

# 2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

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

## Biosensoren auf der Basis von Redoxhydrogel-integrierter Quinohemoprotein

### Alkoholdehydrogenase für die on-line Detektion von Ethanol in Wein

Thomas Erichsen<sup>1</sup>, Mihaela Niculesco<sup>2</sup>, Dima Kisel<sup>1</sup>, Elisabeth Csöregi<sup>2</sup>, Wolfgang Schuhmann<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Analytische Chemie – Elektroanalytik & Sensorik, Ruhr-Universität Bochum, D-44780 Bochum  
Tel. 0234-32-26200  
[thomas.erichsen@ruhr-uni-bochum.de](mailto:thomas.erichsen@ruhr-uni-bochum.de)  
[www.ruhr-uni-bochum.de/elan/](http://www.ruhr-uni-bochum.de/elan/)

<sup>2</sup> University of Lund, Department of Biotechnology, P.O. Box 124, S-221 00 Lund, Schweden

Registriernummer der Online-Anmeldung: 144

#### Poster

Weine aus der Tokaj-Region in Ungarn stellen eine komplizierte Matrix für die Analytik mit Hilfe von Biosensoren dar. Sie zeichnen sich durch gleichzeitig hohe Alkohol- und Glucosekonzentrationen aus. Die geographische Lage des Anbaubereiches bedingt ein regionales Mikroklima, das den Befall der Trauben durch die Edelfäule *Botrytis cinerea* fördert. Der Metabolismus dieses Pilzes erhöht den Glyceringehalt der erhaltenen Weine um ein Vielfaches und führt zur Bildung von weiteren, die Analytik störenden Stoffen<sup>[1]</sup>.

Amperometrische Biosensoren auf der Basis von Oxidasen als biologischer Erkennungskomponente erfordern ein hohes Arbeitspotential von 600 mV [vs. Ag/AgCl] zur Oxidation des katalytisch gebildeten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dies führt zur direkten Oxidation von Inhaltsstoffen der komplexen Probenmatrix an der Elektrode und so zu einer geringen Spezifität dieser Sensoren. Darüber hinaus verfügen die kommerziell erhältlichen Alkoholoxidasen über eine breite Gruppenselektivität und Methanol ist das bevorzugte Substrat. Folglich muß die Entwicklung von Biosensoren für die Bestimmung von Ethanol bzw. Glucose in Wein eine erhebliche Verbesserung der Selektivität zu Folge haben, wobei zum einen die Wahl eines geeigneten Enzyms, zum anderen eine Elektrodenarchitektur mit verringertem Arbeitspotential wesentlich ist.

Für die Oxidation von Ethanol kommen NAD<sup>+</sup>-abhängige Dehydrogenasen bzw. eine Klasse kürzlich entdeckter und isolierter PQQ-abhängiger Dehydrogenasen in Betracht, die eine wesentlich geringere Aktivität für die Oxidation von CH<sub>3</sub>OH aufweisen. Weiterhin wurde die Verwendung von Os-Komplex modifizierten Redoxhydrogelen für Anwendungen im Bereich amperometrischer Biosensoren in den letzten Jahren stark untersucht<sup>[2,3]</sup>. Durch Quervernetzung eines Os-Komplex-modifizierten Polyvinylimidazols in Gegenwart des Enzyms können Biosensoren mit einem Arbeitspotential von

200 mV erhalten werden. Biosensoren für die Bestimmung von Ethanol und Glycerin wurden durch Einschluß der entsprechenden Dehydrogenasen in das Os-Redoxpolymer erhalten, wobei allerdings das Coenzym  $\text{NAD}^+$  zur Analysenlösung zugegeben werden muß. Die Coinjektion von  $\text{NAD}^+$  erfolgt automatisiert und reproduzierbar, so daß prinzipiell auch Langzeitmessungen möglich sind. Allerdings zeigt  $\text{NAD}^+$ -abhängige Alkoholdehydrogenase eine geringe Stabilität, insbesondere bei Kontakt mit Realproben. Im Rahmen des Vortrages werden Ergebnisse zur katalytischen Oxidation von NADH an Os-Redoxpolymeren, zur Stabilität der Sensoren im Fließsystem und in Kontakt mit Realproben gezeigt.

Um die Zugabe des Coenzym  $\text{NAD}^+$  zu vermeiden und gleichzeitig eine Verbesserung der Stabilität der Sensoren zu erreichen, wurde die Integration von Quinohemoprotein Alkoholdehydrogenase (QH-ADH)<sup>[4,5]</sup>, einem Membranenzym aus *Gluconobacter* sp. 33, in das Os-Hydrogel untersucht. Das Multicofaktorenzym verfügt über PQQ (Pyrroloquinolinquinon) als primären Elektronenakzeptor im aktiven Zentrum und 4 Häm-C Gruppen, über die intermediär die Elektronen zur Peripherie des Proteins transportiert werden. Somit ist dieses Enzym optimal für einen schnellen Elektronentransfer über ein Redoxpolymer geeignet. Die Quervernetzung von QH-ADH in ein Os-Redoxpolymer mittels Polyethylenglycoldiglycidylether als bifunktionellem Reagenz auf Graphitelektroden konnten reagenzlose Biosensoren für die Detektion von Ethanol bei einem Arbeitspotential von 300 mV entwickelt werden. Der Elektronentransferpfad dieser Sensoren ist in Abbildung 1 dargestellt.

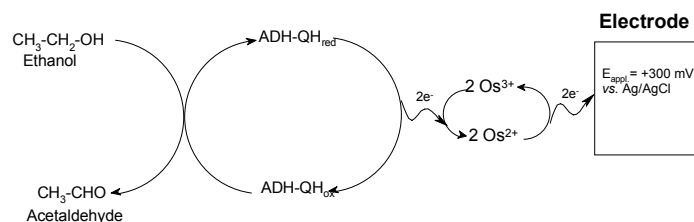


Abb. 1: Elektronentransferpfad des QH-ADH/Os-Hydrogel Biosensors

Die erhaltenen Sensoren sind über mehrere Tage stabil. Allerdings erlaubt der  $K_M$ -Wert des Enzyms lediglich einen linearen Meßbereich der Sensoren bis zu 10 mM Ethanol. Die Konzentration von Ethanol in Wein ist ca. 2.2 M und damit um einen Faktor 220 höher als der Proportionalbereich der entwickelten Biosensoren. Somit ist eine Verdünnung der Probe vor der Messung unabdingbar notwendig, wobei für eine kontinuierliche Fermentationskontrolle diese Verdünnung automatisch, an die zeitlich variable Konzentration im Fermenter anpaßbar und durch Kalibrierung validierbar erhalten werden muß. Auf der Basis eines früher entwickelten sequentiellen Injektionssystems<sup>[6]</sup> wurde durch Implementierung eines Verdünnungsreaktors, Anpassung der Software und des Analysenzyklus eine variable Verdünnung der Probe erreicht. Gleichzeitig wird eine Umpufferung der Probe auf den optimalen pH-Wert bei konstanter Ionenstärke erreicht, und die Konzentration der interferierenden Matrixkomponenten wird entsprechend vermindert.

Abbildung 2 zeigt die kontinuierliche Bestimmung von Ethanol aus einer Probe mit konstanten Ethanolgehalt von 5 Vol% nach automatischer Verdünnung um den Faktor 100. Die Streuung der Meßwerte kann auf eine Änderung der Hydrogelcharakteristik (Quellfähigkeit) infolge der hydrophoben

Probeninhaltsstoffe zurückgeführt werden. Untersuchungen mittels cyclischer Voltammetrie belegen die Abhängigkeit der Sensorcharakteristik, insbesondere der Elektronentransferrate im Redoxpolymer, von der Ethanolkonzentration. Durch Konditionierung des Sensors im Fließsystem durch Präinjektion einer konstanten Ethanolkonzentration konnte die Genauigkeit der Ethanolmessungen erheblich verbessert werden.

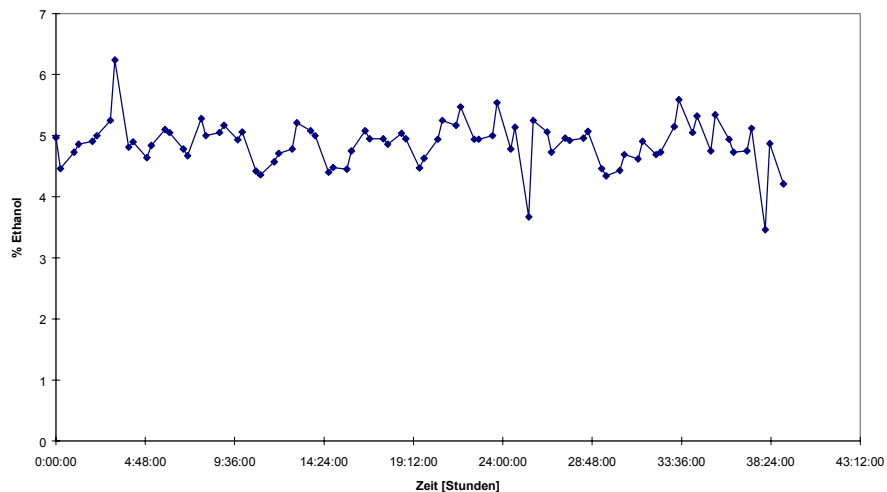


Abb. 2: Kontinuierliche Bestimmung von Ethanol nach automatischer Verdünnung im sequentiellen Injektionssystem

Im Rahmen des Vortrages werden die spezifischen Eigenschaften der entwickelten Ethanolensoren und die Anpassung des sequentiellen Injektionssystems (automatische Verdünnung, optimierte Analysenzyklen, Modulation der Sensorcharakteristika durch hydrophobe Probeninhaltsstoffe) erläutert. Ergebnisse, die mit dem optimierten Gesamtsystem bezüglich der on-line Bestimmung der Ethanolkonzentration bei Laborfermentationen von Traubenmost mit Weinhefe sowie der Bestimmung des Ethanolgehaltes von unterschiedlichen Weinen erhalten wurden, werden präsentiert.

### Literatur

- [1] P. Sudraud and J. Koziat, *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation* **32** (1978) 1063-1071.
- [2] T. Ohara, R. Rajagopalan, and A. Heller, *Anal. Chem.* **66** (1994) 2451-2457.
- [3] N. Larsson, T. Ruzgas, L. Gorton, M. Kokaia, P. Kissinger, and E. Csöregi, *Electrochim. Acta* **43** (1998) 3541-3554
- [4] A. Ramanavicius, W. Schuhmann, K. Habermüller, E. Csöregi, V. Laurinavicius, and W. Schuhmann, *Anal. Chem.* **71**(1999) 3581-3586.
- [5] M. Alkasrawi, I. C. Popescu, V. Laurinavicius, B. Mattiasson, and E. Csöregi, *Anal. Commun.* **36** (1999) 395-398
- [6] W. Schuhmann, H. Wohlschläger, J. Huber, H.-L. Schmidt, H. Stadler. *Anal. Chim. Acta.* **315** (1995) 113.

### Dank

Die Arbeit wurde im Rahmen des Projektes INCO-COPERNICUS Contract IC15-CT98-0907 "Rapid analysis in beverage industry based on automated analyzer with integrated biosensors" gefördert. Die Autoren danken V. Laurinavicius, Inst. Biochemistry, Vilnius, Litauen für die Bereitstellung von QH-ADH und Z. Kerényi, Inst. Viticulture & Enology, Kecskemet, Ungarn für die zahllosen Diskussionen über die Herstellung von Wein.