

Inhaltsverzeichnis

Formelzeichen und Abkürzungen

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung und Problemstellung	3
3 Ergebnisse und Diskussion eigener Arbeiten	9
3.1 Konzept und Aufbau eines neuartigen Systems für die Fließinjektionsanalyse mit immobilisierten Enzymen	9
3.1.1 Anforderungen an Analysensysteme für den Einsatz unter industriellen Bedingungen.....	9
3.1.2 Die Fließinjektionsanalyse und ihre Kombination mit enzymatischen Reaktionen.....	11
3.1.3 Besonderheiten der Gerätekonfiguration bei der Verwendung von Dehydrogenasen als Indikatorenzyme in der FIA.....	12
3.1.3.1 Verschiedene Verfahren zur gleichzeitigen Injektion von Substrat und Cosubstrat	13
3.1.3.2 Beurteilung der Verfahren und Konsequenzen für den Aufbau des Systems	14
3.1.4 Probenentnahme bzw. -aufbereitung im Hinblick auf eine zuverlässige Automatisierung.....	16
3.1.5 Beschreibung des Analysensystems.....	19
3.1.5.1 Funktioneller Aufbau des FIA-Systems	19
3.1.5.2 Bedeutung praxisgerechter Enzymsäulen.....	20
3.1.5.3 Beschreibung des entwickelten Prototypen	22
3.1.6 Ausrichtung des Systems auf die Substratbestimmung in einem bestimmten Probenmedium.....	25
3.1.6.1 Optimierung der Umsatzraten der immobilisierten Enzyme.....	28
3.1.6.1.1 Bedeutung von Art und Aktivität der verwendeten Präparate.....	28
3.1.6.1.2 Einfluß des pH-Wert.....	30

3.1.6.1.3	Abhängigkeit von den Konzentrationen der verwendeten Coenzyme bzw. Inhibitoren	32
3.1.6.1.4	Synergistischer Effekt beim Einsatz gekoppelter Enzymreaktionen	34
3.1.6.2	Anpassung der hydrodynamischen Eigenschaften des Fließsystems an einen vorgegebenen Meßbereich	37
3.1.6.2.1	Änderung des injizierten Volumens.....	37
3.1.6.2.2	Optimierung der Fließgeschwindigkeit.....	39
3.1.6.3	Beurteilung der Ergebnisse	42
3.2	Entwicklung des Softwarepaketes WIN-FIA für die Steuerung und Datenauswertung des entwickelten Analysengerätes	44
3.2.1	Pflichtenheft mit Sollkonzept für die Software	45
3.2.2	Merkmale und struktureller Aufbau von WIN-FIA.....	46
3.2.2.1	Ablaufsteuerung durch WIN-FIA.....	48
3.2.2.2	Datenauswertung durch WIN-FIA	51
3.2.2.2.1	Entwicklung eines „Fuzzy-Filter“ zur Kompensation von Störfaktoren.....	52
3.2.2.2.2	Konzentrationsberechnungen unter Berücksichtigung von Korrekturgrößen	58
3.2.3	Beurteilung der Hard- und Software.....	59
3.3	Anwendung des neukonzipierten Analysengerätes zur Analyse von Schlüsselsubstanzen in verschiedenen Probenmedien	61
3.3.1	Ethanolbestimmung in alkoholfreiem Bier.....	61
3.3.2	Glycerinbestimmung in Wein	64
3.3.3	Diacetylbestimmung in Bier	65
3.3.3.1	Optimierung des Zerfalls von Acetolaktat zu Diacetyl	66
3.3.3.1.1	Einfluß des pH-Werts	67
3.3.3.1.2	Einfluß der Temperatur	68
3.3.3.1.3	Einfluß von Oxidationsmitteln bzw. Metallionen	68
3.3.3.2	Anwendung zur Diacetylbestimmung in Bier	69
3.3.4	Laktatbestimmung in unterschiedlichen Fermentationsprodukten	70
3.3.4.1	Notwendigkeit einer quantitativen Pyruvatabtrennung	71
3.3.4.2	Analyse verschiedener Lebensmittel.....	72
3.3.4.2.1	L-Laktatanalyse in Wein	72
3.3.4.2.2	Selektive D-/L-Laktatbestimmung in Milchprodukten.....	74

3.3.4.2.3 D-/L-Laktatbestimmung für die Prozeßüberwachung einer biologischen Milchsäuerung.....	75
3.3.5 Glucose - Laktatbestimmung in tierischen Zellkulturen.....	77
3.3.6 Acetat - Ethanolbestimmung für die Essigproduktion.....	80
3.3.7 Glucose - Lactose-Bestimmung in „Molke“-Produkten.....	84
3.3.7.1 Bedeutung einer quantitative Glucoseabtrennung	85
3.3.7.2 Analyse von milchgesäuerten Molkenproben.....	89
3.3.8 Glucose - Fructosebestimmung in gezuckerten Lebensmitteln.....	91
3.3.8.1 Analyse durch das Glucose Isomerase/Glucose Dehydrogenase -System.....	92
3.3.8.2 Analyse durch das Glucose Dehydrogenase/Mannit Dehydrogenase-System.....	96
4 Zusammenfassende Schlußbetrachtung und Ausblick	99
5 Material und Methoden.....	108
5.1 Chemikalien, Enzyme und Hilfsmittel	108
5.1.1 Chemikalien	108
5.1.2 Enzyme.....	108
5.1.3 Geräte, sonstiges Material	110
5.2 Derivatisierung und Immobilisierung der Enzyme	111
5.2.1 Silanisierung von CPG	111
5.2.2 Glutardialdehydaktivierung und Immobilisierung der Enzyme.....	111
5.2.3 Packen der Enzymsäulen und Lagerbedingungen.....	112
5.2.4 Bestimmung der kinetischen Parameter bei immobilisierten Enzymen.....	112
5.3 Analytische Kontrollmethoden.....	113
5.3.1 Proteinbestimmung	113
5.3.2 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität	113
5.3.2.1 Acetat Kinase zur Phosphorylierung von Essigsäure.....	114
5.3.2.2 Glucose Oxidase	114
5.3.2.3 Glucose Dehydrogenase.....	115
5.3.2.4 Laktat Dehydrogenase für die Oxidation von Laktat	115
5.3.2.5 Mannit Dehydrogenase für die Reduktion von Fructose.....	115

5.3.2.6 Glucose Isomerase für die Isomerisierung von Fructose	115
5.3.2.7 β -Galactosidase für die Spaltung von Lactose	116
5.3.3 Enzymatische Referenzverfahren zur Substrat-Bestimmung	116
5.3.3.1 Bestimmung von Ethanol	117
5.3.3.2 Bestimmung von Acetat.....	117
5.3.3.3 Bestimmung von Glucose	117
5.3.3.4 Bestimmung von D- bzw.L-Laktat.....	118
5.3.3.5 Bestimmung von Lactose	118
5.3.4 Nichtenzymatische Vergleichsverfahren	118
5.3.4.1 HPLC-Analyse verschiedener Substrate als Referenzbestimmung.....	119
5.3.4.2 Bestimmung von Alkohol mittels SKABAR	119
5.3.4.3 GC-Analyse von Diacetyl und Acetat	119
5.4 Versuchsanordnungen für den Test des FIA-Systems.....	120
5.4.1 Gradientenmischer für die Acetat-Ethanol Bestimmung	120
5.4.2 Aufbau und Durchführung einer biologischen Milchsäuerung.....	121
5.4.3 Experimentelle Methoden zur Bestimmung des oxidativen Acetolaktatzerfalls	122
5.4.3.1 Herstellung von Acetolaktatlösungen.....	122
5.4.3.2 Versuchsaufbau zur Bestimmung des Abbauverhaltens von Acetolaktat	123
5.4.3.3 Elektrochemische Untersuchungen	123
5.5 Fließinjektionsanalyse - Allgemeines zur Durchführung	124
6 Anhang	125
7 Literatur	126