10 Allgemeine Fehlerbetrachtung

Präzision und Richtigkeit sind die entscheidenden Qualitätskriterien analytischer Verfahren. Die Präzision wird durch die unvermeidliche analytische Unschärfe (zufällige Fehler, Systemrauschen) eingeschränkt, die Richtigkeit dagegen durch systematische Fehler [5].

Die Herstellung der Sensoren beinhaltete eine Reihe individueller Fehler. So war die manuelle Auftragung der Enzymmembranen nur begrenzt reproduzierbar. Auch ergaben Inhomogenitäten der Druckpasten unterschiedliche Sensitivitäten sowohl innerhalb eines Elektrodenbatches als auch insbesondere beim Vergleich von Elektroden, die mit verschiedenen Chargen der Druckpaste hergestellt wurden. Demgegenüber stehen die statistischen Fehler, die während eines Messvorgangs beim Ansetzen der Stammlösungen, beim Pipettieren oder durch Temperaturschwankungen entstehen.

Da die Größe der einzelnen Fehler nicht in allen Fällen genau bestimmt werden kann und zudem ihre Zusammenhänge untereinander nicht immer eindeutig sind, kann eine Fehlerfortpflanzung nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz nicht durchgeführt werden. Vielmehr ist es sinnvoll, die statistischen Schwankungen der Messwerte durch wiederholte Messung unter vergleichbaren Bedingungen zu ermitteln. Die Messungen wurden daher in der Regel als Mehrfachbestimmungen durchgeführt. Als Repräsentanzgröße wurde der arithmetische Mittelwert \bar{x} berechnet:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (9)$$

mit \bar{x} = Mittelwert, x_i = Messwert, n = Anzahl der Messungen.

Als statistische Streuungskenngröße wurde der Schätzwert für die Standardabweichung σ der Einzelwerte bestimmt. Die Anzahl der Einzelmessungen n wird für jedes Experiment individuell angegeben.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (10)$$

mit σ = Schätzwert für die Standardabweichung.

In den Diagrammen wird die Standardabweichung als Fehlerbalken dargestellt. Ist dieser nicht ersichtlich, so war der Fehler kleiner als das verwendete Punktsymbol.

Zur Bestimmung der Sensitivität wurden Kalibrationskurven aufgenommen. Die gemessenen Ströme wurden gegen die Analytkonzentration aufgetragen. Durch lineare Regression wurde eine Geradengleichung erhalten, deren Steigung der Sensitivität entspricht. Zur Bestimmung des linearen Messbereiches wurde diejenige Regression akzeptiert, die einen Korrelationskoeffizienten $\geq 0,999$ ergab. Es wurde jeweils der maximal mögliche Bereich bestimmt, der diese Anforderung erfüllte. Als Nachweisgrenze wurde diejenige Analytkonzentration definiert, die ein dreimal so großes Signal wie das Grundrauschen ergab. Das Grundrauschen der Strom-Zeit-Kurven wurde als Abweichung vom Mittelwert der Messpunkte über einen Zeitraum von mindestens einer Minute definiert.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung des Vierkanalpotentiostaten Vino multisens

Um das Signalrauschen bei unterschiedlichen Belastungszuständen zu untersuchen, wurden die Signalverläufe an einer Sensorkarte mit 4 Glucosesensoren mit einem Oszilloskop aufgezeichnet (Abb. 13). Das Signalrauschen an den Glucosesensoren wurde bei Belastungen von $0 \mu\text{M}$ Glucose (= Grundstrom) (Abb. 13 A) und von $100 \mu\text{M}$ Glucose (Abb. 13 B) untersucht. In beiden Abbildungen stellt jeweils die obere Kurve das Rauschen vor der Filterung der hochfrequenten Störanteile durch einen Tiefpassfilter 2. Ordnung (Sallen-Key) dar und die untere Kurve das Rauschen nach der Filterung. Dabei wurde der Maßstab der unteren Kurven gegenüber dem der oberen Kurven 10-fach vergrößert. Bei den unteren Kurven entspricht die Höhe eines Fensters (gepunktet) von 5 mV aufgrund des verwendeten Widerstands von $1 \text{ M}\Omega$ einem Strom von 5 nA , so dass das Rauschen nach Filterung in beiden Fällen $\pm 1 \text{ nA}$ beträgt. Das Signalrauschen ist also sehr gering und verschlechtert sich auch bei größerer Belastung der Sensoren nicht. Ein Zeitfenster entspricht 500 ms . In den unteren Kurven sind die Signale der einzelnen Sensoren zu erkennen, die sich geringfügig unterscheiden. Aus einem solchen Zeitfenster wird jeweils über ca. 200 Werte mit Hilfe des AD-Wandlers aufintegriert und gemittelt. Dieser Wert ist dann als Stromwert im Display bzw. als Datenpunkt in den Strom-Zeit-Kurven zu sehen.

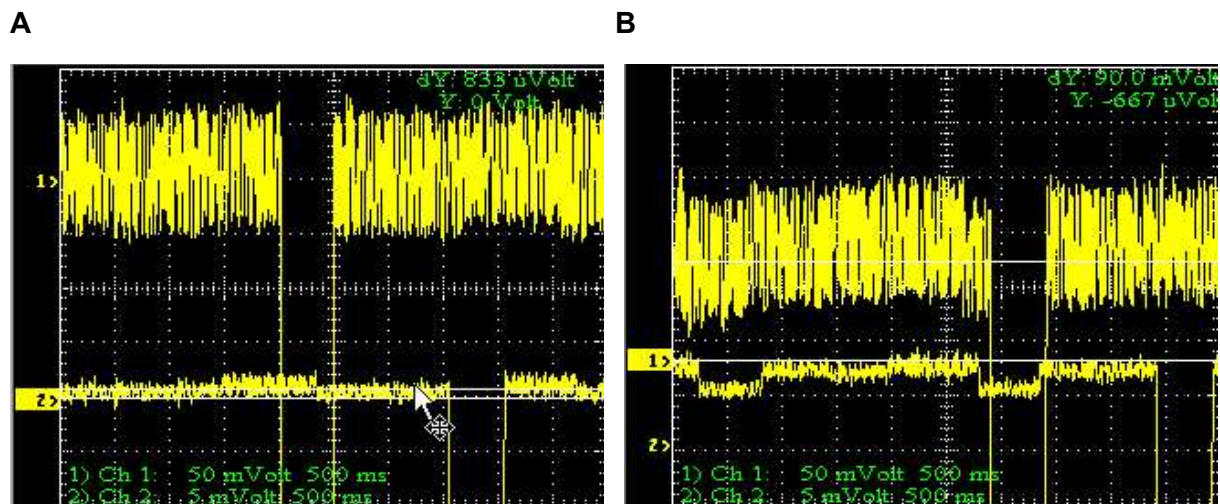


Abb. 13: Einfluss der Filterung auf das Signalrauschen von Glucosesensoren.

Rauschen vor (obere Kurven) und nach (untere Kurven) Filterung der Signale durch einen Tiefpassfilter bei Belastung der Sensoren mit $0 \mu\text{M}$ Glucose (A) und $100 \mu\text{M}$ Glucose (B).

5.2 Charakterisierung der Transducer

Um die Eigenschaften der in Siebdrucktechnik hergestellten Transducer zu untersuchen und Transducer verschiedener Druckchargen miteinander vergleichen zu können, wurden die blanken Platinarbeits Elektroden ohne Enzymmembran mit Wasserstoffperoxid kalibriert. Dabei ergab sich eine Sensitivität von $4,00 \pm 0,41 \text{ nA}/\mu\text{M}$ (relative Standardabweichung = 10,3%, $n = 27$) im untersuchten Messbereich von 5 bis $500 \mu\text{M}$ H_2O_2 . Die Messungen erfolgten in Phosphatpuffer pH 7,0 bei einem Potential von +600 mV vs. Ag/AgCl. Die Ansprechzeiten t_{90} , d. h. die Zeitdauer bis 90% des Stromsignals erreicht wurden, lagen zwischen 10 und 20 Sekunden. Abb. 14 zeigt die H_2O_2 -Kalibrationskurven von vier blanken Platinelektroden einer Sensorkarte.

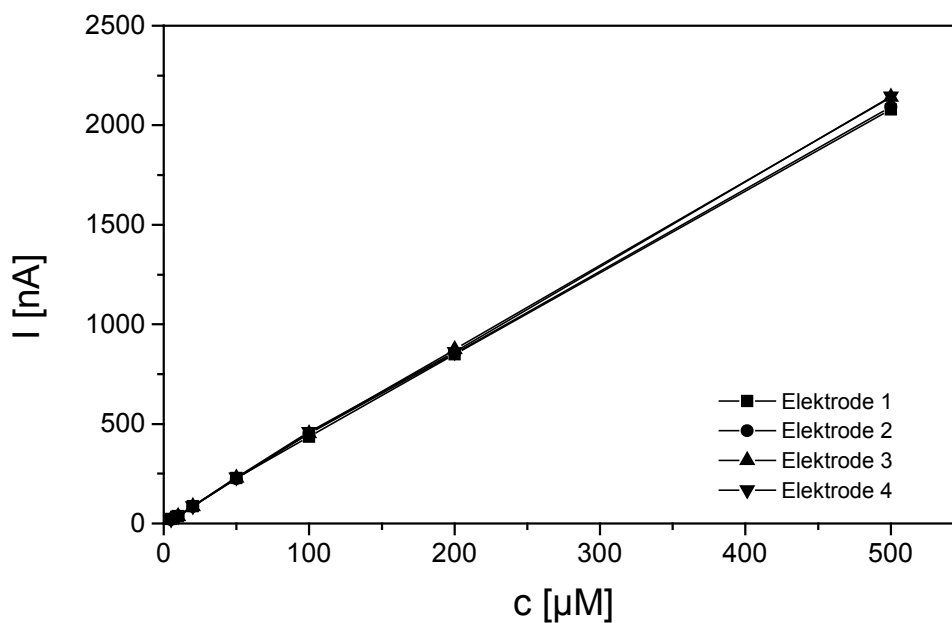


Abb. 14: H_2O_2 -Kalibrationskurven der vier blanken Platinelektroden einer Sensorkarte. Messung in Phosphatpuffer pH 7,0.

Wie bereits frühere Arbeiten gezeigt haben [147], hängt die Sensitivität der Elektroden für Wasserstoffperoxid jedoch von der verwendeten Charge der Platinpaste ab. Obwohl es sich laut Herstellerangaben immer um die gleiche Platinpaste handelte, kam es zu Abweichungen der Sensitivitäten der mit verschiedenen Chargen der Platinpaste gedruckten Transducer. Z. B. betrug die Sensitivität für H_2O_2 von Sensoren, die mit einer anderen Charge der Platinpaste hergestellt wurden, $3,02 \pm 0,60 \text{ nA}/\mu\text{M}$ (20%, $n = 19$).

Weiterhin wurde der Einfluss des Messpotentials auf die Sensitivität der Sensoren bezüglich Wasserstoffperoxid untersucht. Dazu wurde eine Sensorkarte mit vier blanken Platinelektroden nacheinander bei 200, 300, 400, 500 und 600 mV kalibriert (Abb. 15). Auch wenn die Sensitivität für H_2O_2 bei +600 mV nur geringfügig höher war als bei +400 mV und

+500 mV, wurden dennoch alle weiteren H_2O_2 -Messungen sowie die Glucose- und Saccharosemessungen, die auf der Reoxidation des bei der enzymatischen Reaktion gebildeten Wasserstoffperoxids beruhen, bei +600 mV durchgeführt.

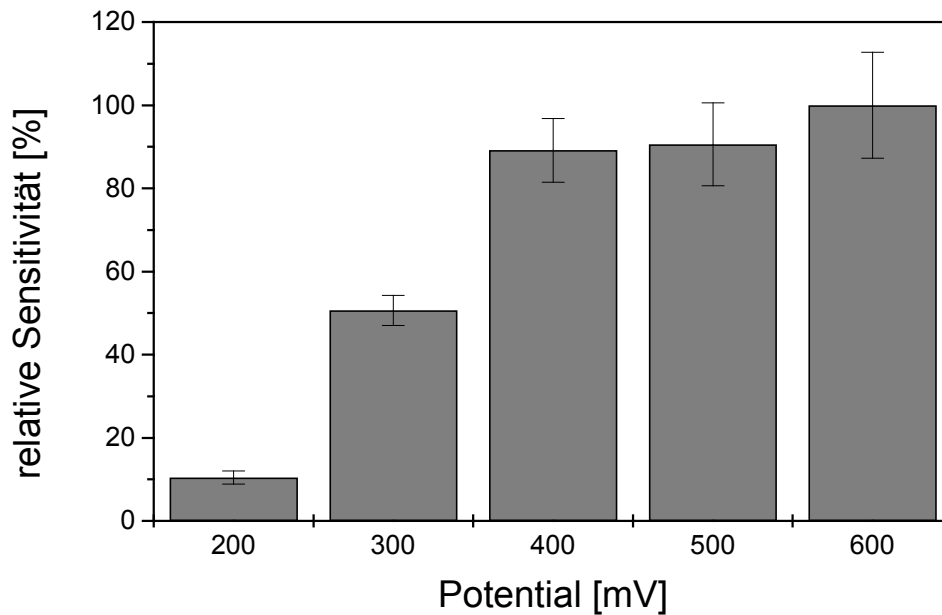


Abb. 15: Einfluss des Messpotentials auf die Sensitivität der Platinelektroden für H_2O_2 .
Messung in Phosphatpuffer pH 7,0.

5.3 Entwicklung der Enzymsensoren

In diesem Kapitel wird zunächst die getrennte Entwicklung der drei Enzymsensoren zur Bestimmung von Glucose, Saccharose und Fructose beschrieben und im Anschluss daran deren Kombination zu einem Multianalysensensor. Die Enzymsensoren zur Bestimmung von Glucose und Saccharose wurden auf Basis von Einzelsensoren entwickelt und etabliert und deren Funktionsweise anschließend auf die Multianalysensoren übertragen. Bei Verwendung der Vierarbeitselektrodensensoren wurden zunächst Sensoren hergestellt, bei denen alle vier Arbeitselektroden einer Sensorkarte als Glucose- bzw. Saccharosesensor immobilisiert wurden, um diese hinsichtlich ihrer Eigenschaften und Reproduzierbarkeit mit den Einzelsensoren vergleichen zu können. Bei der Entwicklung der Fructosesensoren wurden nur erste Versuche mit den Einzelsensoren durchgeführt, anschließend wurden direkt die Vierarbeitselektrodensensoren verwendet, da diese sich bereits bei den Glucose- und Saccharosesensoren bewährt hatten. Es wurden ebenfalls zunächst Sensorkarten mit vier Fructosesensoren hergestellt. Nachdem die drei Enzymsensoren jeweils für sich optimiert und charakterisiert worden waren, wurden sie auf den Vierarbeitselektrodensensoren zu einem Multianalysensensor zur simultanen Bestimmung aller drei Zucker

kombiniert. Mit den Multianalysensensoren wurden ebenfalls umfangreiche Charakterisierungen durchgeführt, bevor sie zur Messung in Realproben eingesetzt wurden.

Die in Kap. 5.2 beschriebenen Abweichungen der Sensitivitäten der Elektroden für Wasserstoffperoxid bei Verwendung verschiedener Chargen der Platinpaste wirkten sich auch bei den Enzymsensoren aus. So kam es teilweise zu Abweichungen der Sensitivitäten für Glucose, Saccharose bzw. Fructose bei Verwendung von Transducern, die mit verschiedenen Chargen der Platinpaste gedruckt worden waren.

5.3.1 Enzymsensoren zur Bestimmung von Glucose

Die Enzymsensoren zur Bestimmung von Glucose wurden, soweit nicht anders erwähnt, durch Immobilisierung des Enzyms Glucoseoxidase im PCS-Hydrogel hergestellt. Als Standard-GOD wurde die Glucoseoxidase der Firma Sigma verwendet. Bei der Immobilisierung wurde die Enzymlösung durch Lösen von 1 mg GOD in 100 μ L Phosphatpuffer pH 7,0 hergestellt, so dass sich laut Herstellerangaben je nach verwendeter GOD-Charge eine Enzymbeladung von 1,8, 2,3 bzw. 2,5 U pro Arbeitselektrode ergab. Diese Unterschiede wirkten sich jedoch nicht auf die Sensitivitäten der Glucosesensoren aus, da bereits im diffusionskontrollierten Bereich gearbeitet wurde (vgl. Kap. 5.3.1.4). Die Messungen mit den Glucosesensoren wurden in Phosphatpuffer pH 7,0 bei einem Potential von +600 mV vs. Ag/AgCl durchgeführt.

5.3.1.1 Charakterisierung der Glucosesensoren

Die Glucose-Einzelsensoren zeigten eine durchschnittliche Sensitivität für Glucose von $0,70 \pm 0,04$ nA/ μ M (5,7%, n = 16). Bei der durchgeführten Kalibration lag je nach Sensorcharge der 1,24 mM- bzw. 2,23 mM-Standard noch im linearen Bereich. Die Glucosesensoren auf Basis der Vierarbeitselektrodensensoren zeigten die gleichen Eigenschaften wie die Glucose-Einzelsensoren. Die durchschnittliche Sensitivität lag bei $0,67 \pm 0,06$ nA/ μ M (9,0%, n = 12) im gleichen Messbereich. Die Strom-Zeit-Kurven wiesen bei beiden Sensortypen keine Drift auf. Die Ansprechzeiten t_{90} lagen jeweils unter 20 s. Abb. 16 A zeigt die Messkurven von vier Glucosesensoren einer Sensorkarte, in Abb. 16 B sind die zugehörigen Kalibrationskurven dargestellt. In beiden Abbildungen ist die gute Reproduzierbarkeit der vier Sensoren einer Sensorkarte zu erkennen.

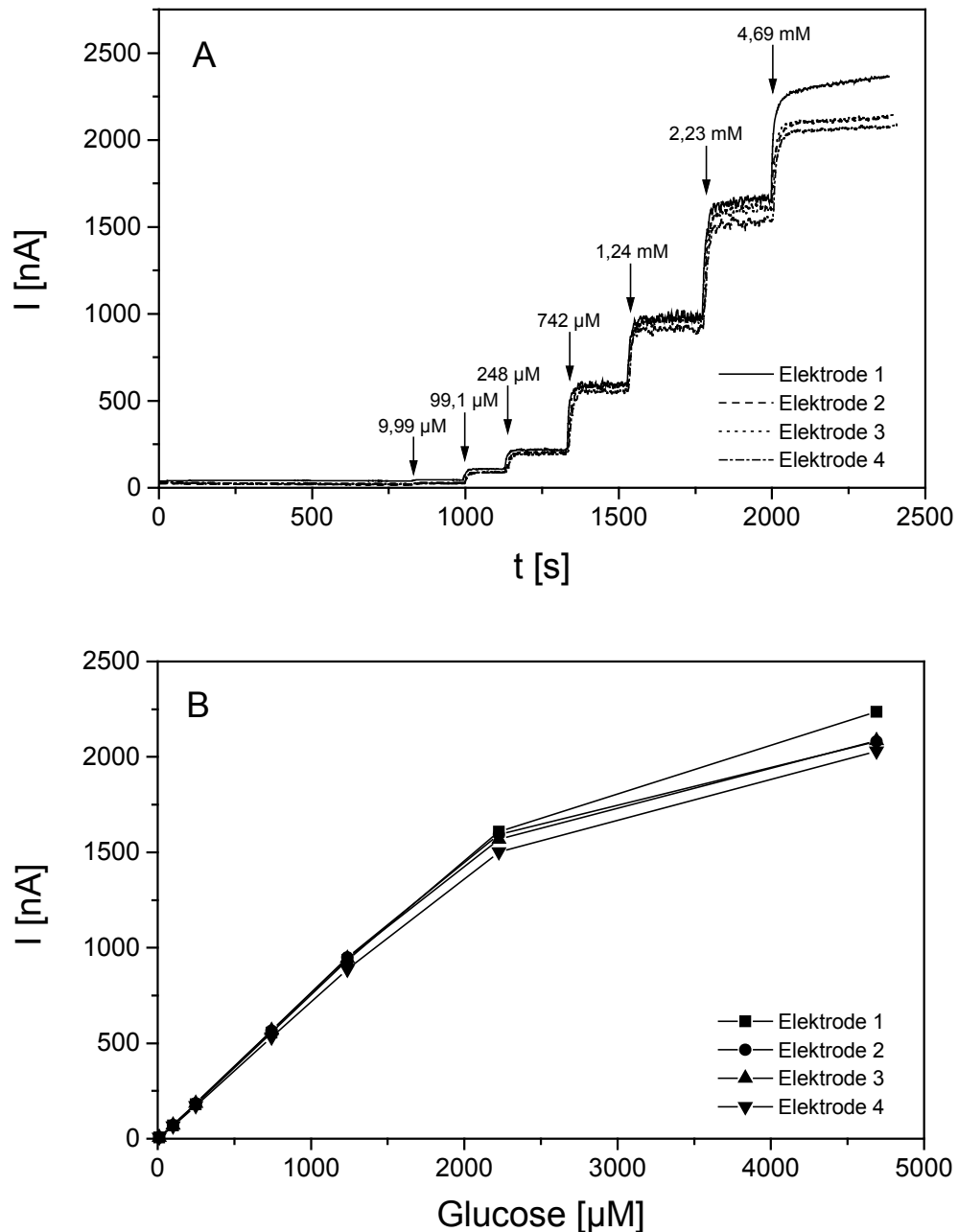


Abb. 16: Messkurven (A) und Kalibrationskurven (B) von vier Glucosesensoren einer Sensorkarte.

Angegeben ist die Gesamtkonzentration an Glucose in der Messlösung. Messung in Phosphatpuffer pH 7,0.

5.3.1.2 Einsatz verschiedener PCS-Hydrogele

Zur Immobilisierung wurde hauptsächlich das von der Firma Senslab bezogene PCS-Hydrogel verwendet. Daneben wurde jedoch auch das im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte PCS-Hydrogel eingesetzt (vgl. Kap. 4.5.1.1). Am Beispiel der Glucosesensoren wurden die verschiedenen PCS-Gele miteinander verglichen (Abb. 17).

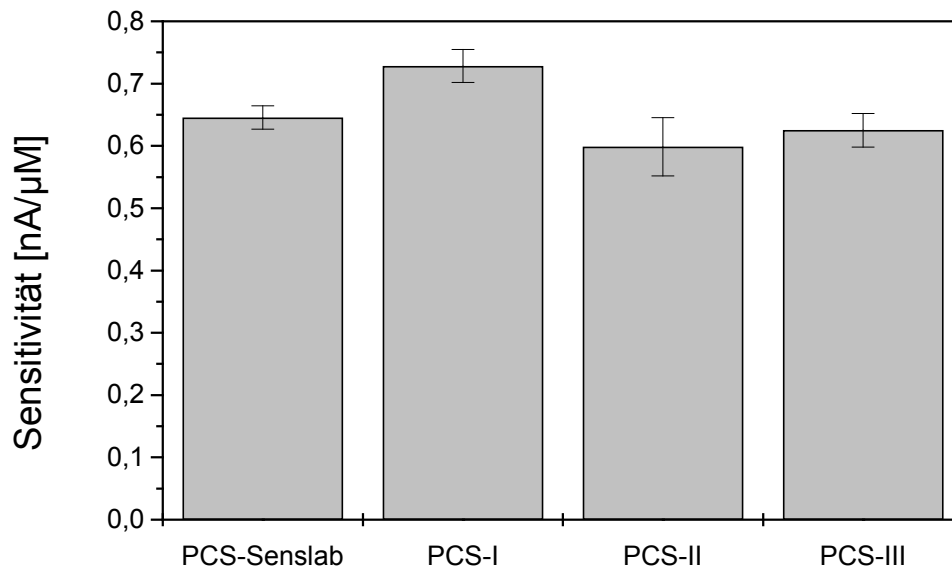


Abb. 17: Einsatz verschiedener PCS-Hydrogele bei der GOD-Immobilisierung.

Messungen mit jeweils vier bis sechs Einzelsensoren pro PCS-Charge in Phosphatpuffer pH 7,0. Die Chargen PCS-I und PCS-II wurden freundlicherweise von Frau Dr. Yvonne Röder zur Verfügung gestellt.

Die Glucosesensoren, bei denen verschiedene PCS-Hydrogele zur Immobilisierung eingesetzt wurden, zeigten vergleichbare Eigenschaften. Die Sensitivitäten waren ähnlich, linearer Bereich und Ansprechzeiten identisch. Das in dieser Arbeit synthetisierte PCS-Hydrogel wurde daher als gleichwertig mit dem PCS-Hydrogel der Firma Senslab angesehen und bei den Experimenten wird nicht speziell darauf hingewiesen, welches PCS-Gel zur Immobilisierung verwendet wurde.

5.3.1.3 Einsatz verschiedener Glucoseoxidasen

Es wurden Glucoseoxidasen verschiedener Firmen mit unterschiedlichen Aktivitäten eingesetzt und Sensoren mit gleicher Enzymbeladung miteinander verglichen (Tab. 3).

Tab. 3: Vergleich von Enzymsensoren mit unterschiedlichen Glucoseoxidasen. Enzymbeladung 1,8 U pro Arbeitselektrode (laut Herstellerangaben).

| Firma | Sensitivität [nA/μM] | Anzahl der Sensoren (n) |
|-----------------------------|----------------------|-------------------------|
| Sigma, Charge 1, 181 U/mg | 0,96 ± 0,06 | 20 |
| Sigma, Charge 2, 245,9 U/mg | 0,85 ± 0,05 | 10 |
| Diagnostikum, 130 U/mg | 0,86 ± 0,04 | 8 |
| Biocatalysts, 200 U/mg | 0,87 ± 0,03 | 10 |

Die Sensitivitäten der Glucosesensoren mit den verschiedenen Glucoseoxidasen waren sehr ähnlich. Die größten Unterschiede ergaben sich bei den beiden Sigma-Glucoseoxidasen. Allgemein lagen die Sensitivitäten der Glucosesensoren in diesem Experiment deutlich höher als die der in Kap. 5.3.1.1 beschriebenen Sensoren, was auf die bereits erwähnten Unterschiede verschiedener Platinpasten zurückzuführen sein könnte.

Die Glucoseoxidase der Firma Biocatalysts ist laut Herstellerangaben katalasefrei [148, 149]. Viele der anderen auf dem Markt erhältlichen Glucoseoxidasen des Stammes *Aspergillus* enthalten relativ hohe Konzentrationen an Katalase, z. B. kann der Katalasegehalt der in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten GOD aus *Aspergillus niger* der Firma Sigma laut Herstellerangaben bis zu 10 U pro mg Protein betragen. Das Enzym Katalase setzt Wasserstoffperoxid um, und würde somit die Sensitivität der Sensoren verringern und das Messergebnis verfälschen. Um zu untersuchen, ob dies bei der GOD der Firma Sigma der Fall war, wurde das Ansprechen von Glucosesensoren mit GOD der Firmen Sigma und Biocatalysts auf eine kleine Menge (5 μM) H_2O_2 und anschließend als Kontrolle auf eine kleine Menge (10 μM) Glucose miteinander verglichen. Die Signale der Sensoren mit den verschiedenen Glucoseoxidasen waren sowohl für Glucose als auch für Wasserstoffperoxid sehr ähnlich (Abb. 18), d. h. auch bei der GOD von Sigma aus *Aspergillus niger* kam es nicht zu einer signifikanten Umsetzung des Wasserstoffperoxids und damit einhergehenden Verringerung des Messsignals durch Katalase, so dass diese GOD ohne Probleme für alle weiteren Experimente verwendet werden konnte.

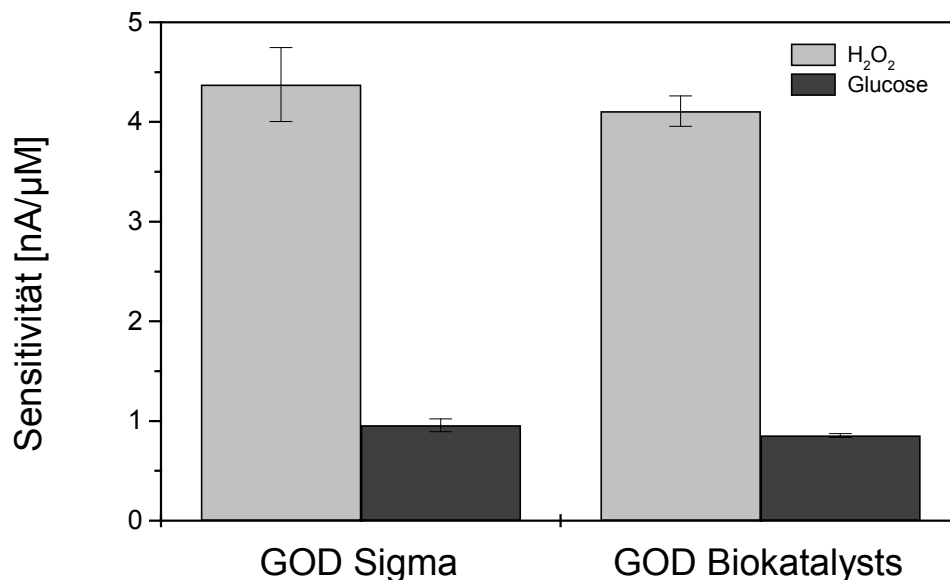


Abb. 18: Überprüfung eines möglichen Katalaseeinflusses verschiedener Glucoseoxidasen.

Messung mit zwei Sensorkarten, die jeweils zwei Glucosesensoren mit GOD der Firma Sigma und zwei Glucosesensoren mit GOD der Firma Biocatalysts enthielten, Enzymbeladung jeweils 1,8 U pro Arbeitselektrode. Messung in Phosphatpuffer pH 7,0.

5.3.1.4 Variation und Optimierung der Enzymbeladung

Um die Enzymbeladung der Glucosesensoren zu variieren, wurde die Enzymlösung bei der Immobilisierung in verschiedenen Konzentrationen angesetzt. Bis zu einer Enzymbeladung von 1,2 U GOD pro Elektrode nahm die Sensitivität der Sensoren zu, danach blieb sie annähernd konstant (Abb. 19), d. h. ab dieser Enzymbeladung arbeitete der Sensor im diffusionskontrollierten Bereich. Die Standard-GOD-Immobilisierung, bei der sich Enzymbeladungen zwischen 1,8 und 2,5 U pro Arbeitslektrode ergaben (vgl. Kap. 5.3.1), war also für ein Arbeiten im diffusionskontrollierten Bereich geeignet.

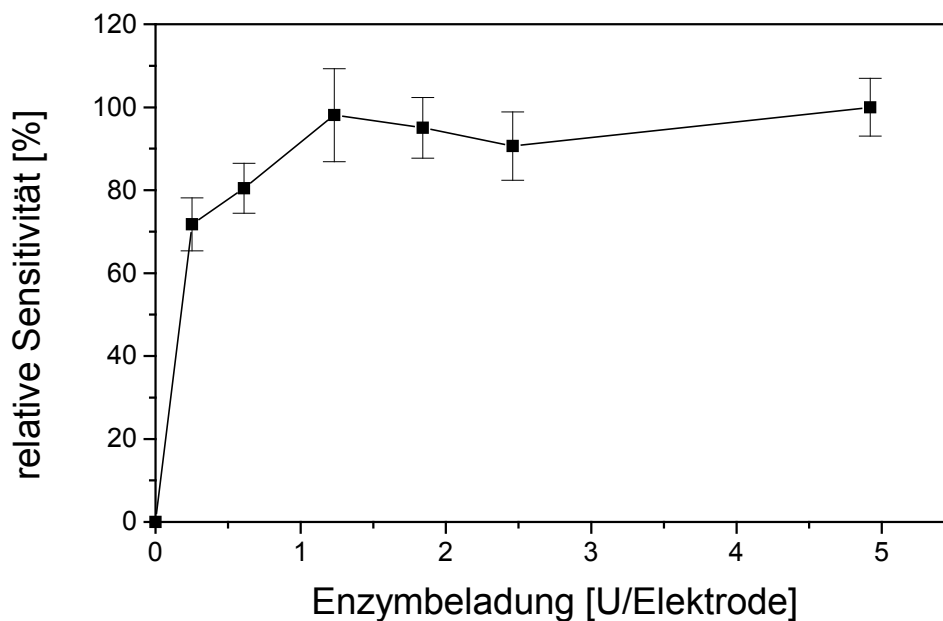


Abb. 19: Einfluss der Enzymbeladung auf die Sensitivität der Glucosesensoren.

Messung mit jeweils drei Sensorkarten mit vier Glucosesensoren identischer Enzymbeladung ($n = 12$) in Phosphatpuffer pH 7,0.

Bei Enzymbeladungen größer als 4,9 U pro Elektrode kam es zu einer mit zunehmender Enzymbeladung immer stärker werdenden Drift in den Stromstufen, so dass diese nicht mehr sinnvoll auszuwerten waren (Abb. 20). Ein Grund hierfür könnte die verminderte Diffusion der Substratmoleküle aufgrund der höheren Proteinbeladung der Membran sein.

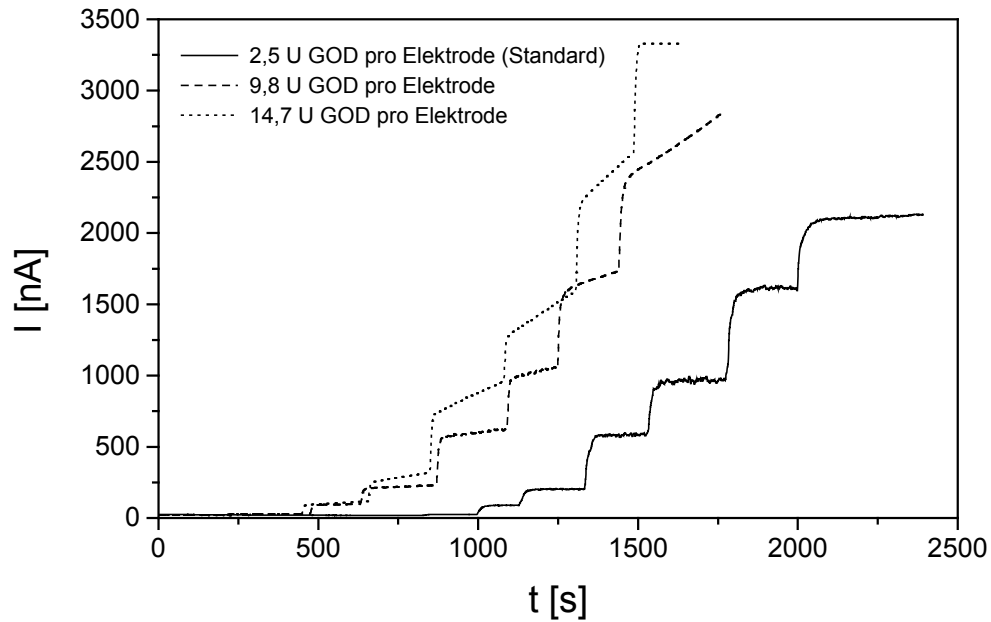


Abb. 20: Zunehmende Drift in den Strom-Zeit-Kurven mit steigender Enzymbeladung.

Untersuchter Bereich bis 24,6 U pro Elektrode (nicht dargestellt). Messung in Phosphatpuffer pH 7,0.

5.3.1.5 Arbeitsstabilität

Um die Arbeitsstabilität der Glucosesensoren zu untersuchen, wurde mit einer Sensorkarte mit drei Glucosesensoren ein Glucosstandard zehnmal im Laufe eines Tages vermessen.

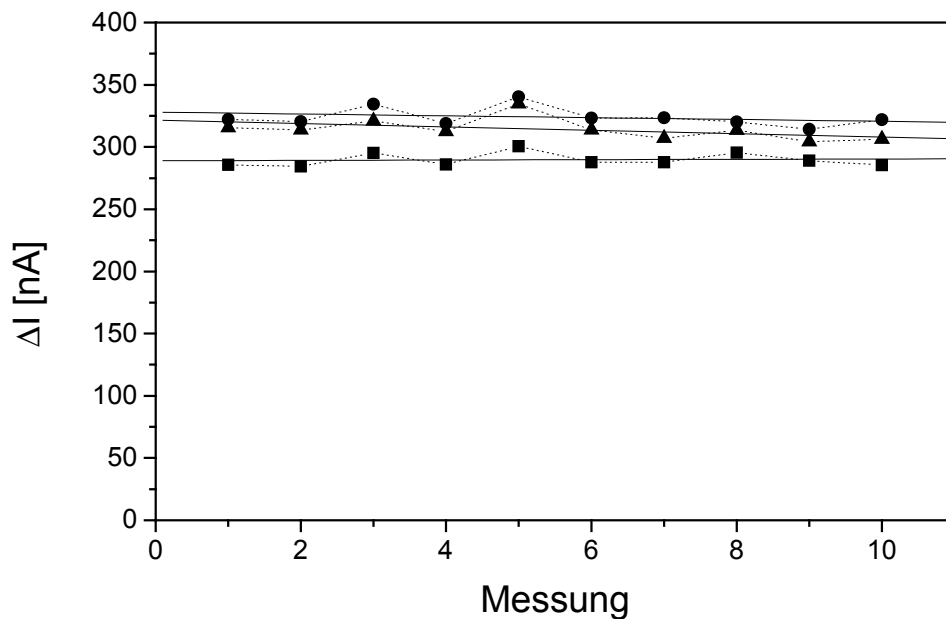


Abb. 21: Arbeitsstabilität der Glucosesensoren.

Messung mit einer Sensorkarte mit 3 Glucosesensoren ($n = 3$). Zugabe von jeweils 333 μM Glucose, dazwischen Pufferwechsel. Messung in Phosphatpuffer pH 7,0.

Die Sensoren zeigten eine gute Arbeitsstabilität bzw. Reproduzierbarkeit von Messung zu Messung. Die maximale Drift der Glucosesensoren betrug lediglich 1,4 nA pro Messung (bestimmt aus der linearen Regression, Abb. 21). Die maximale Standardabweichung war mit 8,1 nA (2,5%) ebenfalls gering. Eine weitere Untersuchung der Arbeitsstabilität erfolgte für die Multianalysensoren (vgl. Kap. 5.3.4.6).

5.3.1.6 Lagerstabilität

Die Lagerstabilität der Glucosesensoren wurde am Beispiel der Einzelsensoren über den Zeitraum eines Jahres untersucht (Abb. 22). Es wurden drei verschiedene Lagerbedingungen getestet: 4 °C in trockener Atmosphäre, 4 °C in feuchter Atmosphäre und Raumtemperatur. Die Sensitivitäten der gekühlt gelagerten Sensoren waren sehr lange stabil. Nach sechs Monaten hatte die Sensitivität lediglich um ca. 20% abgenommen, nach einem Jahr um ca. 50%. Dabei lagen die Sensitivitäten der trocken gelagerten Sensoren meist etwas höher als die der feucht gelagerten Sensoren. Der Feuchtigkeitsgehalt bei der Lagerung brauchte also nicht besonders eingestellt zu werden, es bot sich eine einfache, trockene Lagerung bei 4 °C an. Die Sensitivität der bei Raumtemperatur gelagerten Sensoren nahm dagegen viel schneller ab. Sie sank bereits nach vier Wochen auf knapp 50% und betrug nach einem Jahr ein Drittel der Anfangs-Sensitivität. Alle Sensoren waren jedoch nach einem Jahr noch verwendbar, lediglich in Einzelfällen lag der 1,24 mM-Standard außerhalb des linearen Messbereiches.

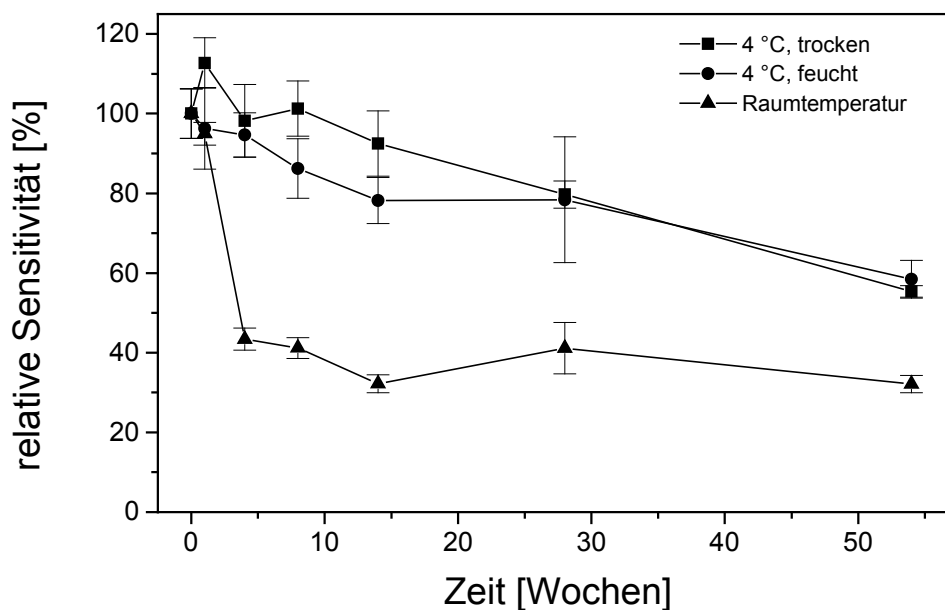


Abb. 22: Lagerstabilität der Glucose-Einzelsensoren.

Messung mit jeweils vier Sensoren unter identischen Bedingungen ($n = 4$). Messung in Phosphatpuffer pH 7,0.

5.3.2 Enzymsensoren zur Bestimmung von Saccharose

Die Enzymsensoren zur Bestimmung von Saccharose wurden im allgemeinen durch Coimmobilisierung der drei Enzyme Invertase, Mutarotase und Glucoseoxidase im PCS-Hydrogel hergestellt. Frühere Arbeiten, bei denen nur die Enzyme Invertase und Glucoseoxidase immobilisiert worden waren [51], ergaben keinerlei Signal für Saccharose und zeigten somit, dass die Coimmobilisierung der Mutarotase für die schnelle Einstellung des Mutarotationsgleichgewichtes zwischen dem bei der enzymatischen Spaltung der Saccharose durch Invertase entstehenden α -Anomeren der Glucose und dem von der Glucoseoxidase ausschließlich verwertbaren β -Anomeren notwendig war. Soweit nicht anders erwähnt, wurden die Enzyme Glucoseoxidase und Invertase von der Firma Sigma und Mutarotase von der Firma Merck verwendet. Die Enzymlösung für die Immobilisierung wurde durch Lösen von 1 mg INV, 0,5 mg MUT und 1 mg GOD in 100 μ L Phosphatpuffer pH 7,0 angesetzt, so dass sich laut Herstellerangaben eine Enzymbeladung von 5,0 U INV, 0,1 U MUT und 1,8 bis 2,5 U GOD, je nach verwendeter GOD-Charge, pro Arbeitselektrode ergab. Da der Saccharosesensor aufgrund der Enzymsequenz auch auf Glucose reagiert, wurden die Saccharosesensoren außer für Saccharose jeweils auch für Glucose kalibriert und charakterisiert. Die Messungen wurden in Phosphatpuffer pH 7,0 bei einem Potential von +600 mV vs. Ag/AgCl durchgeführt.

5.3.2.1 Charakterisierung der Saccharosesensoren

Die Saccharose-Einzelsensoren zeigten Sensitivitäten von $0,70 \pm 0,12$ nA/ μ M (17%, n = 12) für Saccharose und von $0,90 \pm 0,09$ nA/ μ M (10%, n = 12) für Glucose. Die Saccharosesensoren auf Basis der Vierarbeitselektrodensensoren wiesen eine durchschnittliche Sensitivität von $0,82 \pm 0,04$ nA/ μ M (4,9%, n = 12) für Saccharose und von $0,90 \pm 0,05$ nA/ μ M (5,5%, n = 12) für Glucose auf (Abb. 23). Der lineare Messbereich reichte bei beiden Sensortypen sowohl für Saccharose als auch für Glucose von 0,01 mM bis mindestens 1,24 mM. Die Ansprechzeiten t_{90} lagen jeweils unter 30 s. Die Saccharosesensoren auf Basis der Vierarbeitselektrodensensoren besaßen somit vergleichbare Eigenschaften wie die Saccharose-Einzelsensoren. Die Reproduzierbarkeit der Saccharosesensoren konnte durch Verwendung der Vierarbeitselektrodensensoren im Vergleich zu den Einzelsensoren deutlich verbessert werden. Da die Sensitivität der Saccharosesensoren für Saccharose nahezu so groß war wie die für Glucose, kann davon ausgegangen werden, dass die beiden vorgeschalteten Enzymreaktionen die Gesamtreaktion kaum verlangsamten. Die höhere Sensitivität der Saccharosesensoren für Glucose im Vergleich zu den eigentlichen Glucosesensoren lässt sich durch die Anwesenheit der Mutarotase erklären, durch die eine größere Menge an β -D-Glucose für die Reaktion der Glucoseoxidase zur Verfügung steht.

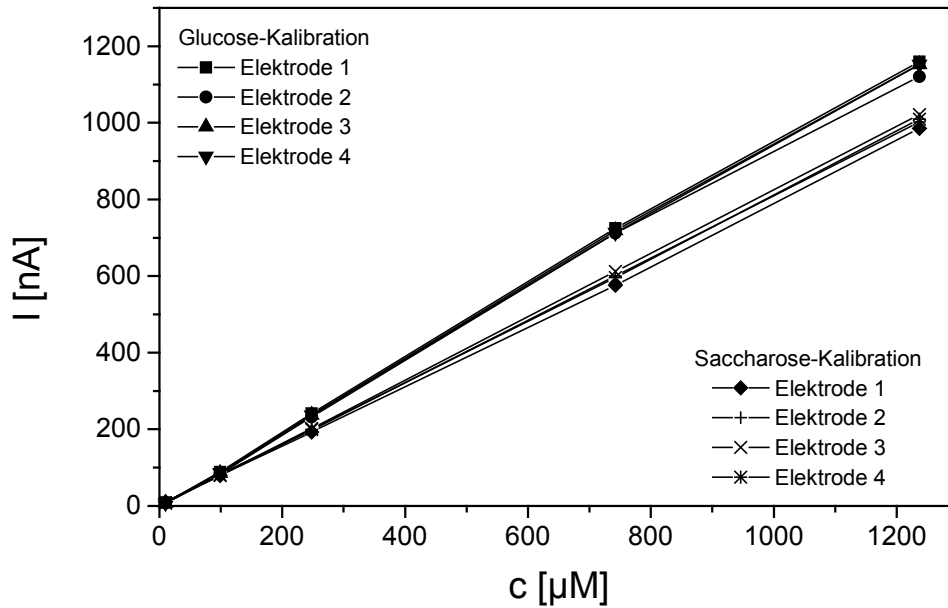


Abb. 23: Kalibrierung der vier Saccharosesensoren einer Sensorkarte für Saccharose und Glucose.

Nur der lineare Messbereich ist dargestellt. Angegeben ist die Gesamtkonzentration des jeweiligen Zuckers in der Messlösung. Messung in Phosphatpuffer pH 7,0.

5.3.2.2 Variation der Mutarotase

Als Alternative zu der Mutarotase der Firma Merck wurde eine Mutarotase der Firma Biozyme Laboratories getestet. Diese Mutarotase besaß laut Herstellerangaben eine sehr hohe spezifische Aktivität von 1866 U/mg Feststoff. Die Enzymlösung zur Immobilisierung wurde durch Lösen von 1 mg INV, 1 mg MUT und 1 mg GOD in 100 μL Phosphatpuffer pH 7,0 angesetzt, so dass sich für die Mutarotase eine Enzymbeladung von 18,66 U pro Elektrode ergab, also etwa um den Faktor 200 höher als bei Verwendung der Mutarotase von Merck. Es wurde untersucht, ob sich dadurch die Sensitivität der Saccharosesensoren sowohl für Saccharose als auch für Glucose noch steigern ließ. Die Messungen wurden mit den Einzelsensoren als Doppelbestimmung durchgeführt ($n = 2$). Die Sensitivität der Sensoren für Saccharose betrug in diesem Fall jedoch nur $0,18 \pm 0,01 \text{ nA}/\mu\text{M}$ (5,5%, $n = 2$), also nur etwa ein Viertel der Sensitivität der Sensoren mit der Mutarotase von Merck. Die Sensitivität für Glucose lag mit $0,71 \pm 0,01 \text{ nA}/\mu\text{M}$ (1,4%, $n = 2$) ebenfalls unter der der Sensoren mit der Mutarotase von Merck. Die Mutarotase von Biozyme Laboratories wurde deshalb im folgenden nicht weiter verwendet.

5.3.2.3 Variation und Optimierung der Enzymbeladung

Um sicherzustellen, dass alle Enzyme in ausreichender Konzentration vorlagen, damit der Sensor unter diffusionskontrollierten Bedingungen arbeitete, wurde bei der Standard-GOD-Beladung von 2,5 U sowohl die INV- als auch die MUT-Beladung variiert (Abb. 24). Es zeigte sich, dass die Sensitivitäten bei höheren Enzymbeladungen als 5,0 U INV und 0,1 U MUT leicht abnehmen. Dieser Abfall ist vermutlich auf eine verminderte Diffusion der Substratmoleküle aufgrund der höheren Proteinbeladung der Membran zurückzuführen. Als Standard-Enzymbeladung des Saccharosesensors wurden daher 5,0 U INV, 0,1 U MUT und 2,5 U GOD festgelegt.

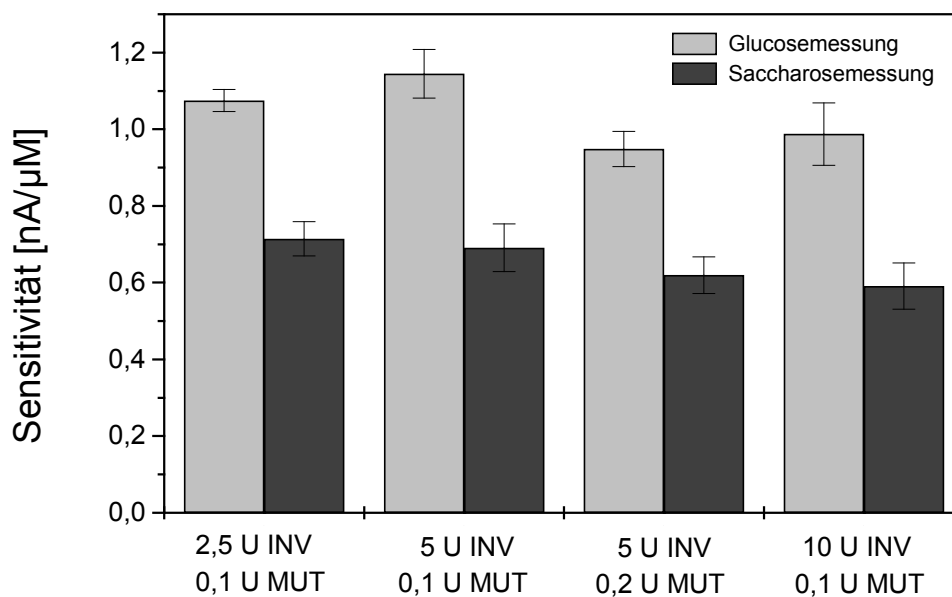


Abb. 24: Einfluss der Enzymbeladung auf die Sensitivität der Saccharosesensoren.

Messung mit jeweils zwei Sensorkarten mit vier Saccharosesensoren identischer Enzymbeladung ($n = 8$) in Phosphatpuffer pH 7,0.

5.3.2.4 Lagerstabilität

Die Lagerstabilität der Saccharosesensoren wurde ebenfalls am Beispiel der Einzelsensoren unter den gleichen Bedingungen wie die der Glucose-Einzelsensoren untersucht (vgl. Kap. 5.3.1.6). Interessanterweise kam es nach einer Woche zu einer starken Zunahme der Sensitivitäten für die Saccharosemessung um bis zu 70% (Abb. 25 A) und für die Glucosemessung um bis zu 50% (Abb. 25 B). Diese Beobachtung ist möglicherweise auf Konformationsänderungen des Enzyms in dem Polymergel nach der Immobilisierung oder auf Veränderungen der Diffusionseigenschaften der Proteinmembran durch Quellprozesse zurückzuführen. Danach blieben die Sensitivitäten der gekühlt gelagerten Sensoren bis nach sechs Monaten annähernd konstant und waren nach einem Jahr in etwa noch so groß wie zu

Beginn der Messungen. Die Sensitivitäten der bei Raumtemperatur gelagerten Sensoren stiegen nicht ganz so stark an wie die der gekühlt gelagerten Sensoren und sanken bereits nach vier Wochen unter den Anfangswert. Nach einem Jahr betrug die Sensitivität der bei Raumtemperatur gelagerten Sensoren noch ca. 30% des Anfangswertes für Saccharose und ca. 40% des Anfangswertes für Glucose. Wie die Glucosesensoren waren auch die Saccharosesensoren nach einem Jahr Lagerung noch einsetzbar und nur in Einzelfällen lag der 1,24 mM-Standard außerhalb des linearen Bereiches.

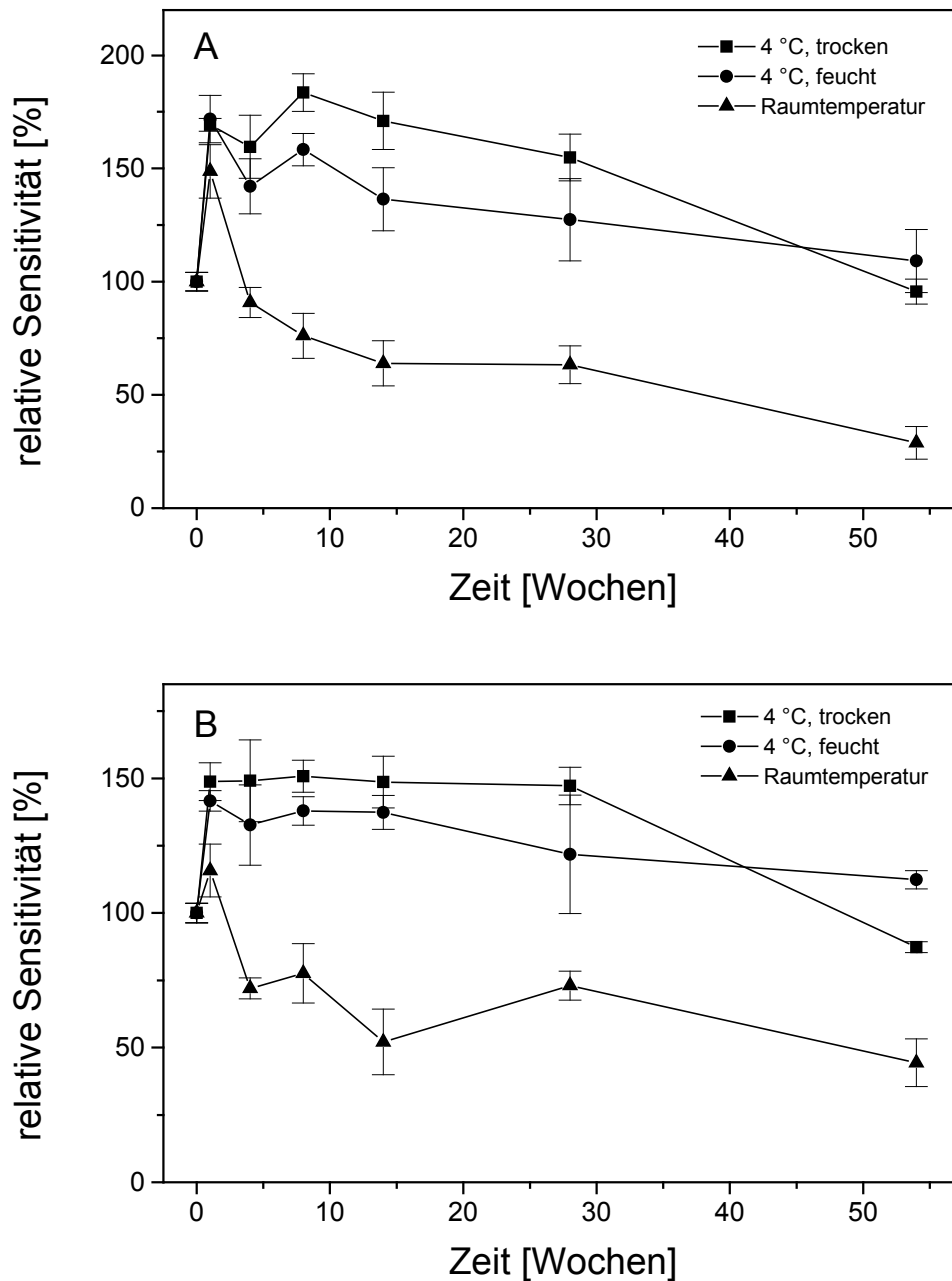


Abb. 25: Lagerstabilität der Saccharose-Einzelsensoren.

Empfindlichkeit für Saccharose (A) und Glucose (B). Messung mit jeweils vier Sensoren unter identischen Bedingungen ($n = 4$). Messung in Phosphatpuffer pH 7,0.

5.3.3 Enzymsensoren zur Bestimmung von Fructose

Für die Enzymsensoren zur Bestimmung von Fructose wurde die Fructosedehydrogenase der Firma Sorachim als Standard-FDH gewählt. Im Gegensatz zur Enzymimmobilisierung bei den Glucose- und Saccharosesensoren musste die FDH-Immobilisierung umfangreich optimiert werden (vgl. Kap. 5.3.3.3 und 5.3.3.4). Bei der endgültigen Immobilisierungsvorschrift erfolgte die Immobilisierung mit Glutaraldehyd. Die Enzymlösung wurde durch Lösen von 1 mg FDH und 10 mg BSA in 100 µL Phosphatpuffer pH 7,0 hergestellt, so dass sich laut Herstellerangaben je nach verwendeter FDH-Charge eine Enzymbeladung von 0,25, 0,28 bzw. 0,34 U pro Arbeitselektrode ergab. Die Messungen wurden hauptsächlich im für die Fructosedehydrogenase vorteilhaften Mc Ilvaine Puffer [29] pH 5,0 mit 5 mM Kaliumhexacyanoferrat als löslichem Mediator bei einem Potential von +400 mV vs. Ag/AgCl durchgeführt.

5.3.3.1 Bestimmung der Enzymaktivität

Die Messung der Aktivität der eingesetzten Fructosedehydrogenasen erfolgte wie unter Kap. 4.3 beschrieben durch spektrophotometrische Endpunktsbestimmung des Preußisch Blau, das durch Abstoppen der enzymatischen Fructoseumsetzung aus dem entstandenen Kaliumhexacyanoferrat(II) gebildet wird. Bei der Bestimmung des Blindwertes machte es keinen Unterschied, ob der Mischung kein Substrat oder kein Enzym zugesetzt wurde. In Tab. 4 sind die mit dieser Methode bestimmten Volumenaktivitäten den laut Herstellerangaben berechneten Volumenaktivitäten gegenübergestellt.

Tab. 4: Aktivitäten verschiedener Fructosedehydrogenasen.

| Fructosedehydrogenase, spez. Aktivität | berechnete Aktivität [U/mL] | bestimmte Aktivität [U/mL] | Anzahl n der Bestimmungen | Abweichung [%] |
|--|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------|
| Sorachim, 34,2 U/mg | 342 | 254,60 ± 4,91 | 5 | -25,6 |
| Fluka, 30 U/mg | 300 | 264,24 ± 4,30 | 2 | -12,0 |
| Sigma, 30 U/mg | 300 | 260,36 ± 3,27 | 2 | -13,2 |
| Sigma, 112 U/mg | 1120 | 709,36 ± 0,53 | 2 | -36,7 |

Die ermittelten Aktivitäten und die vom Hersteller angegebenen Aktivitäten lagen in derselben Größenordnung. Abweichungen kamen dadurch zustande, dass der Aktivitätstest bei Raumtemperatur durchgeführt wurde, die Herstellerangaben sich jedoch auf eine Temperatur von 37 °C beziehen, bei der die Fructosedehydrogenase ihr Temperaturoptimum

hat. Für die FDH der Firma Fluka und die FDH der Firma Sigma mit 30 U/mg wurde dennoch eine sehr gute Übereinstimmung gefunden mit Abweichungen von nur 12 bzw. 13%. Die größten Abweichungen ergaben sich bei der FDH von Sigma mit 112 U/mg. Von dieser FDH stand nur eine sehr geringe Menge zur Verfügung, die daher nicht eingewogen werden konnte, sondern direkt im Präparateglas gelöst werden musste. Möglicherweise kam es aufgrund der schwierigen Handhabung zu einem Verlust an Enzym. Die relativen Standardabweichungen waren mit maximal 2% bei allen Messreihen sehr gering.

Bei der Durchführung des Aktivitätstests wurde die Enzymkonzentration durch Zugabe unterschiedlicher Volumina an Enzymlösung variiert (Schritt 1 in Kap. 4.3). Dabei wurde für alle FDH-Präparationen eine Linearität der bestimmten Aktivität bezogen auf die Enzymkonzentration sichergestellt. In Abb. 26 ist dieser Zusammenhang für die hauptsächlich verwendete FDH der Firma Sorachim gezeigt ($R = 0,997$).

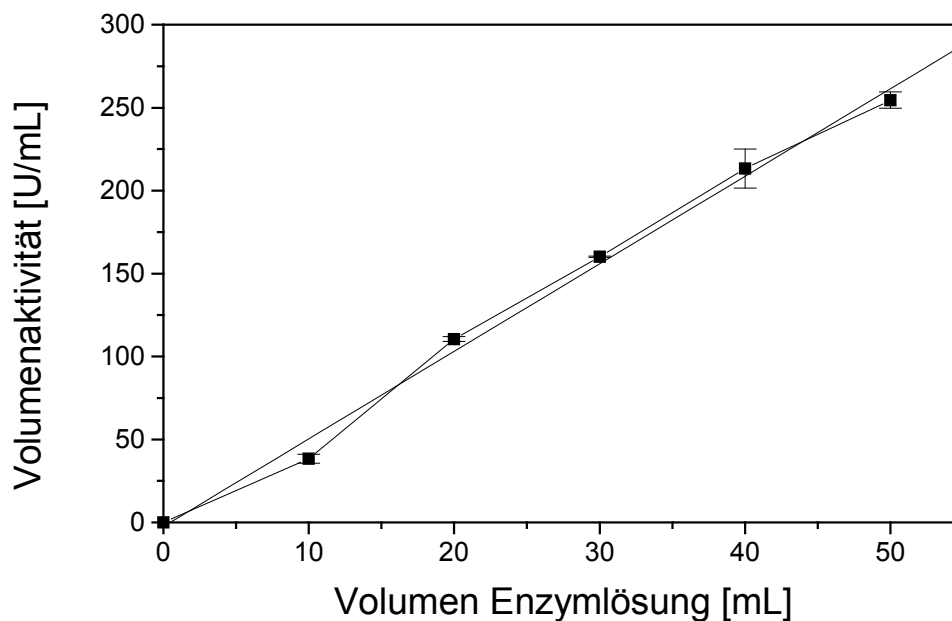


Abb. 26: Abhängigkeit der FDH-Aktivität von der Enzymkonzentration.
FDH der Firma Sorachim.

Weiterhin wurde die Inkubationszeit zur Bildung des Kaliumhexacyanoferrats(II) variiert (Schritt 2 in Kap. 4.3). Dabei wurde ebenfalls die lineare Abhängigkeit des gebildeten Kaliumhexacyanoferrats(II) und damit der enzymatischen Reaktion von der Zeit bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Zur weiteren Charakterisierung der Fructosedehydrogenase wurde ein Absorptionsspektrum im sichtbaren und ultravioletten Bereich aufgenommen. Das Spektrum zeigte bei 276 nm das typische Absorptionsmaximum der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan. Bei 410 nm war

das Absorptionsmaximum des Häms einer Cytochrom c-ähnlichen Untereinheit der FDH zu sehen [14, 150]. Zwei weitere, jedoch wesentlich schwächere Absorptionsmaxima dieser Untereinheit bei 550 und 523 nm [14, 150] sowie das Absorptionsmaximum des Cofaktors der Fructosedehydrogenase, Pyrrolochinolinchinon, bei 475 nm [151] wurden dagegen nicht detektiert.

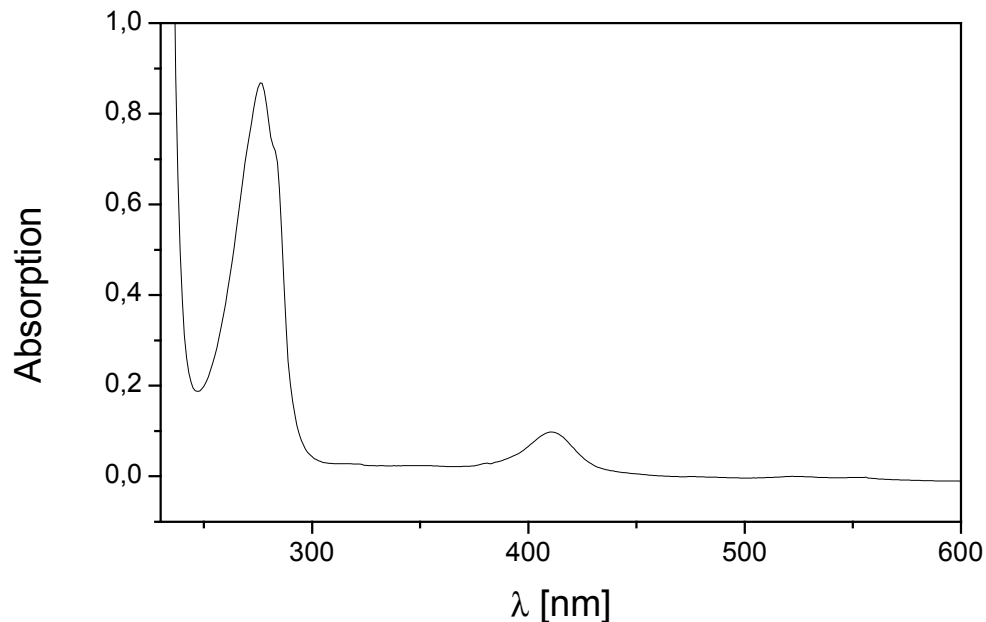


Abb. 27: Absorptionsspektrum der Fructosedehydrogenase.

FDH der Firma Sorachim, Konzentration 0,33% (w/v) in Phosphatpuffer pH 7,0.

5.3.3.2 Cyclovoltammetrische Untersuchungen von Kaliumhexacyanoferrat an Siebdruckelektroden

Als Mediator wurde, soweit nicht anders erwähnt, Kaliumhexacyanoferrat verwendet, dessen Einsatz zur Fructosebestimmung in Verbindung mit FDH in der Literatur beschrieben wird [36, 82-93]. Häufig wird bei mediierten Enzymreaktionen Graphit als Elektrodenmaterial verwendet. Zur Bestimmung eines geeigneten Elektrodenmaterials für die Fructosesensoren und zur Festlegung des Messpotentials wurden Cyclovoltammogramme von $K_3[Fe(CN)_6]$ sowohl an Platin- (Abb. 28) als auch an Graphitelektroden aufgenommen. In beiden Fällen wurde die für Hexacyanoferrat bekannte CV-Form mit einem Oxidationspeak bei +430 mV und einem Reduktionspeak bei -330 mV erhalten. Mit steigender Scanrate kam es zu einer zunehmenden Peakseparation, die auf eine schlechte Reversibilität der Redoxreaktion des Hexacyanoferrat(III)/Hexacyanoferrat(II)-Paares an den siebgedruckten Elektroden hinwies (Daten nicht gezeigt). Andererseits waren die Cyclovoltammogramme der vier verschiedenen Elektroden einer Sensorkarte sowohl im Fall von Graphit als auch von Platin als Elektrodenmaterial annähernd gleich und zeigten die gute Reproduzierbarkeit der

elektrochemischen Eigenschaften der siebgedruckten Elektroden. Da aufgrund dieser Ergebnisse beide Elektrodenmaterialien gleich gut zur Fructosebestimmung geeignet sein sollten, wurde Platin prinzipiell als Elektrodenmaterial festgelegt. Dadurch wurde die Herstellung der Transducer stark vereinfacht, da die Arbeitselektroden der Enzymsensoren zur Bestimmung der drei verschiedenen Zucker so alle aus dem gleichen Material bestanden. Bei einigen Experimenten wurden jedoch auch Graphitelektroden zum Vergleich eingesetzt. Das Messpotential wurde aufgrund der Lage des Oxidationspeaks für die meisten Experimente auf +400 mV festgelegt.

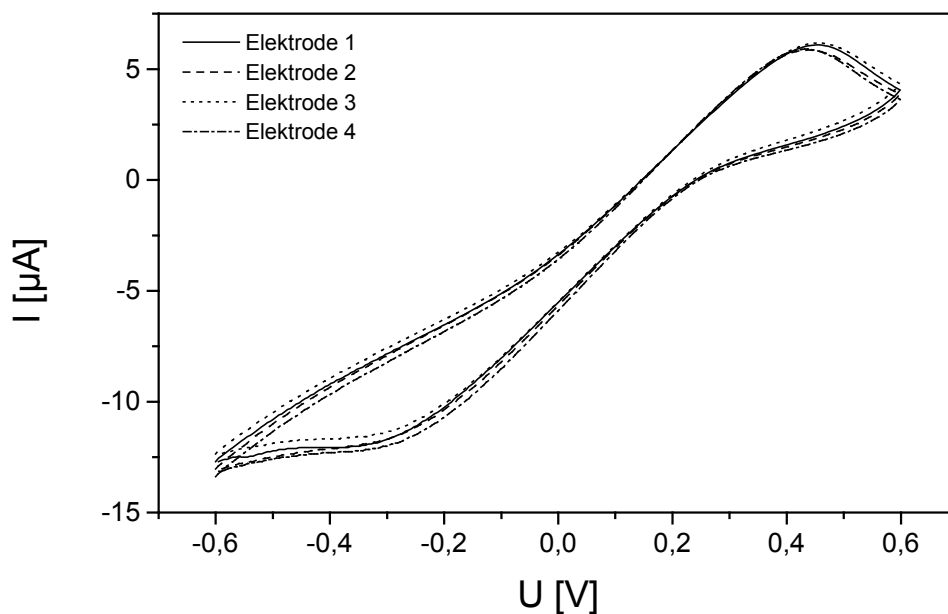


Abb. 28: Cyclovoltammogramm von Kaliumhexacyanoferrat.

5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 an den vier blanken Platinelektroden einer Sensorkarte, Scanrate 50 mV/s.

5.3.3.3 FDH-Immobilisierung im PCS-Hydrogel

Es wurde zunächst versucht, die Sensoren zur Bestimmung von Fructose analog den Glucose- und Saccharosesensoren (vgl. Kap. 5.3.1 und 5.3.2) durch Immobilisierung des Enzyms Fructosedehydrogenase im PCS-Hydrogel herzustellen. Bei den ersten Versuchen wurden sowohl Platin- als auch Graphitstrukturen als Transducer eingesetzt, um festzustellen, ob eines der beiden Elektrodenmaterialien für die Immobilisierung besser geeignet war. Die Enzymlösung für die Immobilisierung wurde durch Lösen von 1 mg FDH (Sorachim) in 100 μL Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 angesetzt, der für die Aktivität der Fructosedehydrogenase von Vorteil ist [29]. Dadurch ergab sich eine Enzymbeladung von 0,25 U pro Elektrode. Bei dem Versuch, die Enzymbeladung durch Verwendung einer konzentrierteren Enzymlösung zu erhöhen, kam es zu einem starken Verlaufen des

Immobilisats über die Arbeitselektrode hinaus auf der Isolierung. Auch bei der verwendeten Enzymbeladung von 0,25 U pro Elektrode deutete sich dieses Verhalten bereits an. Es ist vermutlich auf Zusätze in der Enzympräparation, wie z. B. Detergenz zurückzuführen, das bei membrangebundenen Proteinen oft verwendet wird. Ein weiterer Grund für das Verhalten des Immobilisats könnte auch die Verwendung des Mc Ilvaine Puffers pH 5,0 sein, da sich dadurch nur ein End-pH-Wert der Enzym-PCS-Mischung von etwa 5,0 ergab, während der End-pH-Wert bei der PCS-Immobilisierung normalerweise höher als 6,0 ist. Deshalb wurde als nächstes der zuvor bei der PCS-Immobilisierung eingesetzte Phosphatpuffer pH 7,0 verwendet. Dies führte jedoch nicht zu besseren Immobilisierungsergebnissen. Weiterhin wurde versucht, die Fructosedehydrogenase durch vierstündige Dialyse des Enzyms in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 von Zusätzen in der Enzympräparation zu befreien, doch auch hierdurch ergab sich keine Änderung des Immobilisierungsverhaltens. Um zu überprüfen, ob die Probleme bei der Immobilisierung an der verwendeten Enzympräparation lagen, wurde eine andere Fructosedehydrogenase eingesetzt (Sigma, 30 U/mg Feststoff). Die Enzymlösung wurde ebenfalls durch Lösen von 1 mg FDH in 100 μ L Phosphatpuffer pH 7,0 angesetzt. Diese FDH zeigte jedoch das gleiche Verhalten wie die FDH von Sorachim.

Mit den Fructosesensoren, die eine Enzymbeladung von 0,25 U pro Elektrode (FDH der Firma Sorachim) besaßen, wurden Kalibrierungen durchgeführt. Es wurden sowohl Sensoren verwendet, bei denen das Enzym im Mc Ilvaine Puffer gelöst wurde, als auch solche, bei denen das Enzym im Phosphatpuffer gelöst wurde. Bei den Messungen wurde Kaliumhexacyanoferrat als löslicher Mediator in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt. Alle Sensoren wiesen eine starke Drift der Signale bei Analytzugabe auf, so dass eine sinnvolle Auswertung und insbesondere die Messung von Realproben nicht möglich war (Daten nicht gezeigt). Da zunächst vermutet wurde, dass das Enzym möglicherweise in der Immobilisierungsmatrix nicht stabil genug war, wurde dem Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 zur Immobilisierung 0,1% Triton X-100 zugesetzt, das die FDH stabilisieren sollte [29]. Dadurch ergab sich jedoch keine Verbesserung. Durch Variation der Mediatorkonzentration zeigte sich, dass die Drift der Signale mit zunehmender Mediatorkonzentration abnahm und dass bei einer Konzentration von 200 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ stabile Signale erhalten wurden (Abb. 29). Lediglich die letzte Stromstufe der Kalibrierung, bei der die Fructosekonzentration 4,69 mM betrug, wies noch eine Drift auf. Es ergab sich eine durchschnittliche Sensitivität von $0,066 \pm 0,004$ nA/ μ M (6,1%, n = 4) im linearen Messbereich von 0,05 bis mindestens 2,23 mM.

Diese Ergebnisse bestätigten zwar die prinzipielle Eignung von Kaliumhexacyanoferrat als Mediator zur Bestimmung von Fructose in Verbindung mit FDH. Da es jedoch offensichtlich nur sehr langsam in die PCS-Schicht hineindiffundierte, kam es bei geringen Mediatorkonzentrationen zu der beobachteten Drift der Signale. Aus diesem Grund erschien die

Enzymimmobilisierung im PCS-Gel im Falle der FDH als ungeeignet.

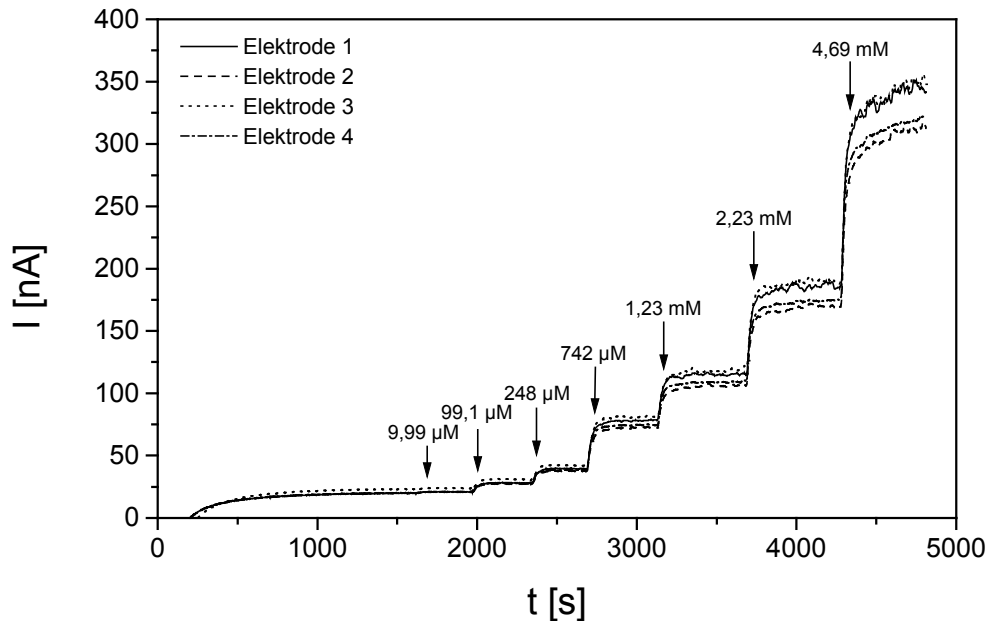


Abb. 29: Messkurven der vier Fructosesensoren einer Sensorkarte.

Immobilisierung der FDH (Sorachim) im PCS-Gel. Messung in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 200 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Angegeben ist die Gesamtkonzentration an Fructose in der Messlösung.

5.3.3.4 FDH-Immobilisierung mit Glutaraldehyd

Als alternative Methode zur Immobilisierung der Fructosedehydrogenase wurde die Quervernetzung mit Rinderserumalbumin durch das bifunktionale Reagenz Glutaraldehyd gewählt. In einem ersten Vorversuch wurde, ausgehend von den Arbeiten von *Frebel* [52], sowohl die Konzentration an Glutaraldehyd als auch an BSA variiert. Glutaraldehyd-, BSA- und FDH-Lösung wurden im Volumenverhältnis 1:1:1 in unterschiedlichsten Kombinationen bezüglich der Konzentrationen miteinander vermischt (Tab. 5). Die Ansätze wurden eine Stunde bei RT stengelassen, um das Polymerisationsverhalten zu beobachten. Sofern die Mischung noch nicht polymerisiert war, wurden anschließend jeweils 2 μL auf die Elektroden pipettiert. Der Versuch zeigte, dass die 1% und 2% Glutaraldehydlösungen offenbar für eine vollständige Polymerisation zu niedrig konzentriert waren, ebenfalls deuteten Ansatz 6 und 8 darauf hin, dass eine 10% BSA-Lösung besser geeignet war als eine 5% BSA-Lösung. Mit den Sensoren dieses Versuches wurden aufgrund von Rissen in den Membranen bzw. einer unvollständigen Polymerisation keine Messungen durchgeführt.

Tab. 5: Optimierung der Immobilisierung von Fructosedehydrogenase mit Glutaraldehyd.

| Ansatz | GA ¹ (v/v) | BSA ¹ (w/v) | FDH ¹ (w/v) | Beobachtungen | Sensitivität [nA/μM], linearer Bereich [mM] |
|--|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--|---|
| Mischungsverhältnis GA:BSA:FDH = 1:1:1, Immobilisierung nach 1 h GA in H ₂ O, BSA in H ₂ O, FDH (Sorachim) in Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst. | | | | | |
| 1 | 1% | 5% | 1% | keine Polymerisation | keine Messungen |
| 2 | 1% | 10% | 1% | keine Polymerisation | |
| 3 | 2% | 5% | 1% | keine Polymerisation | |
| 4 | 2% | 10% | 1% | keine Polymerisation | |
| 5 | 5% | 5% | 1% | Membran ungleichmäßig, unvollständige Polymerisation | |
| 6 | 5% | 10% | 1% | vollständige Polymerisation, Risse in der Membran | |
| 7 | 10% | 5% | 1% | Membran ungleichmäßig, unvollständige Polymerisation | |
| 8 | 10% | 10% | 1% | Polymerisation bereits nach 1 h, nicht mehr pipettierbar | |
| Mischungsverhältnis GA:BSA/FDH = 1:1, Immobilisierung nach 15 min GA in H ₂ O, BSA + FDH (Sorachim) in Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst. | | | | | |
| 9 | 1% | 10% | 1% | keine Polymerisation | |
| 10 | 2% | 10% | 1% | keine Polymerisation | |
| 11 | 5% | 10% | 1% | vollständige Polymerisation, Risse in der Membran nach der Messung: Membran haftete an einigen Stellen nicht mehr an der Elektrode | 0,070 ± 0,004 (5,7%, n = 4) 0,10 - ≥ 2,23 |
| 12 | 10% | 10% | 1% | Polymerisation bereits nach 15 min, nicht mehr pipettierbar | |
| Mischungsverhältnis GA:BSA/FDH = 1:1, Immobilisierung nach 5 min GA in 10% (v/v) Glycerin, BSA + FDH (Sorachim) in Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst. | | | | | |
| 13 | 5% | 10% | 3,3% | vollständige Polymerisation, keine Risse in der Membran nach der Messung: keine Risse in der Membran, Membran haftete an einigen Stellen nicht mehr an der Elektrode | 0,038 ± 0,001 (2,6%, n = 4) 0,05 - ≥ 2,23 |

Tab. 5: Optimierung der Immobilisierung von Fructosedehydrogenase mit Glutaraldehyd (Fortsetzung).

| Ansatz | GA ¹ (v/v) | BSA ¹ (w/v) | FDH ¹ (w/v) | Beobachtungen | Sensitivität [nA/μM], linearer Bereich [mM] |
|--|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--|---|
| 14 | 10% | 10% | 3,3% | vollständige Polymerisation, keine Risse in der Membran nach der Messung: starke Risse in der Membran, Membran haftete an einigen Stellen nicht mehr an der Elektrode | 0,035 ± 0,001 (2,9%, n = 2) 0,05 - ≥ 2,23 |
| Mischungsverhältnis GA:BSA/FDH = 1:1, Immobilisierung nach 5 min GA in 10% (v/v) Glycerin (Ansatz 15) bzw. 20% (v/v) Glycerin (Ansatz 16) gelöst. BSA + FDH (Sorachim) in Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst. Silanisierung der Elektroden vor der Immobilisierung. | | | | | |
| 15 | 5% | 10% | 1% | vollständige Polymerisation, keine Risse in der Membran, gute Haftung der Membran an der Elektrode | 0,057 ± 0,003 (5,3%, n = 4) 0,05 - ≥ 2,23 |
| 16 | 10% | 10% | 1% | vollständige Polymerisation, keine Risse in der Membran, gute Haftung der Membran an der Elektrode | 0,050 ± 0,004 (8,0%, n = 4) 0,05 - ≥ 1,24 |

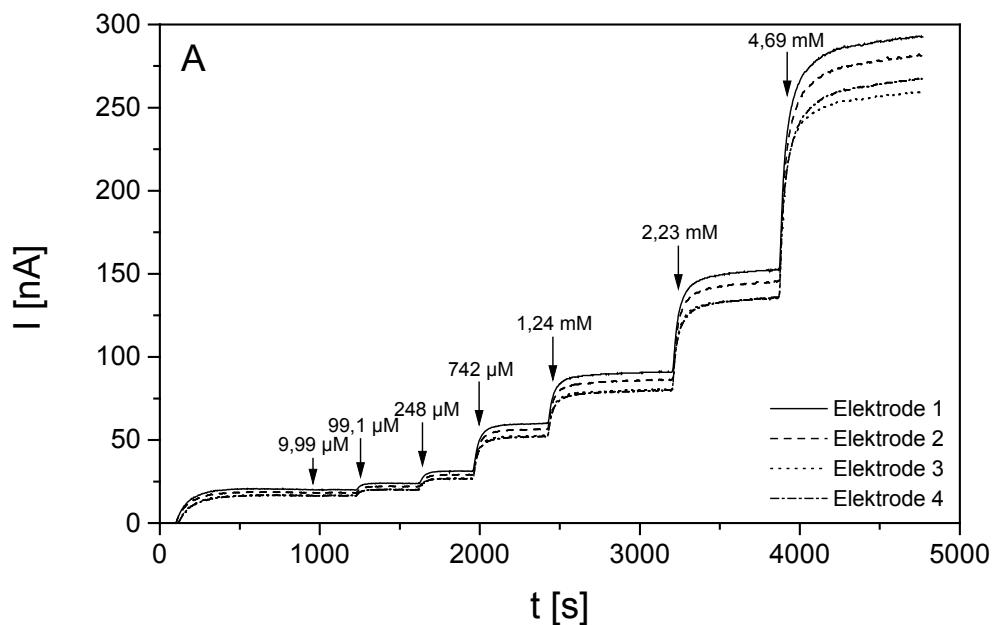
¹ Konzentration vor Mischung der Lösungen.

Im folgenden wurden FDH und BSA zusammen in einer Lösung angesetzt, die dann mit der Glutaraldehydlösung im Verhältnis 1:1 vermischt wurde. Aufgrund der aus dem neuen Mischungsverhältnis resultierenden veränderten Endzusammensetzung der Immobilisierungsmischung wurden nochmals alle Konzentrationen der Glutaraldehydlösung getestet. Erneut kam es bei Verwendung der 1% und 2% Glutaraldehydlösungen zu keiner Polymerisation. Bei Verwendung der 5% Glutaraldehydlösung verlief die Polymerisation vollständig, die Membranen wiesen jedoch Risse auf, wurden aber trotzdem zur Messung eingesetzt.

Um Risse zu vermeiden, wurde die Glutaraldehydlösung statt in destilliertem Wasser in einer glycerinhaltigen Lösung angesetzt. In diesem Experiment wurde eine FDH-Konzentration von 3,3% gewählt, um zu überprüfen, ob höhere FDH-Konzentrationen als 1% wie bei der Immobilisierung im PCS-Gel bei der Glutaraldehyd-Immobilisierung ebenfalls problematisch waren. Es kam zwar zu einem leichten Verlaufen des Immobilisats über die Arbeitselektrode hinaus auf die Isolierung, die Polymerisation verlief jedoch vollständig und die Sensoren konnten zur Messung eingesetzt werden. Die im Vergleich zu den Sensoren

aus Ansatz 11 niedrigeren Sensitivitäten sind durch eine zu hohe Proteinbeladung der Membran zu erklären. Dieser Effekt wurde in Kap. 5.3.3.7 systematisch untersucht. Die starken Risse in den Membranen der Sensoren aus Ansatz 14 nach der Messung sind vermutlich auf eine zu starke Vernetzung aufgrund der hohen Glutaraldehyd- und Proteinkonzentration zurückzuführen.

Um eine gute Haftung der Membranen zu gewährleisten, wurden die Elektroden vor der Immobilisierung mit APTS silanisiert. In der Literatur wird beschrieben, dass APTS kovalent an sauerstoffhaltige Gruppen auf der Platinoberfläche gebunden wird [152]. Somit findet bei der Enzymimmobilisierung mit Glutaraldehyd neben der Quervernetzung der Proteinmoleküle untereinander auch eine Verknüpfung mit dem Transducer über die auf der Platinoberfläche eingeführten Aminogruppen des Aminosilans statt, was der Membran eine erhöhte Stabilität verleiht. Als Standardimmobilisierungsprozedur für die FDH wurden im folgenden die Bedingungen für Ansatz 15 (Tab. 5) gewählt. In der Immobilisierungslösung lagen dabei 2,5% Glutaraldehyd, 5% Glycerin, 2,5% BSA und 0,25% FDH vor. Je nach verwendeter FDH-Charge ergab sich eine Enzymbeladung zwischen 0,25 und 0,34 U pro Elektrode. Die Ansprechzeiten t_{90} der Fructosesensoren lagen zwischen 90 und 120 s. Die Messkurven und die daraus resultierenden Kalibrationskurven der vier Fructosesensoren einer Sensorkarte sind in Abb. 30 gezeigt. Alle Membranen wiesen auch nach der Messung keine Risse auf und hafteten gut an der Elektrode.



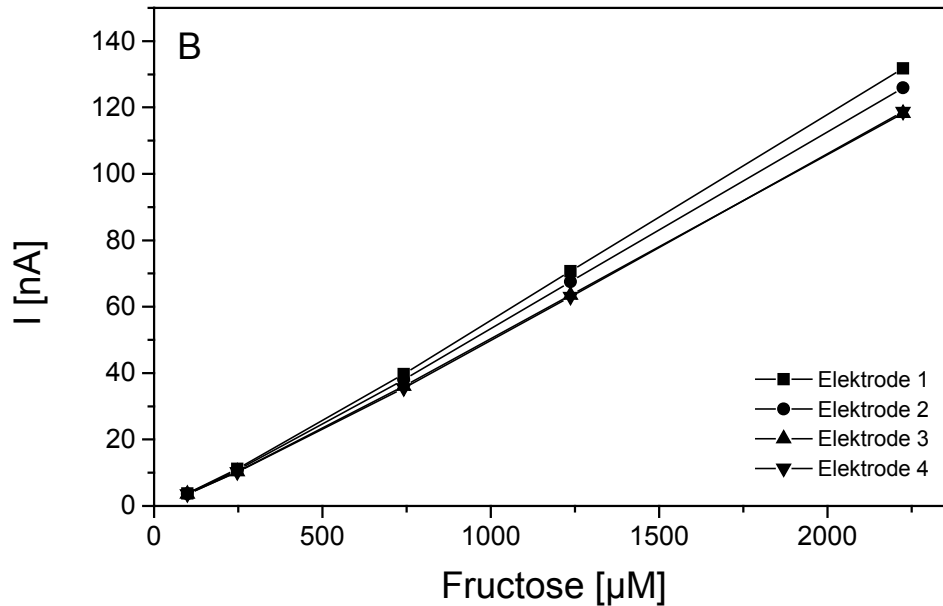


Abb. 30: Messkurven (A) und Kalibrationskurven (B) der vier Fructosesensoren einer Sensorkarte.

Immobilisierung der FDH (Sorachim) mit Glutaraldehyd. Messung in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$. Angegeben ist die Gesamtkonzentration an Fructose in der Messlösung.

5.3.3.5 Variation der Mediatorkonzentration

Um zu untersuchen, ob bei den mit Glutaraldehyd immobilisierten Fructosesensoren die Messsignale ebenfalls von der Mediatorkonzentration abhängig waren, wurde die Konzentration an $K_3[Fe(CN)_6]$ im Messpuffer variiert. Abb. 31 zeigt, dass die höchsten Sensitivitäten der Sensoren bei Mediatorkonzentrationen zwischen 1 und 2,5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ erreicht wurden. Bei Mediatorkonzentrationen von 3 und 5 mM waren die Sensitivitäten nur geringfügig niedriger (94-95%), sie nahmen jedoch bei einer noch höheren Mediatorkonzentration von 10 mM weiter ab auf 85% des maximalen Wertes.

Der lineare Messbereich der Fructosesensoren nahm dagegen mit steigender Mediatorkonzentration zu (Abb. 31). Bei einer Mediatorkonzentration von 0,5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ lag nur der 0,74 mM-Standard noch innerhalb des linearen Messbereiches, für 1 bis 1,5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ waren die Kalibrationskurven bis mindestens 1,24 mM linear. Zwischen 2 und 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ wurde ein linearer Zusammenhang bis einschließlich des 2,23 mM-Standards erreicht, der sich durch eine Mediatorkonzentration von 10 mM bis auf den 4,69 mM-Standard erhöhen ließ. Dass dieses Verhalten im Falle der Fructosesensoren mit PCS-Membran nicht beobachtet wurde, ist ein weiteres Indiz dafür, dass der Mediator Hexacyanoferrat nur schwer in die PCS-Membran eindiffundierte. Die effektive Mediatorkonzentration am Enzym war daher bei der PCS-Immobilisierung deutlich geringer

als die 200 mM, die in dem in Abb. 29 dargestellten Experiment in der Messlösung vorlagen. Je nach Anforderung ist es durch Variation der Mediatorkonzentration möglich, die Sensitivität und den linearen Messbereich der Fructosesensoren gezielt einzustellen. Für die Experimente in dieser Arbeit wurde eine Mediatorkonzentration von 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ gewählt. Dadurch wurde eine Sensitivität der Sensoren von 94% des Maximalwertes und ein linearer Messbereich bis mindestens 2,23 mM sichergestellt. Die Kalibrationskurven wiesen bei dieser Mediatorkonzentration gegenüber Konzentrationen zwischen 2 und 3 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, bei denen im gleichen linearen Messbereich geringfügig höhere Sensitivitäten erreicht wurden, einen besseren Korrelationskoeffizienten bei der linearen Regression auf. Ist jedoch in einem Experiment ein besonders großer linearer Messbereich erwünscht, so ist auch die Verwendung höherer Mediatorkonzentrationen unter leichter Einbuße der Sensitivität denkbar.

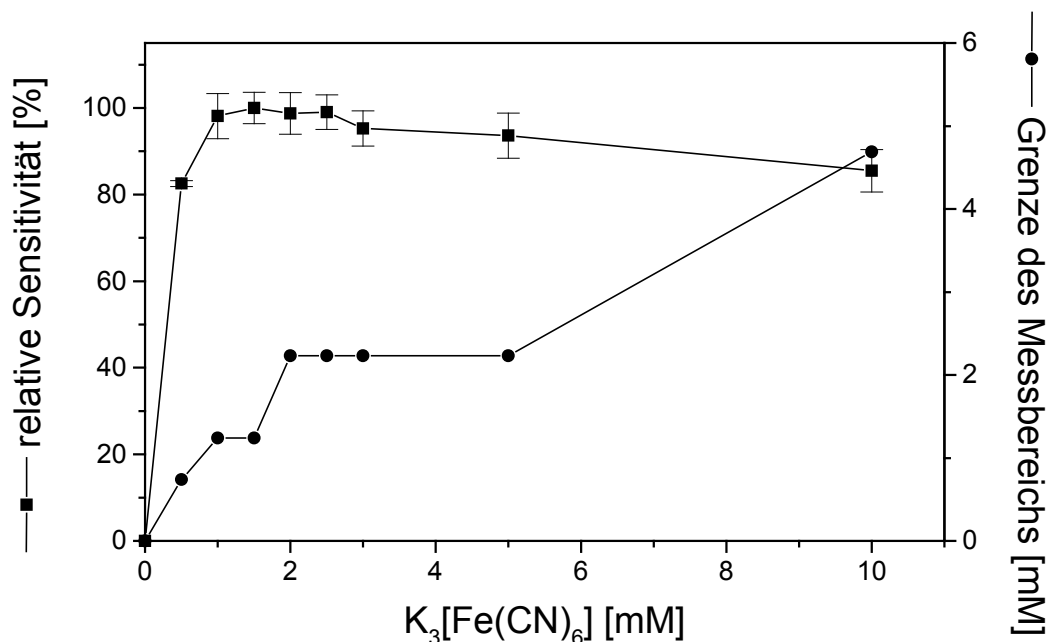


Abb. 31: Abhängigkeit der Sensitivität und des linearen Bereiches der Fructosesensoren von der Mediatorkonzentration.

Messung mit zwei Sensorkarten mit jeweils drei Fructosesensoren ($n = 6$) nacheinander in verschiedenen Mc Ilvaine Puffern pH 5,0 mit aufsteigender $K_3[Fe(CN)_6]$ -Konzentration.

5.3.3.6 Einsatz verschiedener Fructosedehydrogenasen

Es wurden Fructosedehydrogenasen verschiedener Firmen mit unterschiedlichen Aktivitäten eingesetzt und Sensoren mit gleicher Enzymbeladung miteinander verglichen (Tab. 6).

Die Sensitivitäten der Fructosesensoren mit den verschiedenen Fructosedehydrogenasen waren sehr ähnlich, lediglich bei Verwendung der FDH der Firma Sigma mit einer besonders hohen spezifischen Aktivität von 112 U/mg Feststoff ergaben sich um 10 bis 17% höhere

Sensitivitäten als bei Verwendung der anderen drei Fructosedehydrogenasen mit spezifischen Aktivitäten um 30 U/mg.

Tab. 6: Vergleich von Enzymsensoren mit unterschiedlichen Fructosedehydrogenasen. Enzymbeladung 0,34 U pro Elektrode (laut Herstellerangaben).

| Firma | Sensitivität [nA/μM] | Anzahl der Sensoren (n) |
|---------------------|----------------------|-------------------------|
| Sorachim, 34,2 U/mg | 0,120 ± 0,012 | 12 |
| Fluka, 30 U/mg | 0,127 ± 0,007 | 8 |
| Sigma, 30 U/mg | 0,120 ± 0,015 | 8 |
| Sigma, 112 U/mg | 0,140 ± 0,008 | 6 |

5.3.3.7 Variation und Optimierung der Enzymbeladung

Zur Optimierung der Enzymbeladung der Fructosesensoren wurde das Verhältnis von FDH und BSA der Enzym-BSA-Lösung bei einer Gesamteinkonzentration von 11% (m/v) variiert. Das gleiche Experiment wurde auch unter Zusatz von 1% Hydroxypropyl-β-cyclodextrin zur Immobilisierungsmischung durchgeführt. Hydroxypropyl-β-cyclodextrin hat einerseits stabilisierende Eigenschaften auf die Fructosedehydrogenase (vgl. Kap. 5.3.4.7). Andererseits erhöht es die Viskosität der Immobilisierungsmischung, so dass diese nicht so stark über die Arbeitselektrode hinaus auf die Isolierung verläuft. Deshalb wurde untersucht, ob durch Zusatz von Hydroxypropyl-β-cyclodextrin höhere Enzymbeladungen aufgrund des besseren Immobilisierungsverhaltens realisiert werden konnten.

Unter Verwendung der Standard-FDH von Sorachim kam es bei den Enzym-BSA-Lösungen mit den beiden höchsten Konzentrationen an FDH von 10 und 6%, entsprechend Enzymbeladungen von 3,4 bzw. 2,1 U pro Elektrode, kam es sowohl ohne als auch mit Zusatz von Hydroxypropyl-β-cyclodextrin zu einem starken Verlaufen des Immobilisats auf den Elektroden. Außerdem verlief die Polymerisation unvollständig, so dass mit diesen Sensoren keine Messungen durchgeführt wurden. Bei den Sensoren, die die Enzym-BSA-Lösung mit 4 und 2% FDH enthielten, entsprechend Enzymbeladungen von 1,4 bzw. 0,68 U pro Elektrode, führte der Zusatz von Hydroxypropyl-β-cyclodextrin zu einer starken Verbesserung des Immobilisierungsverhaltens. Während das Immobilisat ohne Hydroxypropyl-β-cyclodextrin auf den Elektroden verlief, war die Immobilisierung mit Hydroxypropyl-β-cyclodextrin gut. In beiden Fällen verlief die Polymerisation jedoch vollständig, so dass diese Elektroden und alle weiteren mit niedrigeren FDH-Konzentrationen zur Messung eingesetzt wurden (Abb. 32).

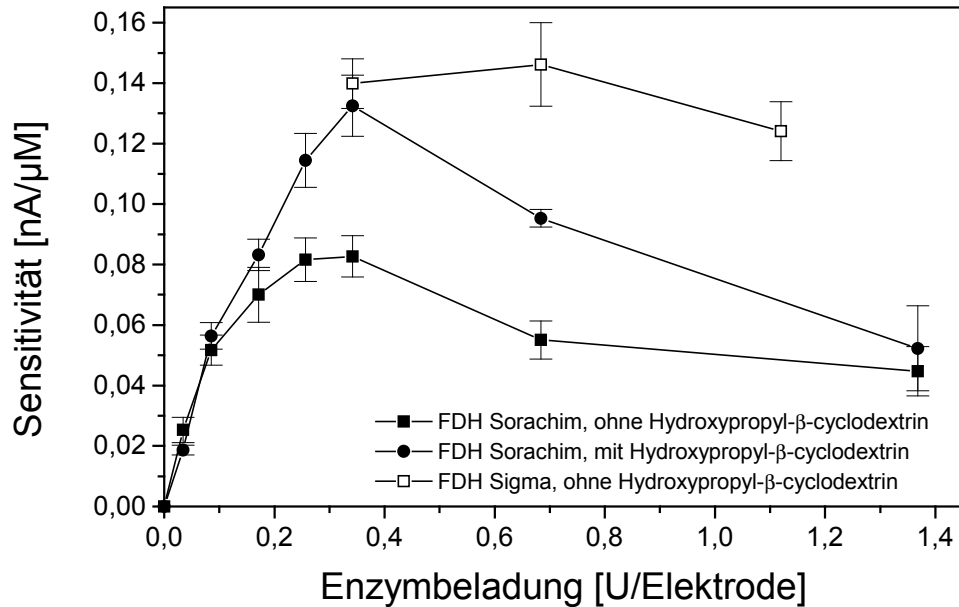


Abb. 32: Einfluss der Enzymbeladung auf die Sensitivität der Fructosesensoren.

FDH Sorachim: Messung mit jeweils zwei Sensorkarten (ohne Hydroxypropyl-β-cyclodextrin) bzw. einer Sensorkarte (mit Hydroxypropyl-β-cyclodextrin) mit vier Fructosesensoren identischer Enzymbeladung ($n = 8$ bzw. $n = 4$), Zugabe jeweils $238 \mu\text{M}$ Fructose-Standard, FDH Sigma: Messung mit jeweils zwei Sensorkarten mit drei Fructosesensoren mit identischer Enzymbeladung ($n = 6$), Zugabe jeweils $333 \mu\text{M}$ Fructosestandard, alle Messungen in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit $5 \text{ mM K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Bei den Sensoren ohne Hydroxypropyl-β-cyclodextrin kam es bis zu einer Enzymbeladung von $0,34 \text{ U pro Elektrode}$ zu einer Zunahme der Sensitivität, bei höheren Enzymbeladungen nahm die Sensitivität wieder ab. Für Enzymbeladungen von $0,26$ und $0,34 \text{ U pro Elektrode}$ ergaben sich fast identische Sensitivitäten, so dass die Verwendung der verschiedenen Chargen der FDH von Sorachim mit leicht unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten in jeweils 1% Konzentration keinen Einfluss auf die Sensitivität haben sollte. Der Abfall der Sensitivität bei höheren Enzymbeladungen kann zum einen an den veränderten Diffusionseigenschaften der Membran bei unterschiedlichen FDH-BSA-Verhältnissen liegen, zum anderen aber auch an der schlechteren Polymerisation des Immobilisats bei höheren FDH-Konzentrationen. Die Sensoren, bei denen Hydroxypropyl-β-cyclodextrin coimmobilisiert wurde, zeigten die gleiche Tendenz wie die Sensoren ohne Hydroxypropyl-β-cyclodextrin, jedoch bei höheren absoluten Sensitivitäten.

Zusätzlich wurde ein Beladungstest mit der Fructosedehydrogenase der Firma Sigma mit $112 \text{ U/mg Feststoff}$ durchgeführt. Aufgrund der hohen spezifischen Aktivität war es mit dieser FDH möglich, mit wesentlich geringeren Proteinkonzentrationen höhere Enzymbeladungen zu realisieren als bei Verwendung der Standard-FDH von Sorachim. Dadurch entfielen die Probleme des Verlaufens des Immobilisats bei der Immobilisierung. In diesem Experiment

wurden Enzymbeladungen gewählt, die in der gleichen Größenordnung lagen wie bei Verwendung der FDH von Sorachim, aufgrund der höheren Konzentration der Enzymlösung sind jedoch auch weitaus höhere Enzymbeladungen möglich. Die Sensitivitäten waren geringfügig höher als die maximal erreichten Sensitivitäten der Sensoren mit der Standard-FDH unter Zusatz von Hydroxypropyl- β -cyclodextrin. Bei der höchsten untersuchten Enzymbeladung von 1,1 U pro Elektrode kam es auch bei Verwendung dieser FDH bereits zu einem leichten Abfall der Sensitivität, so dass noch höhere Enzymbeladungen nicht sinnvoll erschienen. Die Verwendung der FDH von Sigma kann von Vorteil sein, wenn mit den Fructosesensoren besonders hohe Sensitivitäten erreicht werden sollen, ansonsten ist die Aktivität der Standard-FDH von Sorachim jedoch ausreichend.

5.3.3.8 Verwendung von Phenazinmethosulfat als Mediator

Um zu überprüfen, ob das Messpotential am Fructosesensor möglicherweise durch die Wahl eines anderen Mediators noch weiter gesenkt werden konnte, wurde Phenazinmethosulfat (PMS) (andere Bezeichnung: N-Methylphenazoniummethylsulfat) eingesetzt. Es wurden exemplarisch einige Cyclovoltammogramme von PMS an Fructosesensoren aufgenommen, die nach der Standard-FDH-Immobilisierung mit Glutaraldehyd unter Verwendung der Sensorkarten mit Platin als Elektrodenmaterial hergestellt worden waren. Die Cyclovoltammogramme wiesen einen ausgeprägten Oxidationspeak bei +100 mV auf (Abb. 33). Die Cyclovoltammogramme der vier Fructosesensoren einer Sensorkarte waren fast identisch und zeigten somit die gute Reproduzierbarkeit der Herstellung der Sensoren bezüglich des Siebdruckprozesses.

Aufgrund der Lage des Oxidationspeaks wurde das Messpotential für die Fructosekalibrierungen zunächst auf +150 mV festgelegt. Bei diesem Potential lagen die Grundströme im negativen Bereich bei ~ -250 nA und wiesen eine starke Drift auf. Eine Messung bei diesem Potential erschien daher nicht sinnvoll und es wurde ein höheres Potential gewählt. Bei einem Potential von +200 mV wiesen die Grundströme ebenfalls eine starke Drift im negativen Bereich bei ~ -90 nA auf. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit den Cyclovoltammogrammen überein, bei denen die Ströme bei Potentialen zwischen 100 und 200 mV deutlich positiv sind. Möglicherweise ist der Unterschied dadurch zu erklären, dass die Cyclovoltammogramme in einem statischen System aufgenommen wurden, während die amperometrischen Messungen unter gerührten Bedingungen ausgeführt wurden. Darüberhinaus wurden die cyclovoltammetrischen Untersuchungen nicht systematisch, sondern nur bei einer Scanrate von 50 mV/s durchgeführt. Es ist zu vermuten, dass es mit steigender Scanrate zu einer zunehmenden Peakseparation kommt, wodurch die Ströme bei 100 bis 200 mV im negativen Bereich liegen könnten. Bei +300 mV lagen die Grundströme

zwischen 15 und 19 nA, die Sensoren wiesen eine Sensitivität für Fructose von $0,142 \pm 0,005$ nA/ μ M (3,5%, n = 8) auf. Bei einem Potential von +400 mV ergaben sich Grundströme von 60 bis 66 nA, die durchschnittliche Sensitivität der Sensoren lag bei $0,160 \pm 0,007$ nA/ μ M (4,4%, n = 4).

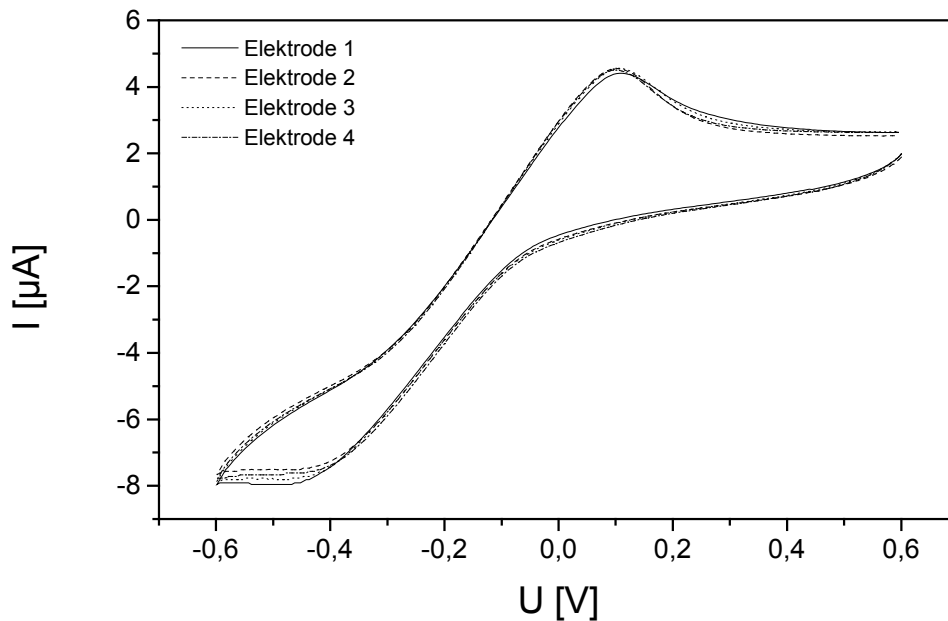


Abb. 33: Cyclovoltammogramm von N-Methylphenazoniummethylsulfat.

5 mM PMS in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 an den vier Fructosesensoren einer Sensorkarte, Scanrate 50 mV/s.

Als optimal bei der Verwendung von PMS als Mediator erwies sich daher ein Messpotential von +300 mV. Bei diesem Potential wurden niedrige, positive Grundströme erhalten und die Strom-Zeit-Kurven wiesen nur eine geringe Drift auf (Abb. 34). PMS war damit prinzipiell als Mediator für die Fructosebestimmung geeignet. Im Vergleich zu $K_3[Fe(CN)_6]$ als Mediator wiesen die Fructosesensoren bei Verwendung von PMS höhere Sensitivitäten auf. Der lineare Messbereich sowie die Ansprechzeiten waren dagegen bei den PMS-medierten Messungen schlechter. Nur der 1,24 mM-Standard lag noch innerhalb des linearen Messbereiches, die Ansprechzeiten t_{90} lagen zwischen 150 und 200 s. Zusätzlich war die Handhabung der PMS-haltigen Lösungen aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Mediators komplizierter als bei $K_3[Fe(CN)_6]$. Aufgrund dieser Nachteile, insbesondere aufgrund der längeren Ansprechzeiten, da die Schnelligkeit des Analysensystems ein wichtiges Merkmal im Hinblick auf die Praxistauglichkeit darstellt, wurde PMS im folgenden nicht weiter als Mediator eingesetzt.

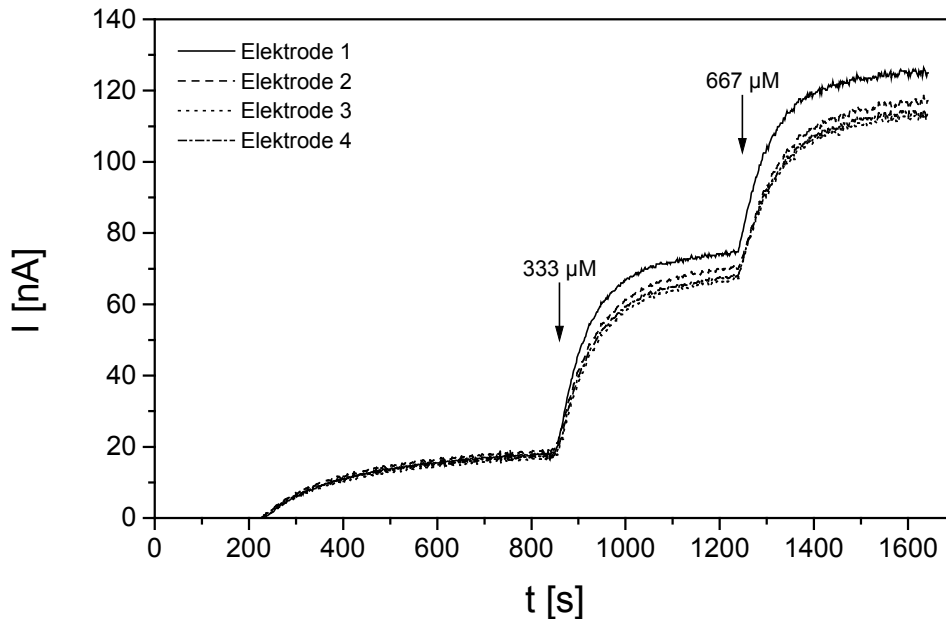


Abb. 34: Messkurven der vier Fructosesensoren einer Sensorkarte.

Immobilisierung der FDH (Sorachim) mit Glutaraldehyd. Messung in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM PMS. Potential +300 mV vs. Ag/AgCl. Angegeben ist die Gesamtkonzentration an Fructose in der Messlösung.

5.3.4 Multianalysensoren

Nachdem die drei Enzymsensoren zur Bestimmung von Glucose, Saccharose und Fructose getrennt voneinander entwickelt, optimiert und charakterisiert worden waren, wurden sie auf den Vierarbeitselektrodensensoren zu einem Multianalysensensor für die simultane Bestimmung der drei Zucker kombiniert. Soweit nicht anders erwähnt, wurden die Messungen mit den Multianalysensoren in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ durchgeführt. Das Messpotential an den Glucose-, Saccharose- und Blindsensoren betrug +600 mV vs. Ag/AgCl und am Fructosesensor +400 mV vs. Ag/AgCl.

5.3.4.1 Querempfindlichkeit

Bei der Entwicklung der Multianalysensoren musste besonders darauf geachtet werden, dass sich die verschiedenen Enzymsensoren auf einer Sensorkarte nicht gegenseitig beeinflussten, da dadurch die Messergebnisse verfälscht würden. Dabei war einerseits eine Querdiffusion des am Glucose- und Saccharosesensor gebildeten Wasserstoffperoxids zu den benachbarten Sensoren möglich, andererseits konnte die bei der Saccharoseumsetzung gebildete Glucose bzw. Fructose zum Glucose- bzw. Fructosesensor diffundieren und dort ein Signal verursachen.

Es wurde zunächst die Querdiffusion des Wasserstoffperoxids untersucht. Dazu wurden Sensorkarten mit jeweils zwei Glucose- und Blindsensoren hergestellt. Damit die Blindsensoren bezüglich des Proteingehalts und der Diffusionseigenschaften mit den Enzymsensoren vergleichbar waren, wurden sie durch Immobilisierung einer 2% BSA-Lösung im PCS-Hydrogel hergestellt. Bei einer kompletten Glucosekalibration kam es an den Blindsensoren in den meisten Fällen zu gar keinem Signal (Abb. 35), in einigen Fällen kam es zu einem mit ansteigenden Glucosekonzentrationen stärker werdenden Rauschen (Daten nicht gezeigt). Die Querdiffusion des Wasserstoffperoxids war also vernachlässigbar.

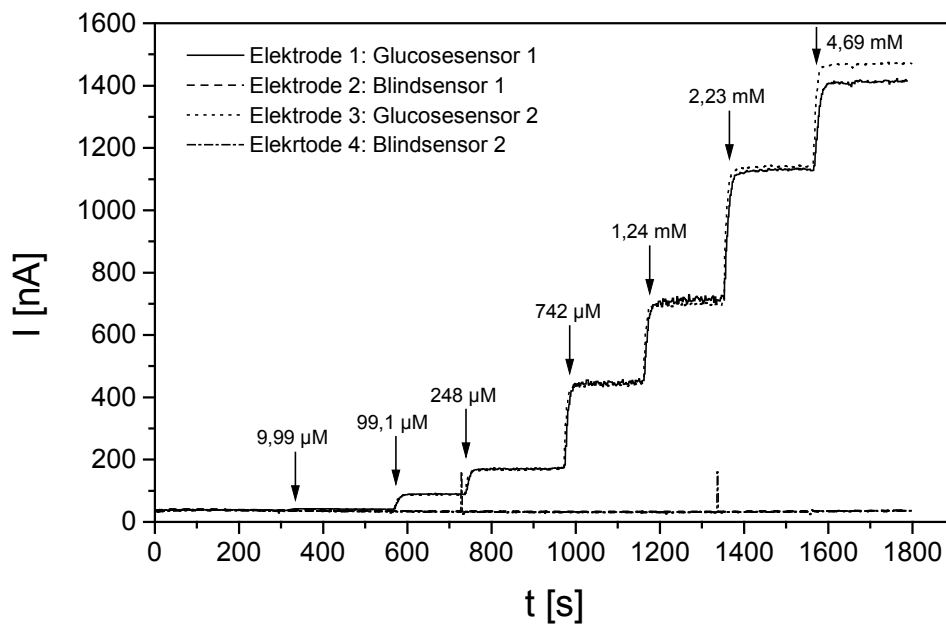


Abb. 35: Querempfindlichkeit der Glucose- und Blindsensoren.

Messung mit einer Sensorkarte mit jeweils zwei Glucose- und Blindsensoren in Phosphatpuffer pH 7,0. Angegeben ist die Gesamtkonzentration an Glucose in der Messlösung. Zur Anordnung der Sensoren auf der Sensorkarte siehe Abb. 37.

Als nächstes wurde untersucht, ob die bei der Saccharoseumsetzung entstehende Glucose am Glucosesensor ein Signal verursachte. Dazu wurden Sensorkarten mit jeweils zwei Glucose- und Saccharosesensoren hergestellt. Bei Zugabe von 100 µM Saccharoselösung wurde Glucosesensor 1, der sich im größeren Abstand zu den Saccharosesensoren befand, gar nicht durch die Saccharosezugabe beeinflusst. Glucosesensor 2, der direkt neben den Saccharosesensoren lag, wurde nur geringfügig durch möglicherweise vom Saccharosesensor diffundierende Glucose oder diffundierendes Wasserstoffperoxid beeinflusst (Abb. 36). Die Stromzunahme durch die Saccharosezugabe am Glucosesensor 2 betrug etwa 4 nA, dies entspricht immerhin 3,7% des Glucosesignals. Bei den Multianalysensoren sollte deshalb darauf geachtet werden, Glucose- und Saccharosesensor so zu positionieren, dass sie sich möglichst nicht gegenseitig beeinflussen.

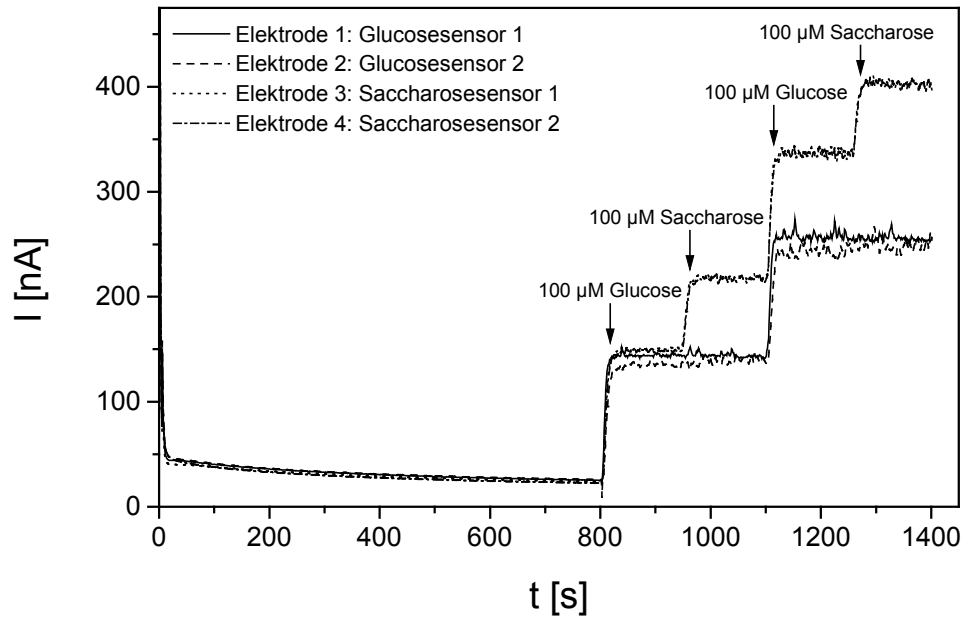


Abb. 36: Querempfindlichkeit der Glucose- und Saccharosensoren.

Messung mit einer Sensorkarte mit jeweils zwei Glucose- und Saccharosensoren in Phosphatpuffer pH 7,0. Angegeben sind die Konzentrationen der einzelnen Zuckerzugaben. Zur Anordnung der Sensoren auf der Sensorkarte siehe Abb. 37.

Zur Herstellung der Multianalysensoren wurden auf jeweils einer der vier Arbeitselektroden die Enzyme für den Glucose-, Saccharose- bzw. Fructosensensor immobilisiert. Die vierte Arbeitselektrode diente als Blindsensor zur Detektion eventueller Störsignale. Für die einzelnen Enzymsensoren wurde folgende Reihenfolge auf der Sensorkarte festgelegt (Abb. 37):

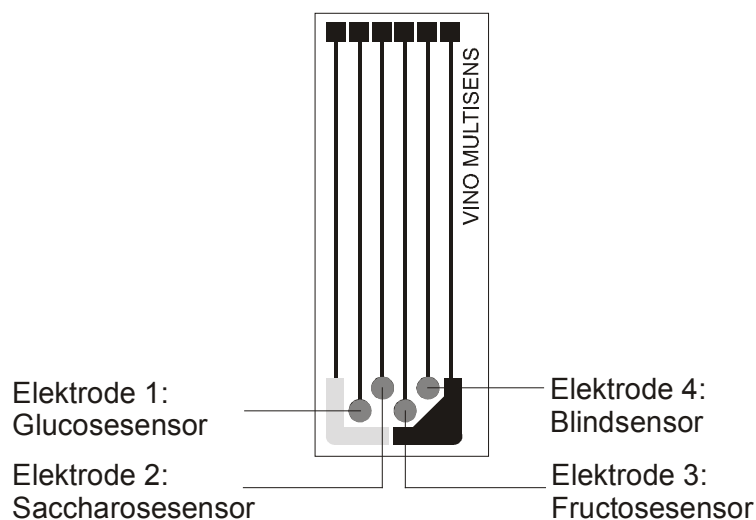


Abb. 37: Anordnung der Enzymsensoren auf der Sensorkarte.

In dieser Reihenfolge kam es nicht zu einer gegenseitigen Beeinflussung der Sensoren. Bei aufeinanderfolgender Zugabe von jeweils 500 μM Glucose-, Saccharose- und Fructoselösung sprach jeder Sensor nur auf den Analyten an, für den das entsprechende Enzym spezifisch war (Abb. 38).

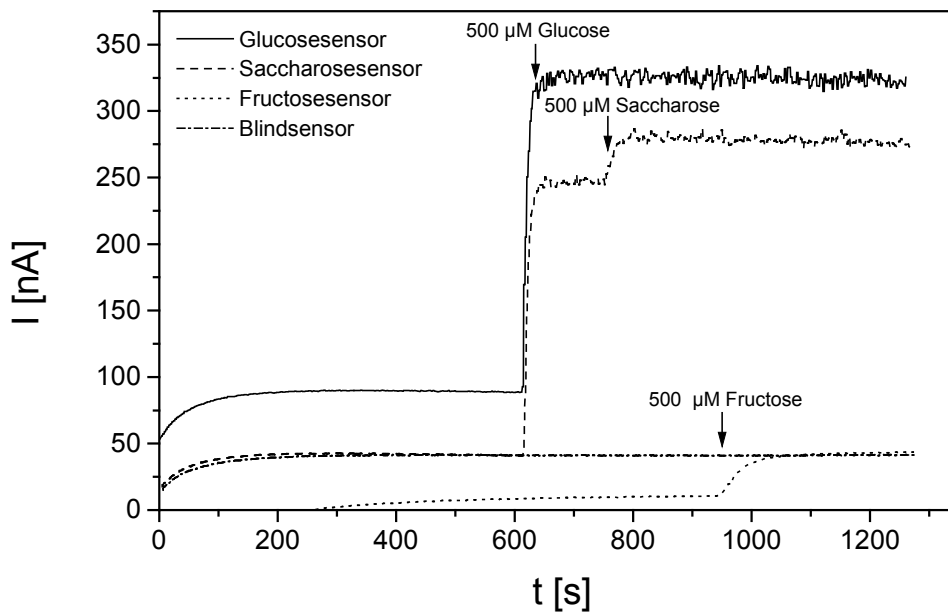


Abb. 38: Querempfindlichkeit des Glucose-, Saccharose- und Fructosesensors einer Sensorkarte.

Messung in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Angegeben sind die Konzentrationen der einzelnen Zuckerzugaben.

Insbesondere war kein Anstieg des Signals am Glucosesensor bei Saccharosezugabe zu erkennen, obwohl der Glucose- und Saccharosesensor direkt nebeneinander lagen. Die Beeinflussung des Glucosesensors durch den Saccharosesensor schien auch von der vertikalen Position abhängig zu sein. Die in Abb. 38 zu erkennenden unterschiedlich hohen Grundströme der verschiedenen Sensoren waren gerätetechnisch bedingt und hatten keinen Einfluss auf die Messung.

5.3.4.2 Variation des Messpotentials

Um die optimalen Messpotentiale für die einzelnen Enzymsensoren des Multianalysensensors zu bestimmen, wurden nacheinander steigende Potentiale von 0 bis 600 mV vs. Ag/AgCl angelegt. Es kann davon ausgegangen werden, dass das optimale Messpotential des Saccharosesensors mit dem des Glucosesensors übereinstimmt, da in beiden Fällen die Reoxidation des Wasserstoffperoxids an der Platinelektrode detektiert wird. Aus diesem Grund wurde dieses Experiment nur für den Glucose- und Fructosesensor durchgeführt

(Abb. 39). Bei einem Potential von 0, 100 und 200 mV waren die Grundströme in Übereinstimmung mit den Cyclovoltammogrammen von Kaliumhexacyanoferrat (Abb. 28) jeweils negativ. Da bei Potentialen bis 200 mV noch keine oder nur eine sehr geringe Umsetzung von Wasserstoffperoxid stattfindet (vgl. Abb. 15), sind die negativen Grundströme auf den in der Messlösung vorhandenen Mediator zurückzuführen. Erst bei Potentialen ≥ 300 mV wurden die Grundströme sowohl an den Glucose- als auch an den Fructosesensoren positiv.

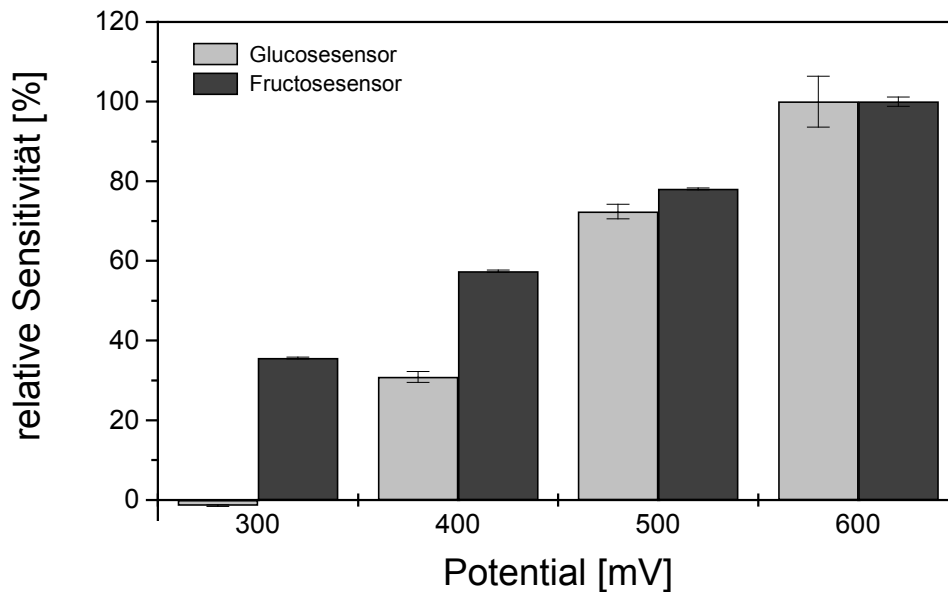


Abb. 39: Einfluss des Messpotentials auf die Sensitivität der Glucose- und Fructosesensoren.

Messung mit einer Sensorkarte mit jeweils zwei Glucose- und Fructosesensoren ($n = 2$) in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$. Zugabe jeweils 333 μ M Glucose- und Fructosestandard.

Interessanterweise kam es bei einem Potential von 300 mV an den Glucosesensoren bei Analytzugabe zu einer geringen Abnahme des Stromsignals, während die Fructosesensoren bereits positive Signale zeigten. Sowohl für die Glucose- als auch für die Fructosesensoren wurden die maximalen Sensitivitäten bei einem Potential von 600 mV erreicht. Während jedoch bei den Fructosesensoren bei einem Potential von 400 mV bereits etwa 60% des maximalen Sensorsignals erreicht wurden, lag die Sensitivität der Glucosesensoren bei diesem Potential nur bei 30% des Maximalwertes. Die Glucosesensoren zeigten damit bezüglich der Abhängigkeit des Sensorsignals vom Messpotential andere Eigenschaften als die blanken Platinelektroden bei einer H_2O_2 -Kalibration, die bei einem Potential von 400 und 500 mV bereits 90% des maximalen Signals aufwies (vgl. Abb. 15). Diese beiden Experimente sind jedoch nicht direkt miteinander vergleichbar, da die H_2O_2 -Kalibrationen der blanken Platinelektroden im Phosphatpuffer pH 7,0 durchgeführt wurden, während in diesem

Experiment Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 verwendet wurde, wodurch allgemein geringere Sensitivitäten erhalten wurden. Das Messpotential für die Glucose- und Saccharosesensoren wurde daher auf +600 mV festgelegt. Als Messpotential für den Blindsensor wurde ebenfalls +600 mV gewählt, um sicherzustellen, dass eventuelle Störstoffe möglichst vollständig erfasst wurden. Die maximale Sensitivität der Fructosesensoren wurde ebenfalls bei einem Potential von 600 mV erreicht. Da es jedoch bei den Fructosesensoren zu einem vergleichsweise stetigen Anstieg des Grundstroms mit steigendem Potential kam, wurde als Kompromiss zwischen ausreichend hohen Signalen und niedrigem Grundstrom das Messpotential für die Fructosesensoren auf +400 mV festgelegt. Der Grundstrom lag bei diesem Potential bei etwa 20 nA, bei einem Potential von +600 mV betrug er bereits 35 nA. Bei den Glucosesensoren wurde diese Zunahme des Grundstroms mit steigendem Potential nicht beobachtet. Für Potentiale zwischen 400 und 600 mV lagen die Grundströme zwischen 15 und 20 nA.

5.3.4.3 pH-Abhängigkeit

Da die verwendeten Enzyme laut Herstellerangaben unterschiedliche pH-Optima besaßen, sollte für die Messungen mit den Multianalysensoren ein Kompromiss bezüglich des pH-Wertes der Messlösung gefunden werden. Dazu wurde die Abhängigkeit der Sensorsignale vom pH-Wert der Messlösung im Bereich von pH 4,0 bis 8,0 untersucht. Es wurden zwei verschiedene Puffersysteme verwendet, Mc Ilvaine Puffer im Bereich von pH 4,0 bis 5,5 und Phosphatpuffer im Bereich von pH 5,0 bis 8,0. Dazu wurden zwei Messreihen durchgeführt, Messreihe 1 wurde bei pH 8,0 gestartet und der pH-Wert der Messlösung von Messung zu Messung erniedrigt (Abb. 40 A), bei Messreihe 2 wurde mit der Messung im Puffer pH 4,0 begonnen und der pH-Wert der Messlösung sukzessive erhöht (Abb. 40 B).

Bei der Messreihe 1 lag das pH-Optimum der Glucose- und Saccharosesensoren im Bereich von pH 6,0 bis 7,0. In diesem pH-Bereich waren die Sensitivitäten jeweils nahezu gleich, so dass Glucose- und Saccharosesensor sehr gut auf ein- und derselben Sensorkarte kombiniert werden konnten. Das pH-Optimum der Fructosesensoren lag dagegen bei pH 5,0 bis 5,5. Das bedeutete, dass für die Kombination von Glucose-, Saccharose- und Fructosesensor auf einer Sensorkarte ein Kompromiss bezüglich der Messlösung gefunden werden musste. Bei der Messreihe 2, beginnend im Puffer pH 4,0, ergab sich für den Glucosesensor das gleiche Bild wie in Messreihe 1, die Sensitivitäten waren bei höheren pH-Werten annähernd gleich. Es fiel allerdings auf, dass die absoluten Sensitivitäten der Saccharose- und Fructosesensoren niedriger waren als in Messreihe 1. Die Sensitivität des Saccharosesensors für Glucose erreichte in Messreihe 2 erst bei pH 7,0 die Sensitivität des

Glucosesensors. In Messreihe 1 war dies - in Übereinstimmung mit den Glucosekalibrierungen in Kap. 5.3.1.1 und 5.3.2.1 - bereits bei pH 5,0 der Fall. Möglicherweise kam es in Messreihe 2 durch die anfänglichen Messungen bei niedrigen pH-Werten zu einer Inaktivierung von Enzymen. Die Glucoseoxidase war als sehr stabiles Enzym von diesem Effekt offensichtlich nicht betroffen, wohl aber die empfindlicheren Enzyme Invertase, Mutarotase und Fructosedehydrogenase. Das pH-Optimum der Fructosesensoren lag jedoch auch in Messreihe 2 bei pH 5,0 bis 5,5.

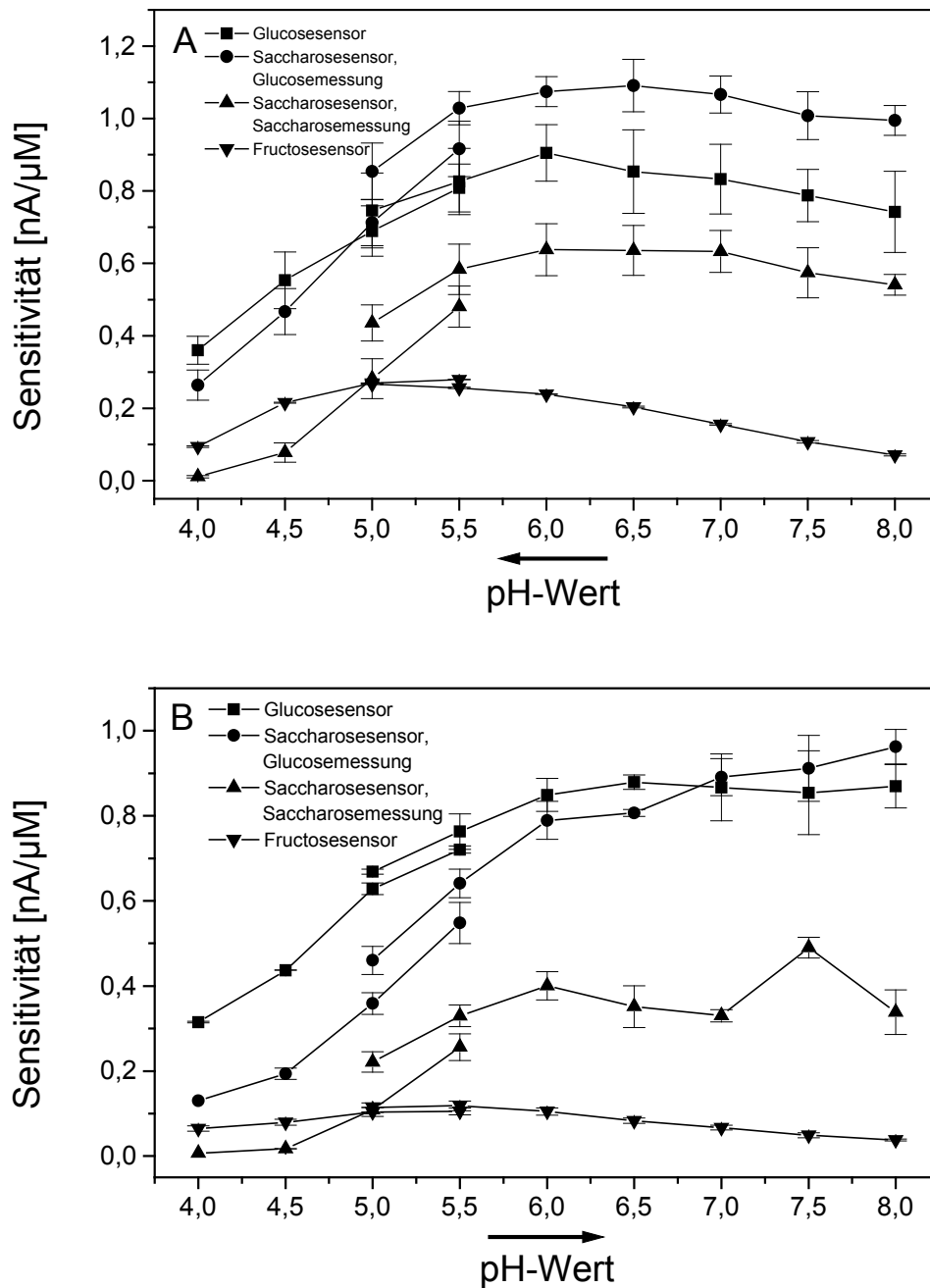


Abb. 40: pH-Abhängigkeit der Multianalysensoren.

Start der Messreihe bei pH 8,0 (A) und bei pH 4,0 (B). Messung mit jeweils zwei Multianalysensoren ($n = 2$). Zugabe jeweils 333 μM Glucose-, Saccharose- und Fructosestandard.

Bei der Wahl des Standard-Messpuffers für die Multianalysensoren ist zu berücksichtigen, dass weder Messreihe 1 noch Messreihe 2 genau den späteren Bedingungen entsprechen, da die Sensoren im allgemeinen vor ihrer Messung nicht in einem Puffer mit höherem oder niedrigerem pH-Wert, sondern trocken gelagert wurden. Da die absoluten Signale der Glucose- und Saccharosesensoren wesentlich höher als die der Fructosesensoren im jeweils optimalen Messpuffer waren, wurde die Messlösung für die Multianalysensoren nach dem pH-Optimum der Fructosesensoren ausgewählt, d. h. es kamen die Puffer mit pH 5,0 und 5,5 in Betracht. Bei der Auswahl des Messpuffers wurde nicht nur die Sensitivität der Sensoren berücksichtigt, sondern auch die Ansprechzeiten t_{90} sowie die Tatsache, dass die Saccharosezugabe, abhängig vom verwendeten Puffer, am Fructosesensor eine leichte Stromzunahme verursachte (Tab. 7).

Tab. 7: Einfluss des Messpuffers auf charakteristische Parameter der Fructosesensoren. Ansprechzeiten t_{90} und durch Saccharosezugabe hervorgerufenen Signal am Fructosesensor.

| Puffer | t_{90} Fructosesensor [s] | | ΔI [nA] ($\Delta I/I(\text{Fructose})$) | |
|--------------|-----------------------------|----------------|--|----------------------|
| | pH 5,0 | pH 5,5 | pH 5,0 | pH 5,5 |
| Messreihe 1: | | | | |
| Mc Ilvaine | $38,5 \pm 3,5$ | $31,5 \pm 2,8$ | $1,4 \pm 0,3$ (1,5%) | $3,1 \pm 0,4$ (3,3%) |
| Phosphat | $47,0 \pm 4,2$ | $38,0 \pm 2,8$ | $3,1 \pm 0,3$ (3,5%) | $4,0 \pm 0,6$ (4,7%) |
| Messreihe 2: | | | | |
| Mc Ilvaine | $97,5 \pm 29,0$ | $59,5 \pm 0,7$ | $0,5 \pm 0,1$ (1,5%) | $2,0 \pm 0,3$ (5,6%) |
| Phosphat | $111 \pm 1,4$ | $74,5 \pm 4,9$ | $1,9 \pm 0,1$ (4,7%) | $2,7 \pm 0,1$ (6,7%) |

Betrachtet man nur die Sensitivitäten, erscheint die Verwendung des Phosphatpuffers mit pH 5,5 am sinnvollsten, in dem die Signale der durch die niedrigen pH-Werte am stärksten beeinträchtigten Saccharosesensoren noch am höchsten waren. Allerdings war in diesem Puffer in beiden Messreihen auch die durch die Saccharosezugabe verursachte Stromzunahme am Fructosesensor am größten (4,7% bzw. 6,7% bezogen auf das Fructosesignal). Diese Stromzunahme ließ sich durch Verwendung von Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 deutlich verringern (1,5% bezogen auf das Fructosesignal in beiden Messreihen). Der Stromanstieg ist entweder auf die Diffusion der bei der Saccharoseumsetzung gebildeten Fructose oder auf die Diffusion des entstehenden H_2O_2 zum Fructosesensor zurückzuführen. Die Ansprechzeiten t_{90} waren im Mc Ilvaine Puffer geringfügig niedriger als im Phosphatpuffer. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 als

Messlösung für die Multianalysensoren gewählt. In diesem Puffer lag in Messreihe 1 die Sensitivität der Glucosesensoren immer noch bei 76% und die der Saccharosesensoren für Glucose bei 65% ihres maximalen Wertes. Am stärksten wurden die Signale der Saccharosesensoren für Saccharose beeinträchtigt, sie erreichten nur noch knapp 50% des maximalen Wertes. In Messreihe 2 betrug die Sensitivität der Saccharosesensoren sogar nur noch 37% des maximalen Wertes für Glucose und 22% des Maximums für Saccharose. In beiden Messreihen lagen die Sensitivitäten der Saccharosesensoren für Saccharose jedoch immer noch in der Größenordnung der Signale der Fructosesensoren und waren hoch genug, um problemlos ausgewertet zu werden.

Da sich in Messreihe 1 für die Fructosesensoren sehr hohe Sensitivitäten von etwa $0,27 \text{ nA}/\mu\text{M}$ ergaben, die bei einer direkten Messung im Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 sonst nicht erreicht wurden, wurde vermutet, dass die zunächst durchgeführten Messungen bei höheren pH-Werten möglicherweise einen stabilisierenden Effekt auf die Fructosedehydrogenase hatten. Es wurde deshalb eine Messreihe durchgeführt, bei der die Multianalysensoren vor der Messung im Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 unterschiedlich lange im Phosphatpuffer pH 7,0 gelagert wurden. Während sich bei einer 10- bzw. 30-minütigen Lagerung im Phosphatpuffer pH 7,0 (Daten nicht gezeigt) keine Änderungen gegenüber einer direkten Messung im Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 ergaben, konnten die Sensitivitäten der Fructosesensoren durch eine zweistündige Lagerung im Phosphatpuffer pH 7,0 dagegen um 30% gesteigert werden (Abb. 41).

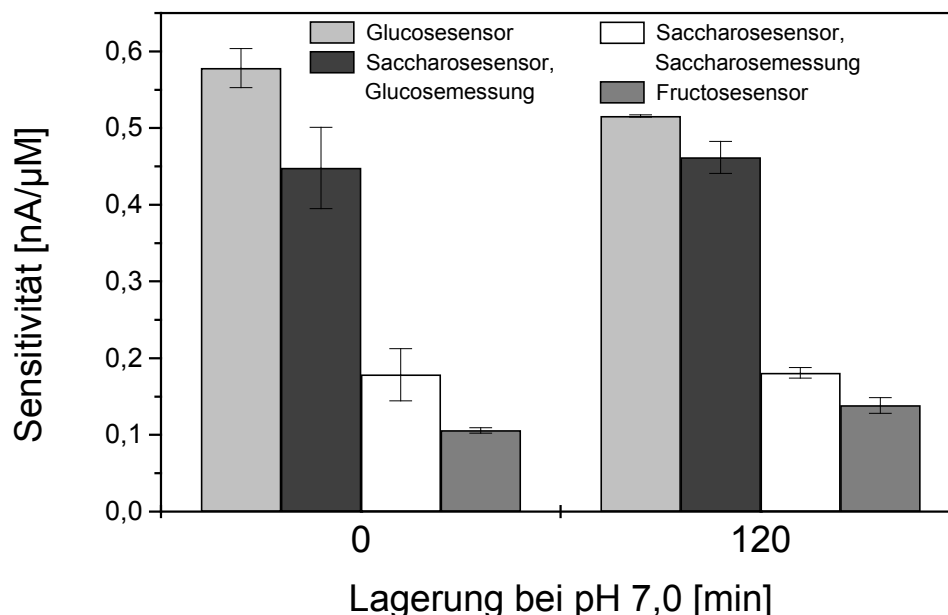


Abb. 41: Einfluss der Lagerung der Multianalysensoren im Phosphatpuffer pH 7,0 vor der Messung im Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 auf die Sensorsignale.

Messung mit zwei Multianalysensoren ($n = 2$).

Diese Steigerung war jedoch nicht so hoch, wie nach den Ergebnissen der Messreihe 1 zu erwarten gewesen wäre. Möglicherweise kam der Unterschied daher, dass die Sensoren im Puffer pH 7,0 nur gelagert wurden und keine Messungen bei angelegtem Potential durchgeführt wurden, oder aber die Sensoren hätten über einen noch längeren Zeitraum im Puffer pH 7,0 oder sogar Puffer pH 8,0 gelagert werden müssen. Da jedoch die Signale der Fructosesensoren auch bei direkter Messung im Mc Ilvaine Puffer hoch genug waren, wurden hierzu keine weiteren Experimente durchgeführt. Die Sensitivitäten der Glucose- und Saccharosesensoren wurden durch eine vorgeschaltete Lagerung im Phosphatpuffer pH 7,0 nicht beeinflusst.

5.3.4.4 Eigenschaften der Multianalysensoren unter Standardbedingungen

Aufgrund der Ergebnisse der vorangegangenen Kapitel wurden die Messung in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ als Mediator und ein Potential von +600 mV vs. Ag/AgCl für die Glucose-, Saccharose- und Blindsensoren und von +400 mV vs. Ag/AgCl für den Fructosesensor als Standardbedingungen festgelegt. Die Eigenschaften der einzelnen Enzymsensoren des Multianalysensors sind in Tab. 8 zusammengefasst.

Tab. 8: Eigenschaften der Multianalysensoren unter Standardbedingungen.

Aufgrund unterschiedlicher Sensitivitäten der Enzymsensoren bei Verwendung verschiedener Transducerchargen sind die Sensitivitäten als Bereiche angegeben.

| Parameter | Glucosesensor | Saccharosesensor | Saccharosesensor | Fructosesensor |
|----------------------------------|---------------|------------------|------------------|----------------|
| | | Glucose | Saccharose | |
| Sensitivität [nA/μM] | 0,5 - 0,7 | 0,4 - 0,6 | 0,07 - 0,10 | 0,06 - 0,10 |
| Nachweisgrenze [μM] | 5 | 5 | 30 | 30 |
| Grenze des lin. Bereichs [mM] | ≥ 1,24 | ≥ 1,24 | ≥ 1,24 | ≥ 2,23 |
| Ansprechzeit t_{90} [s] | < 20 | < 30 | < 30 | 90 - 120 |
| Grundstrom [nA] | 10 - 20 | 10 - 20 | 10 - 20 | 10 - 20 |

Wenn alle 3 Zucker gleichzeitig bestimmt wurden, wurde zuerst eine Kalibrierlösung, die Glucose und Fructose in gleichen Konzentrationen enthielt, zum Messpuffer pipettiert. Nach etwa 1 min erfolgte die Zugabe der Saccharose-Kalibrierlösung. Zu diesem Zeitpunkt war die

Glucosemessung am Glucose- und Saccharosesensor bereits abgeschlossen, während der Strom am Fructosesensor noch nicht den maximalen Wert erreicht hatte. Nach einer weiteren Minute waren die Saccharose- und Fructosemessung abgeschlossen. Durch dieses Messschema wurde berücksichtigt, dass zur simultanen Bestimmung aller 3 Zucker die Zugabe der Saccharose-Kalibrierlösung getrennt von der Zugabe der Glucoselösung erfolgen musste. Weiterhin wurde die relativ lange Ansprechzeit des Fructosesensors für die Zugabe der Saccharoselösung genutzt, so dass die eigentlichen Kalibrationen nach etwa 2 min abgeschlossen war.

5.3.4.5 Temperaturabhängigkeit

Die Temperaturabhängigkeit der Sensorsignale der Multianalysensoren wurde für die Temperaturen 15, 25 und 35 °C untersucht (Abb. 42). 25 °C entspricht in etwa Raumtemperatur, bei der die Messungen in dieser Arbeit durchgeführt wurden. Die optimale Temperatur für die Gärung, bei der die Sensoren eingesetzt werden sollen, liegt mit etwa 20 bis 25 °C [116, 117] genau in diesem Bereich. In manchen Fällen wird jedoch auch eine gekühlte Gärung bei niedrigeren Temperaturen durchgeführt. Deshalb wurde die Einsatzfähigkeit der Sensoren bei 15 °C getestet. Die Temperaturoptimum der meisten Enzyme liegt dagegen bei höheren Temperaturen. So besitzt die eingesetzte Fructose-dehydrogenase laut Herstellerangaben ein Temperaturoptimum von 37 °C [29], das der Mutarotase liegt mit 30 bis 37 °C im gleichen Bereich [24, 25]. Glucoseoxidase und Invertase weisen sogar noch höhere Temperaturoptima von 50 bis 55 °C (GOD) bzw. 50 bis 60 °C (INV) [24, 25] auf. Aus diesem Grund wurde 35 °C als weitere Temperatur gewählt, um zu testen, ob sich die Sensitivität der Sensoren dadurch noch weiter steigern ließ.

Die Sensitivität der Glucose- und Saccharosesensoren nahm wie erwartet mit steigender Temperatur zu. Die Sensitivität der Fructosesensoren war dagegen im untersuchten Temperaturbereich bei 25 °C am höchsten, betrug bei 35 °C allerdings nur noch 50% des maximalen Wertes. Dies widerspricht den Herstellerangaben, kann jedoch auf unterschiedliche Eigenschaften des gelösten Enzyms bei der Bestimmung der Aktivität und des auf dem Sensor immobilisierten Enzyms zurückzuführen sein. Weiterhin ist bemerkenswert, dass die Sensitivität der Fructosesensoren bereits bei 15 °C 90% des maximal erreichten Wertes betrug. Dies ist von Vorteil für den direkten Einsatz der Sensoren bei Proben aus einer gekühlten Gärung, da somit die ohnehin im Vergleich zu den Glucose- und Saccharosesensoren niedrigeren Sensitivitäten der Fructosesensoren nicht noch weiter abnehmen.

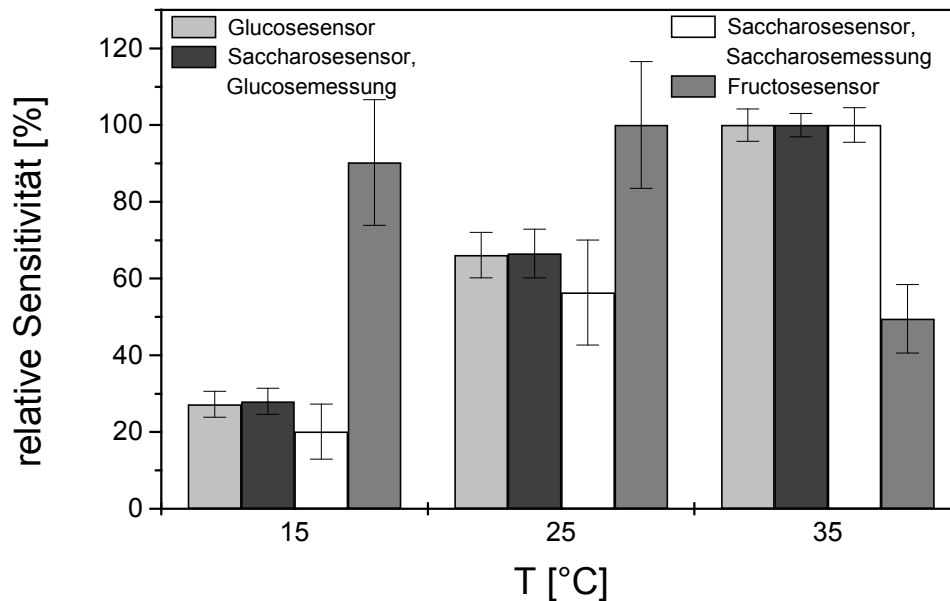


Abb. 42: Temperaturabhängigkeit der Multianalysensoren.

Messung mit zwei Multianalysensoren ($n = 2$) in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$. Zugabe jeweils 333 μ M Glucose-, Saccharose- und Fructosestandard.

5.3.4.6 Arbeitsstabilität

Im Hinblick auf die Nutzung des Vinoxant-Analysensystems durch den Anwender ist vorgesehen, dass die Multianalysensorkarten vor Ort einen Tag lang verwendet werden können. Zur Untersuchung der Arbeitsstabilität der Sensoren und gleichzeitig auch der Reproduzierbarkeit der Sensorsignale wurden die Multianalysensoren über einen Zeitraum von zehn Stunden stündlich vermessen (Abb. 43). Zwischen den einzelnen Messungen wurde die Puffervorlage gewechselt.

Die Signale der Glucosesensoren waren über den Zeitraum der Messungen stabil. Die maximale Differenz zwischen dem höchsten und dem niedrigsten Signal betrug 8%. Bei den Saccharosesensoren war die Differenz der Signale sowohl für die Glucose- als auch für die Saccharosebestimmung zwischen der ersten und der zweiten Messung am größten. Das Sensorsignal für Glucose verringerte sich um 20%, das für Saccharose sogar um 50%. Möglicherweise ist dies auf eine starke Inaktivierung der Enzyme Invertase und Mutarotase zu Beginn der Messungen im für die Saccharosesensoren unvorteilhafteren Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 zurückzuführen. Nach der 2. Messung war die Drift der Signale zwischen den Messungen geringer und betrug maximal 9% für die Glucosemessungen und maximal 15% für die Saccharosemessungen. Sowohl für die Glucose- als auch für die Saccharosesensoren kam es ab der 9. Messung ($t = 8$ h) nochmals zu einem leichten Anstieg der Signale. Ein Grund hierfür könnte eine Stabilisierung der Enzyme im PCS-

Hydrogel durch das längere Quellen der Membranen in der Messlösung sein.

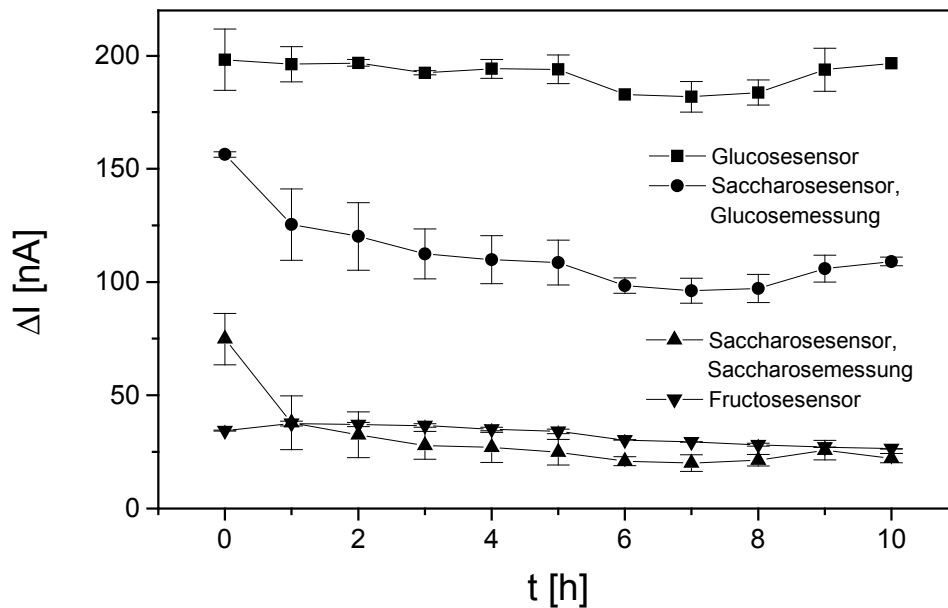


Abb. 43: Arbeitsstabilität der Multianalysensoren.

Messung mit zwei Multianalysensoren ($n = 2$) in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$. Zugabe jeweils 333 μ M Glucose-, Saccharose- und Fructosstandard.

Bei den Fructosesensoren kam es von der ersten zur zweiten Messung zu einer Zunahme des Signals um 9%. Nach der zweiten Messung nahm das Sensorsignal von Messung zu Messung leicht ab. Bei der letzten Messung wurden noch 77% des maximalen Sensorsignals erreicht. Da das Messkonzept für die Multianalysensoren eine interne Kalibrierung bei der Messung in Realproben vorsieht, haben die Differenzen der Signale zwischen den einzelnen Messungen keinen Einfluss auf das Messergebnis und die Multianalysensoren können problemlos über die Zeitdauer eines Tages verwendet werden. Innerhalb eines Messzyklus waren die Signale stabil, unterschiedliche Sensitivitäten ergaben sich nur bei zeitlich auseinanderliegenden Messungen. Zwischen den einzelnen Messungen betrug die Zeit bis zum Erreichen eines konstanten Grundstroms nach dem Pufferwechsel ca. 30 s, inklusive des Pufferwechsels ca. 90 s, d. h. die Sensoren waren nach dieser kurzen Zeit bereits wieder messbereit.

5.3.4.7 Lagerstabilität

Während die Anforderung an die Arbeitsstabilität der Multianalysensoren aufgrund des Messkonzepts auf einen Tag beschränkt war, sollte die Lagerstabilität der Sensoren mehrere Monate betragen, um eine kommerzielle Anwendung zu ermöglichen. Die Glucose- und Saccharose-Einzelsensoren hatten bereits eine sehr gute Lagerfähigkeit bewiesen (vgl. Kap.

5.3.1.6 und 5.3.2.4). Es wurde nun die Lagerstabilität der kompletten Multianalysensoren über einen Zeitraum von 3 Monaten untersucht. Dabei wurden verschiedene Additive eingesetzt, deren stabilisierende Wirkung auf Enzyme aus der Literatur bekannt war [55, 57-59, 61-63, 65-69]. Insbesondere für die im Vergleich zu den anderen Enzymen empfindliche Fructosedehydrogenase sollte getestet werden, ob der Einsatz eines Stabilisators zur Erhöhung der Lagerstabilität der Fructosesensoren beitragen würde.

In einem Vorversuch wurden Ectoin, Hydroxyectoin, Trehalose, Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, Glycerin, DEAE-Dextran/Lactitol und Gummi arabicum wie unter Kap. 4.5.3 angegeben mit den jeweiligen Enzymen coimmobilisiert. Es wurde das Immobilisierungsverhalten und die Sensitivität der Sensoren für Glucose und Fructose untersucht. Die FDH-Glutaraldehydmischung mit dem DEAE-Dextran/Lactitol-Gemisch polymerisierte sofort aus und war somit nicht mehr immobilisierbar. Die Glucose- und Saccharosesensoren mit DEAE-Dextran/Lactitol wiesen inhomogene Membranen auf. Das DEAE-Dextran schien sich nicht vollständig gelöst zu haben. DEAE-Dextran/Lactitol wurde deshalb nicht als Stabilisator eingesetzt. Die Sensoren, bei denen Gummi arabicum verwendet wurde, wiesen bei optischer Kontrolle mit Hilfe der Stereolupe unregelmäßige Membranen auf. Die Sensoren mit Glycerin zeigten bei der Kalibrierung vergleichsweise niedrige Sensitivitäten (0,51 nA/ μ M für Glucose, 0,051 nA/ μ M für Fructose). Mit Gummi arabicum und Glycerin wurden daher ebenfalls keine weiteren Versuche zur Stabilisierung durchgeführt. Das Immobilisierungsverhalten und die Sensitivitäten der Sensoren, die Ectoin, Hydroxyectoin, Trehalose und Hydroxypropyl- β -cyclodextrin enthielten, war gut. Da es sich bei Ectoin und Hydroxyectoin um sehr ähnliche Substanzen handelt, wurde nur Hydroxyectoin weiter verwendet, durch dessen Zusatz eine um etwa 20% höhere Sensitivität des Fructosesensors im Vergleich zu Ectoin erreicht wurde.

Für den dreimonatigen Lagerversuch wurden Multianalysensoren hergestellt, die 0,2 M (3,2%) Hydroxyectoin, 0,2 M (7,6%) Trehalose bzw. 1% Hydroxypropyl- β -cyclodextrin enthielten. Zur Kontrolle wurden Sensoren ohne Stabilisator hergestellt. Die Lagerung erfolgte in trockener Atmosphäre bei 4 °C. Diese Lagerbedingung hatte sich bei den Stabilitätsuntersuchungen der Einzelsensoren als beste erwiesen.

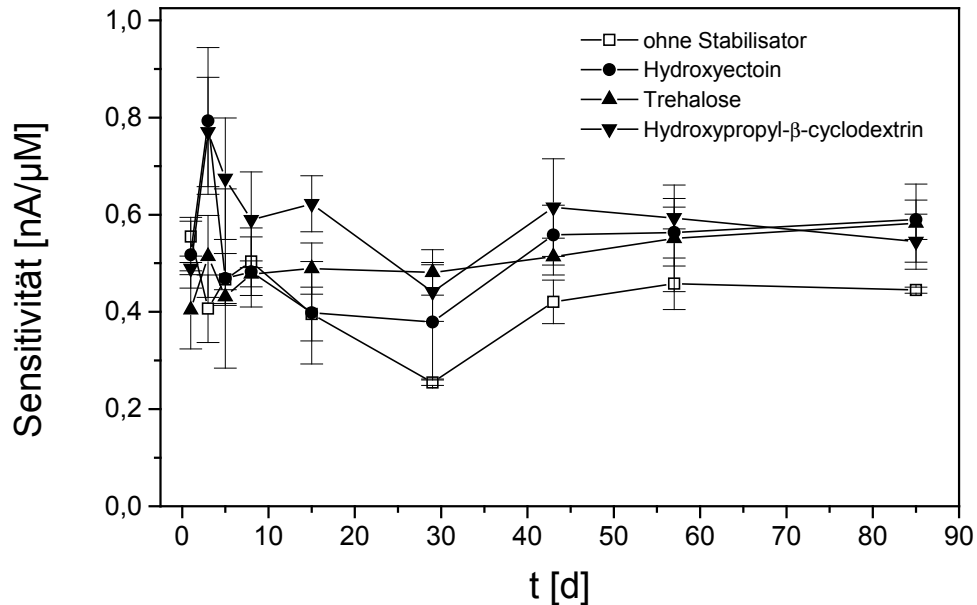


Abb. 44: Einfluss verschiedener Stabilisatoren auf die Lagerstabilität der Glucose-sensoren.

Messung mit jeweils drei Multianalysensoren ($n = 3$) in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$. Zugabe jeweils 333 μM Glucose-, Saccharose- und Fructosestandard. Die Sensoren wurden bis zur Messung gelagert und nur einmal verwendet.

Zu Beginn der Messungen lagen die Sensitivitäten der verschiedenen Glucosesensoren relativ dicht beieinander zwischen 0,40 und 0,55 $\text{nA}/\mu\text{M}$ (Abb. 44). Dabei wiesen die Sensoren ohne Additiv sogar die höchsten Sensitivitäten auf. Nach drei Tagen kam es zu einer transienten Aktivierung bei den Glucosesensoren, die Hydroxyectoin und Hydroxypropyl- β -cyclodextrin enthielten, die Sensorsignale nahmen um 50 bis 60% zu. Nach fünf Tagen sank die Sensitivität der Sensoren mit Hydroxyectoin jedoch bereits unter den Anfangswert, die Sensitivität der Sensoren mit Hydroxypropyl- β -cyclodextrin nahm dagegen langsamer ab. Ab der vierten Woche waren die Signale der Glucosesensoren mit allen drei verschiedenen Additiven höher als die Signale der Sensoren ohne Additiv. Somit waren alle drei Additive als Stabilisator für die Glucoseoxidase geeignet. Tendenziell wurden die höchsten Sensitivitäten durch Zusatz von Hydroxypropyl- β -cyclodextrin erhalten, die Sensoren mit Trehalose wiesen dagegen über den gesamten Zeitraum die konstantesten Signale auf.

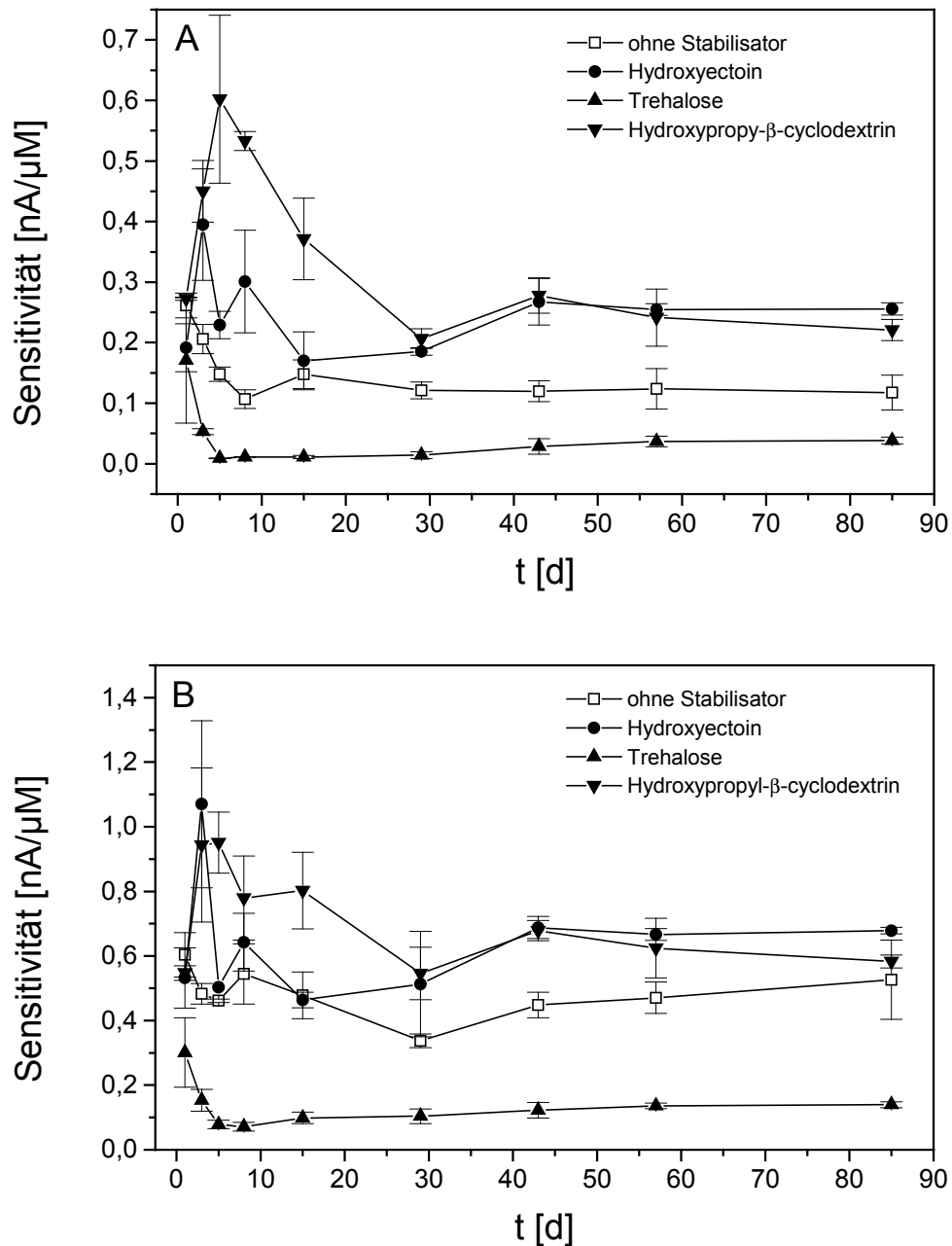


Abb. 45: Einfluss verschiedener Stabilisatoren auf die Lagerstabilität der Saccharose-sensoren.

Sensitivitäten für Saccharose (A) und für Glucose (B). Messung mit jeweils drei Multianalysensoren ($n = 3$) in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$. Zugabe jeweils 333 μ M Glucose-, Saccharose- und Fructosestandard. Die Sensoren wurden bis zur Messung gelagert und nur einmal verwendet.

Die Saccharosesensoren, die Hydroxyectoin und Hydroxypropyl- β -cyclodextrin als Additiv enthielten, zeigten ebenfalls eine transiente Aktivierung nach drei Tagen (Abb. 45). Bei den Sensoren mit Hydroxyectoin nahm sowohl das Saccharose- als auch das Glucosesignal um 100% zu. Bei den Sensoren mit Hydroxypropyl- β -cyclodextrin nahmen beide Signale um

etwa 70% zu, das Saccharosesignal stieg nach fünf Tagen sogar noch weiter auf 120% des Ausgangssignals, während das Glucosesignal konstant blieb. Die Signale der Sensoren mit Hydroxyectoin sanken dagegen nach fünf Tagen bereits wieder auf das Anfangsniveau. Ab der vierten Woche blieben die Signale der Sensoren mit Hydroxyectoin und Hydroxypropyl- β -cyclodextrin sowohl für Saccharose als auch für Glucose annähernd konstant und hatten am Ende der Untersuchungen vergleichbare Werte wie zu Beginn. In beiden Fällen lagen die Signale über denen der Saccharosesensoren ohne Additiv, so dass Hydroxyectoin und Hydroxypropyl- β -cyclodextrin als Stabilisatoren für das Dreienzymssystem Invertase/Mutarotase/Glucoseoxidase geeignet waren. Als ungeeignet zur Stabilisierung erwies sich dagegen Trehalose. Die Sensitivitäten der Sensoren mit Trehalose waren bereits zu Beginn der Messung niedriger als die der anderen Saccharosesensoren und sanken schnell noch weiter ab. So lagen sie ab dem fünften Tag um $0,1 \text{ nA}/\mu\text{M}$ für Glucose und unter $0,05 \text{ nA}/\mu\text{M}$ für Saccharose. Optische Untersuchungen der polymerisierten Membranen der trehalosehaltigen Saccharosesensoren mit Hilfe der Stereolupe zeigten, dass die Membranen sehr viele kleine Blasen aufwiesen. Mit dem bloßen Auge betrachtet erschienen die Membranen weiß und nicht wie im Normalfall durchsichtig. Diese Besonderheiten traten jedoch nicht beim Pipettieren der Immobilisierungsmischung auf, sondern erst erst nach der Polymerisation.

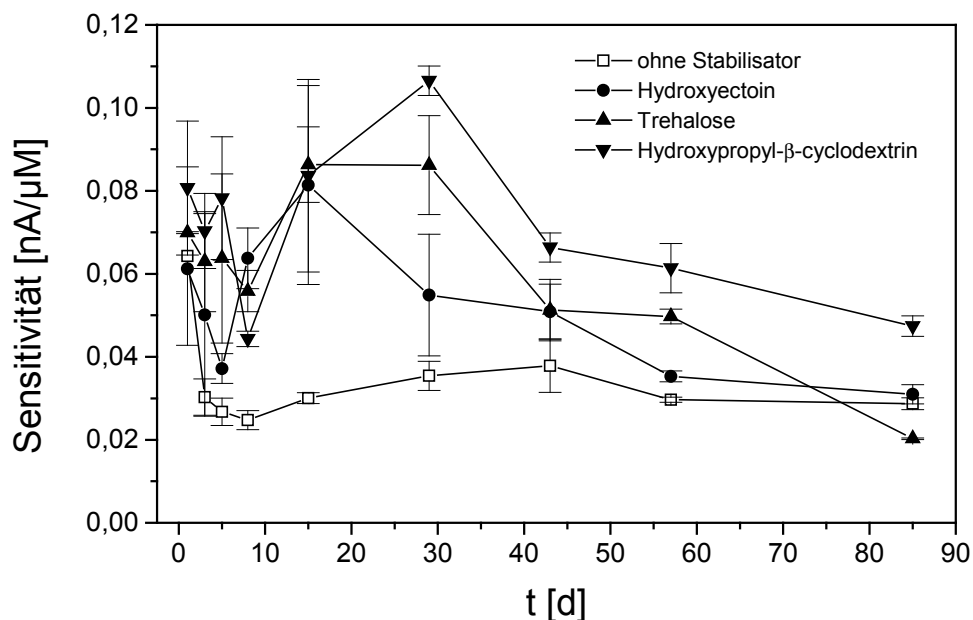


Abb. 46: Einfluss verschiedener Stabilisatoren auf die Lagerstabilität der Fructose-sensoren.

Messung mit jeweils drei Multianalysensoren ($n = 3$) in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit $5 \text{ mM K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Zugabe jeweils $333 \mu\text{M}$ Glucose-, Saccharose- und Fructosestandard. Die Sensoren wurden bis zur Messung gelagert und nur einmal verwendet.

Die Sensitivität der Fructosesensoren konnte durch Zusatz von Hydroxypropyl- β -cyclodextrin bereits zu Beginn der Messungen um 25% gegenüber den Sensoren ohne Stabilisator gesteigert werden (Abb. 46). Die Verwendung aller drei Additive führte nach 2 bis 4 Wochen zu stark erhöhten Sensitivitäten, während die Sensitivität der Fructosesensoren ohne Stabilisator bereits nach drei Tagen auf etwa 50% des Anfangswertes sank, dann aber bis zum Ende der Untersuchungen annähernd konstant blieb. Nach 3 Monaten lagen die Signale der Sensoren mit Hydroxyectoin geringfügig über denen der Sensoren ohne Additiv, durch Zusatz von Hydroxypropyl- β -cyclodextrin wurden dagegen noch um 65% höhere Signale erreicht. Die Signale der Sensoren mit Trehalose waren am Ende der Untersuchungen wiederum am niedrigsten. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin war daher für die Fructosedehydrogenase als Stabilisator am besten geeignet. Neben der stabilisierenden Wirkung hatte es außerdem einen positiven Effekt auf das Immobilisierungsverhalten. Durch Zusatz von Hydroxypropyl- β -cyclodextrin kam es nicht mehr zu dem sonst bei der FDH-Immobilisierung auftretenden, problematischen Verlaufen der Immobilisierungsmischung über die Arbeitselektrode hinaus auf die Isolierung.

Soll bei der Herstellung der Multianalysensoren das gleiche Additiv für die drei verschiedenen Enzymsensoren verwendet werden, so empfiehlt sich der Einsatz von Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, das auf alle Enzymsysteme eine stabilisierende Wirkung hatte. Es ist jedoch auch der Einsatz verschiedener Additive für die unterschiedlichen Enzymsensoren denkbar. Bereits die Multianalysensoren ohne Stabilisator zeigten jedoch eine gute Lagerstabilität. Sie wiesen sogar im allgemeinen, nach einer anfänglichen Abnahme der Signale, über den untersuchten Zeitraum die konstantesten Signale auf. Alle Sensoren ohne Stabilisator, insbesondere auch die Fructosesensoren, waren nach einer Lagerung von drei Monaten noch verwendbar. In der Regel wurde daher in dieser Arbeit mit Sensoren ohne Zusatz von Stabilisatoren gearbeitet.

Die hier gezeigten Lagerstabilitäten der Glucose- und Saccharosesensoren als Teil der Multianalysensoren sind mit denen der Glucose- und Saccharose-Einzelsensoren (vgl. Kap. 5.3.1.6 und 5.3.2.4) nicht direkt vergleichbar, da die Messungen mit den Einzelsensoren im Phosphatpuffer pH 7,0 durchgeführt wurden, bei den Messungen mit den Multianalysensoren jedoch der Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 verwendet wurde. So kam es bei den Messungen mit den Multianalysensoren ohne Stabilisator nicht wie bei den Saccharose-Einzelsensoren zu einer starken Zunahme der Sensorsignale nach einer Woche. Dies ist vermutlich auf die Verwendung des für die Saccharosesensoren ungünstigeren Mc Ilvaine Puffers pH 5,0 zurückzuführen.

5.3.4.8 Immobilisierung mit Glutaraldehyd

Im Hinblick auf den Einsatz des Analysensystems beim Anwender und die damit verbundene Produktion der Multianalysensoren in größeren Stückzahlen ist es sinnvoll, den Herstellungsprozess zu vereinfachen und zu automatisieren. Die Immobilisierung der einzelnen Enzymsensoren der Multianalysensorkarte sollte deshalb möglichst einheitlich erfolgen. Da sich die Immobilisierung im PCS-Hydrogel für die Fructosedehydrogenase als ungeeignet erwiesen hatte, wurde nun umgekehrt versucht, die Glucose- und Saccharosesensoren durch Immobilisierung der Enzyme mit Glutaraldehyd herzustellen. Dabei wurden für den Glucose- und Saccharosesensor die Enzymkonzentrationen beibehalten, die bei der Immobilisierung im PCS-Hydrogel verwendet wurden. Mit den Multianalysensoren wurden nacheinander komplette Kalibrationskurven für Glucose, Saccharose und Fructose aufgenommen (Tab. 9).

Tab. 9: Eigenschaften der Multianalysensoren nach Immobilisierung mit Glutaraldehyd.

Glucosesensor: 1% GOD, 10% BSA, Saccharosesensor: 1% INV, 0,5% MUT, 1% GOD, 10% BSA, Fructosesensor: 1% FDH, 10% BSA (Standard), Blindsensor: 10% BSA. Messung mit zwei Multianalysensoren (n = 2) in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$.

| Sensor | Sensitivität [nA/ μ M] | linearer Bereich [mM] | t_{90} [s] | Grundstrom [nA] |
|---|-------------------------------|--------------------------|-----------------|--------------------|
| Glucosesensor | 0,69 \pm 0,16 | 0,01 - \geq 1,24 | 10 | 50 |
| Saccharosesensor, Glucosekalibrierung | 0,71 \pm 0,13 | 0,01 - \geq 1,24 | 10 | 50 |
| Saccharosesensor, Saccharosekalibrierung | 0,39 \pm 0,07 | 0,01 - \geq 2,23 | 10 | 50 |
| Fructosesensor | 0,11 \pm 0,01 | 0,05 - \geq 1,24 | 50 | 10 - 20 |

Die Eigenschaften des Glucosesensors waren mit dem im PCS-Hydrogel immobilisierten Glucosesensor vergleichbar. Beim Saccharosesensor dagegen war insbesondere die Sensitivität für Saccharose weitaus höher als bei dem im PCS-Hydrogel immobilisierten Saccharosesensor. Die Sensitivität des PCS-Saccharosesensors für Saccharose lag bei einer Messung in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 in der Größenordnung der Sensitivität des Fructosesensors für Fructose, während die des Glutaraldehyd-Saccharosesensors etwa viermal so hoch war. Der lineare Messbereich der Glutaraldehyd-Saccharosesensoren für Saccharose war ebenfalls größer als der der PCS-Saccharosesensoren. Die Sensitivität der Fructosesensoren lag mit 0,11 nA/ μ M im normalen Bereich, jedoch war der lineare Messbereich für Fructose in diesem Experiment erstaunlicherweise etwas kleiner als sonst,

obwohl die FDH-Immobilisierung nicht geändert wurde. Die Ansprechzeiten t_{90} waren für alle Sensoren sehr gut, insbesondere waren die Ansprechzeiten der Fructosesensoren mit 50 s relativ kurz. Die Grundströme waren für die Glucose- und Saccharosesensoren mit etwa 50 nA verhältnismäßig hoch, für die Fructosesensoren lagen sie dagegen im üblichen Bereich von 10 bis 20 nA.

Um die mit Glutaraldehyd immobilisierten Glucose- und Saccharosesensoren noch besser mit den im PCS-Hydrogel immobilisierten Sensoren vergleichen zu können, wurde eine Glucose-Kalibrierung im für die Glucose- und Saccharosesensoren optimalen Phosphatpuffer pH 7,0 ohne Mediator durchgeführt. Die Sensitivitäten waren mit $1,13 \pm 0,02$ nA/ μ M für den Glucosesensor und $1,39 \pm 0,02$ nA/ μ M für den Saccharosesensor, jeweils im linearen Messbereich von 0,01 bis $\geq 1,24$ mM Glucose, sehr gut, allerdings waren die Ansprechzeiten bei beiden Sensoren mit 45 bis 60 s für eine Glucosemessung ungewöhnlich hoch. Die Grundströme lagen dagegen mit etwa 20 nA im üblichen Bereich, was darauf hindeutet, dass die hohen Grundströme bei der Messung in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 durch die Messlösung verursacht wurden.

Die Ergebnisse zeigen die prinzipielle Eignung der Glutaraldehyd-Immobilisierung für die kompletten Multianalysensoren, für eine endgültige Anwendung der Sensoren sollten jedoch die Enzym-BSA-Verhältnisse für den Glucose- und Saccharosesensor optimiert und die Sensoren noch weiter charakterisiert werden. Die weiteren Messungen wurden daher mit den gemischt immobilisierten, optimierten Multianalysensoren durchgeführt.

5.3.4.9 Einfluss von Störsubstanzen

Als elektrochemisch aktive Störsubstanzen liegen im Wein Ascorbat und Sulfit vor. Es wurde daher einerseits untersucht, welche Signale durch diese Substanzen hervorgerufen wurden, andererseits wurde versucht, Störsignale mit Hilfe einer semipermeablen Membran, die direkt auf der Platinelektrode aufgebracht wurde, auszuschließen. Dazu wurde das Nafion[®]-Polymer verwendet, das als Kationenaustauscherpolymer vor allem Anionen von der Elektrode fernhält [153-156].

Für die Glucose- und Saccharosesensoren erfolgte die Untersuchung der Störsignale zunächst im Phosphatpuffer pH 7,0 ohne Mediator. Abb. 47 zeigt das Ansprechverhalten von jeweils zwei Glucosesensoren ohne und mit Nafion[®]-Membran auf Zugaben von je 100 μ M Glucose, Sulfit und Ascorbat. Bei den Sensoren ohne Nafion[®]-Membran betrug das Ascorbatsignal $29 \pm 5\%$ des Glucosesignals, durch Zugabe von Sulfit kam es nach einem anfänglichen Stromanstieg um etwa 3% des Glucosesignals zu einer leicht negativen Drift von etwa -2 nA/min. Durch die Nafion[®]-Membran verringerte sich zwar das Glucosesignal auf 20% des ursprünglichen Wertes, da die Nafion[®]-Membran eine zusätzliche Diffusionsbarriere

darstellt, die Störsignale konnten jedoch praktisch völlig ausgeschlossen werden.

Die Saccharosesensoren zeigten das gleiche Verhalten. Das Ascorbatsignal betrug am Sensor ohne Nafion® $38 \pm 4\%$ des Saccharosesignals, durch Sulfitzugabe kam es nach einem Stromanstieg um etwa 2,5% des Saccharosesignals zu einer leicht negativen Drift von etwa 2 nA/min. Durch die Nafion®-Membran verringerte sich das Signal für Glucose auf 18%, das für Saccharose auf 13% des ursprünglichen Signals, die Störsignale konnten ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

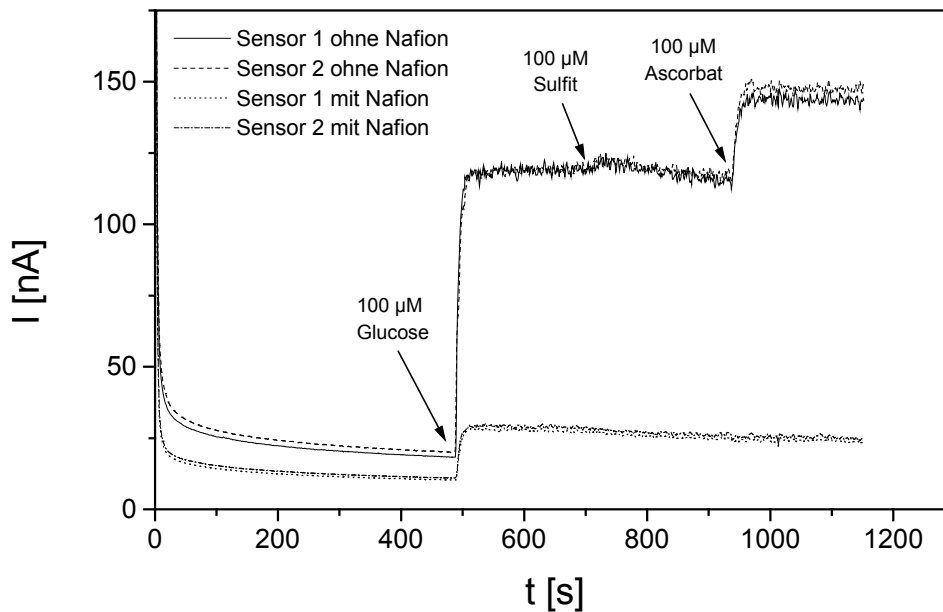


Abb. 47: Ansprechverhalten von Glucosesensoren ohne und mit Nafion®-Membran auf Glucose, Sulfit und Ascorbat.

Messung in Phosphatpuffer pH 7,0 ohne Mediator.

Im Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, dem eigentlichen Messpuffer für die Multianalysensoren, zeigten die Sensoren dagegen ein völlig anderes Ansprechen auf die Störsubstanzen. Bei den Glucosesensoren ohne Nafion® kam es durch Sulfitzugabe zu einer wesentlich stärkeren Signalabnahme als bei Messung im Phosphatpuffer pH 7,0 ohne Mediator um -37% bezogen auf das Glucosesignal. Das Ascorbatsignal war ebenfalls negativ und betrug -9% des Glucosesignals. Die Saccharosesensoren zeigten wieder das gleiche Verhalten (Daten nicht gezeigt). Erstaunlicherweise kam es bei den Glucose- und Saccharosesensoren mit Nafion®-Membran zu den gleichen Ergebnissen (Abb. 48). Dadurch, dass die eigentlichen Analytsignale durch die Nafion®-Membran verringert wurden, waren die Störsignale relativ gesehen sogar noch größer. Da die Nafion®-Membran, wie Abb. 47 zeigt, in der Lage ist, die Störsubstanzen Ascorbat und Sulfit von der Elektrode fernzuhalten, müssen die großen Störsignale bei der Messung im Mc Ilvaine Puffer pH 5,0

mit 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ durch Vorgänge in der Messlösung verursacht werden. Die Nafion[®]-Membran ist daher zum Ausschluss von Störsubstanzen in Verbindung mit der verwendeten Messlösung ungeeignet.

Der Fructosesensor mit Nafion[®]-Membran zeigte bei Zugabe des Analyts Fructose kein Messsignal. Offensichtlich wird der für die Fructosebestimmung notwendige, negativ geladene Mediator durch die Nafion[®]-Membran von der Elektrode ferngehalten. Auch aus diesem Grund ist Nafion[®] als semipermeable Membran für die Multianalysensoren nicht geeignet. Zum Ausschluss von Störsignalen an den Multianalysensoren müsste entweder eine andere semipermeable Membran (kein Kationenaustauscher) oder ein anderer, nicht negativ geladener Mediator verwendet werden. Da die Konzentration von Ascorbat und Sulfit im Wein jedoch etwa um den Faktor 1000 geringer ist als die der zu bestimmenden Zucker (vgl. Tab. 15, Kap.6), kann davon ausgegangen werden, dass das Messsignal durch die Anwesenheit der Störsubstanzen praktisch nicht beeinflusst wird. Die Messungen in Realproben wurden daher mit den Multianalysensoren ohne zusätzliche Membranen durchgeführt.

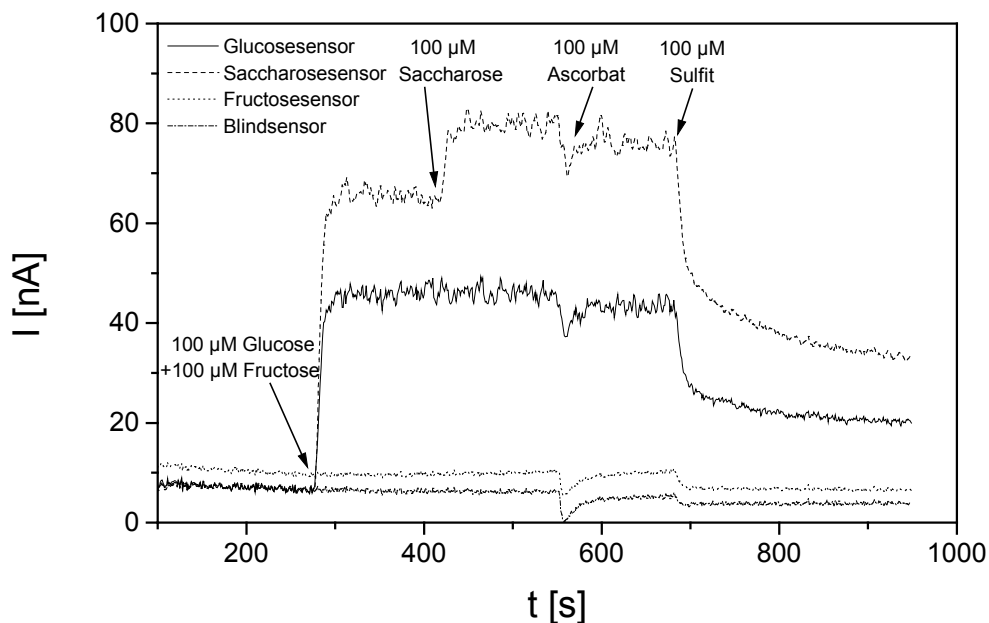


Abb. 48: Ansprechverhalten eines Multianalysensors mit Nafion[®]-Membran auf Glucose, Fructose, Saccharose, Ascorbat und Sulfit.

Messung in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$.

5.3.4.10 Wiederfindungsrate

Zur Vorbereitung auf die Messungen in Realproben wurden verschiedene Zuckergemische hergestellt, deren Konzentration mit Hilfe einer internen Kalibration bestimmt wurde. Mit dieser Messreihe sollte die prinzipielle Eignung der Multianalysensoren zur simultanen

Bestimmung der Zucker unter Beweis gestellt werden. Auf die Bestimmung von Saccharose wurde verzichtet, da dieser Zucker bei der Vergärung von Traubenmost eine stark untergeordnete Rolle spielt und in Wein normalerweise nicht vorhanden ist. Es wurden äquimolare Glucose-Fructose-Gemische mit einem Gesamtzuckergehalt zwischen 1,8 und 180 g/L (0,01 bis 1 M) untersucht. Dies entspricht dem Konzentrationsbereich, in dem die Zucker üblicherweise im Wein und Most vorliegen. Bei den Messungen wurde zunächst eine Kalibrierlösung, die 100 mM Glucose und 100 mM Fructose enthielt, so zugegeben, dass eine Konzentrationserhöhung um jeweils 100 µM der beiden Zucker vorlag. Danach wurde das Gemisch entsprechend der in Tab. 10 angegebenen Verdünnung zugegeben, anschließend erfolgte ein zweiter, identischer Kalibrationsschritt. Im Unterschied zum Aufstockverfahren, bei dem die Gesamtkonzentrationen zur Auswertung herangezogen wurden, wurden hier die Stromdifferenzen bestimmt, die sich aus den einzelnen Zugaben ergaben, und aus dem Verhältnis der Stromzunahmen wurde die jeweilige Zuckerkonzentration berechnet (Tab. 10). Dabei wurde der Mittelwert aus beiden Kalibrationsschritten zur Auswertung herangezogen, da in den Zuckergemischen keine Störstoffe vorlagen, die Matrixeffekte verursachen konnten. Die Abweichungen der bestimmten Konzentrationen vom berechneten Wert lagen in allen Fällen unter 10% und zeigten somit die Eignung der Multianalysensoren zur simultanen Bestimmung von Glucose und Fructose.

Tab. 10: Messung verschiedener äquimolarer Glucose-Fructose-Gemische.

Die Messung wurde als Einzelbestimmung (n = 1) in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ durchgeführt.

| c(Glucose) berechnet [g/L] | c(Glucose) bestimmt [g/L] | c(Fructose) berechnet [g/L] | c(Fructose) bestimmt [g/L] | Verdünnung |
|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------|
| 0,9 | 0,85 | 0,9 | 0,96 | 1:100 |
| 9 | 8,71 | 9 | 9,62 | 1:1000 |
| 18 | 18,1 | 18 | 18,4 | 1:1000 |
| 36 | 39,2 | 36 | 38,4 | 1:1000 |
| 54 | 52,6 | 54 | 55,9 | 1:1000 |
| 72 | 67,1 | 72 | 71,4 | 1:1000 |
| 90 | 83,2 | 90 | 89,8 | 1:1000 |

5.4 Realproben

Die zu Beginn der Arbeit verwendeten Glucose-Einzelsensoren wurden zur Bestimmung der Glucosekonzentration in verschiedenen Rot- und Weißweinen eingesetzt. Die im weiteren Verlauf dieser Arbeit entwickelten Multianalysensoren wurden zur simultanen Bestimmung der Glucose- und Fructosekonzentration in verschiedenen Rot- und Weißweinen sowie in Proben eines kompletten Gärverlaufs eingesetzt. Da Saccharose im Wein normalerweise nicht vorliegt, wurde die simultane Bestimmung des Glucose-, Saccharose- und Fructosegehaltes mit den Multianalysensoren in einigen Sekten demonstriert. Sekt enthält Saccharose, da bei der Sektbereitung vor der Fertigstellung die sogenannte "Versanddosage", meist eine Lösung reinsten Zuckers in Wein, zur Einstellung der Süße und Geschmacksrichtung zugesetzt wird [116]. Es wurden Multianalysensoren ohne semipermeable Membran zum Ausschluss von Störstoffen und ohne Zusatz von Stabilisatoren verwendet. Als Probenvorbereitung erfolgte bei den Wein- und Sektproben ausschließlich eine Verdünnung (1:20 bis 1:2000) durch Zugabe der Probe zum Messpuffer. Eine Verdünnung von 1:1000 wurde als Standardverdünnung für die meisten Proben gewählt. Bei besonders niedrigen oder hohen Zuckerkonzentrationen wurde die Verdünnung der Probe entsprechend angepasst. Durch die hohen Verdünnungen änderte sich der pH-Wert der Messlösung nicht. Die Gärproben wurden sowohl sterilfiltriert als auch unfiltriert eingesetzt.

Die Messungen erfolgten wie unter Kap. 5.3.4.10 beschrieben. Wurde Saccharose mitbestimmt, so erfolgte nach dem kombinierten Glucose-/Fructosekalibrationsschritt jeweils ein Saccharosekalibrationsschritt gleicher Konzentration. Bei Messungen mit den Glucose-Einzelsensoren wurde dagegen eine Kalibrierlösung verwendet, die nur 100 mM Glucose enthielt. Der Kalibrationsschritt vor der Probenzugabe entspricht einer externen Kalibration im Messpuffer. Der Kalibrationsschritt nach der Probenzugabe stellt dagegen eine interne Kalibration dar, bei der Wein als Matrix im Messpuffer vorliegt und dadurch hervorgerufene Effekte berücksichtigt werden. Bei einigen Proben waren die durch den ersten und zweiten Kalibrationsschritt erhaltenen Stromsignale identisch, in diesen Fällen lag keine Beeinflussung des Signals durch die Inhaltsstoffe im Wein vor. Bei anderen Proben dagegen unterschieden sich die Signale der beiden Kalibrationsschritte. Um diese Matrixeffekte zu berücksichtigen und um eine einheitliche Auswertung zu gewährleisten, wurde bei allen Proben nur der zweite Kalibrationsschritt für die Auswertung herangezogen. Die Signale am Fructosesensor wiesen in manchen Fällen eine leichte Drift auf. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde deshalb immer das Stromsignal, das 120 Sekunden nach Zugabe der Kalibrierlösung bzw. Probe vorlag, ausgewertet. Am Blindsensor wurde im allgemeinen kein Signal beobachtet. In einigen Fällen trat eine leichte Drift des Grundstroms mit steigenden Zuckerkonzentrationen auf. Es war daher nicht notwendig, die Signale an den

Enzymsensoren um ein Blindsignal zu korrigieren. Die Enzymsensoren zeigten bei den Messungen in Realproben keine Auffälligkeiten, sondern wiesen die gleichen Eigenschaften wie bei einer Kalibration im Messpuffer auf.

5.4.1 Bestimmung mit den Einzelsensoren

Mit den Glucose-Einzelsensoren wurde die Glucosekonzentration in verschiedenen Rot- und Weißweinen bestimmt. Die Referenzanalytik erfolgte photometrisch nach der enzymatischen Methode am Staatlichen Veterinär- und Chemischen Landesuntersuchungsamt in Münster.

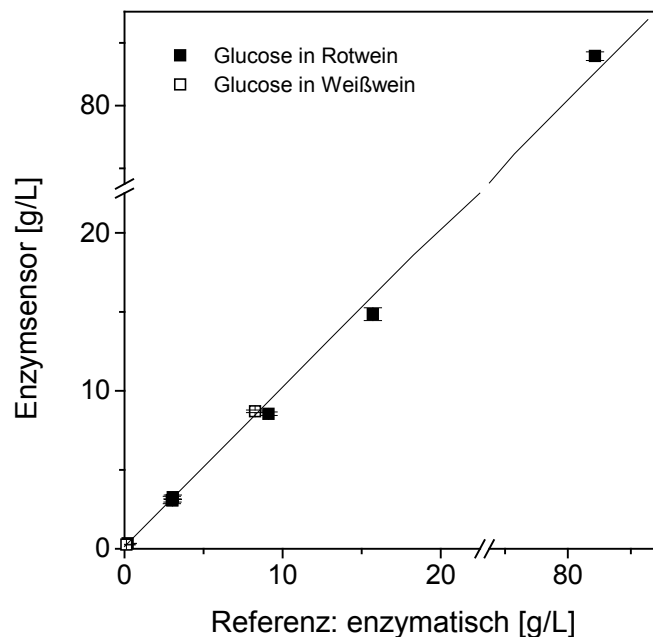


Abb. 49: Bestimmung der Glucosekonzentration in Rot- und Weißweinen mit den Glucose-Einzelsensoren.

Die Bestimmungen wurden mit zwei bzw. vier Glucose-Einzelsensoren ($n = 2$ bzw. 4) in Phosphatpuffer pH 7,0 durchgeführt. Die Proben wurden in einer Verdünnung zwischen 1:40 und 1:2000 zugegeben.

Die mit den Glucose-Einzelsensoren bestimmten Werte wiesen eine sehr gute Übereinstimmung mit den Referenzwerten auf (Abb. 49). Bei neun Proben ergab sich die Steigung der Geradengleichung zu 1,0096 mit einem Korrelationskoeffizienten von $R = 0,9987$. Dabei wurde nicht zwischen Rot- und Weißweinen unterschieden. Für zwei Proben mit einem sehr niedrigen Glucosegehalt von 0,20 bzw. 0,12 g/L betrug die Abweichung vom Referenzwert +67% bzw. +117%, bei allen anderen Proben lag die Abweichung unter $\pm 7\%$. Darüberhinaus zeigten die Glucose-Einzelsensoren eine sehr gute Präzision, die Abweichungen der mit verschiedenen Sensoren ermittelten Werte betragen maximal 7%.

5.4.2 Bestimmung mit den Multianalysensoren

5.4.2.1 Bestimmung der Einzelzucker in Wein

Die Multianalysensoren wurden zur simultanen Bestimmung der Glucose- und Fructosekonzentration in verschiedenen Rot- und Weißweinen eingesetzt. Die Referenzanalytik erfolgte photometrisch nach der enzymatischen Methode am Staatlichen Veterinär- und Chemischen Landesuntersuchungsamt in Münster sowie am Staatlichen Untersuchungsamt Hessen.

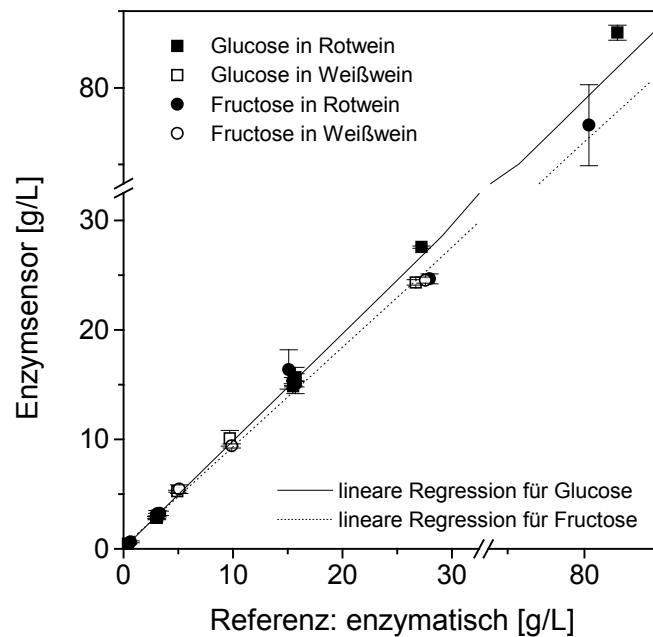


Abb. 50: Simultane Bestimmung der Glucose- und Fructosekonzentration in Rot- und Weißweinen mit den Multianalysensoren.

Die Bestimmungen wurden mit zwei Multianalysensoren ($n = 2$) in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ durchgeführt. Die Proben wurden in einer Verdünnung zwischen 1:20 und 1:2000 zugegeben.

Die Korrelation zwischen den mit den Multianalysensoren bestimmten Werten und den Referenzwerten war sehr gut (Abb. 50). Insbesondere war kein systematischer Unterschied zwischen Rot- und Weißweinproben zu erkennen. Für die Glucosebestimmung ergab sich die Steigung der Geradengleichung zu 0,9796 mit einem Korrelationskoeffizienten von $R = 0,9992$ bei 12 Proben. Die maximale Abweichung vom Referenzwert betrug +14% bei einer Probe mit sehr niedrigem Glucosegehalt von 0,4 g/L. Bei allen anderen Proben lag die Abweichung vom Referenzwert bei maximal $\pm 7\%$. Für die Fructosebestimmung war die Übereinstimmung geringfügig schlechter. Die Steigung der Geradengleichung betrug 0,9093 mit einem Korrelationskoeffizienten von $R = 0,9984$ bei 11 Proben, d. h. es lag eine systematische Unterbestimmung um 10% vor. Die maximale Abweichung vom Referenzwert

lag in zwei Fällen bei -12%. Sowohl die Glucose- als auch die Fructosesensoren zeigten eine gute Präzision. Die Abweichungen der mit den beiden Multianalysensoren ermittelten Werte betragen maximal 9% für die Glucosebestimmung, bei der Fructosebestimmung lagen sie in zwei Fällen zwischen 10 und 15%, ansonsten ebenfalls unter 9%.

Bei fünf der untersuchten Weine erfolgte die Bestimmung der Glucosekonzentration sowohl mit den Glucose-Einzelsensoren als auch mit den Multianalysensoren. In Tab. 11 sind die Ergebnisse gegenübergestellt. Mit beiden Sensortypen wurden gleich gute Ergebnisse erhalten.

Tab. 11: Vergleich der Glucosebestimmung im Wein mit den Einzel- und Multianalysensoren.

| Referenzwert [g/L] | Einzelsensor [g/L] | Abweichung vom Referenzwert [%] | Multianalysensor [g/L] | Abweichung vom Referenzwert [%] |
|-----------------------|-----------------------|------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| 2,99 | 3,08 ± 0,22 | +3,18 | 2,84 ± 0,10 | -6,41 |
| 3,04 | 3,05 ± 0,10 | +0,33 | 2,84 ± 0,18 | -5,02 |
| 3,06 | 3,26 ± 0,14 | +6,62 | 3,00 ± 0,25 | -1,96 |
| 15,72 | 14,86 ± 0,41 | -5,49 | 15,37 ± 1,20 | -2,23 |
| 84,30 | 87,89 ± 0,08 | +4,26 | 87,19 ± 0,98 | +3,43 |

5.4.2.2 Bestimmung der Einzelzucker in Sekt

Die Multianalysensoren wurden zur simultanen Bestimmung der Glucose-, Saccharose- und Fructosekonzentration in verschiedenen Sektproben eingesetzt. Da der Saccharosesensor aufgrund der Enzymsequenz die Summe des Glucose- und Saccharosegehaltes misst, wurde die Saccharosekonzentration durch Differenzbildung ermittelt. Weil die Sensitivitäten des Glucose- und Saccharosesensors für Glucose unterschiedlich groß sind, konnte nicht einfach das durch die Probe verursachte Stromsignal am Glucosesensor von dem am Saccharosesensor subtrahiert werden, sondern das Signal am Saccharosesensor musste um die am Glucosesensor gemessene Konzentration an Glucose korrigiert werden (Gleichung 11).

$$c_S = \frac{I_S \cdot S_G - I_G \cdot S_{SG}}{S_G \cdot S_{SS}} \quad (11)$$

mit c_S = Saccharosekonzentration, I_G = Stromsignal am Glucosesensor, I_S = Stromsignal am Saccharosesensor, S_G = Sensitivität des Glucosesensors, S_{SG} = Sensitivität des

Saccharosesensors für Glucose, S_{SS} = Sensitivität des Saccharosesensors für Saccharose.

Die Durchführung der Referenzmessungen erfolgte photometrisch nach der enzymatischen Methode am Staatlichen Veterinär- und Chemischen Landesuntersuchungsamt in Münster.

Es ergab sich eine gute Übereinstimmung zwischen den mit den Multianalysensoren bestimmten Werten und den Referenzwerten (Abb. 51). Bei drei Proben hatte die Geradengleichung eine Steigung von 1,0697 mit einem Korrelationskoeffizienten von $R = 0,9994$ für die Glucosebestimmung, eine Steigung von 1,1039 mit einem Korrelationskoeffizienten von $R = 0,9994$ für die Fructosebestimmung und eine Steigung von 0,9450 mit einem Korrelationskoeffizienten von $R = 0,9870$ für die Saccharosebestimmung. Die Abweichung vom Referenzwert lag zwischen 0 und +6% für die Glucosebestimmung, zwischen +1 und +5% für die Fructosebestimmung und zwischen -3 und +2% für die Saccharosebestimmung. Die Präzision der Saccharosesensoren war - bedingt durch die Differenzbestimmung - etwas schlechter als die der Glucose- und Fructosesensoren. Die Abweichungen der mit den beiden Multianalysensoren ermittelten Werte betragen maximal 4% für die Glucosebestimmung, maximal 7% für die Fructosebestimmung und maximal 15% für die Saccharosebestimmung.

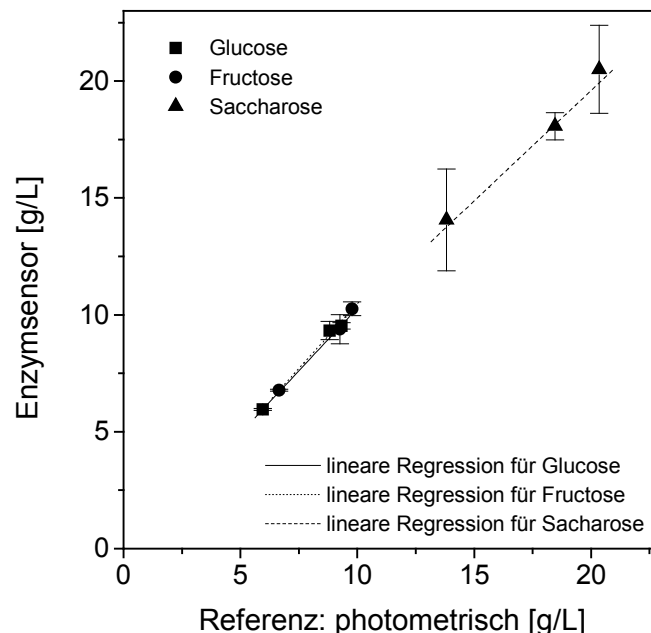


Abb. 51: Simultane Bestimmung der Glucose-, Saccharose- und Fructosekonzentration in Sekten mit den Multianalysensoren.

Die Bestimmungen wurden mit zwei Multianalysensoren ($n = 2$) in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ durchgeführt. Die Proben wurden vor der Messung geschüttelt, um vorhandene Kohlensäure auszutreiben. Die Verdünnung der Proben betrug 1:1000.

5.4.2.3 Bestimmung des Gesamtzuckers in Wein

Zur Ermittlung der Gesamtzuckerkonzentration wurde mit den Multianalysensoren die Glucose- und Fructosekonzentration bestimmt und addiert. Die Referenzanalytik erfolgte nasschemisch nach Luff-Schorl oder Dr. Jacob am Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe und am Staatlichen Untersuchungsamt Hessen. Mit diesen Methoden wird die Summe der reduzierenden Zucker bestimmt.

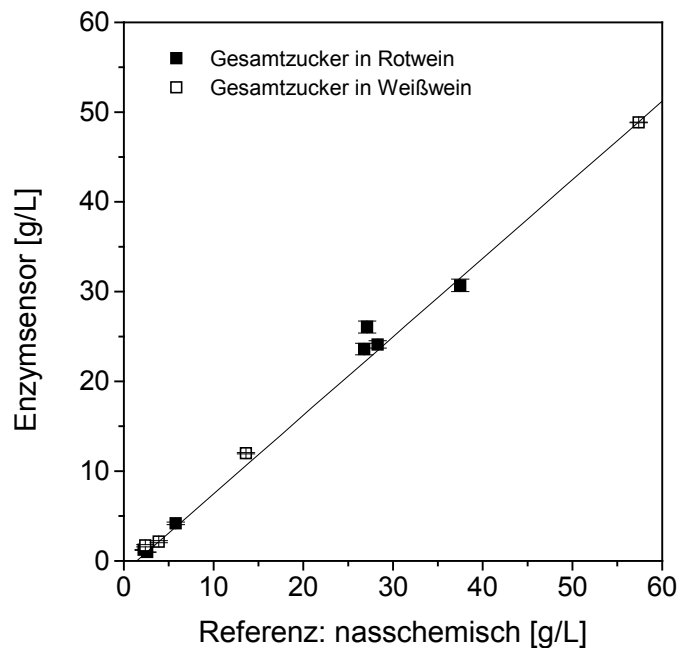


Abb. 52: Bestimmung des Gesamtzuckers in Rot- und Weißweinen mit den Multianalysensoren.

Die Bestimmungen wurden mit zwei Multianalysensoren ($n = 2$) in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ durchgeführt. Die Proben wurden in einer Verdünnung zwischen 1:200 und 1:1000 zugegeben.

Die Übereinstimmung der mit den Multianalysensoren bestimmten Werte mit den nasschemisch ermittelten Referenzwerten (Abb. 52) war nicht so gut wie mit den enzymatisch ermittelten Referenzwerten (vgl. Kap. 5.4.2.1 und 5.4.2.2). Bei 11 Proben ergab sich die Steigung der Geradengleichung zu 0,8742, obwohl eine sehr gute Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $R = 0,9999$ erzielt wurde. In allen Fällen wurden mit den Multianalysensoren zu niedrige Werte bestimmt. Bei Proben mit niedrigen Gesamtzuckergehalten zwischen 2 und 6 g/L wurden Abweichungen zwischen -29 und -63% erhalten. Bei den anderen Proben mit Gesamtzuckergehalten von mehr als 10 g/L lagen die Abweichungen vom Referenzwert zwischen -4 und -19%. Die Präzision der Multianalysensoren war sehr gut, die Abweichungen der mit den beiden Sensoren ermittelten Werte betragen maximal 7%. Der Grund für die starken Abweichungen der mit den Multianalysensoren bestimmten Werte von den Referenzwerten liegt darin, dass bei der

Bestimmung nach Luff-Schorl und Dr. Jacob nicht nur die Hexosen Glucose und Fructose erfasst werden, sondern auch die im Wein vorliegenden, nicht vergärbaren Pentosen Arabinose und Rhamnose [3].

5.4.2.4 Charakterisierung eines Gärverlaufs

Um Proben einer realen Gärung zu erhalten, wurden 10 L Most ("Neuer Süßer") unter Zusatz einer Kaltgärhefe und Hefenährsalz in einem Gärballon zur Gärung gebracht. Nach elf Tagen war die Gärung abgeschlossen. Während der Gärung wurden einmal täglich mehrere Proben genommen und jeweils ein Teil der Proben sterilfiltriert. Die Referenzanalytik erfolgte in den sterilfiltrierten Proben mittels HPLC bei einem Weinlabor (Analytisches Labor Link GmbH, Weisenheim/Sand) (Abb. 53). Saccharose war in den Proben nicht mehr nachweisbar, da die Gärung bei dem als Ausgangsmaterial verwendeten Most schon leicht eingesetzt hatte, wodurch auch bereits ein geringer Anfangs-Alkoholgehalt (1%) vorlag. Der Gesamtzuckerergehalt ergab sich somit aus der Summe des Glucose- und Fructosegehaltes.

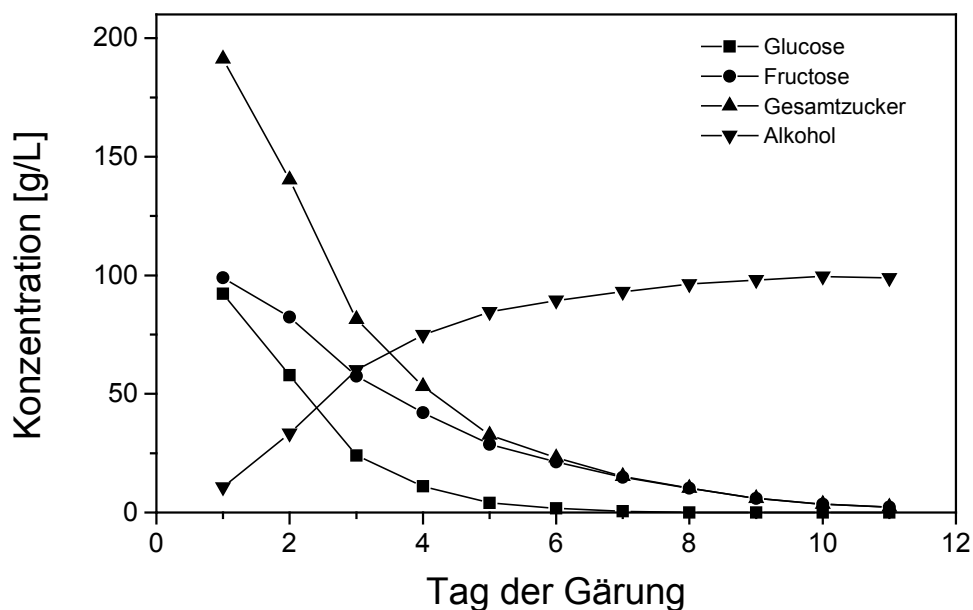


Abb. 53: Charakterisierung eines Gärverlaufes, Referenzanalytik mittels HPLC. Verwendung der sterilfiltrierten Proben.

Abb. 54 zeigt die mit den Multianalysensoren bestimmten Werte im Vergleich zu den Referenzwerten. Insgesamt wurde eine gute Übereinstimmung gefunden. Bei den Proben der ersten beiden Gärtage wurden sowohl für Glucose als auch für Fructose um 8 bis 10% zu hohe Werte bestimmt. Anschließend lagen die Abweichungen vom Referenzwert für die Glucosebestimmung bis zum 6. Gärtag bei $\pm 4\%$. Bei Probe 7 mit einem geringen

Glucosegehalt von 0,5 g/L ergab sich eine Abweichung von +25%, außerdem war die Messung mit einem Fehler von 20% behaftet. Weiterhin konnten für die Proben 8 bis 11, bei denen die Glucosekonzentration 0 g/L betrug, mit den Multianalysensoren keine genauen Werte mehr bestimmt werden. Bei Probe 8 konnte der Glucosegehalt auf <0,5 g/L festgelegt werden, bei den Proben 9 bis 11 auf <0,1 g/L. Die relative Standardabweichung für die Glucosebestimmung lag bei Probe 1 bis 6 zwischen 1 und 13%.

Bei der Fructosebestimmung betrug die Abweichung vom Referenzwert ab dem 3. Gärtag im allgemeinen zwischen -1 und -11%, in zwei Fällen wurden größere Abweichungen von -17% (Probe 11) und -20% (Probe 9) erhalten. Die relative Standardabweichung für die Fructosebestimmung lag in drei Fällen zwischen 14 und 17%, ansonsten unter 10%. In 5 Gärproben wurde zusätzlich mit 2 Multianalysensoren der Saccharosegehalt bestimmt. Dabei wurde im Mittel ein Wert von $-0,533 \pm 1,69$ g/L Saccharose gefunden ($n = 10$).

In Abb. 54 ist deutlich zu erkennen, dass während der Gärung zunächst überwiegend Glucose und in geringerem Maße Fructose umgesetzt wird. Da das Glucose/Fructose-Verhältnis vom Vergärungsgrad abhängt [2], kann das Fortschreiten der Gärung sehr gut mit den Multianalysensoren kontrolliert werden.

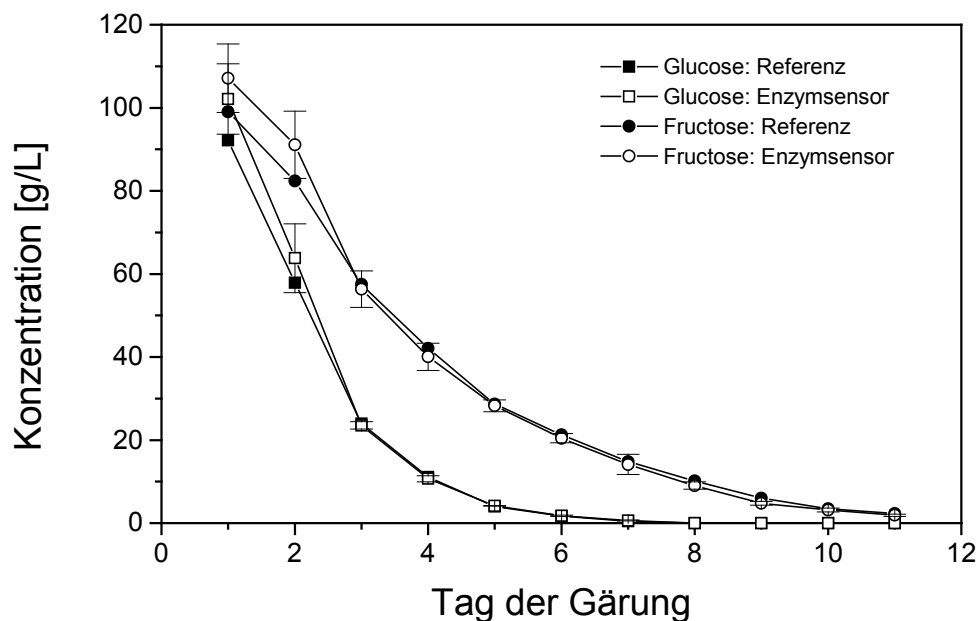


Abb. 54: Charakterisierung eines Gärverlaufes mit den Multianalysensoren, Vergleich mit der Referenzanalytik.

Verwendung der sterilfiltrierten Proben. Die Bestimmungen wurden mit vier Multianalysensoren ($n = 4$) in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ durchgeführt. Verdünnung: Probe 1-3: 1:2000, Probe 4-6: 1:1000, Probe 7: 1:500, Probe 8-11: 1:200.

Um eventuell vorhandene Matrixeffekte aufzudecken, wurde exemplarisch für drei Gärproben der Kalibrationsschritt vor der Probezugabe zur Auswertung herangezogen und mit den Ergebnissen, die durch Auswertung des Kalibrationsschrittes nach der Probezugabe erhalten wurden, verglichen (Tab. 12).

Tab. 12: Vergleich der durch Auswertung des Kalibrationsschrittes vor bzw. nach der Probezugabe bestimmten Glucose- und Fructosekonzentrationen.

Verwendung der sterilfiltrierten Proben. Messung mit 4 Multianalysensoren (n = 4) in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$.

| Nr. | Referenz [g/L] | Glucose | | Referenz [g/L] | Fructose | |
|-----|-------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|
| | | Enzymsensor vor [g/L] | Enzymsensor nach [g/L] | | Enzymsensor vor [g/L] | Enzymsensor nach [g/L] |
| 1 | 92,2 | 99,89 ± 8,25 | 102,11 ± 8,45 | 99,0 | 111,21 ± 11,09 | 107,11 ± 8,24 |
| 4 | 11,1 | 10,13 ± 0,81 | 10,68 ± 0,71 | 42,1 | 43,4 ± 4,25 | 40,04 ± 3,26 |
| 7 | 0,5 | 0,66 ± 0,12 | 0,63 ± 0,13 | 14,8 | 16,51 ± 3,11 | 14,13 ± 2,43 |

Bezüglich der Übereinstimmung mit den Referenzwerten konnten keine eindeutigen Tendenzen festgestellt werden. Im allgemeinen stimmten die durch Auswertung des Kalibrationsschrittes nach der Probezugabe erhaltenen Werte etwas besser mit den Referenzwerten überein. Bei der Fructosebestimmung wurden durch Auswertung des ersten Kalibrationsschrittes in allen Fällen höhere Werte erhalten als durch Auswertung des zweiten Kalibrationsschrittes. Da jedoch durch Auswertung des ersten Kalibrationsschrittes keine wesentlich schlechteren Ergebnisse erhalten wurden als durch Auswertung des zweiten Kalibrationsschrittes, der eine interne Kalibration darstellt und somit Wein als Matrix berücksichtigt, konnte davon ausgegangen werden, dass Matrixeffekte bei der Messung mit den Multianalysensoren in Proben einer realen Gärung keine Probleme verursachten.

Zur weiteren Untersuchung eventuell vorhandener Matrix- und Verdünnungseffekte wurde Probe 4, die eine größere Menge beider Zucker enthielt, in fünf verschiedenen Verdünnungen vermessen (Abb. 55). Dabei wurde kein wesentlicher Verdünnungs- bzw. Matrixeffekt beobachtet. Die Abweichung zwischen dem höchsten und niedrigsten bestimmten Wert betrug 10% für die Glucosebestimmung und 7% für die Fructosebestimmung. Da der Fructosegehalt dieser Probe mit ca. 42 g/L noch sehr hoch war, würde diese Probe bei einer Routinemessung mit einer hohen Verdünnung von 1:1000 oder 1:2000 vermessen. Das Experiment zeigte aber, dass bei Messungen mit den Multianalysensoren in Proben einer realen Gärung auch bei niedrigeren Verdünnungen keine Matrixeffekte auftraten.

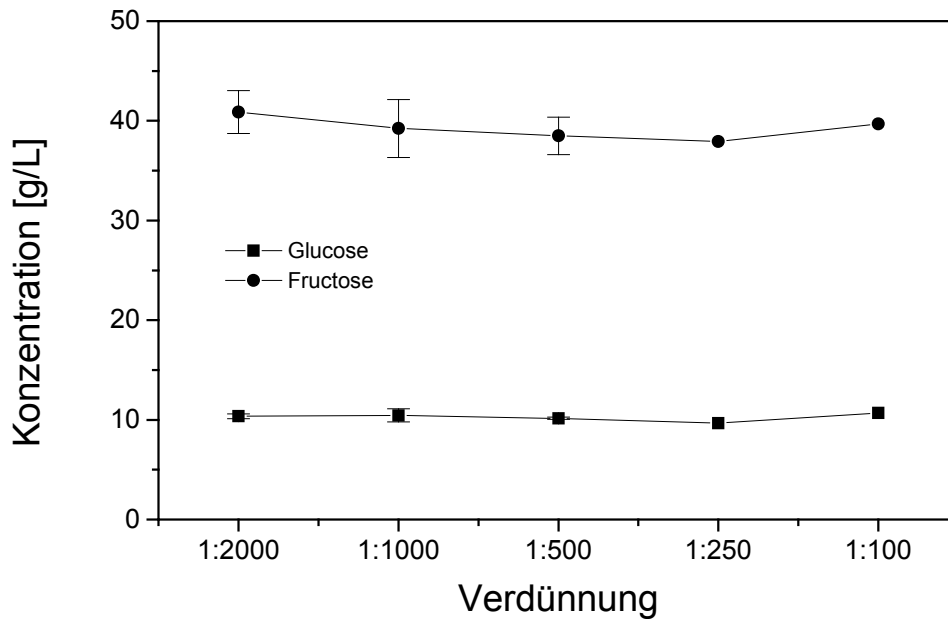


Abb. 55: Abwesenheit von Matrixeffekten.

Bestimmung des Glucose- und Fructosegehaltes in Gärprobe 4 durch Zugabe der Probe zum Messpuffer in fünf verschiedenen Verdünnungen (1:2000: n = 4, 1:1000: n = 6, 1:500: n = 2, 1:250, 1:100: n = 1).

Weiterhin wurde untersucht, ob die Sterilfiltration der gezogenen Gärproben einen Einfluss auf den Zuckergehalt hatte. Dazu wurde die Glucose- und Fructosekonzentration zusätzlich in den unfiltrierten Gärproben 1, 4 und 7 bestimmt. Die ermittelten Werte sind in Tab. 13 und Tab. 14 den in den filtrierten Proben bestimmten Werten sowie den Referenzwerten gegenübergestellt. In Gärprobe 1 wurde im Vergleich zum Referenzwert ein um 13% zu niedriger Glucosegehalt bestimmt. Insbesondere wurde sowohl der Glucose- als auch der Fructosegehalt mit den Multianalysensoren in der unfiltrierten Gärprobe 1 wesentlich niedriger bestimmt als in der filtrierten Gärprobe 1. Da jedoch die in der filtrierten Gärprobe 1 bestimmten Werte zu hoch lagen, war die Übereinstimmung mit den Referenzwerten etwa gleich gut. Bei den Gärproben 4 und 7 stimmten die in den unfiltrierten und filtrierten Proben gefundenen Zuckergehalte sehr gut überein.

Das Experiment zeigte, dass die Glucose- und Fructosekonzentration in gärendem Most mit den Multianalysensoren genauso gut in unfiltrierten wie in sterilfiltrierten Proben bestimmt werden konnte. Insbesondere machte es dabei keinen Unterschied, ob die unfiltrierten Proben vor der Messung zentrifugiert wurden, so dass sich Feststoffe am Boden des Probengefäßes absetzten, oder ob die Proben vor der Messung mit Hilfe eines Schüttlers gut durchmischt wurden, um die Feststoffe in der Probe zu verteilen. Weiterhin war es nicht notwendig, den Volumenfehler, der sich durch die Feststoffe in der Probe ergab, zu berücksichtigen. Dadurch, dass die in den unfiltrierten Proben bestimmten Werte eine gute

Übereinstimmung mit den in den filtrierten Proben bestimmten Referenzwerten aufwiesen, braucht der Anwender die Proben vor der Messung keiner Vorbehandlung zu unterziehen. Dies stellt einen erheblichen Vorteil für die einfache und praktische Anwendung der Multianalysensoren dar.

Tab. 13: Bestimmung der Glucosekonzentration in filtrierten und unfiltrierten Gärproben.

Die Bestimmungen wurden mit zwei bzw. vier (Probe 4) Multianalysensoren ($n = 2$ bzw. 4) in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ durchgeführt.

| Probe | Referenzwert [g/L] | Enzymsensor [g/L] | Enzymsensor [g/L] |
|-------|--------------------|-------------------|--------------------|
| | filtrierte Probe | filtrierte Probe | unfiltrierte Probe |
| 1 | 92,2 | $102,11 \pm 8,45$ | $79,96 \pm 7,87$ |
| 4 | 11,1 | $10,68 \pm 0,71$ | $10,74 \pm 0,39$ |
| 7 | 0,5 | $0,63 \pm 0,13$ | $0,63 \pm 0,01$ |

Tab. 14: Bestimmung der Fructosekonzentration in filtrierten und unfiltrierten Gärproben.

Die Bestimmungen wurden mit zwei bzw. vier (Probe 4) Multianalysensoren ($n = 2$ bzw. 4) in Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 mit 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ durchgeführt.

| Probe | Referenzwert [g/L] | Enzymsensor [g/L] | Enzymsensor [g/L] |
|-------|--------------------|-------------------|--------------------|
| | filtrierte Probe | filtrierte Probe | unfiltrierte Probe |
| 1 | 99,0 | $107,11 \pm 8,24$ | $95,11 \pm 12,13$ |
| 4 | 42,1 | $40,04 \pm 3,26$ | $39,17 \pm 0,56$ |
| 7 | 14,8 | $14,13 \pm 2,43$ | $14,04 \pm 0,69$ |

6 Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit gelang die Entwicklung eines Multianalysensensors zur simultanen Bestimmung der Zucker Glucose, Fructose und Saccharose für die Überwachung von Gärprozessen. Die Enzymsensoren zur Bestimmung der drei Zucker wurden zunächst getrennt voneinander entwickelt, optimiert und charakterisiert und anschließend zu einem Multianalysensensor kombiniert.

6.1 Entwicklung der Enzymsensoren

Bei der Charakterisierung der Transducer und auch der Enzymsensoren fiel auf, dass es bei Verwendung von Transducern, die mit verschiedenen Chargen der ausgewählten Platinpaste gedruckt worden waren, teilweise zu unterschiedlichen Sensitivitäten kam, obwohl es sich laut Herstellerangaben immer um die gleiche Platinpaste handelte. Die Sensitivitäten für Wasserstoffperoxid unterschieden sich z. B. um bis zu 25%. Ein weiterer Faktor, der die Sensitivität der Sensoren beeinflusste, war die Qualität des gelieferten PCS-Gels der Firma SensLab. So waren bei verschiedenen Chargen des PCS-Gels unterschiedliche Mengen an PEI-Lösung notwendig, um die Polymerisation des Gels einzuleiten. Darüberhinaus kam es bei einer der Chargen des PCS-Gels nach Einstellen des pH-Wertes zu einer sehr schnellen Polymerisation, die eine weitere Verarbeitung und die Herstellung homogener Enzymmembranen unmöglich machte. Um von solchen Unsicherheitsfaktoren weitestgehend unabhängig zu werden, wurde auch ein im Rahmen dieser Arbeit synthetisiertes PCS-Gel verwendet, das zu vergleichbaren Ergebnissen führte wie das käufliche PCS-Gel. Dadurch wird es prinzipiell möglich, die Eigenschaften und Qualität des PCS-Gels selbst zu kontrollieren. Allerdings müsste dafür auch einiger Aufwand für die Qualitätssicherung von Synthese und Lagerung des PCS-Gels betrieben werden [54].

Die Verwendung von Enzympräparationen verschiedener Firmen führte bei den Glucose- und Fructosesensoren nur zu geringfügig unterschiedlichen Sensitivitäten, bei den Saccharosesensoren hatte der Einsatz zweier verschiedener Mutarotase-Präparationen dagegen einen erheblich größeren Einfluss auf die Sensitivität. Durch Enzymbeladungstests wurde bei allen drei Enzymsensoren sichergestellt, dass im diffusionskontrollierten Bereich gearbeitet wurde. Nach einem anfänglichen Anstieg der Sensitivitäten mit steigenden Enzymkonzentrationen wurde bei den Glucosesensoren im Fall hoher Enzymbeladungen schließlich eine Drift in den Stromstufen beobachtet, bei den Saccharose- und Fructosesensoren nahm die Sensitivität ab einer bestimmten Enzymbeladung wieder ab. Diese Effekte sind vermutlich auf eine verminderte Diffusion der Substratmoleküle aufgrund der höheren Proteinbeladung der Membran zurückzuführen. Das Arbeiten im

diffusionslimitierten Bereich durch eine entsprechend hohe Enzymbelastung ist nicht immer möglich. Bei einem Alkoholsensor konnte mit den verwendeten Alkoholoxidasepräparationen die Enzymbelastung nicht so weit gesteigert werden, dass der diffusionslimitierte Bereich erreicht wurde [157].

Der in dieser Arbeit beschriebene Saccharosesensor wurde durch Coimmobilisierung der Enzyme Invertase, Mutarotase und Glucoseoxidase hergestellt. Frühere Arbeiten, bei denen nur die Enzyme Invertase und Glucoseoxidase immobilisiert worden waren [51], ergaben keinerlei Signal für Saccharose und zeigten somit, dass die Coimmobilisierung der Mutarotase für die schnelle Einstellung des Mutarotationsgleichgewichtes zwischen dem α - und dem β -Anomeren der Glucose notwendig war. Die meisten der in der Literatur beschriebenen Saccharosesensoren basieren ebenfalls auf der 3-Enzymsequenz Invertase, Mutarotase, Glucoseoxidase [35, 88, 102, 158-168]. Dabei wurde über eine Steigerung der Sensitivität des Saccharosesensors durch Coimmobilisierung der Mutarotase um das Hundertfache [35] bzw. um den Faktor 20 berichtet [161]. Es wurden jedoch auch Saccharosesensoren ohne das Enzym Mutarotase beschrieben, bei denen entweder nur das thermische Gleichgewicht zwischen dem α - und β -Anomeren der Glucose genutzt wurde [41, 42, 169], oder Phosphationen in der Immobilisierungsschicht und der Messlösung dazu dienten, die Umwandlung der α -Glucose in β -Glucose zu katalysieren [159].

Da der Saccharosesensor aufgrund der Enzymsequenz die Summe des Glucose- und Saccharosegehaltes misst, wurde die Saccharosekonzentration durch Differenzbildung ermittelt. Weil die Sensitivität des Saccharosesensors für Glucose im allgemeinen höher war als die des Glucosesensors, konnte nicht einfach das durch die Probe verursachte Stromsignal am Glucosesensor von dem am Saccharosesensor subtrahiert werden, sondern das Signal am Saccharosesensor musste unter Berücksichtigung der Sensitivität des Saccharosesensors für Glucose um die am Glucosesensor gemessene Glucosekonzentration korrigiert werden. Die höhere Sensitivität des Saccharosesensors für Glucose lässt sich auf die Anwesenheit der Mutarotase im Saccharosesensor zurückführen, durch die der Glucoseoxidase eine größere Menge an β -D-Glucose als Substrat zur Verfügung steht. Es wäre daher denkbar, den Glucosesensor ebenfalls durch Coimmobilisierung von Mutarotase herzustellen, um dadurch gleiche Sensitivitäten des Glucose- und Saccharosesensors für Glucose zu erreichen, die die Berechnung der Saccharosekonzentration stark vereinfachen würden. Ein solcher Glucosesensor wurde in der Literatur beschrieben [170], und dessen analytische Eigenschaften mit denen eines Glucosesensors, der nur GOD enthielt, verglichen. Durch die Coimmobilisierung der Mutarotase wurde eine um 44% höhere Sensitivität erreicht, die Standardabweichung bezüglich der Sensitivität verschlechterte sich dagegen um den Faktor 2. Auch die Wiederholbarkeit und Richtigkeit der Messungen wurden durch die Anwesenheit der Mutarotase schlechter. Diese Beobachtungen wurden

durch eine möglicherweise inhomogene Verteilung der Mutarotase an der Elektrodenoberfläche erklärt. Die Sensitivität des Glucosesensors wurde jedoch nicht mit der Sensitivität für Glucose eines entsprechenden Saccharosesensors verglichen.

Zur Bestimmung von Saccharose neben Glucose nutzten mehrere Arbeitsgruppen die Differenzmessung. Durch Messung der Glucosekonzentration mit einer Glucoseelektrode vor und nach Zugabe der Enzyme Invertase und Mutarotase zur Messlösung wurden die beiden Zucker nacheinander bestimmt [159]. In den meisten Fällen wurde jedoch jeweils ein Glucose- und ein Saccharosesensor eingesetzt [158, 160, 165]. Dabei wurde in einem Fall - im Unterschied zu dem beschriebenen Konzept einer Mutarotase-Coimmobilisierung - durch Coimmobilisierung einer inaktiven Invertase mit der GOD des Glucosesensors eine fast identische Sensitivität des Glucose- und Saccharosesensors für Glucose erreicht, so dass die Signale direkt subtrahiert werden konnten [160]. Bei der Differenzbestimmung mit den Enzymsensoren der Firma SensLab muss dagegen auch die Sensitivität des Saccharosesensors für Glucose berücksichtigt werden [158]. Eine andere Arbeitsgruppe nutzte bei Verwendung von nur einer Elektrode das unterschiedlich schnelle Ansprechen des Sensors auf Glucose und Saccharose [163]. Auch über den Einsatz eines Glucose-eliminierenden Reaktors in einer FIA wurde berichtet [88, 102]. Der Reaktor enthielt die Enzyme Glucoseoxidase, Mutarotase und Katalase und wurde dem Saccharosereaktor vorgeschaltet. Für die Fructosebestimmung mit dem Enzym Fructosedehydrogenase war die Verwendung eines Mediators notwendig, da bei dieser Oxidation kein Wasserstoffperoxid entstand. Es wurde hier hauptsächlich Hexacyanoferrat eingesetzt, dessen Eignung als Mediator zum Elektronentransfer zwischen FDH und Elektrode aus der Literatur bekannt war [36, 82-93]. Bei der Aufnahme von Cyclovoltammogrammen von Hexacyanerrat an Platin- und auch Graphitelektroden konnten Ergebnisse, die zuvor im Arbeitskreis mit einer anderen Transducerstruktur erhalten wurden [53], reproduziert werden. Die Cyclovoltammogramme der vier verschiedenen Elektroden einer Sensorkarte waren annähernd gleich und zeigten die gute Reproduzierbarkeit der elektrochemischen Eigenschaften der siebgedruckten Elektroden. Andererseits wies eine zunehmende Peakseparation mit steigender Scanrate auf eine schlechte Reversibilität des Hexacyanoferrat-Redoxpaares an den siebgedruckten Elektroden hin. Dieses Verhalten ist auf den polymeren Pastenbinder in der Platinpaste zurückzuführen und wird bei siebgedruckten Platinelektroden - im Gegensatz zu Platinmakroelektroden - häufig beobachtet, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Messungen, da es sich nicht um kinetische Messungen handelte. Die gleiche Beobachtung machten auch *Erlenkötter* [53] bei der Verwendung von Elektroden, die mit den gleichen Pasten hergestellt worden waren wie die hier beschriebenen Sensorkarten, aber eine andere Struktur besaßen, sowie *Rüger* [171] bei der Verwendung von Platinelektroden, die mit Hochtemperaturpasten hergestellt worden waren.

Die Fructosedehydrogenase ist ein relativ empfindliches Enzym, das verglichen mit Glucoseoxidase in kleinen Mengen bezogen wird und daher schlechter zu handhaben ist. Zur Überprüfung der für die Immobilisierung hergestellten FDH-Lösung und zum Vergleich verschiedener FDH-Präparationen untereinander wurde der in der Literatur beschriebene [138, 139] und von den Herstellern empfohlene [29, 137] Enzymaktivitätstest etabliert. Die Abweichungen der so bestimmten Enzymaktivitäten von den nach den Herstellerangaben berechneten Enzymaktivität lassen sich dadurch erklären, dass der Aktivitätstest bei Raumtemperatur durchgeführt wurde, während sich die Herstellerangaben auf eine Temperatur von 37 °C beziehen, bei der die gelöste Fructosedehydrogenase ihr Temperaturoptimum besitzt [29].

Die für die Enzyme Glucoseoxidase bzw. Invertase, Mutarotase und Glucoseoxidase bisher angewendete Immobilisierung durch Geleinschluss im Poly(carbamoylsulfonat)-Hydrogel erwies sich für die Fructosedehydrogenase als ungeeignet, da die auf diese Weise hergestellten Sensoren eine starke Drift der Signale aufwiesen. Die Drift wurde bei hohen Mediatorkonzentrationen geringer und zeigte, dass das Hexacyanoferrat offensichtlich nur sehr langsam in die PCS-Schicht hineindiffundierte. Aus diesem Grund erfolgte die Immobilisierung der Fructosedehydrogenase durch Vernetzung mit BSA und Glutaraldehyd. Diese klassische Immobilisierungsmatrix [7] wurde bereits zur Immobilisierung der Fructosedehydrogenase eingesetzt [36, 86-88, 94, 102]. Mit der hauptsächlich verwendeten FDH-Präparation der Firma Sorachim, die eine spezifische Aktivität von etwa 30 U/mg besaß, wurden die höchsten Sensitivitäten der Sensoren bei Enzymbeladungen von 0,3 U pro Elektrode erreicht, bei höheren Enzymbeladungen nahm die Sensitivität wieder ab. Dies ist vermutlich auf eine verminderte Diffusion der Substratmoleküle aufgrund der höheren Proteinbeladung der Membran zurückzuführen. Durch Verwendung einer Enzympräparation der Firma Sigma mit einer sehr hohen spezifischen Aktivität von 112 U/mg war es möglich, mit geringeren Proteinkonzentrationen höhere Enzymbeladungen zu realisieren als bei Verwendung der FDH von Sorachim. Daher wäre es denkbar, dass die Sensitivität der Sensoren mit der FDH von Sigma bei höheren Enzymbeladungen nicht abnimmt, da die Membran nicht so viel Protein enthält wie bei Verwendung der FDH von Sorachim. Die Sensoren mit der FDH von Sigma wiesen jedoch die höchsten Sensitivitäten bei einer Enzymbeladung von 0,3 bis 0,7 U pro Elektrode auf, bei höheren Enzymbeladungen nahm die Sensitivität ebenfalls leicht ab. Daher war es nicht sinnvoll, wesentlich höhere Enzymbeladungen zu realisieren als die, die auch mit der FDH von Sorachim erreicht werden konnten. Die spezifische Aktivität der FDH von Sorachim war somit völlig ausreichend. Da die FDH von Sigma nur in sehr kleinen Mengen zur Verfügung stand, mussten hier zusätzlich auch ökonomische Gesichtspunkte berücksichtigt werden.

Bei der Variation der Mediatorkonzentration wurden die höchsten Sensitivitäten der

Fructosesensoren zwischen 1 und 2,5 mM Hexacyanoferrat erhalten, bei Mediatorkonzentrationen von 3 und 5 mM waren die Sensitivitäten nur geringfügig niedriger, nahmen jedoch bei einer noch höheren Mediatorkonzentration von 10 mM weiter ab. Dieser Befund stimmt mit den von *Xie et al.* [86] publizierten Ergebnissen überein, die ebenfalls über einen Anstieg der Signale eines Fructosesensors bis zu einer Mediatorkonzentration von 2 mM und abnehmende Signale bei höheren Mediatorkonzentrationen berichteten. Als mögliche Erklärung für die Abnahme der Sensorsignale bei höheren Mediatorkonzentrationen gaben sie an, dass überschüssiges $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ in die Enzymmembran diffundiert und sich an das immobilisierte Enzym anlagert. Dabei würden die aktiven Zentren der Fructosedehydrogenase blockiert und die enzymatische Reaktion verlangsamt. In hohen Konzentrationen könnte $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ somit als reversibler Inhibitor wirken. *Stredansky et al.* [83] fanden ebenfalls die höchsten Sensitivitäten für Fructosesensoren bei Mediatorkonzentrationen zwischen 2 und 3 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, dagegen konnten sie den inhibierenden Effekt von höheren $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ -Konzentrationen nicht bestätigen. Der lineare Bereich der Fructosesensoren nahm dagegen mit steigender Mediatorkonzentration zu. Über diesen Effekt wurde bei *Xie et al.* [86] sowie *Stredansky et al.* [83] nicht berichtet, beide gaben einen linearen Bereich bis 1 mM Fructose an. Eine andere Arbeitsgruppe fand dagegen einen solchen Zusammenhang zwischen der Mediator- und der Fructosekonzentration [87, 89]. Die Sensitivität des beschriebenen Fructosereaktors nahm mit steigender Mediatorkonzentration zu, bis ein molares Verhältnis von Fructose zu Hexacyanoferrat von 1:4 erreicht war, bei höheren Mediatorkonzentrationen blieb die Sensitivität konstant. Es wurde daher ein mindestens fünffacher molarer Überschuss an Mediator verwendet.

6.2 Charakterisierung der Multianalysensoren

Die einzelnen Enzymsensoren beeinflussten sich nach ihrer Kombination auf der Sensorkarte zu einem Multianalysensensor nicht gegenseitig. Bei der Messung im Mc Ilvaine Puffer mit pH 5,0 sprach jeder Sensor nur auf den Analyten an, für den das entsprechende Enzym spezifisch war. Dieser Messpuffer auf der Basis von Citronensäure und Dikaliumhydrogenphosphat wurde als Kompromiss für die Messungen mit den Multianalysensoren gewählt, da die verwendeten Enzyme unterschiedliche pH-Optima besaßen. Dabei wurde das pH-Optimum der Fructosesensoren am stärksten berücksichtigt, da die Sensitivität der Fructosesensoren im jeweils optimalen Messpuffer um eine Größenordnung niedriger war als die der Glucose- und Saccharosesensoren. Für die meisten der in der Literatur beschriebenen Fructosesensoren wurden ebenfalls Messpuffer mit einem pH-Wert von 4,5 oder 5,0 eingesetzt. Dabei handelte es sich hauptsächlich um Mc Ilvaine Puffer [36, 90, 91-93, 102, 104], in einigen Fällen um Phosphatpuffer [96, 101]

oder Acetatpuffer [98, 99, 103]. Nur in wenigen Arbeiten wurden Messpuffer mit höheren pH-Werten zwischen 6,0 und 7,2 verwendet [83-85, 94, 95, 106]. Der Grund dafür war entweder das pH-Optimum des Sensors, das in diesem Bereich lag [85, 95], oder aber eine negative Ladung der verwendeten "solid binding matrix" bei hohen pH-Werten, die den Ausschluss von Interferenzen ermöglichte [84].

Die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Sensitivitäten des Multianalysensensors im Bereich von 15 bis 35 °C ergab am Glucose- und Saccharosesensor wie nach der RGT-Regel erwartet eine deutliche Zunahme der Sensitivität mit steigender Temperatur. Die Sensitivität des Fructosesensors betrug dagegen bei 35 °C nur noch 50% des maximalen Wertes, der schon bei 25 °C erreicht wurde. Dies widerspricht den Herstellerangaben für dieses Enzym [29], wird jedoch auf die unterschiedlichen Eigenschaften des gelösten und des immobilisierten Enzyms zurückzuführen sein. Eine entsprechende Temperaturabhängigkeit der Fructosedehydrogenase wurde auch für einen Sensor beschrieben, bei dem die FDH durch Elektropolymerisation in einen Polypyrrolfilm eingeschlossen war [172]. Das immobilisierte Enzym zeigte ebenfalls bei Raumtemperatur höhere Aktivitäten als bei 37 °C. Die meisten anderen Arbeitsgruppen berichteten dagegen über ein Temperaturoptimum des Fructosesensors bei 30 °C [85, 89, 93, 99, 173], führten die Messungen jedoch trotzdem teilweise bei 25 °C durch, da das Signal/Rausch-Verhältnis bei dieser Temperatur besser war [85] bzw. die Signale der Sensoren über einen längeren Zeitraum konstant blieben [173] als bei 30 °C.

Um den Einfluss eventuell vorhandener Störstoffe gering zu halten, sollte bei einem möglichst niedrigen Potential gemessen werden. Bei der Variation des Messpotentials kam es bei Potentialen unter 300 mV in Übereinstimmung mit den Cyclovoltammogrammen von Kaliumhexacyanoferrat sowohl am Glucose- als auch am Fructosesensor zu negativen Grundströmen. Da bei diesen Potentialen noch keine oder nur eine sehr geringe Umsetzung von Wasserstoffperoxid stattfindet, sind die negativen Grundströme auf den in der Messlösung vorhandenen Mediator zurückzuführen. Das Signal des Fructosesensors beruht auf der Umsetzung des Mediators $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, der zunächst den reduzierten Cofaktor PQQH₂ reoxidiert und anschließend selbst an der Elektrode reoxidiert wird. Am Glucosesensor ist die Oxidation des reduzierten Cofaktors FADH₂ in Anwesenheit von Hexacyanoferrat prinzipiell sowohl durch den natürlichen Elektronenakzeptor O₂ als auch durch den "künstlichen" Redoxmediator möglich. Die maximalen Sensitivitäten des Glucose- und Fructosesensors wurden jeweils bei einem Potential von 600 mV erreicht. Während jedoch bei den Fructosesensoren bei einem Potential von 400 mV bereits etwa 60% des maximalen Sensorsignals erreicht wurden, lag die Sensitivität der Glucosesensoren bei diesem Potential nur bei 30% des Maximalwertes. Dies ist ein Indiz dafür, dass am Glucosesensor auch in Anwesenheit von Hexacyanoferrat Sauerstoff als Substrat für die FADH₂-Oxidation unter

H₂O₂-Bildung diene, da sonst bei einem Potential von 400 mV bereits höhere Sensitivitäten hätten erreicht werden müssen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen von *Shul'ga et al.* [174], die die Konkurrenz von Sauerstoff und Hexacyanoferrat bei der Glucosemessung mit einem Enzymfeldeffekttransistor mit immobilisierter Glucoseoxidase untersuchten. Dabei fanden sie, dass die Reoxidation des FADH₂ bei niedrigen Glucosekonzentrationen bevorzugt durch Sauerstoff, und erst bei höheren Glucosekonzentrationen, bei denen ein Sauerstoff-Defizit erreicht wird, durch Hexacyanoferrat bestimmt wird. Da die Sensitivität des Glucosesensors in dieser Arbeit im allgemeinen über einen Bereich bis 1,2 mM Glucose bestimmt wurde, ist die Bedingung einer niedrigen Glucosekonzentration gegeben. Darüberhinaus verwendeten *Shul'ga et al.* sehr hohe Konzentrationen an Hexacyanoferrat zwischen 40 und 165 mM, um Interferenzen durch Sauerstoff zu unterdrücken, während in dieser Arbeit bei einer Konzentration von 5 mM K₃[Fe(CN)₆] gearbeitet wurde.

Das Messkonzept für die Multianalysensoren sieht vor, dass der Anwender mit einem Sensor vor Ort einen Tag lang Messungen durchführt und den Sensor dann wegwirft. Bei jeder Messung führt der Anwender eine interne Einpunktkalibration durch. Damit unterscheidet sich dieses Messkonzept deutlich von dem Konzept, auf dem z. B. viele Glucosesensoren zur Kontrolle der Blutzuckerkonzentration bei Diabetes-Patienten beruhen. Bei diesen Sensoren erfolgt eine Batch-Kalibration direkt nach der Herstellung und vor der weiteren Lagerung. Eine Kalibrierung zum Zeitpunkt der Anwendung des Sensors ist dann nicht mehr notwendig. Auch der Einsatz von Sensoren in einem Durchflusssystem beruht häufig auf einem anderen Prinzip. Hier wird oftmals mit demselben Sensor bzw. Reaktor, der das Enzym in hoher Konzentration enthält, über einen langen Zeitraum gemessen. Für die Multianalysensoren ergibt sich aus dem beschriebenen Messkonzept eine geforderte Verwendbarkeit der Sensoren für die Dauer eines Tages sowie nach einer Lagerung von mehreren Monaten. Aufgrund der internen Kalibration haben Schwankungen der Sensitivitäten keinen Einfluss auf die Verwendbarkeit der Sensoren.

Bei Untersuchungen zur Arbeitsstabilität des Multianalysensors zeigte der Glucosesensor über einen Zeitraum von 10 Stunden stabile Signale. Die Signale des Fructosesensors betragen nach dieser Zeit noch 77% des Anfangswertes, die des Saccharosesensors betragen noch 70% des Anfangswertes für Glucose und 30% des Anfangswertes für Saccharose. Dabei nahm die Sensitivität des Saccharosesensors für Saccharose zwischen der ersten und der zweiten Messung bereits um 50% ab. Möglicherweise ist dies auf eine starke Inaktivierung der Enzyme Invertase und Mutarotase im für die Saccharosesensoren unvorteilhafteren Mc Ilvaine Puffer pH 5,0 zurückzuführen. Die Signale des Saccharosesensors für Saccharose lagen jedoch nach 10 Stunden in der Größenordnung der Signale des Fructosesensors und konnten somit problemlos ausgewertet werden.

Aufgrund des Messkonzepts, das eine interne Kalibration der Multianalysensoren bei jeder Messung vorsieht, wird das Messergebnis durch die Abnahme der Sensitivitäten nicht beeinträchtigt und die Sensoren können vor Ort mindestens einen Tag lang verwendet werden. Bemerkenswert ist die gute Arbeitsstabilität des Fructosesensors. Ein Fructosesensor auf der Basis von Ferrocen-modifizierten Celluloseacetat-Membranen [95] erreichte nach 8 Stunden im besten Fall nur noch 40% der ursprünglichen Aktivität. Die Signale eines Sensors, der durch Modifikation einer Graphitpaste mit FDH und einem Osmium-Redoxmediator hergestellt wurde, waren 4 Stunden lang stabil, betrug nach 10 Stunden 50% und nach 15 Stunden 20% des Anfangswertes [99]. Wiederholtes Ein- und Ausschalten des Potentials zwischen den Messungen führte bei diesem Sensor zu einer noch schnelleren Abnahme der Signale.

Die Lagerstabilität wurde zunächst für die Glucose- und Saccharose-Einzelsensoren im Phosphatpuffer mit pH 7,0 ohne Mediator, dem optimalen Messpuffer für diese Sensoren, untersucht. Die Glucose- und Saccharose-Einzelsensoren wiesen eine sehr gute Lagerstabilität auf. Die Signale der Glucosesensoren betrug nach 6 Monaten noch 80%, nach einem Jahr noch 50% des Anfangswertes. Bei den Saccharosesensoren kam es nach einer Woche sogar zu einer starken Aktivierung um bis zu 70% für die Saccharosemessung und um bis zu 50% für die Glucosemessung. Die Signale blieben auf diesem Niveau sechs Monate lang annähernd konstant und erreichten nach einem Jahr in etwa den Ausgangswert (100% Aktivität). Diese Aktivierung ist möglicherweise auf Konformationsänderungen von Enzymen in dem Polymergel nach der Immobilisierung oder auf Veränderungen der Diffusionseigenschaften der Proteinmembran durch Quellprozesse zurückzuführen. Auch für den Saccharosesensor der Firma SensLab wurde über eine Zunahme der Sensorsignale um 9,5% nach 4-wöchiger, gekühlter Lagerung berichtet [158], die ebenfalls auf Quellvorgänge des Enzym- und Membransystems zurückgeführt wurde. Ein Anstieg der Signale nach einer Lagerung von wenigen Tagen wurde auch für einen Saccharosesensor gefunden, der keine Mutarotase enthielt [159]. Die Signale des beschriebenen Sensors nahmen um etwa 40% zu, erreichten jedoch nach einigen Tagen wieder den Anfangswert und blieben dann über einen Zeitraum von etwa 70 Tagen konstant. Die Langzeitstabilität der meisten der in der Literatur beschriebenen Saccharosesensoren war dagegen schlechter. Die Enzymaktivität eines Saccharosereaktors betrug nach 4 Tagen 60%, nach 15 Tagen 50% und nach 30 Tagen noch 25% [88]. Die Sensitivität eines Saccharosesensors, der durch Zweischritt-Immobilisierung auf einer Platinelektrode hergestellt wurde, verringerte sich nach 15 Tagen auf 92%, nach 30 Tagen auf 70% des Anfangswertes [160]. Zwei Saccharosesensoren verschiedener Arbeitsgruppen, die auf einer Sauerstoff-Elektrode basierten, zeigten keinen Sensitivitätsverlust nach zweimonatiger Lagerung [161] bzw. nach 50-tägigem Einsatz [162]. Mit einem Sensorsystem, bei dem eine Invertase/Mutarotase-Messzelle mit einer GOD-

Elektrode kombiniert wurde, wurden stabile Sensorsignale über einen Zeitraum von 4 Wochen erzielt [163]. Ein Saccharosesensor, bei dem die Enzyme in einer Polyvinylacetat-Membran immobilisiert wurden, wies eine konstante Enzymaktivität des Saccharosesensors für mindestens eine Woche auf [169]. Über die Stabilität der Sensoren über einen längeren Zeitraum wurden keine Angaben gemacht.

Die Lagerstabilität der Multianalysensoren wurde im Mc Ilvaine Puffer mit pH 5,0 und mit Kaliumhexacyanoferrat als Mediator untersucht. Die Multianalysensoren wiesen eine gute Lagerstabilität auf. Nach der Lagerung der Multianalysensoren über einen Zeitraum von 3 Monaten ohne Zusatz von stabilisierenden Additiven besaß der Glucosesensor noch 80% seiner ursprünglichen Sensitivität, der Saccharosesensor 87% der Anfangssensitivität für Glucose und 45% der Anfangssensitivität für Saccharose und der Fructosesensor ebenfalls 45%. Als geeignete Stabilisatoren für alle Sensoren erwiesen sich Hydroxyectoin und Hydroxypropyl- β -cyclodextrin. Durch Zusatz dieser Additive wurden bei allen Sensoren nach 3 Monaten sowohl relativ, bezogen auf das Anfangssignal, als auch absolut gesehen höhere Signale erhalten als ohne Additiv. Besonders stark wirkte sich diese Stabilisierung auf das Saccharosesignal des Saccharosesensors aus, das durch den verwendeten Messpuffer stark beeinträchtigt wurde. Bei Verwendung von Hydroxypropyl- β -cyclodextrin war das Saccharosesignal nach 3 Monaten um 83% höher als ohne Additiv, bei Verwendung von Hydroxyectoin betrug die Steigerung sogar 117%. Der Fructosesensor wurde durch Hydroxypropyl- β -cyclodextrin am besten stabilisiert. Durch Zusatz dieses Additivs war das Fructosesignal nach 3 Monaten um 62% höher als ohne Additiv.

In der Literatur wurde bisher hauptsächlich die stabilisierende Wirkung des Hydroxyectoins und Hydroxypropyl- β -cyclodextrins gegenüber Stressbedingungen wie Hitze, wiederholtes Einfrieren und Auftauen sowie Gefriertrocknung auf die gelösten Enzyme Lactatdehydrogenase, Phosphofruktokinase, Isocitratdehydrogenase sowie β -Galactosidase beschrieben [55, 57-59, 63]. In dieser Arbeit konnte der enzymstabilisierende Einfluss dieser Additive auf weitere Enzyme übertragen werden, die im Unterschied zu den in der Literatur beschriebenen stabilisierten Enzymen in immobilisierter Form vorlagen. Die Stabilisierung der Enzyme Invertase und Fructosedehydrogenase durch Hydroxyectoin oder Hydroxypropyl- β -cyclodextrin wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von *Olschewski* [147], der die beste Stabilisierung eines Lactosesensors mit immobilisierter β -Galactosidase ebenfalls durch Hydroxypropyl- β -cyclodextrin erreichte.

Trehalose war zur Stabilisierung des Glucosesensors ebenfalls geeignet, am Fructosesensor wurden jedoch nach 3 Monaten und am Saccharosesensor bereits zu Beginn der Untersuchungen durch Zusatz von Trehalose niedrigere Sensitivitäten erreicht als ohne

Additiv. Der in der Literatur beschriebene enzymstabilisierende Einfluss der Trehalose [57, 58, 61, 62] konnte somit nur eingeschränkt bestätigt werden. Generell haben die Zusätze bei dieser Art von Biosensoren nicht nur einen Einfluss auf die Enzymaktivität und -stabilität, sondern auch auf die Diffusion des Substrates und auf die Elektrochemie. Die Destabilisierung des Saccharosesensors scheint jedoch auf Probleme bei der Polymerisation des Immobilisats zurückzuführen zu sein. *Olschewski* [147] machte die gleiche Beobachtung bei der Coimmobilisierung von Trehalose und β -Galctosidase.

Im Hinblick auf einen späteren Einsatz der Multianalysensoren durch den Anwender in der Weinanalytik ist eine ausreichend lange Lagermöglichkeit der Sensoren für die verkaufende Firma essentiell. Um die Lagerstabilität der Sensoren über einen längeren Zeitraum sowie bei Raumtemperatur und unter Stressbedingungen zu untersuchen, würden zukünftig kürzere Inkubationen bei höherer Temperatur durchgeführt werden.

Aufgrund der internen Kalibration bei der Messung waren die Multianalysensoren - auch ohne Zusatz stabilisierender Additive - nach 3 Monaten noch voll einsatzfähig. Bemerkenswert ist insbesondere die gute Lagerstabilität des Fructosesensors, da es sich bei Fructosedehydrogenase um ein relativ instabiles Enzym handelt. Die meisten der in der Literatur beschriebenen Fructosesensoren wiesen eine schlechtere Langzeitstabilität auf. Die Restaktivität eines Fructosereaktors betrug nach 30 Tagen 40% [89], ein Fructosesensor auf der Basis einer *p*-Benzochinon-modifizierten Graphitelektrode [103] sowie ein Fructose-sensor, der in Kombination mit β -Galctosidase zur Lactulosebestimmung genutzt wurde [82], zeigten Restsignale von jeweils 30% nach 21 bzw. 11 Tagen. Bei einem Dünnschichtsensor betrug die Restaktivität nach 6 Tagen 10 bzw. 40%, je nach verwendetem Mediator [93]. Das Fructosesignal eines Sensors, mit dem nacheinander Fructose und Glucose bestimmt wurden, betrug nach 30 Tagen sogar nur noch 1% des Anfangswertes [85]. Als vernachlässigbar wurde auch die Sensitivität eines Fructosesensors beschrieben, der auf einer Ferrocen-modifizierten Graphitelektrode basierte [94]. Sie konnte jedoch durch Zusatz von Triton[®] X-100 erheblich gesteigert werden, so dass nach 2 Monaten noch eine Restaktivität von 60% erhalten wurde. Bei der Fructosedehydrogenase handelt es sich um ein membrangebundenes Enzym, das durch Detergenzien wie Triton[®] X-100 stabilisiert wird. Auch die in dieser Arbeit verwendeten FDH-Präparationen enthielten Triton[®] X-100, das nicht entfernt wurde. Die meisten Arbeitsgruppen führten die Untersuchungen zur Langzeitstabilität mit einem Sensor durch, der zwischen den Messungen unter definierten Bedingungen gelagert wurde, während in dieser Arbeit zur Bestimmung der Lagerstabilität jeder Sensor nur einmal verwendet und bis zu seinem Einsatz gekühlt gelagert wurde. Diese unterschiedlichen Methoden zur Bestimmungen der Sensorstabilität ergeben sich aus den verschiedenen Messkonzepten. Eine sehr gute Lagerstabilität wurde mit einem Fructosesensor erzielt, der durch Modifikation einer Graphitelektrode mit Meldolablu und

FDH hergestellt wurde [104]. Bei gekühlter Lagerung blieben die Signale über einen Zeitraum von 2 Monaten konstant. Ein Fructosesensor auf der Basis eines "solid binding matrix" Komposit-Transducers zeigte sogar nach 6 Monaten annähernd 100% Aktivität, wenn die Oberfläche des Sensors mechanisch erneuert wurde, andernfalls betrug die Restaktivität etwa 50% [83].

Die meisten Messungen in dieser Arbeit wurden noch mit Sensoren ohne Zusatz eines Stabilisators durchgeführt. Für zukünftige Arbeiten ist jedoch ein Redesign der Multianalysensoren denkbar, bei dem unter anderem standardmäßig ein Additiv mit stabilisierender Wirkung coimmobilisiert werden könnte. Hier bietet sich insbesondere Hydroxypropyl- β -cyclodextrin an, das auf alle verwendeten Enzyme einen stabilisierenden Einfluss hatte. Bei einem Redesign der Sensoren wäre auch eine einheitliche Immobilisierung der verschiedenen Enzyme anzustreben, um den Herstellungsprozess der Multianalysensoren zu vereinfachen und zu verkürzen. Dazu wurden bereits erste Versuche unternommen, alle Enzyme durch Vernetzung mit BSA und Glutaraldehyd zu immobilisieren. Die Ergebnisse zeigten die prinzipielle Eignung dieser Methode zur Immobilisierung des gesamten Multianalysensors, für eine endgültige Anwendung der Sensoren sollten jedoch die Enzym-BSA-Verhältnisse für den Glucose- und Saccharosesensor noch optimiert und die Sensoren weiter charakterisiert werden. *Shul'ga et al.* [174] etablierten die Enzymimmobilisierung mit Glutaraldehyd aus der Gasphase. Dabei wird zunächst die Enzym-BSA-Lösung, die zusätzlich Glycerin enthält, auf die Arbeitselektrode aufgetragen. Anschließend werden die Elektroden für 30 Minuten einer gesättigten Glutaraldehyd-Atmosphäre ausgesetzt. Die Glutaraldehyd-Immobilisierung besitzt damit das Potential zur weiteren Automatisierung des Herstellungsprozesses der Sensoren, da das Auftragen der Enzym-BSA-Glycerin-Lösung mit einem automatischen Dispenser möglich wäre. Dadurch, dass die Enzymlösung keinen Glutaraldehyd enthält, entfällt das Problem des Verklebens der Dispensiernadel, das die automatische Dispensierung von Enzym-Glutaraldehyd- und Enzym-PCS-Mischungen unmöglich macht, da die Mischungen nach kurzer Zeit in der Nadel polymerisieren würden. Durch eine entsprechend große Vorrichtung, in dem die Sensoren anschließend dem gasförmigen Glutaraldehyd ausgesetzt werden, sollte die schnelle und einfache Herstellung größerer Stückzahlen der Sensoren möglich sein. Durch die automatische Dispensierung sollte sich außerdem die reproduzierbare der Herstellung der Enzymmembranen gegenüber der Dispensierung von Hand deutlich verbessern.

Ein Problem bei der Messung mit Enzymsensoren stellen elektrochemisch aktive Störsubstanzen dar, die bei dem angelegten Potential ebenfalls an der Elektrode umgesetzt werden und dadurch das Messergebnis verfälschen können. Die im Wein relevanten Störsubstanzen sind Ascorbat und Sulfid. Zum Ausschluss von Störsignalen existieren verschiedene Konzepte. Häufig wird eine semipermeable Membran, wie z. B. die Nafion[®]-

Membran, auf die Elektrode aufgebracht, die durch ihre Ladung Störsubstanzen von der Elektrode fernhält [153-156]. Eine andere Möglichkeit besteht in der Umsetzung der Störstoffe. So kann z. B. zum Ausschluss von Ascorbat die Probe vor der Messung mit Ascorbatoxidase behandelt werden. Auch die Coimmobilisierung der Ascorbatoxidase auf dem Enzymsensor ist möglich [175]. Durch die Anwesenheit eines weiteren Enzyms ist jedoch eine schlechtere Reproduzierbarkeit des Sensors zu erwarten. Bei der Messung mit Enzymreaktoren in einem Durchflusssystem kann ein Ascorbat-eliminierender Reaktor dem eigentlichen Enzymreaktor vorgeschaltet werden [102]. Durch elektrochemische Voroxidation der Störstoffe an einer Elektrode, die sich vor der eigentlichen Glucoseelektrode befand, wurde eine interferenzfreie Glucosebestimmung möglich [176]. Ein anderes Konzept sieht die Verwendung eines Blindsensors ohne Enzym zur Detektion von Störsignalen vor. Das Blindsignal wird dann vom Signal des Enzymsensors subtrahiert. Dieses Konzept wurde in der vorliegenden Arbeit verfolgt. Darüberhinaus wurde jedoch die Möglichkeit untersucht, Störsignale mit Hilfe einer semipermeablen Membran zu eliminieren.

Das Nafion[®]-Polymer war zum Ausschluss von Störsubstanzen für die Multianalysensoren nicht geeignet. Bei der Messung mit reinen Glucose- oder Saccharosesensoren im Puffer mit pH 7,0 ohne Mediator konnten zwar Störsignale, die durch Ascorbat und Sulfit verursacht wurden, durch die Nafion[®]-Membran vollständig ausgeschlossen werden. Bei der Messung mit den Multianalysensoren im Puffer mit pH 5,0 mit Hexacyanoferrat als Mediator kam es jedoch bei Verwendung von Sensoren sowohl ohne als auch mit Nafion[®]-Membran zu starken Störsignalen. Da die Eignung des Nafion[®]-Polymers zum Ausschluss der Störsubstanzen Ascorbat und Sulfit zuvor gezeigt worden war, müssen die Störsignale bei der Messung mit den Multianalysensoren durch die Messlösung verursacht worden sein, möglicherweise durch Reaktion der Störsubstanzen mit dem Mediator. Auf diese Problematik wiesen auch *Scheller et al.* [7] hin. *Han et al.* [177] nutzten die Reaktion zwischen Mediator und "Störsubstanz" zur Bestimmung von Ascorbat mit Hilfe einer mediatorspezifischen glassy carbon-Elektrode. Darüberhinaus wurde am Fructosesensor mit Nafion[®]-Membran kein Fructosesignal erhalten, da offenbar der für die Fructosebestimmung notwendige, negativ geladene Mediator durch die Nafion[®]-Membran von der Elektrode ferngehalten wurde. Es müsste daher entweder eine andere semipermeable Membran oder ein anderer, nicht negativ geladener Mediator verwendet werden. Die Störstoffe Ascorbat und Sulfit liegen im Wein jedoch in einer um den Faktor 1000 geringeren Konzentration vor als die zu bestimmenden Zucker (Tab. 15) [116]. Daher war bei der Zuckerbestimmung höchstens eine sehr geringe Beeinflussung des Messsignals zu erwarten. Dies bestätigte sich bei der Verwendung eines Blindsensors, an dem keine Blindsignale detektiert wurden, so dass die Verwendung einer Membran zum Ausschluss von Störstoffen nicht notwendig war.

6.3 Messungen in Realproben

Bei der simultanen Bestimmung der Einzelzucker in Realproben wurde eine gute Übereinstimmung zwischen den Multianalysensoren - und auch Glucose-Einzelsensoren - und der enzymatisch-photometrischen Referenzmethode erhalten. Die Abweichungen vom Referenzwert lagen, von Ausnahmen abgesehen, unter 10%. Insbesondere stimmte auch die durch Differenzbestimmung ermittelte Saccharosekonzentration gut mit den Referenzwerten überein. Darüberhinaus wiesen die Sensoren eine gute Präzision auf. Die relative Standardabweichung der mit verschiedenen Sensoren bestimmten Werte lag im allgemeinen ebenfalls unter 10%. Die relative Standardabweichung bei der Saccharosebestimmung war - bedingt durch die Differenzbildung - mit 15% etwas größer. Bei den Bestimmungen konnte kein Unterschied zwischen Rot- und Weißweinen festgestellt werden, d. h. dass Gerbstoffe, die im Rotwein in etwa 10-fach höherer Konzentration vorliegen als im Weißwein (Tab. 15) [116], sich nicht störend auf die elektrochemische Messung auswirkten. Auf eine prinzipiell mögliche Beeinflussung der Messung durch Polyphenole wiesen auch *Hanke et al.* [36] hin. Sie gaben Polyphenole als Grund für zu hohe Messwerte an, die mit einem Fructosesensor in einer Fließinjektionsanalyse erhalten wurden. Die Verwendung einer Fließdiffusionsanalyse, bei der solche Stoffe durch eine Membran teilweise abgetrennt wurden, führte jedoch nicht zu besseren Ergebnissen.

Tab. 15: Konzentration ausgewählter Weininhaltsstoffe [116].

| Inhaltsstoff | Konzentrationsbereich |
|----------------------------|-----------------------|
| Gesamtzucker | 0 - 200 g/L |
| Fructose | 0 - 150 g/L |
| Glucose | 0 - 50 g/L |
| Ethanol | 44 - 120 g/L |
| Ascorbat | 0 - 10 mg/L |
| Schwefeldioxid, frei | 0 - 100 mg/L |
| Schwefeldioxid, gebunden | 20 - 400 mg/L |
| Phenole, gesamt (Weißwein) | 40 - 400 mg/L |
| Phenole, gesamt (Rotwein) | 300 - 4000 mg/L |

Im Vergleich zu der vom Prinzip her sehr ähnlichen enzymatischen Referenzmethode, allerdings unter Verwendung anderer Enzyme, war die Übereinstimmung der Multianalysensoren mit der nasschemischen Referenzmethode bei der Bestimmung des Gesamtzuckergehaltes im Wein, die durch Messung und Addition der Glucose- und

Fructosekonzentration erfolgte, schlechter. Mit den Multianalysensoren wurden systematisch niedrigere Werte bestimmt. Der Zuckergehalt der untersuchten Weine lag in diesem Fall zwischen 2 und 58 g/L. Wenn man von einem Glucose/Fructose-Verhältnis von 1:1 ausgeht, ergibt sich für die Probe mit dem niedrigsten Zuckergehalt für beide Zucker eine Konzentration von 1 g/L. Die Nachweisgrenze wurde für den Glucosesensor mit 5 μM Glucose (entsprechend einem Strom von 3 nA bei einer Sensitivität des Glucosesensors von 0,6 nA/ μM) und für den Fructosesensor mit 30 μM Fructose (entsprechend einem Strom von 2,4 nA bei einer Sensitivität des Fructosesensors von 0,08 nA/ μM) angegeben. Aufgrund des geringeren Rauschens konnten mit dem Fructosesensor kleinere Ströme gemessen werden als mit dem Glucosesensor. Eine Konzentration von 1 g/L entspricht bei der hier durchgeführten Verdünnung von 1:200 einem Strom von 16,7 nA am Glucosesensor und von 1,65 nA am Fructosesensor und ist daher mit den Sensoren noch bestimmbar. Bei den Messungen in Realproben wurde die Verdünnung jeweils der Zuckerkonzentration der Probe angepasst, so dass ein Arbeiten im linearen Messbereich gewährleistet war. Lineare Messbereiche bis mindestens 1,24 mM für den Glucose- und Saccharosesensor sowie bis mindestens 2,23 mM für den Fructosesensor waren daher ausreichend, und es war nicht notwendig, zusätzliche Diffusionsmembranen zur Erweiterung des linearen Messbereiches, die immer auch zu einer Verringerung der Sensitivität und damit der Nachweisgrenze führen, zu verwenden.

Bei Proben mit niedrigen Gesamtzuckergehalten zwischen 2 und 6 g/L lagen die Abweichungen vom Referenzwert zwischen -29 und -63%, bei Proben mit Gesamtzuckergehalten von mehr als 10 g/L zwischen -4 und -19%. Die Präzision der Sensoren war mit einer relativen Standardabweichung von maximal 7% auch in diesem Fall gut. Bei den nasschemischen Bestimmungen nach Luff-Schorl und Dr. Jacob werden nicht nur die Hexosen Glucose und Fructose erfasst, sondern auch die im Wein vorliegenden, nicht vergärbaren Pentosen Arabinose und Rhamnose [3]. Der Arabinosegehalt liegt typischerweise zwischen 0,2 und 1,5 g/L, der Rhamnosegehalt beträgt 0,1 bis 0,5 g/L [116]. In Weinen aus botrytisfaulem Lesegut kann insbesondere der Arabinosegehalt noch wesentlich höher sein und in Mengen von einigen Gramm vorliegen [178]. Im Mittel kann von einer Konzentration der Pentosen von etwa 1 g/L ausgegangen werden. Zur Bestimmung der vergärbaren Zucker wird daher vom Gesamtzucker 1 g/L abgezogen [3, 113]. Da die Pentosen mit den Multianalysensoren nicht erfasst werden, kommt es zwangsläufig zu unterschiedlichen Ergebnissen, insbesondere bei Proben mit einem niedrigen Gesamtzuckergehalt, bei denen eine Konzentration der Pentosen von 1 g/L bis zu 50% der Konzentration an Glucose und Fructose entsprechen kann.

Die Multianalysensoren sollen nicht nur zur Analytik gebrauchsfertiger Weine (z. B. bei Untersuchungsämtern) eingesetzt werden, sondern insbesondere bei der Weinbereitung

durch den Winzer, der dadurch die Möglichkeit hat, das Fortschreiten der Gärung zu verfolgen und den richtigen Zeitpunkt zum Abstoppen der Gärung festzustellen. Um die Eignung der Sensoren für diese Anwendung zu überprüfen, wurde ein kompletter Gärverlauf mit den Multianalysensoren charakterisiert. Die Abweichung von den Referenzwerten, die mit der HPLC bestimmt wurden, lag auch hier in den meisten Fällen unter 10%, ebenso wie die relative Standardabweichung. Die gute Übereinstimmung sowohl mit den enzymatischen als auch mit den durch HPLC bestimmten Referenzwerten ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die starken Abweichungen von den nasschemischen Referenzwerten nicht auf den Sensor zurückzuführen sind. Es war deutlich zu erkennen, dass während der Gärung zunächst überwiegend Glucose und in geringerem Maße Fructose umgesetzt wurde. Da das Glucose/Fructose-Verhältnis vom Vergärungsgrad abhängt [2], sind die Multianalysensoren dazu geeignet, das Fortschreiten der Gärung zu verfolgen. Besonders vorteilhaft wäre hierbei die gleichzeitige Bestimmung der Zunahme des Alkoholgehaltes. Zu diesem Zweck wurde bereits ein Alkoholsensor auf der Basis einer Alkoholoxidase entwickelt [157], der nach weiteren Optimierungen ideal mit den Zuckersensoren kombiniert werden könnte. Bei den Messungen in den Gärproben wurde kein Matrix- und Verdünnungseffekt beobachtet. Zum einen konnten bei einem Vergleich der Zuckerkonzentrationen, die durch Auswertung des Kalibrationsschrittes vor und nach der Probenzugabe ermittelt wurden, keine eindeutigen Tendenzen festgestellt werden. Zum anderen wurden bei verschiedenen Verdünnungen einer Probe immer annähernd die gleichen Werte erhalten. Weiterhin machte es keinen Unterschied, ob in sterilfiltrierten oder unfiltrierten Proben gemessen wurde. Dies ist ein erheblicher Vorteil für die einfache und schnelle Anwendung der Multianalysensoren, da der Anwender die Proben vor der Messung keiner Vorbehandlung unterziehen muss. Darüberhinaus stellt dies eine starke Vereinfachung gegenüber der photometrischen Messung dar, bei der Trübstoffe - und auch die Farbstoffe im Rotwein - das Messergebnis verfälschen und die Probe daher vor der Messung filtriert bzw. geklärt werden muss.

Bei den Messungen in Realproben wurde in dieser Arbeit ein Kalibrationsschritt vor und nach der Probenzugabe durchgeführt, um eventuell vorhandene Matrixeffekte feststellen zu können. Da sich jedoch durch die Auswertung der beiden Kalibrationsschritte keine systematischen Unterschiede im Bezug auf die Abweichung vom Referenzwert ergaben, genügt zukünftig die Durchführung eines Kalibrationsschrittes. Nach der Einstellung des Grundstromes, die bei angelegtem Potential maximal 30 Sekunden dauert, erfolgt dann zunächst die Zugabe der Probe. Nach 2 min wird die kombinierte Glucose-/Fructose-Kalibrationslösung zugegeben. Während die Ansprechzeit t_{90} des Fructosesensors 90 bis 120 s beträgt, ist die Glucosemessung bereits nach etwa 30 s abgeschlossen. Die Zeit, die der Fructosesensor zum Erreichen eines stabilen Signals benötigt, kann daher für die Saccharose-Kalibration genutzt werden, die getrennt von der Glucosekalibration erfolgen

muss, damit auch die Bestimmung der Sensitivität des Saccharosesensors für Glucose möglich ist. Die Kalibrierung aller drei Sensoren ist daher innerhalb von 2 min abgeschlossen. Die Messung der Probe und die Kalibrierung der Sensoren dauert somit 4,5 min. Zwischen den einzelnen Messungen wird eine Minute für den Pufferwechsel und das Spülen des Sensors benötigt, das ähnlich wie bei der Messung mit einer pH-Elektrode abläuft. Ein kompletter Messzyklus dauert also 5,5 min, so dass in einer Stunde bis zu 10 Bestimmungen durchgeführt werden können. Hinzugerechnet werden muss vor der ersten Messung mit einem neuen Sensor das Quellen der Membranen mit 10 Minuten sowie die Vorkonditionierung mit 4 Minuten. Diese Schritte entfallen bei jeder weiteren Messung.

Dies stellt einen erheblichen zeitlichen Vorteil gegenüber den nasschemischen Bestimmungsmethoden dar. Die Dauer der Bestimmung nach Luff-Schorl wird mit etwa 30 min pro Probe angegeben [178]. Außerdem kann der Winzer mit den Multianalysensoren - im Gegensatz zu einer nasschemischen, enzymatisch-photometrischen oder HPLC-Bestimmung, die alle an die Durchführung in einem Analysenlabor gebunden sind - die Analyse schnell und einfach selbst durchführen. Dadurch entfallen Transporte zu einem zentralen Labor, die mit einem beträchtlichen Zeitverlust verbunden sind, bis das Analyseergebnis vorliegt und der Winzer hat die Möglichkeit, schneller in den Gärprozess einzugreifen, wodurch die Einstellung der Restsüße des Weines und damit die gezielte Produktion von Weinen hoher Qualität wesentlich vereinfacht wird. Der wesentliche Vorteil der Multianalysensoren gegenüber den nasschemischen Methoden besteht dabei in der Möglichkeit, die Konzentrationen der einzelnen Zucker zu bestimmen. Durch die Kenntnis des Glucose/Fructose-Verhältnisses ist neben der bereits erwähnten Kontrolle des Gärverlaufs z. B. der Nachweis einer eventuellen Süßung möglich, da Weine, bei denen eine Süßung vorgenommen wurde, ein charakteristisches Verhältnis aus Glucose und Fructose aufweisen, während Weine, deren Restsüße aus einer gestoppten Gärung resultiert, fast ausschließlich Fructose enthalten. Außerdem ist die getrennte Bestimmung von Glucose und Fructose wichtig zur Bezeichnung eines Weines als Diabetikerwein. Darüberhinaus können durch die Verwendung der Multianalysensoren anstelle nasschemischer Analysemethoden große Mengen an schwermetallhaltigen Chemikalien eingespart werden, die bei nicht ordnungsgemäßer Entsorgung als bedenklich für die Umwelt einzustufen sind. Dieser Aspekt führte dazu, dass die Entwicklung der Multianalysensoren zusammen mit einem Handmessgerät im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit einer mittelständischen Firma von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt gefördert wurde. Abb. 56 zeigt den Prototyp des Vinoquant-Analysensystem des Projektpartners Leo Kübler GmbH, das bereits auf mehreren Weinfachmessen sowie einer Biotechnologiemesse präsentiert wurde.

Bei den in der Literatur beschriebenen Enzymsensoren, die zur Zuckerbestimmung in Wein eingesetzt wurden, handelte es sich hauptsächlich um Glucosesensoren [33, 34, 132-136],

teilweise in Kombination mit einem Alkoholsensor [34, 133]. In einem Fall wurden Enzymreaktoren zur Bestimmung von Glucose und Fructose in Wein beschrieben [135]. Durch Verwendung der Enzyme Hexokinase und Glucose-6-phosphatdehydrogenase bzw. zusätzlich Phosphoglucose-Isomerase beruhte die Bestimmung mit den Reaktoren auf dem gleichen Prinzip wie die Bestimmung mit enzymatisch-photometrischen Tests, bei denen die Fructosekonzentration durch Differenzbildung ermittelt werden muss. Mit den Enzymsensoren von *Miertuš et al.* können die Analyte Glucose, Fructose und Ethanol gleichzeitig bestimmt werden [84]. Die Sensoren wiesen eine gute Stabilität und eine gute Übereinstimmung mit den Referenzwerten auf. Das Biosensorsystem wird unter dem Namen Wine Checker "PerBacco 2000" kommerziell vertrieben [128], ist jedoch zumindest auf dem deutschen Markt bislang wenig bekannt.



Abb. 56: Prototyp des Vinoquant Analysensystems des Projektpartners Leo Kübler GmbH.

Als Hauptkonkurrenten des hier entwickelten Vinoquant-Analysensystems erwiesen sich das Handmessgerät SensLab 1 mit den Enzymsensoren der Firma SensLab [131] sowie das Reflectoquant[®]-System der Firma Merck [126], das auf enzymatischer Messung mit optischer Detektion eines gebildeten unlöslichen Farbstoffs in einem Teststreifen beruht. Beide Systeme können jedoch immer nur einen Analyten zur Zeit bestimmen, zur Bestimmung verschiedener Analyte müssen die Enzymsensoren bzw. Teststäbchen ausgetauscht werden. Daher ist mit den Multianalysensoren gegenüber diesen Systemen ein Zeitvorteil zu erwarten. Für die SensLab-Sensoren wird eine Zeit von drei Minuten für einen kompletten Messzyklus inklusive Spülen des Sensors angegeben [131]. Da zur Saccharosebestimmung

auch die Sensitivität des Saccharosesensors für Glucose berücksichtigt werden muss [158], wären somit zur Bestimmung der Zucker Glucose, Saccharose und Fructose vier Messzyklen notwendig. Dies entspricht einer Zeit von 12 min gegenüber 5,5 min, die bei der Messung mit den Multianalysensoren benötigt werden. Darüberhinaus wurde bei den Multianalysensoren mit Fructose ein Parameter etabliert, der bei SensLab und Merck noch nicht standardmäßig erhältlich ist.

In der Zukunft ist die Entwicklung weiterer Enzymsensoren auf der Basis von Oxidoreduktasen zur Bestimmung bei der Weinbereitung relevanter Analyte geplant. Dazu wurde bereits ein Alkoholsensor entwickelt [157]. Erste Ergebnisse liegen auch für einen Lactat- [175] sowie für einen Gluconatsensor [179] vor. Außerdem wird die Entwicklung eines Malatsensors angestrebt, der zusammen mit dem Lactatsensor die Kontrolle der sogenannten malo-laktischen Gärung erlaubt, die bei hochwertigen Weinen eine Rolle spielt, sowie die Entwicklung eines Glycerinsensors. Glycerin stellt ein wichtiges Nebenprodukt der Gärung dar und verleiht dem Wein Vollmundigkeit und abgerundeten Geschmack. Bei der Entwicklung weiterer Enzymsensoren für die Weinanalytik sollen weiterhin die Sensorkarten mit jeweils vier Elektroden verwendet werden und keine Sensorkarten mit beispielsweise acht Elektroden, da es schwierig ist, Reaktionsbedingungen zu finden, bei denen mit vielen verschiedenen Enzymsensoren gleichzeitig gearbeitet werden kann. Schon bei dem in dieser Arbeit beschriebenen Multianalysensensor zur Bestimmung von Glucose, Fructose und Saccharose musste ein Kompromiss bezüglich des pH-Wertes der Messlösung gefunden werden. Auf den Sensorkarten können dann jeweils mehrere Enzymsensoren, die sich im Hinblick auf die Verdünnung der Probe und die optimalen Messbedingungen am besten kombinieren lassen, zusammengefasst werden. Potentielle Anwender des entwickelten Analysensystems sind neben Winzereien auch Brennereien, Fruchtsaftbetriebe und Brauereien. Der wichtigste Zucker im Bier ist die Maltose, für deren Bestimmung ebenfalls bereits ein Enzymsensor entwickelt wurde [180].

7 Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit gelang die Entwicklung eines Multianalysensensors zur simultanen Bestimmung der Zucker Glucose, Saccharose und Fructose für die Überwachung von Gärprozessen. Die Enzymsensoren zur Bestimmung der drei Zucker wurden zunächst getrennt voneinander entwickelt, optimiert und charakterisiert und anschließend zu einem Multianalysensensor kombiniert.

Die Herstellung der amperometrischen Transducer erfolgte in der Siebdrucktechnik. In einem Druckvorgang konnten bis zu 1000 Sensorkarten mit guter Reproduzierbarkeit hergestellt werden. Zu Beginn der Arbeit wurden einige Experimente mit Einzelsensoren mit nur einer Platinarbeits Elektrode durchgeführt, anschließend wurden die neu entwickelten Sensorkarten mit vier Platinarbeits Elektroden sowie je einer integrierten Ag/AgCl-Referenz- und Graphitgegenelektrode verwendet. Die Glucose- und Saccharosesensoren auf Basis der Einzelsensoren und auf Basis der Sensorkarten zeigten vergleichbare Eigenschaften.

Der Glucosesensor wurde durch Immobilisierung des Enzyms Glucoseoxidase in einem Poly(carbamoylsulfonat)-Hydrogel (PCS-Gel) hergestellt. Die Glucosebestimmung erfolgte durch amperometrische Detektion des bei der enzymatischen Reaktion gebildeten Wasserstoffperoxids, das bei +600 mV vs. Ag/AgCl anodisch oxidiert wurde. Die Sensitivität der Glucosesensoren betrug im Phosphatpuffer mit pH 7,0 durchschnittlich 0,7 nA/ μ M, der lineare Messbereich reichte bis mindestens 1,24 mM und die Ansprechzeiten t_{90} lagen unter 20 s.

Durch Coimmobilisierung der Enzyme Invertase, Mutarotase und Glucoseoxidase im PCS-Gel wurde ein Saccharosesensor realisiert. Die Saccharosebestimmung basierte somit ebenfalls auf der H₂O₂-Detektion. Die Sensitivität der Sensoren betrug im Phosphatpuffer mit pH 7,0 durchschnittlich 0,7 nA/ μ M für Saccharose und 0,9 nA/ μ M für Glucose. Die Saccharosekonzentration wurde durch Differenzbestimmung mit dem Glucosesensor unter Verwendung der jeweiligen Sensitivitäten berechnet. Der lineare Messbereich reichte für beide Analyte bis mindestens 1,24 mM und die Ansprechzeiten t_{90} lagen jeweils unter 30 s.

Für die Fructosebestimmung mit dem Enzym Fructosedehydrogenase war die Verwendung eines Mediators zum Elektronentransfer zwischen Enzym und Elektrode notwendig. Als löslicher Mediator wurde Kaliumhexacyanoferrat gewählt, dessen Umsetzung an der Elektrode bei +400 mV vs. Ag/AgCl das Messsignal lieferte. Die bisher verwendete Immobilisierung im PCS-Gel erwies sich für die Fructosedehydrogenase als ungeeignet, die Immobilisierung wurde deshalb durch Vernetzung mit BSA und Glutaraldehyd durchgeführt. Die Fructosesensoren zeigten im Citrat-Phosphat basierten Mc Ilvaine Puffer mit pH 5,0 eine durchschnittliche Sensitivität von 0,08 nA/ μ M. Der lineare Messbereich reichte bis

mindestens 2,23 mM und die Ansprechzeiten t_{90} lagen zwischen 90 und 120 s.

Zur Herstellung der Multianalysensoren diente jeweils eine der vier Arbeitselektroden auf der Sensorkarte als Glucose-, Saccharose- bzw. Fructosesensor. Die vierte Arbeitselektrode wurde als Blindsensor zur Detektion eventueller Störsignale ausgelegt. Die einzelnen Enzymsensoren beeinflussten sich nach ihrer Kombination auf der Sensorkarte bei der Messung im Mc Ilvaine Puffer mit pH 5,0 nicht gegenseitig.

Aufgrund der um eine Größenordnung niedrigeren Sensitivität des Fructosesensors im Vergleich zu den Sensitivitäten des Glucose- und Saccharosesensors im jeweils optimalen Messpuffer wurde der Mc Ilvaine Puffer mit pH 5,0 als Kompromiss für die Messungen mit den Multianalysensoren gewählt. Am stärksten beeinträchtigt wurde dadurch die Sensitivität des Saccharosesensors für Saccharose, die mit 0,07 bis 0,10 nA/ μ M nun in der Größenordnung der Sensitivität des Fructosesensors lag, jedoch immer noch hoch genug für eine problemlose Auswertung war.

Im Hinblick auf die Temperaturabhängigkeit zeigten der Glucose- und der Saccharosesensor im untersuchten Bereich von 15 bis 35 °C eine Zunahme der Sensitivität mit steigender Temperatur, während für den Fructosesensor die höchsten Signale bei einer Temperatur von 25 °C erhalten wurden.

Entsprechend des mit den Multianalysensoren verfolgten Konzeptes, den Sensor nicht als echten Einwegsensoren auszulegen, sondern jeweils für einen Tag Messungen mit demselben Sensor zu ermöglichen, war die Arbeitsstabilität der Multianalysensoren von großer Bedeutung. Über einen Zeitraum von 10 h zeigte der Glucosesensor vollständig stabile Signale. Die Signale des Fructosesensors betragen bei der letzten Messung noch 77% des Anfangswertes, die des Saccharosesensors lagen bei 70% des Anfangswertes für Glucose und 30% des Anfangswertes für Saccharose. Dabei nahm die Sensitivität des Saccharosesensors für Saccharose jedoch bereits nach 1 h um 50% ab. Da das Messkonzept jedoch bei jeder Messung einer unbekannt Probe eine Einpunkt-Kalibration zur Bestimmung der relevanten Sensitivitäten vorsah, konnten die Sensoren problemlos einen Tag lang verwendet werden.

Im Hinblick auf eine spätere Produktion und den Vertrieb der Multianalysensoren durch eine kooperierende Firma und den Einsatz der Sensoren durch den Winzer in der Vor-Ort-Analytik musste auch eine ausreichende Lagerstabilität gewährleistet werden. Die Lagerstabilität der zunächst untersuchten Glucose- und Saccharose-Einzelsensoren war sehr gut. Die höchste Stabilität der Sensoren wurde bei einer trockenen, gekühlten Lagerung erreicht. Die auf diese Weise gelagerten Glucosesensoren wiesen nach 6 Monaten noch 80% und nach einem Jahr noch 50% der ursprünglichen Signale auf. Bei den Saccharosesensoren kam es nach einer Woche sogar zu einer Zunahme der Signale um bis zu 70% für die Saccharosemessung und um bis zu 50% für die Glucosemessung. Auf

diesem Niveau blieben die Signale über einen Zeitraum von 6 Monaten annähernd konstant und erreichten nach einem Jahr die Anfangswerte.

Die Stabilität der Multianalysensoren wurde über einen Zeitraum von 3 Monaten verfolgt. Ohne Zusatz stabilisierender Additive besaß der Glucosesensor nach dieser Zeit noch 80% seiner ursprünglichen Sensitivität, der Saccharosesensor 87% der Anfangssensitivität für Glucose und 45% der Anfangssensitivität für Saccharose. Der Fructosesensor zeigte ebenfalls 45% des ursprünglichen Signals. Während das Additiv Trehalose zu einer Destabilisierung des Saccharosesensors führte, waren die aus der Enzymtechnologie bekannten Additive Hydroxyectoin und Hydroxypropyl- β -cyclodextrin zur Stabilisierung aller drei Enzymsensoren geeignet, so dass nach dreimonatiger Lagerung sowohl absolut gesehen als auch relativ, bezogen auf das Anfangssignal, höhere Signale erreicht wurden als ohne Additiv.

Das Nafion[®]-Polymer war zum Ausschluss von Störsubstanzen bei der Messung mit den Multianalysensoren nicht geeignet. Zwar konnten bei reinen Glucose- oder Saccharosesensoren im Puffer mit pH 7,0 ohne Mediator Störsignale, die durch Ascorbat und Sulfid verursacht wurden, durch die Nafion[®]-Membran vollständig ausgeschlossen werden, bei den Multianalysensoren im Puffer mit pH 5,0 und mit Hexacyanoferrat als Mediator kam es jedoch sowohl ohne als auch mit Nafion[®]-Membran zu starken Störsignalen. Darüberhinaus wurde am Fructosesensor mit Nafion[®]-Membran kein Fructosesignal erhalten, da der negativ geladene Mediator offensichtlich von der Elektrode ferngehalten wurde. Aufgrund der geringen Störstoffkonzentration in Wein im Vergleich zu den Konzentrationen der zu bestimmenden Zucker erwies sich die Verwendung einer anderen semipermeablen Membran jedoch als nicht notwendig.

Bei der simultanen Bestimmung der Glucose- und Fructosekonzentration in Weinen sowie der Glucose-, Fructose- und Saccharosekonzentration in Sekten ergab sich eine gute Übereinstimmung der mit den Multianalysensoren erhaltenen Werte mit den enzymatisch-photometrisch bestimmten Referenzwerten. Sowohl die Abweichung vom Referenzwert als auch die relative Standardabweichung der Sensoren lag im allgemeinen unter 10%. Die Übereinstimmung der Multianalysensoren mit den nasschemischen Referenzmethoden bei der Bestimmung des Gesamtzuckergehaltes war dagegen schlechter, da diese Methoden die einzelnen Zucker nicht getrennt, sondern als Summe aller reduzierenden Zucker erfassen, somit auch die Pentosen Arabinose und Rhamnose. Mit dem Multianalysensensor wurden dadurch systematisch niedrigere Werte erhalten.

Als Bewährungsprobe unter möglichst realistischen Bedingungen gelang mit den Multianalysensoren die Charakterisierung eines kompletten Gärverlaufs. Die Abweichung vom Referenzwert, der hier mittels HPLC bestimmt wurde, sowie die relative Standardabweichung der Sensoren lag in den meisten Fällen unter 10%. Bei den

Messungen der Gärproben wurde kein Matrix- und Verdünnungseffekt beobachtet. Außerdem konnten auch unfiltrierte Proben gemessen werden. Wie erwartet wurde während der Gärung zunächst überwiegend Glucose und in geringerem Maße Fructose umgesetzt, so dass das Fortschreiten der Gärung sehr gut mit den Multianalysensoren verfolgt werden konnte. Damit sind in dieser Arbeit die Voraussetzungen geschaffen worden, mit Multianalysensoren eine schnelle, zuverlässige Vor-Ort-Analytik bei der Überwachung von Gärprozessen durchführen zu können.

8 Literatur

- 1 Matissek, R., Schnepel, F.-M., Steiner, G., Lebensmittelanalytik. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1992.
- 2 Prior, B., Das Glucose/Fructose-Verhältnis im Most während der Gärung. Diplomarbeit, Fachhochschule Wiesbaden, Fachbereich Weinbau und Getränketechnologie, Geisenheim, 1989.
- 3 Schmitt, A., Aktuelle Weinanalytik - ein Leitfaden für die Praxis. Verlag Heller Chemie- und Verwaltungsgesellschaft mbH, Schwäbisch Hall, 1983.
- 4 Rapp, A., Weinanalytik. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1985.
- 5 Cammann, K. (Hrsg.), Instrumentelle Analytische Chemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin, 2001.
- 6 Hall, E. A. H., Biosensoren. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1990.
- 7 Scheller, F., Schubert, F., Biosensoren. Birkhäuser Verlag, Berlin, 1989.
- 8 Clark, L. C., Lyons, C., Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102 (1962) 29-45.
- 9 Alvarez-Icaza, M., Bilitewski, U., Mass production of biosensors. *Anal. Chem.* 65 (1993) 525A-533A.
- 10 Stryer, L., Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996.
- 11 Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M., Prinzipien der Biochemie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2001.
- 12 Bartlett, P. N., Whitaker, R. G., Strategies for the development of amperometric enzyme electrodes. *Biosens.* 3 (1987/1988) 359-379.
- 13 Duine, J. A., Frank Jzn., J., Quinoproteins: a novel class of dehydrogenases. *Trends Biochem. Sci.* 6 (1981) 278-280.
- 14 Marcinkeviciene, J., Johansson, G., Kinetic studies of the active sites functioning in the quinohemoprotein fructose dehydrogenase. *FEBS Letters* 318 (1993) 23-26.
- 15 Salisbury, S. A., Forrest, H. S., Cruse, W. B. T., Kennard, O., A novel coenzyme from bacterial primary alcohol dehydrogenases. *Nature* 280 (1979) 843-844.
- 16 Duine, J. A., Frank Jzn., J., Verwiel, P. E. J., Structure and activity of the prosthetic group of methanol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 108 (1980) 187-192.

- 17 Duine, J. A., Quinoproteins: enzymes containing the quinoid cofactor pyrrolochinoline quinone, topaquinone or tryptophan-tryptophan quinone. *Eur. J. Biochem.* 200 (1991) 271-284.
- 18 Duine, J. A., The PQQ story. *J. Biosci. Bioeng.* 88 (1999) 231-236.
- 19 Goodwin, P. M., Anthony, C., The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. *Adv. Microb. Physiol.* 40 (1998) 1-80.
- 20 Anthony, C., Pyrrolochinoline quinone (PQQ) and quinoprotein enzymes. *Antioxidants & Redox Signaling* 3 (2001) 757-774.
- 21 Matsushita, K., Tomaya, H., Yamada, M., Adachi, O., Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58 (2002) 13-22.
- 22 D'Costa, E. J., Higgins, I. J., Turner, A. P. F., Quinoprotein glucose dehydrogenase and its application in an amperometric glucose sensor. *Biosens.* 2 (1986) 71-87.
- 23 Davidson, V. L., Jones, L. H., Intermoleclar electron transfer from quinoproteins and its relevance to biosensor technology. *Anal. Chim. Acta* 249 (1991) 235-240.
- 24 Schomburg, D., Salzmann, M. (Hrsg.), *Enzyme Handbook*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995.
- 25 Bergmeyer, H. U., *Methods of Enzymatic Analysis*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1987.
- 26 Toyobo Enzymes, Invertase. Produktinformation, Toyobo, Japan, 1998/1999.
- 27 Yamada, Y., Aida, K., Uemura, T., A new enzyme, D-fructose dehydrogenase. *Agric. Biol. Chem.* 30 (1966) 95-96.
- 28 Ameyama, M., Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O., D-Fructose dehydrogenase of *Gluconobacter industrius*: purification, characterization, and application to enzymatic microdetermination of D-fructose. *J. Bacteriol.* 145 (1981) 814-823.
- 29 Toyobo Enzymes, D-Fructose dehydrogenase. Produktinformation, Toyobo, Japan, 1998/1999.
- 30 Sprules, S. D., Hartley, I. C., Wedge, R., Hart, J. P., Pittson, R., A disposable reagentless screen-printed amperometric biosensor for the measurement of alcohol in beverages. *Anal. Chim. Acta* 329 (1996) 215-221.
- 31 Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionin adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnol. Bioeng.* 68 (2000) 98-105.

- 32 Ianniello, R. M., Yacynych, A. M., Immobilized enzyme chemically modified electrode as an amperometric sensor. *Anal. Chem.* 53 (1981) 2090-2095.
- 33 Bilitewski, U., Chemnitz, G. C., Rüger, P., Schmid, R. D., Miniaturized disposable biosensors. *Sens. Actuators B* 7 (1992) 351-355.
- 34 Rüger, P., Bilitewski, U., Schmid, R. D., Glucose and ethanol biosensors based on thick-film technology. *Sens. Actuators B* 4 (1991) 267-271.
- 35 Bilitewski, U., Jäger, A., Rüger, P., Weise, W., Enzyme electrodes for the determination of carbohydrates in food. *Sens. Actuators B* 15-16 (1993) 113-118.
- 36 Hanke, A., Eberhardt, A., Bilitewski, U., Galensa, R., Künnecke, W., Biosensoren in automatisierten Analysensystemen. *D. Lebensm. Rundsch.* 92 (1996) 35-39.
- 37 Hajizadeh, K., Halsall, H. B., Heineman, W. R., Immobilization of lactate oxidase in a poly(vinyl alcohol) matrix on platinized graphite electrodes by chemical cross-linking with isocyanate. *Talanta* 38 (1991) 37-47.
- 38 Rohm, I., Bilitewski, U., UV-polymerisierbare Enzympaste zur Herstellung von Biosensoren und damit hergestellte Biosensoren. Europäisches Patent (1996) EP 0 691 408 A1.
- 39 Rohm, I., Künnecke, W., Bilitewski, U., UV-polymerizable screen-printed enzyme pastes. *Anal. Chem.* 67 (1995) 2304-2307.
- 40 Rohm, I., Genrich, M., Collier, W., Bilitewski, U., Development of ultraviolet-polymerizable enzyme pastes: bioprocess applications of screen-printed L-lactate sensors. *Analyst* 121 (1996) 877-881.
- 41 Hampp, N., Eppelsheim, C., Popp, J., Bisenberger, M., Bräuchle, C., Design and application of thick-film multisensors. *Sens. Actuators A* 31 (1992) 144-148.
- 42 Popp, J., Silber, A., Bräuchle, C., Hampp, N., Sandwich enzyme membranes for amperometric multi-biosensor applications: improvement of linearity and reduction of chemical cross-talk. *Biosens. Bioelectron.* 10 (1995) 243-249.
- 43 Silber, A., Bisenberger, M., Bräuchle, C., Hampp, N., Thick-film multichannel biosensors for simultaneous amperometric and potentiometric measurements. *Sens. Actuators B* 30 (1996) 127-132.
- 44 Dave, B. C., Dunn, B., Selverstone Valentine, J., Zink, J. I., Sol-gel encapsulation methods for biosensors. *Anal. Chem.* 66 (1994) 1120A-1127A.
- 45 Umana, M., Waller, J., Protein-modified electrodes. The glucose oxidase/polypyrrole system. *Anal. Chem.* 58 (1986) 2979-2983.

- 46 Vorlop, K.-D., Muscat, A., Beyersdorf, J., Entrapment of microbial cells with polyurethane hydrogel beads with the average of low toxicity. *Biotechnol. Tech* 6 (1992) 483-488.
- 47 Vorlop, K.-D., Muscat, A., Biokatalysator auf Polyurethanbasis. Deutsches Patent (1993) DE 42 17 891 A1.
- 48 Vorlop, K.-D., Muscat, A., Biokatalysator auf Polyurethanbasis. Europäisches Patent (1993) EP 0 571 748 A2.
- 49 Schneider, J., Gründig, B., Renneberg, R., Cammann, K., Madras, M. B., Bick, R. P., Vorlop, K.-D., Hydrogel matrix for three enzyme entrapment in creatine/creatinine amperometric biosensing. *Anal. Chim. Acta* 325 (1996) 161-167.
- 50 Loechel, C., Chemnitz, G.-C., Borchardt, M., Cammann, K., Amperometric bi-enzyme based biosensor for the determination of lactose with an extended linear range. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 207 (1998) 381-385.
- 51 Meier, S., Entwicklung amperometrischer Enzymsensoren in Siebdrucktechnik zur Bestimmung von Glucose und Saccharose. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 1999.
- 52 Frebel, H., Amperometrische Enzymsensoren und Chemometrie - Neue Wege in der Biosensorik, Bestimmung biogener Amine für die Fischfrische. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 1999.
- 53 Erenkötter, A., Entwicklung eines Biosensors zur on-line Bestimmung des Creatinins im Dialysat von Hämodialysepatienten. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2000.
- 54 Röder, Y., Entwicklung eines enzymatischen Sensorsystems zur Bestimmung von Harnstoff im Dialysat. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2000.
- 55 Galinski, E. A., Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia* 49 (1993) 487-496.
- 56 Galinski, E. A., Pfeiffer, H. P., Trüper, H. G., 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid: a novel cyclic amino acid from halophilic phototropic bacteria of genus *Ectothiorhodospira halochloris*. *Eur. J. Biochem.* 149 (1985) 135-139.
- 57 Lippert, K., Galinski, E. A., Enzyme stabilisation by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37 (1992) 61-65.
- 58 Lippert, K., Vergleichende Untersuchungen zu den enzymstabilisierenden Eigenschaften der Ectoine. Dissertation, Universität Bonn, 1992.

- 59 Göller, K., Galinski, E. A., Protection of a model enzyme (lactate dehydrogenase) against heat, urea and freeze-thaw treatment by compatible solute additives. *J. Mol. Cat. B* 7 (1999) 37-45.
- 60 Knapp, S., Ladenstein, R., Galinski, E. A., Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes β -hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles* 3 (1999) 191-198.
- 61 Crowe, J. H., Carpenter, J. F., Crowe, L. M., Anchordoguy, T. J., Are freezing and drying similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiol.* 27 (1990) 219-231.
- 62 Carpenter, J. F., Crowe, J. H., An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochem.* 28 (1989) 3916-3922.
- 63 Izutsu, K., Yoshioka, S., Terao, T., Stabilization of β -galactosidase by amphiphilic additives during freeze-drying. *Int. J. Pharmaceut.* 90 (1993) 187-194.
- 64 Arakawa, T., Timasheff, S. N., The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.* 47 (1985) 411-414.
- 65 McAteer, K., Simpson, C. E., Gibson, T. D., Gueguen, S., Boujtita, M., El Murr, N., Proposed model for shelf-life prediction of stabilised commercial enzyme-based systems and biosensors. *J. Mol. Cat. B* 7 (1999) 47-56.
- 66 Gibson, T. D., Hulbert, J. N., Parker, S. M., Woodward, J. R., Higgins, I. J., Extended shelf life of enzyme-based biosensors using a novel stabilization system. *Biosens. Bioelectron.* 7 (1992) 701-708.
- 67 Schumacher, J. T., Münch, I., Richter, T., Rohm, I., Bilitewski, U., Investigations with respect to stabilization of screen-printed enzyme electrodes. *J. Mol. Cat. B* 7 (1999) 67-76.
- 68 Gavalas, V. G., Chaniotakis, N. A., Polyelectrolyte stabilized oxidase based biosensors: effect of diethylaminoethyl-Dextran on the stabilization of glucose and lactate oxidases into porous conductive carbon. *Anal. Chim. Acta* 404 (2000) 67-73.
- 69 Hart, A. L., Cox, H., Janssen, D., Stabilization of lactate oxidase in screen-printed enzyme electrodes. *Biosens. Bioelectron.* 11 (1996) 833-837.
- 70 Cammann, K., Lemke, U., Rohen, A., Sander, J., Wilken, H., Winter, B., Chemo- und Biosensoren - Grundlagen und Anwendungen. *Angew. Chem.* 103 (1991) 519-541.
- 71 Speiser, B., *Elektroanalytische Methoden I: Elektrodenreaktionen und Chronoamperometrie.* ChiuZ 15 (1981) 21-26.
- 72 Wedler, G., *Lehrbuch der Physikalischen Chemie.* VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1987.

- 73 Galán-Vidal, C. A., Muñoz, J., Domínguez, C., Alegret, S., Chemical sensors, biosensors and thick-film technology. *Trends in Anal. Chem.* 14 (1995) 225-231.
- 74 Wang, J., Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges. *Electroanal.* 13 (2001) 983-988.
- 75 Wilkins, E., Atanasov, P., Glucose monitoring: state of the art and future possibilities. *Med. Eng. Phys.* 18 (1996) 273-288.
- 76 Hart, J. P., Wring, S. A., Screen-printed voltammetric and amperometric electrochemical sensors for decentralized testing. *Electroanal.* 6 (1994) 617-624.
- 77 Hart, J. P., Wring, S. A., Recent developments in the design and application of screen-printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses. *Trends in Anal. Chem.* 16 (1997) 89-103.
- 78 Palleschi, G., Cubadda, R., Electrochemical biosensors for food analysis and the food industry. *Ital. J. Food Sci.* 13 (2001) 137-157.
- 79 Maines, A., Ashworth, D., Vadgama, P., Enzyme electrodes for food analysis. *Food technol. biotechnol.* 34 (1996) 31-42.
- 80 Wagner, G., Guilbault, G. G., Food biosensor analysis. Marcel Dekker Verlag, New York, 1984.
- 81 Habermüller, K., Mosbach, M., Schuhmann, W., Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 560-568.
- 82 Mayer, M., Genrich, M., Künnecke, W., Bilitewski, U., Automated determination of lactulose in milk using an enzyme reactor and flow analysis with integrated dialysis. *Anal. Chim. Acta* 324 (1996) 37-45.
- 83 Stredansky, M., Pizzariello, A., Stredanska, S., Miertuš, S., Determination of D-fructose in foodstuffs by an improved amperometric biosensor based on a solid binding matrix. *Anal. Commun.* 36 (1999) 57-61.
- 84 Miertuš, S., Katrlík, J., Pizzariello, A., Středanský, Švitel, J., Švorc, J., Amperometric biosensors based on solid binding matrices applied in food quality monitoring. *Biosens. Bioelectron.* 13 (1998) 911-923.
- 85 Antiochia, R., Palleschi, G., A tri-enzyme electrode probe for the sequential determination of fructose and glucose in the same sample. *Anal. Letters* 30 (1997) 683-697.
- 86 Xie, X., Kuan, S. S., Guilbault, G. G., A simplified fructose biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 6 (1991) 49-54.

- 87 Matsumoto, K., Baeza Baeza, J. J., Mottola, H. A., Simultaneous kinetic-based determination of fructose and ascorbate with a rotating bioreactor and amperometric detection: application to the analysis of food samples. *Anal. Chem.* 65 (1993) 1658-1661.
- 88 Matsumoto, K., Kamikado, H., Matsubara, H., Osajima, Y., Simultaneous determination of glucose, fructose, and sucrose in mixtures by amperometric flow injection analysis with immobilized enzyme reactors. *Anal. Chem.* 60 (1988) 147-151.
- 89 Matsumoto, K., Hamada, O., Ukeda, H., Osajima, Y., Amperometric flow injection determination of fructose with immobilized fructose 5-dehydrogenase reactor. *Anal. Chem.* 58 (1986) 2732-2734.
- 90 Garcia, C. A. B., de Oliveira Neto, G., Kubota, L. T., New fructose biosensors utilizing a polypyrrole film and D-fructose 5-dehydrogenase immobilized by different processes. *Anal. Chim. Acta* 374 (1998) 201-208.
- 91 Khan, G. F., Kobatake, E., Ikariyama, Y., Aizawa, M., Amperometric biosensor with PQQ enzyme immobilized in a mediator-containing polypyrrole matrix. *Anal. Chim. Acta* 281 (1993) 527-533.
- 92 Khan, G. F., Shinohara, H., Ikariyama, Y., Aizawa, M., An amperometric biosensor for fructose using a PQQ enzyme. *Sens. Actuators B* 13-14 (1993) 673-674.
- 93 Bassi, A. S., Lee, E., Zhu, J.-X., Carbon paste mediated, amperometric, thin film biosensors for fructose monitoring in honey. *Food Research Internat.* 31 (1998) 119-127.
- 94 Boujtita, M., El Murr, N., Ferrocene-mediated carbon paste electrode modified with D-fructose dehydrogenase for batch mode measurement of D-fructose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 89 (2000) 55-66.
- 95 Tkáč, J., Voštiar, I., Šturdík, E., Gemeiner, P., Mastihuba, V., Annus, J., Fructose biosensor based on D-fructose dehydrogenase immobilised on a ferrocene-embedded cellulose acetate membrane. *Anal. Chim. Acta* 439 (2001) 39-46.
- 96 Darder, M., Casero, E., Pariente, F., Lorenzo, E., Biosensors based on membrane-bound enzymes immobilized in a 5-(octyldithio)-2-nitrobenzoic acid layer on gold electrodes. *Anal. Chem.* 72 (2000) 3784-3792.
- 97 Shinohara, H., Kusaka, T., Yokota, E., Monden, R., Sisido, M., Electron transfer between redox enzymes and electrodes through artificial redox proteins and its application for biosensors. *Sens. Actuators B* 65 (2000) 144-146.

- 98 Narváez, A., Suárez, G., Popescu, I. C., Katakis, I., Domínguez, E., Reagentless biosensors based on self-deposited redox polyelectrolyte-oxidoreductases architectures. *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 43-52.
- 99 Paredes, P. A., Parellada, J., Fernández, V. M., Katakis, I., Domínguez, E., Amperometric mediated carbon paste biosensor based on D-fructose dehydrogenase for the determination of fructose in food analysis. *Biosens. Bioelectron.* 12 (1997) 1233-1243.
- 100 Narváez, A., Parellada, J., Domínguez, E., Katakis, I., Effects of mediator and paste hydrophobicity on the response of amperometric carbon paste electrodes: binder paste electrodes. *Quím. Anal.* 15 (1996) 75-82.
- 101 Kinnear, K. T., Monbouquette, H. G., An amperometric fructose biosensor based on fructose dehydrogenase immobilized in a membrane mimetic layer on gold. *Anal. Chem.* 69 (1997) 1771-1775.
- 102 Matsumoto, K., Tsukatani, T., Higuchi, S., Simultaneous sensing of five compounds in fruit by amperometric flow injection system with immobilized-enzyme reactors. *Sens. Mat.* 7 (1995) 167-177.
- 103 Ikeda, T., Matsushita, F., Senda, M., D-fructose dehydrogenase-modified carbon paste electrode containing p-benzoquinone as a mediated amperometric fructose sensor. *Agric. Biol. Chem.* 54 (1990) 2919-2924.
- 104 Garcia, C. A. B., de Oliveira Neto, G., Kubota, L. T., Grandin, L. A., A new amperometric biosensor for fructose using a carbon paste electrode modified with silica gel coated with merrill's blue and fructose 5-dehydrogenase. *J. Electroanal. Chem.* 418 (1996) 147-151.
- 105 Sekine, Y., Hall, E. A. H., A lactulose sensor based on coupled enzyme reactions with a ring electrode fabricated from tetrathiafulvalen-tetracyanoquinodimethane. *Biosens. Bioelectron.* 13 (1998) 995-1005.
- 106 Begum, A., Kobatake, E., Suzawa, T., Ikariyama, Y., Aizawa, M., New electrocatalytic biomolecular interface for fabricating a fructose dehydrogenase-based sensing system. *Anal. Chim. Acta* 280 (1993) 31-36.
- 107 Qian, J., Liu, Y., Liu, H., Yu, T., Deng, J., Characterization of regenerated silk fibroin membrane for immobilizing peroxidase and construction of an amperometric hydrogen peroxide sensor employing phenazine methosulphate as electron shuttle. *J. Electroanal. Chem.* 397 (1995) 157-162.

- 108 Liu, H., Ying, T., Sun, K., Li, H., Qi, D., Reagentless amperometric biosensors highly sensitive to hydrogen peroxide, glucose and lactose based on N-methyl phenazine methosulfate incorporated in a Nafion film as an electron transfer mediator between horseradish peroxidase and an electrode. *Anal. Chim. Acta* 344 (1997) 187-199.
- 109 Wang, J., Mo, J.-W., Li, S., Porter, J., Comparison of oxygen-rich and mediator-based glucose-oxidase carbon-paste electrodes. *Anal. Chim. Acta* 441 (2001) 183-189.
- 110 Amine, A., Kauffmann, J.-M., Patriarche, G. J., Characterization of mediated and non-mediated oxidase enzyme based glassy carbon electrodes. *Talanta* 40 (1993) 1157-1162.
- 111 Kulys, J., The carbon paste electrode encrusted with a microreactor as glucose biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 14 (1999) 473-479.
- 112 Lapenaite, I., Kurtinaitiene, B., Marcinkeviciene, L., Bachmatova, I., Laurinavicius, V., Ramanavicius, A., An enzymatic sensor for the analysis of glycerol in beverages. *Chem. Pap.* 55 (2001) 345-349.
- 113 Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P., *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2001.
- 114 Baltes, W., *Lebensmittelchemie*. 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995.
- 115 Verordnung (EWG) Nr. 2676/90 der Kommission der Europäischen Gemeinschaften vom 17. September 1990 zur Festlegung gemeinsamer Analysenmethoden für den Weinsektor; Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 272, 33. Jahrgang, 3. Oktober 1990.
- 116 Jacob, L., *Lexikon der Oenologie*. Verlag und Druckerei Meininger GmbH, Neustadt an der Weinstraße, 1995.
- 117 Bergner, K.-G., Lemperle, E., *Weinkompandium*. S. Hirzel Verlag Stuttgart, Leipzig, 2001.
- 118 www.leo-kuebler.de
- 119 Bernal, J. L., DelNozal, M. J., Toribio, L., DelAlamo, M., HPLC analysis of carbohydrates in wines and instant coffees using anion exchange chromatography coupled to pulsed amperometric detection. *J. Agricult. Food Chem.* 44 (1996) 507-511.
- 120 Würdig, G., Woller, R., *Chemie des Weines*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 1989.
- 121 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, L 39.00 - E(EG) und 1(EG) bis 10 (EG), Methode 6, April 1981.

- 122 Rebelein, H., "5-Minuten-Methoden" zur genauen Bestimmung des Alkohol-, Zucker- und Gesamt-SO₂-Gehaltes (Destillation) in Weinen und Fruchtsäften. Allgem. Deutsche Weinfachzeitung 107 (1971) 590-594.
- 123 Jacob, L., Die kombinierte Alkohol-Zucker-Bestimmung, ein Weg zur Vereinfachung der Weinanalyse. Allgem. Deutsche Weinfachzeitung 109 (1973) 780-783.
- 124 Untersuchungsmethoden für Wein - ein Überblick. Die Weinwirtschaft Technik 1 (1987) 13-16.
- 125 Methoden der enzymatischen BioAnalytik und Lebensmittelanalytik, Informationsschrift Boehringer Mannheim, Mannheim, 1995.
- 126 www.merckeurolab.de
- 127 Luque de Castro, M. D., Luque-García, J. L., Biosensors in wine production monitoring. Anal. Lett. 33 (2000) 963-996.
- 128 www.biofutura.com
- 129 Švorc, J., Miertuš, S., Katrlík, J., Stred'anský, M., Composite transducers for amperometric biosensors. The glucose sensor. Anal. Chem. 69 (1997) 2086-2090.
- 130 Katrlík, J., Pizzariello, A., Mastihuba, V., Švorc, J., Stred'anský, M., Miertuš, S., Biosensors for L-malate and L-lactate based on solid binding matrix. Anal. Chim. Acta 379 (1999) 193-200.
- 131 Firmenprospekt, SensLab GmbH Leipzig, 2001.
- 132 Del Cerro, M. A., Cayuela, G., Reviejo, A. J., Pingarrón, J. M., Wang, J., Graphite-*teflon*-peroxidase composite electrodes. Application to the direct determination of glucose in musts and wines. Electroanal. 9 (1997) 1113-1119.
- 133 Razumienė, J., Gurevičienė, V., Laurinavičius, V., Gražulevičius, J. V., Amperometric detection of glucose and ethanol in beverages using flow cell and immobilised on screen-printed carbon electrode PQQ-dependent glucose or alcohol dehydrogenases. Sens. Actuators B 78 (2001) 243-248.
- 134 Mayer, M., Ruzicka, J., Flow injection based renewable electrochemical sensor system. Anal. Chem. 68 (1996) 3808-3814.
- 135 Agudo, M., Ríos, A., Valcárel, M., Automated implementation of the method of standard additions in unsegmented flow systems. Anal. Chim. Acta 308 (1995) 77-84.
- 136 Dremel, B. A. A., Schaffar, B. P. H., Schmid, R. D., Determination of glucose in wine and fruit juice based on a fibre-optic glucose biosensor and flow-injection analysis. Anal. Chim. Acta 225 (1989) 293-301.

- 137 Enzymatic Assay of D-Fructose dehydrogenase. Produktinformation, Sigma, Deisenhofen, 2001.
- 138 Ameyama, M., Adachi, O., D-Fructose dehydrogenase from gluconobacter industrius, membrane-bound. *Methods Enzymol.* 89 (1982) 154-159.
- 139 Ameyama, M., Enzymatic microdetermination of D-glucose, D-fructose, D-gluconate, 2-keto-D-gluconate, aldehyde, and alcohol with membrane-bound dehydrogenases. *Methods Enzymol.* 89 (1982) 20-29.
- 140 Reichl, H., Hybridintegrierte Technologie und Entwurf von Dickschichtschaltungen. 2. Auflage, Dr. Alfred Hürtig Verlag, Heidelberg, 1988.
- 141 Wang, J., Pedrero, M., Sakslund, H., Hammerich, O., Pingarron, J., Electrochemical activation of screen-printed carbon strips. *Analyst* 121 (1996) 345-350.
- 142 Zhang, Y., Wilson, G. S., Electrochemical oxidation of H₂O₂ on Pt and Pt + Ir electrodes in physiological buffer and its applicability to H₂O₂-based biosensors. *J. Electroanal. Chem.* 345 (1993) 253-271.
- 143 Kröger, S., Turner, A. P. F., Solvent-resistant carbon electrodes screen printed onto plastic for use in biosensors. *Anal. Chim. Acta* 347 (1997) 9-18.
- 144 Speiser, B., Elektroanalytische Methoden II: Cyclische Voltammetrie. *ChiuZ* 15 (1981) 62-67.
- 145 Heinze, J., Cyclovoltammetrie - die Spektroskopie des Elektrochemikers. *Angew. Chem.* 96 (1984) 823-916.
- 146 Kitzinger Weinbuch, Kleine Weinfibel. Selbstverlag, Paul Arauner GmbH, Kitzingen/Main.
- 147 Olschewski, H., Lagerstabile enzymatische Biosensoren zur quantitativen Bestimmung von L-Lysin und Lactose im Fließinjektionssystem "Labtool". Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2002.
- 148 Cunnah, P., High stability catalase free glucose oxidase for diagnostics. Produktinformation, Biokatalysts, Pontypridd, UK.
- 149 Glucose oxidase G575P. Produktinformation, Biokatalysts, Pontypridd, UK.
- 150 Ameyama, M., Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O., D-Fructose dehydrogenase of gluconobacter industrius: purification, characterization, and application to enzymatic microdetermination of D-fructose. *J. Bacteriol.* 145 (1981) 814-823.
- 151 Duine, J. A., Frank Jzn., J., Jongejan, J. A., PQQ and quinoprotein enzymes in microbial oxidations. *FEMS* 32 (1986) 165-178.

- 152 Weetall, H. H., Immobilized enzymes, antigens, antibodies, and peptides. Marcel Dekker, New York, 1975.
- 153 Vaidya, R., Atanasov, P., Wilkins, E., Effect of interferences on the performance of glucose enzyme electrodes using Nafion coatings. *Med. Eng. Phys.* 17 (1995) 416-424.
- 154 Pan, S. T., Arnold, M. A., Selectivity enhancement for glutamate with Nafion/glutamate oxidase biosensor. *Talanta* 43 (1996) 1157-1162.
- 155 Patel, N. G., Erlenkötter, A., Cammann, K., Chemnitz, G.-C., Fabrication and characterization of disposable type lactate oxidase sensors for dairy products and clinical analysis. *Sens. Actuators B* 67 (2000) 134-141.
- 156 Tombach, B., Schneider, J., Matzkies, F., Schaefer, R. M., Chemnitz, G. C., Amperometric creatinine biosensor for hemodialysis patients. *Clin. Chim. Acta* 312 (2001) 129-134.
- 157 Patel, N. G., Meier, S., Cammann, K., Chemnitz, G.-C., Screen-printed biosensors using different alcohol oxidases. *Sens. Actuators B* 75 (2001) 101-110.
- 158 Mitzkat, L., Strehlitz, B., Biosensoren messen Saccharose. *LaborPraxis* Februar 2002, 80-83.
- 159 Gülce, H., Çelebi, S., Özyörük, H., Yıldız, A., Amperometric enzyme electrode for sucrose determination prepared from glucose oxidase and invertase co-immobilized in poly(vinylferrocenium). *J. Electroanal. Chem.* 397 (1995) 217-223.
- 160 Suarareungchai, W., Worasing, S., Sritongkum, P., Tanticharoen, M., Kirtikara, K., Dual electrode signal-subtracted biosensor for simultaneous flow injection determination of sucrose and glucose. *Anal. Chim. Acta* 380 (1999) 7-15.
- 161 Filipiak, M., Fludra, K., Gościmińska, E., Enzymatic membranes for determination of some disaccharides by means of an oxygen electrode. *Biosens. Bioelectron.* 11 (1996) 355-364.
- 162 Leite, V., Leão, I., C., de Vasconcelos, G. F. V., Pimentel, M. C. B., Silva, V. L., Melo, E. H. M., Lima Filho, J. L. Simple and inexpensive flow injection analysis for determination of sucrose using invertase and glucose oxidase immobilised on glass beads. *Biotechnol. Techn.* 9 (1995) 345-348.
- 163 Mizutani, F., Yabuki, S., Rapid determination of glucose and sucrose by an amperometric glucose-sensing electrode combined with an invertase/mutarotase-attached measuring cell. *Biosens. Bioelectron.* 12 (1997) 1013-1020.

- 164 Guémas, Y., Boujtita, M., El Murr, N., Biosensor for determination of glucose and sucrose in fruit juices by flow injection analysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 89 (2000) 171-181.
- 165 Hu, T., Zhang, X.-E., Zhang, Z.-P., Chen, L.-Q., A screen-printed disposable enzyme electrode system for simultaneous determination of sucrose and glucose. *Electroanal.* 12 (2000) 868-870.
- 166 Lima Filho, J. L., Pandey, P. C., Weetall, H. H., An amperometric flow injection analysis enzyme sensor for sucrose using tetracyanoquinodimethane modified graphite paste electrode. *Biosens. Bioelectron.* 11 (1996) 719-723.
- 167 Karube, I., Yokoyama, K., Trends in biosensor research and development. *Sens. Actuators B* 13-14 (1993) 12-15.
- 168 Weigel, B., Hitzmann, B., Kretzmer, G., Schürgerl, K., Huwig, A., Giffhorn, F., Analysis of various sugars by means of immobilized enzyme coupled flow injection analysis. *J. Biotechnol.* 50 (1996) 93-106.
- 169 Bisenberger, M., Bräuchle, C., Hampp, N., A triple-step potential waveform at enzyme multisensors with thick-film gold electrodes for detection of glucose and sucrose. *Sens. Actuators B* 28 (1995) 181-189.
- 170 Gueguen, S., Boujtita, M., El Murr, N., Effect of the mutarotase on the analytical behaviour of modified carbon paste glucose biosensor. *Analisis* 27 (1999) 587-591.
- 171 Rüger, P., Amperometrische Enzymsensoren auf der Basis der Dickschichttechnologie. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, 1992.
- 172 Swann, M. J., Bloor, D., Haruyama, T., Aizawa, M., The role of polypyrrole as charge transfer mediator and immobilization matrix for D-fructose dehydrogenase in a fructose sensor. *Biosens. Bioelectron.* 12 (1997) 1169-1182.
- 173 Ikeda, T., Matsushita, F., Senda, M., Amperometric fructose sensor based on direct bioelectrocatalysis. *Biosens. Bioelectron.* 6 (1991) 299-304.
- 174 Shul'ga, A. A., Koudelka-Hep, M., de Rooij, N. F., Netchiporouk, L. I., Glucose-sensitive enzyme field effect transistor using potassium ferricyanide as an oxidizing substrate. *Anal. Chem.* 66 (1994) 205-210.
- 175 Perdomo, J., Hinkers, H., persönliche Mitteilungen.
- 176 Ernst, H., Mikrosystemtechnischer Lösungsansatz zur Vermeidung von Querempfindlichkeiten bei der amperometrischen Glucosebestimmung. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2002.

-
- 177 Han, X. J., Tang, J. L., Wang, J. G., Wang, E. A., Electrocatalytic oxidation of ascorbic acid by norepinephrine embedded in lipid cast film at a glassy carbon electrode. *Electrochim. Acta* 46 (2001) 3367-3371.
- 178 Methoden zur Zuckerbestimmung. *Weinwirtschaft Technik* 6 (1988) 6-11.
- 179 Khodari, M., Borchers, T., persönliche Mitteilungen.
- 180 Poperechna, N., Borchers, T., persönliche Mitteilungen.

Die experimentellen Arbeiten wurden in der Zeit von Februar 1999 bis März 2002 am Lehrstuhl für Analytische Chemie des Instituts für Anorganische und Analytische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Cammann angefertigt.

Bei Herrn Prof. Dr. K. Cammann bedanke ich mich für die interessante Aufgabenstellung und die Möglichkeit, mein Dissertationsthema frei zu gestalten.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Gabriele Chemnitz, Herrn Dr. Torsten Borchers sowie Herrn Dr. Oleksandr Shulga für die ausgezeichnete Betreuung, die zahlreichen Anregungen und die stete Diskussionsbereitschaft während der praktischen Arbeiten und der Anfertigung dieser Arbeit.

Für das angenehme Arbeitsklima und die freundschaftliche Atmosphäre danke ich meinen Kollegen Frau Dr. Heike Frebel, Herrn Dr. Ansgar Erenkötter, Frau Dr. Yvonne Röder, Herrn Holger Olschewski, Herrn Eric Frauendorfer, Frau Nataliya Poperechna und Herrn Sergey Verzakov.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. K. Cammann und den Mitarbeitern des Instituts für Chemo- und Biosensorik für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Michael Kießhauer danke ich für die Entwicklung der Vierkanalpotentiostaten und die stete Hilfsbereitschaft bei den größeren und kleineren Problemen mit diesen Geräten.

Dem Staatlichen Veterinär- und Chemischen Landesuntersuchungsamt in Münster, dem Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe sowie dem Staatlichen Untersuchungsamt Hessen danke ich für die Bereitstellung der Realproben und die Durchführung der Referenzanalytik.

Der Deutschen Bundesstiftung Umwelt danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Bei den Mitarbeitern der Leo Kübler GmbH bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. N. G. Patel und seiner Familie sowie den Mitgliedern des Department of Electronics der Sardar Patel University und des Sicart, Vallabh Vidyanagar, Gujarat, Indien, für die wundervolle Zeit, die ich in Indien verbracht habe.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern für ihr Verständnis und ihre Unterstützung während meines gesamten Studiums bedanken.