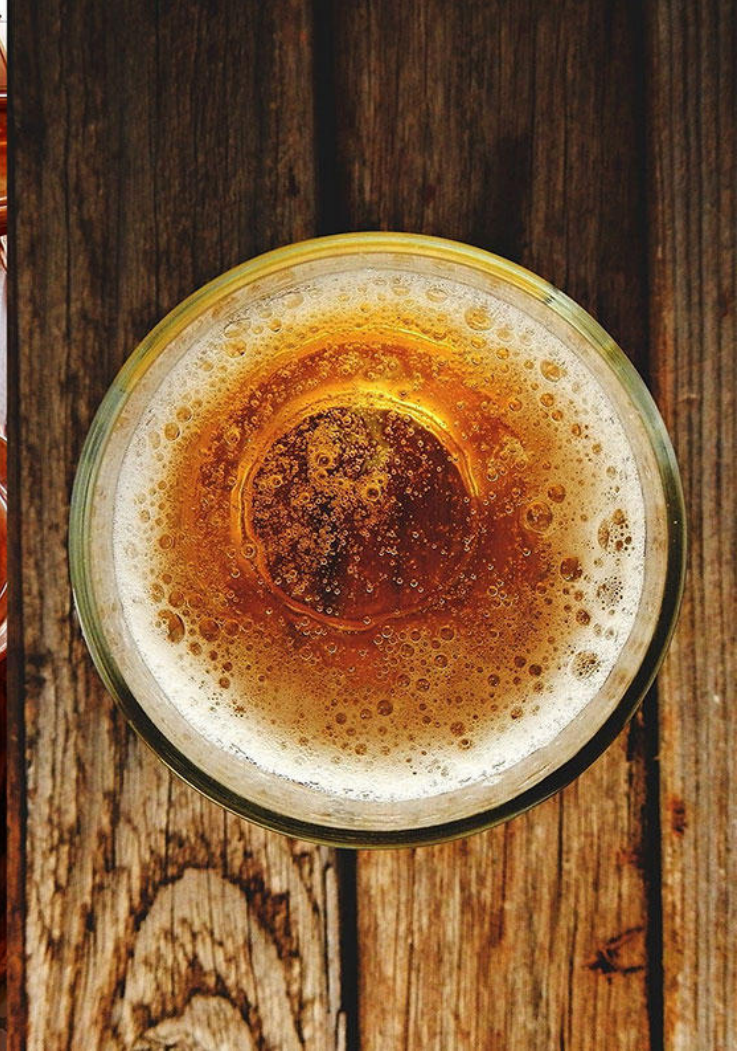




Application Note AN-EC-035

Verwendung eines tragbaren Stand-alone-Systems zur einfachen Überwachung der Gärung

In-situ-Messungen von Milchsäure in Bier mittels Siebdruck-Elektroden (SPEs)

Milchsäure (2-Hydroxypropansäure) ist vor allem in sauren Milchprodukten enthalten. Im Bier trägt die Milchsäure zum Säuregehalt und zu den milchigen Aromen bei und entsteht normalerweise durch die Gärung mit Milchsäurebakterien. Diese Bakterien können absichtlich in die Würze eingebracht werden, sie können aber auch als Folge einer Infektion auftreten.

Obwohl Milchsäure bis zu einer gewissen Menge im Bier essentiell ist, wird ein Übermaß an Milchsäure als qualitativer Mangel angesehen. Ihre Wahrnehmungsschwelle liegt bei 0,0044 mol/L. In einigen Lambic-Bieren kann die Milchsäurekonzentration jedoch Werte von mehr als 0,0333 mol/L erreichen.

In dieser Application Note wird ein enzymatischer Sensor, der auf einer siebgedruckten Elektrode basiert, zur Messung der Milchsäure in kommerziellen Bieren verwendet, um seine potenzielle Anwendung bei der Gärungsüberwachung zu demonstrieren.

GERÄTE UND SOFTWARE

Die Messungen wurden mit der Messgerät DROPSTATPLUS und dem CASTDIR-Anschluss für siebgedruckte Elektroden durchgeführt (Abbildung 1).

Aufgrund ihrer Selektivitätseigenschaften wurden siebgedruckte Elektroden auf der Basis von L-Lactat-Oxidase (LACT10) als Biosensor-Substrat verwendet. Das analytische Signal entspricht dem Nachweis eines Wasserstoffperoxid-Zwischenprodukts. Dieses Nebenprodukt entsteht bei der Umwandlung von Laktat in Brenztraubensäure durch die enzymatische Reaktion, die an der Arbeitselektrode stattfindet.

Der DROPSTATPLUS ist ein kundenspezifisches elektrochemisches Lesegerät, das auf einem Potentiostaten basiert und entsprechend den spezifischen Anforderungen des Anwenders konfiguriert wird. Durch Angabe der elektrochemischen Technik und deren Parameter sowie der Kalibrierkurve kann ein einzelnes Gerät automatisch die Konzentration des Analyten, für den der elektrochemische Sensor entwickelt wurde, direkt auf einem LCD-Bildschirm anzeigen. Die gesamte für diese Studie verwendete Hardware ist in Tabelle 1 aufgeführt.



Abbildung 1. Das DROPSTATPLUS-Gerät und der CASTDIR-Anschluss als Interface für siebgedruckte Elektroden.

Tabelle 1. Übersicht über die Hard- und Softwareausstattung.

Ausrüstung	Artikelnummer
Gerät	DROPSTATPLUS
Biosensor-SPE	LACT10
Anschluss für SPEs	CASTDIR

NACHWEIS VON MILCHSÄURE

In diesem Fall wurde die amperometrische Detektion als Analysetechnik gewählt. Durch Anlegen eines Potentials von -0,1 V ist es möglich, Milchsäure in weniger als 75 s zu messen, da das Stromsignal dann seinen stationären Zustand erreicht. Die Verwendung dieses besonders niedrigen Potentials ist aufgrund des Mediators möglich und entscheidend für die Vermeidung typischer Störsignale, die beim Anlegen höherer Potentiale auftreten [1].

Durch einfaches Auftragen eines Probentropfens auf der LACT10-SPE ist es möglich, Milchsäure im Bereich von 0 bis 0,0004 mol/L zu messen. Eine typische Kalibrierkurve, die mit Daten aus Dreifachmessungen erhalten wurde, ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Ergebnisse wurden in einer wässrigen Lösung von 0,1 mol/L Tris-NO^3 bei einem pH-Wert von 7,2 erzielt, in der Milchsäure nur in ihrer dissoziierten Form vorkommt, d. h. als Laktat und nicht als Milchsäure.

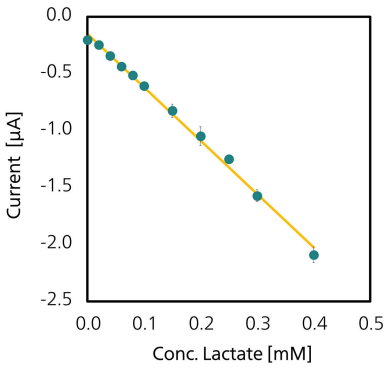


Abbildung 2. Eine typische Kalibrierkurve, die mit Laktat-Standardlösungen zwischen 0-0,0004 mol/L in einer wässrigen Lösung von 0,1 mol/L Tris-Nitrat (pH 7,2) unter Verwendung von LACT10-Elektroden erhalten wurde. Die Messzeit betrug 75 s.

MESSUNG DER MILCHSÄURE IN HANDELSÜBLICHEM BIER

Vier verschiedene Biersorten einer lokalen Brauerei (Cotoya) wurden ausgewählt, um die LACT10-Sensoren mit echten Proben zu testen. Dabei handelt es sich um ein India Pale Ale (IPA) mit normalem Milchsäuregehalt, ein Sauerbier, das mit speziell behandeltem Malz hergestellt wird, um das Bier zu säuern, ein Gerstenweinbier mit hohem Alkoholgehalt und ein Lambic-Bier (Al Debalu), das durch eine wilde Gärung gewonnen wird.

Um Matrixeffekte zu vermeiden, wurde jedes Bier vor der Messung im Verhältnis 1:10 mit einer wässrigen Lösung von 0,1 mol/L Tris-NO^3 pH 7,2 verdünnt. Es ist nicht notwendig, die Proben zu entgasen, da die erzielten Ergebnisse mit und ohne Entgasung der Biere sehr ähnlich waren.

Zur Validierung der erhaltenen Daten wurde ein kommerzielles L-Lactat-Assay-Kit verwendet. Die optischen Experimente wurden mit SPELEC-Geräten und der DropView SPELEC-Software durchgeführt. Mit dem optischen Kit war eine unterschiedliche Probenverdünnung erforderlich, um Matrixeffekte bei den jeweiligen Bier-Typen zu vermeiden. Die Sauerbierprobe wurde im Verhältnis 1:100 verdünnt, IPA im Verhältnis 1:20, Al Debalu- (Lambic) Bier im Verhältnis 1:50 und Gerstenweinbier im Verhältnis 1:10.

Die mit beiden Methoden (elektrochemisch und optisch) erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt.

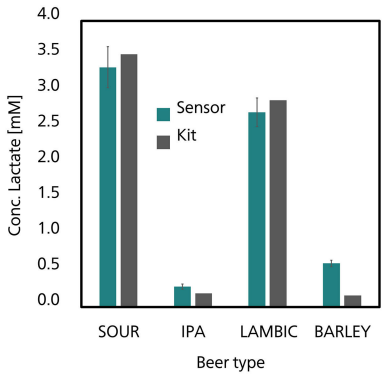


Abbildung 3. Datenvergleich mit dem elektrochemischen Laktatsensor von Metrohm DropSens (in grün) und mit einem optischen L-Laktat-Assay-Kit (in grau).

Beachten Sie, dass das Gerstenweinbier mit dem optischen Assay-Kit nicht korrekt gemessen werden konnte, da seine dunkelbraune Farbe mit der Messwellenlänge des Kits (450 nm) interferierte. Es besteht ein Kompromiss zwischen der Absorption von Bier und seiner geringen Laktatkonzentration. Daher ist die Empfindlichkeit nicht ausreichend, um es zu messen. Dies kann durch eine Behandlung des Bieres mit PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon) behoben werden, welches die Farbe entfernt und somit die Absorption verhindert.

In Anbetracht der Tatsache, dass die mit beiden Methoden erhaltenen Daten recht ähnlich sind, zeigt dieser Versuch die Möglichkeit, Laktat in Bier in weniger als 75 Sekunden mit einem tragbaren Messgerät nachzuweisen, ohne dass komplexe Vorbehandlungen oder die Verwendung sperriger optischer Geräte erforderlich sind.

FAZIT

In dieser Studie wird ein elektrochemischer Biosensor für den Nachweis von Milchsäure in Bier vorgeschlagen. Die Probe muss bei der vorgeschlagenen elektrochemischen Methode nur 1:10 mit einer Lösung von 0,1 mol/L Tris-NO3 bei pH 7,2 verdünnt werden. Mit Hilfe eines einfachen amperometrischen Tests ist es möglich, in 75 s die Menge an Milchsäure in einer Bierprobe ohne jegliche Vorbehandlung zu messen. Die erzielten Messergebnisse sind vergleichbar mit den Ergebnissen, die mit einem herkömmlichen L-Lactat-Assay-Kit und nicht tragbaren optischen Geräten durchgeführt werden.

REFERENZ

1. Biscay, J.; Rama, E. C.; García, M. B. G.; et al. Enzymatic Sensor Using Mediator-Screen-Printed Carbon Electrodes. *Electroanalysis* 2011, *23* (1), 209–214. DOI:10.1002/elan.201000471

VERWANDTE APPLICATION NOTES

AN-T-227 Bestimmung von Natriumlactat

AN-PAN-1057 Inline-Überwachung von Fermentationsprozessen

AN-NIR-093 Qualitätskontrolle von Fermentationsprozessen

CONTACT

Metrohm Inula
Shuttleworthstraße 25
1210 Wien
office@metrohm.at

KONFIGURATION



Eigenständiges, auf Ihre Endanwendung zugeschnittenes elektrochemisches Lesegerät

DropStat Plus ist ein individualisiertes elektrochemisches Lesegerät für Forscher, die erfolgreich einen elektrochemischen Sensor entwickelt haben, um unmittelbare Resultate auf Basis eines optimierten Verfahrens zu erhalten. Das Gerät mit Touchscreen, Lithium-Ionen-Akku und der Möglichkeit zur drahtlosen Datenübertragung kann bis zu 3 Methoden und bis zu 8 Kalibrierungen pro Methode speichern. Es kann ideal als OEM- oder Eigenmarken-Gerät ausgeführt werden.



µStat Kabelanschluss für Dickfilmelektroden

Verbindet einfache (1 WE) Dickfilmelektroden mit µStat 200, µStat 300, µStat 400, µStat 4000/P, µStat 8000/P, µStatECL, SpectroECL und der SPELEC-Gerätefamilie.



Lactat-Sensor

Geeignet für die Bestimmung von L(+)-Lactat in Flüssigproben.