



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 220 142 A1

4(51) G 01 N 33/48  
C 12 Q 1/00

## AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP G 01 N / 256 151 4

(22) 01.11.83

(44) 20.03.85

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, Rudower Chaussee 5, DD

(72) Renneberg Reinhard, Dipl.-Biochem.; Weise, Hartmut, Dipl.-Ing.; Liebs, Peter, Dr. sc. Dipl.-Biol.; Riedel, Klaus, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Scheller, Frieder, Dr. sc. Dipl.-Chem.; Dorn, Inge, DD

(54) Verfahren zur Bestimmung von Naturstoffen mittels selektiver mikrobiologischer Elektroden

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur spezifischen Bestimmung von Naturstoffen mittels mikrobiologischer Elektroden. Sie hat das Ziel, durch Einsatz mikrobiologischer Elektroden eine den Enzymelektroden vergleichbare Spezifität und Schnelligkeit bei der Bestimmung zu erhalten. Erfindungsgemäß werden die für die Bestimmung eines Naturstoffes in mikrobiologischen Elektroden benutzten Mikroorganismen in Nährlösungen mit diesem bestimmten Stoff angezogen. Nach Dosierung des zu bestimmenden Substrates in die Meßzelle wird die Änderungsgeschwindigkeit der Atmung als Maß für dessen Konzentration genutzt. Dabei wird Stromstärkeänderung pro Zeit gemessen. Das Verfahren ist geeignet für den Einsatz in der Mikrobiologie, der Landwirtschaft, der Lebensmittelindustrie und -analytik, der Pharmazie und Toxikologie sowie im Umweltschutz.

Riedel  
Renneberg  
Weise  
Liebs  
Dorn  
Scheller

"Verfahren zur Bestimmung von Naturstoffen mittels selektiver  
mikrobiologischer Elektroden"

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur spezifischen Bestimmung von Naturstoffen (Kohlenhydraten, organischen Säuren, Alkoholen, Aminosäuren usw.) in komplexen Lösungen mit mikrobiologischen Sensoren, die spezifisch wirkende Mikroorganismen enthalten.

Das Verfahren ist geeignet für den Einsatz in der Mikrobiologie, der Landwirtschaft, der Lebensmittelindustrie und -analytik, der Pharmazie und Toxikologie sowie im Umweltschutz.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Für die Bestimmung natürlicher Substrate, wie Kohlenhydrate, Alkohole, organische Säuren und Aminosäuren werden neben den herkömmlichen spektrometrischen und chromatographischen Verfahren in zunehmendem Maße elektrochemische Sensoren in Form von Enzym- und Mikroorganismenelektroden eingesetzt

(GUILBAULT, G. G., Enzyme microb. Technol., 2, 258 - 264 (1980), SUZUKI, S. and KARUBE, I., Proc. 6. Int. Ferm. Symp., London (Canada), Vol. III, p 355 - 360 (1980), FUKUI and TANAKA, Ann. Rev. Microbiol., 36, 145 - 172 (1982)).

Der Einsatz von Enzymelektroden ist dabei im wesentlichen auf solche Reaktionen beschränkt, die zur Bildung bzw. Verbrauch von  $O_2$  und  $H_2O_2$  führen in Verbindung mit dem polarographischen Nachweis. Weiterhin limitiert die Verfügbarkeit von Enzymen, die teilweise sehr aufwendige Präparation und gerin-

ge Stabilität deren Einsatzbreite. Die Kofaktoregenerierung bereitet ebenfalls große Schwierigkeiten. Mikrobiologische Elektroden können überall dort, wo durch Substratnutzung  $O_2$  verbraucht wird, eingesetzt werden. Eine aufwendige Enzympräparation und eine Kofaktoregenerierung entfällt. Multienzymreaktionen können sehr einfach durch Mikroorganismen durchgeführt werden. Diese Vorteile der mikrobiologischen Elektroden werden aber durch den Nachteil der unspezifischen Wirkung zum Teil wieder aufgehoben. Ein spezifischer Nachweis bestimmter Stoffe in komplexen Lösungen, z. B. Fermentationslösungen, ist deshalb mit mikrobiologischen Elektroden nur unter Einschränkungen möglich.

#### Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, o. g. Nachteil der mikrobiologischen Elektrode zu beseitigen und eine den Enzymelektroden vergleichbare Spezifität und Schnelligkeit einer Messung zu erhalten.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, mittels mikrobiologischer Elektroden spezifische Naturstoffe in natürlichen Systemen und komplexen Lösungen zu bestimmen. Erfindungsgemäß werden die in den Mikroorganismenelektroden eingesetzten Mikroorganismen kultiviert, indem jeweils die für die Analytik eines bestimmten Naturstoffes (Kohlenhydrate, organische Säuren, Alkohole, Aminosäuren usw.) benutzten Mikroorganismen in einem Nährmedium angezogen werden, das bevorzugt diesen Naturstoff als C-Quelle enthält. Durch diese Anzucht wird das für den entsprechenden Naturstoff benötigte Aufnahmesystem der Mikroorganismen induziert und andere Transportsysteme (deren Substrate nicht vorhanden sind) nicht oder nur schwach ausgebildet. Die Nutzung der jeweiligen spezifischen Transportsysteme der Mikroorganismen für die Substratanalytik er-

möglichst nicht nur eine hohe Spezifität, sondern auch eine sehr schnelle Messung, indem die Änderung der Atmungsgeschwindigkeit als Folge der Substrataufnahme erfaßt wird.

Die auf o. g. Art und Weise angezüchteten Mikroorganismen werden immobilisiert bzw. fixiert zur Herstellung mikrobiologischer Elektroden benutzt. Nach Dosierung des zu bestimmenden Stoffes in die Meßzelle wird die Änderungsgeschwindigkeit der Atmung als Maß für die Substratkonzentration genutzt.

Diese Änderung wird als Stromstärke pro Zeiteinheit gemessen.

Der Vorteil des Verfahrens besteht darin, daß Naturstoffe, mit denen die verwendeten Mikroorganismen kultiviert wurden, ohne großen zeitlichen Aufwand bestimmt werden können. Ein weiterer Vorteil besteht in der Möglichkeit der simultanen Substratbestimmung. Dabei werden mehrere selektive mikrobiologische Elektroden eingesetzt.

#### Ausführungsbeispiele

Die Erfindung wird nachfolgend an Ausführungsbeispielen näher erläutert.

##### 1. Beispiel

Glukosebestimmung mittels im Glukosemedium angezogenen Bacillus subtilis-Zellen

In einem Glukose enthaltenden Medium (20 g Glukose, 5 g Casamino acids, 5 g Ammoniumchlorid, 20 ml Stammlösung Salze ad 1 l 0,134 M Phosphatpuffer pH 6,0; Stammlösung Salze: 0,4 %  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,13 %  $\text{CaCl}_2$ , 0,2 %  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,46 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3,7 %  $\text{HCl}$ ) angezogene B. subtilis-Zellen werden nach 18 - 20stündiger Kultivierung auf Rotationsschüttlern bei 30°C zu Beginn der stationären Phase geerntet und zur Herstellung einer mikrobiologischen Elektrode nach der in DD-WP G 01 N/238 412/8 beschriebenen Art und Weise benutzt. Hierzu werden 100 µl Kulturlösung auf ein Filterplättchen von 2 - 5 mm Durchmesser zentrifugiert, so daß eine Zellkon-

zentration von ca. 0,2 mg Trockengewicht pro Filter erreicht wird. Das Filter wird auf eine Polyäthylenmembran einer Sauerstoffelektrode plaziert und durch eine Dialysemembran zur Lösungsseite abgeschlossen. In eine gerührte bei 30°C temperierte Meßzelle wird 2,5 ml 0,1 mol Phosphatpuffer pH 6,8 eingebracht. Die Sauerstoffkonzentration wird in Ampere mittels Meßverstärker bei einer angelegten Spannung von -600 mV gemessen bzw. die Änderung der Stromstärke nach Dosierung des Substrates in A/min. Diese Änderungsgeschwindigkeit wird als Maß für die Substratkonzentration genutzt. Nach Dosierung von 100 µl Glukose enthaltende Lösung fällt die Sauerstoffkonzentration (gemessen als Strom) infolge der verstärkten Atmung rapid. Diese Änderung der Stromstärke pro Zeiteinheit (A/min) ist proportional der Glukosekonzentration (Tabelle 1). Die Ansprechzeit der Elektrode beträgt 2 sek. Werden Maltoselösungen dosiert, tritt nur eine äußerst geringe Änderung der Stromstärke, d. h. des Sauerstoffverbrauchs auf (Tabelle 1). Nach einer Substratbestimmung wird die Meßzelle 2 mal mit Phosphatpuffer gespült.

Tabelle 1

Glukosebestimmung mittels glukoseselektiver Mikroorganismenelektrode (*B. subtilis*) im Glukosemedium angezogen. Zur Kontrolle wird die Änderungsgeschwindigkeit der Stromstärke pro min. nach Maltosedosierung angegeben

| Substrat Konz. [mM] <sup>1)</sup> |      | Änderung der Stromstärke pro Zeiteinheit $\left[ \frac{\mu A}{min} \right]$ |
|-----------------------------------|------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Glukose                           | 0    | 0                                                                           |
|                                   | 0,15 | 0,14                                                                        |
|                                   | 0,6  | 0,64                                                                        |
|                                   | 1,2  | 0,89                                                                        |
| Maltose                           | 0    | 0                                                                           |
|                                   | 0,15 | 0,02                                                                        |
|                                   | 0,6  | 0,03                                                                        |
|                                   | 1,2  | 0,04                                                                        |

<sup>1)</sup> Endkonzentration im Meßansatz, d. h. bei Dosierung von 100 µl Lösung enthält diese das 25fache.

## 2. Beispiel

### Maltosebestimmung mittels in Maltose angezogener B. subtilis-Zellen

Die zur Präparation einer maltoseselektiven Mikroorganismen-elektrode benutzten B. subtilis-Zellen werden in dem im Beispiel 1 beschriebenen Medium, das an Stelle von Glukose 20 g Maltose enthält, angezogen. Anzucht, Herstellung der Elektrode und Art der Messung entspricht der Beschreibung in Beispiel 1.

Tabelle 2 demonstriert die Abhängigkeit der Änderung der Stromstärke pro Minute von der Maltose und Glukosekonzentration. Ein Vergleich mit den in der Tabelle 1 glukoseangezogenen Zellen verdeutlicht die selektive Wirkung der Anzucht.

### Tabelle 2

Maltosebestimmung mittels maltoseselektiver Mikroorganismen-elektrode (B. subtilis).

Zur Kontrolle wird die Änderungsgeschwindigkeit der Stromstärke pro min. nach Glukosedosierung angegeben

| Substrat | Konz. [mM] <sup>1)</sup> | Änderung der Stromstärke pro Zeiteinheit $\left[ \frac{\mu A}{min} \right]$ |
|----------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Maltose  | 0                        | 0                                                                           |
|          | 0,15                     | 0,25                                                                        |
|          | 0,6                      | 0,81                                                                        |
|          | 1,2                      | 0,76                                                                        |
| Glukose  | 0                        | 0                                                                           |
|          | 0,15                     | 0,09                                                                        |
|          | 0,6                      | 0,21                                                                        |
|          | 1,2                      | 0,22                                                                        |

1) siehe Anmerkung Tabelle 1

### 3. Beispiel

#### Gleichzeitige Bestimmung von Maltose und Glukose in Lösungen mittels selektiver Mikroorganismenelektroden

Eine simultane Bestimmung von Glukose und Maltose in natürlichen Lösungen wird durch den gleichzeitigen Einsatz von maltose- und glukoseselektiven Mikroorganismenelektroden in einer Meßzelle erreicht. Die selektiven Elektroden werden wie in Beispiel 1 und 2 beschrieben, bereitet und in eine Doppelmeßzelle eingebracht.

Durch Glukoseeichlösungen werden die Elektroden eingeeicht und die verschiedenen Empfindlichkeiten der Elektroden ausgeglichen (mit Hilfe verschiedener Empfindlichkeitseinstellungen an den Meßverstärkern), d. h. die Empfindlichkeit der glukoseselektiven Elektrode wird auf die Empfindlichkeit der maltoseselektiven Elektrode eingestellt, da die Glukoseelektrode, wie aus dem Vergleich Beispiel 1 und 2 ersichtlich, empfindlicher auf Glukose reagiert.

Die glukoseselektive Elektrode zeigt die Glukosekonzentration direkt an. Die Differenz der Stromstärke der maltose- und glukoseselektiven Elektrode entspricht der Maltosemenge (Tabelle 3).

Tabelle 3

Simultane Glukose- und Maltosebestimmung mit Hilfe von selektiven Mikroorganismenelektroden

| Testlösungen<br>[mMol] |         | Änderung der Stromstärke pro<br>Zeiteinheit $\left[ \frac{\mu A}{\text{min}} \right]$ |                                           |                                                             | Ermittelte Kon-<br>zentrationen<br>[mMol] |         |
|------------------------|---------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------|
| Glukose                | Maltose | Glukose-<br>selekti-<br>ve Elek-<br>trode                                             | Maltose-<br>selekti-<br>ve Elek-<br>trode | Differenz<br>Maltose-<br>elektr. -<br>Glukose-<br>elektrode | Glukose                                   | Maltose |
| 0,15                   | -       | 0,06                                                                                  | 0,06                                      | 0                                                           | 0,15                                      | -       |
| 0,60                   | -       | 0,20                                                                                  | 0,20                                      | 0                                                           | 0,60                                      | -       |
| -                      | 0,15    | 0,01                                                                                  | 0,25                                      | 0,24                                                        | -                                         | 0,15    |
| -                      | 0,6     | 0,02                                                                                  | 0,81                                      | 0,79                                                        | -                                         | 0,6     |
| 0,15                   | 0,15    | 0,06                                                                                  | 0,31                                      | 0,25                                                        | 0,15                                      | 0,16    |
| 0,15                   | 0,6     | 0,07                                                                                  | 0,87                                      | 0,80                                                        | 0,17                                      | 0,61    |
| 0,6                    | 0,15    | 0,20                                                                                  | 0,26                                      | 0,06                                                        | 0,60                                      | 0,15    |
| 0,6                    | 0,6     | 0,22                                                                                  | 1,00                                      | 0,78                                                        | 0,65                                      | 0,59    |

#### 4. Beispiel

Glutaminsäurebestimmung mittels B. subtilis-Zellen, die in einem glutaminsäureenthaltenden Medium angezogen wurden

Die zur Glutaminsäurebestimmung benutzte Elektrode wurde, wie im Beispiel 1 beschreiben, präpariert, wobei die B. subtilis-Zellen ohne Kohlenhydrate angezogen werden. Hierdurch wird zwar eine 8fache Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber Glutaminsäure im Vergleich zu Zellen, die in einem Glukosemedium angezogen wurden, erreicht, die Glukoseempfindlichkeit wird aber nur um 50 % reduziert (Tabelle 5), so daß eine direkte Glutaminsäurebestimmung mit einer Elektrode in Gegenwart von Glukose nicht möglich ist. Durch Nutzung von 2

Elektroden, einer glukosespezifischen Elektrode (mit Zellen, die im Glukosemedium angezogen werden), die nicht auf Glutaminsäure anspricht, und einer sog. glutaminsäureselktiven Elektrode (Zellen kohlenhydratfrei angezogen), die eine Empfindlichkeit gegenüber Glutaminsäure aufweist, aber noch Glukose anzeigt, ist es möglich, durch Differenzbildung Glutaminsäure mittels mikrobiologischer Elektroden zu bestimmen.

#### Tabelle 4

Glutaminsäurebestimmung mittels glutaminsäureempfindlicher Mikroorganismenelektrode

Zum Vergleich wird die Änderung der Stromstärke nach Dosierung von Glutaminsäure und Glukose einer Elektrode, die in Glukose angezogene Zellen enthält, angegeben.

| Substrat      | Konz. | Änderung der Stromstärke pro Zeiteinheit $\left[ \frac{\mu A}{\text{min}} \right]$ |                                        |
|---------------|-------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
|               |       | Elektrode mit Zellen aus Glutaminsäuremedium                                       | Elektrode mit Zellen aus Glukosemedium |
| Glukose       | 0,15  | 0,13                                                                               | 0,25                                   |
| Glutaminsäure | 1,2   | 0,16                                                                               | 0,02                                   |

1) Anmerkung: Tabelle 1

#### 5. Beispiel

Glukosebestimmung mittels immobilisierter, auf Glukose angezogener *B. subtilis*-Zellen

Die Kultivierung erfolgt wie im Beispiel 1. Die speziell auf Glucose kultivierten Zellen werden durch Zentrifugation von der Nährboillon abgetrennt, wobei 100 ml verwendet werden. Der Rückstand wird mit 10 ml Phosphatpuffer versetzt und aufgerührt.

5  $\mu$ l der Kleberlösung (2,5 g handelsüblicher Kleber, Epasol-Kontakt, wird mit 30 ml Essigsäureäthylester gemischt) werden auf eine Polyäthylenfolie gegeben. Direkt auf den trocknenden Kleber werden 10  $\mu$ l der Zellsuspension aufgebracht. Die so präparierte Polyäthylenfolie wird 20 Minuten in einem Exikator unter Vakuum aufbewahrt. Danach werden auf die Zellen weitere 5  $\mu$ l der Kleberlösung gegeben und mit einer Dialysemembran abgedeckt.

Am nächsten Tag wird die trägerfixierte Mikroorganismen-Folie zum Bespannen einer Sauerstoffelektrode benutzt. Die Herstellung der Elektrode und die Art der Messung entsprechen dem im Beispiel 1 Beschriebenen. Tabelle 5 gibt die Stromwerte für Glukose und Maltose wieder.

Tabelle 5

Glukose- und Maltosebestimmung mittels immobilisierter, glukoseselektiver B. subtilis-Zellen

|        |            | Glukosezugabe:<br>0,15 mM [ $\mu$ A/min] | Maltosezugabe:<br>0,15 mM [ $\mu$ A/min] |
|--------|------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| 1. Tag | 1. Messung | 0,12                                     | 0                                        |
|        | 2. Messung | 0,11                                     | 0                                        |
|        | 3. Messung | 0,13                                     | 0                                        |
|        | 4. Messung | 0,12                                     | 0                                        |
| 2. Tag | 1. Messung | 0,11                                     | 0                                        |
|        | 2. Messung | 0,12                                     | 0                                        |
|        | 3. Messung | 0,10                                     | 0                                        |
| 3. Tag | 1. Messung | 0,11                                     | 0                                        |
|        | 2. Messung | 0,10                                     | 0                                        |
|        | 3. Messung | 0,10                                     | 0                                        |
| 6. Tag | 1. Messung | 0,09                                     | 0                                        |
|        | 2. Messung | 0,10                                     | 0                                        |
|        | 3. Messung | 0,09                                     | 0                                        |

#### 6. Beispiel

Maltosebestimmung mittels immobilisierter, auf Maltose angezogener B. subtilis-Zellen

Die Kultivierung erfolgt wie im Beispiel 2. Die speziell auf Maltose kultivierten Zellen werden entsprechend dem Beispiel 5 auf einer Polyäthylenfolie mit der Kleberlösung trägerfixiert und in gleicher Weise werden, unter Verwendung einer Sauerstoffelektrode, jeweils Glukose- bzw. Maltoselösungen vermessen.

Tabelle 6

Maltose- und Glukosebestimmung mittels immobilisierter,  
maltoseselektiver B. subtilis-Zellen

|        |            | Glukosezugabe:<br>0,15 mM [ $\mu$ A/min] | Maltosezugabe:<br>0,15 mM [ $\mu$ A/min] |
|--------|------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| 1. Tag | 1. Messung | 0,02                                     | 0,30                                     |
|        | 2. Messung | 0,01                                     | 0,28                                     |
|        | 3. Messung | 0,03                                     | 0,31                                     |
| 2. Tag | 1. Messung | 0,01                                     | 0,29                                     |
|        | 2. Messung | 0,01                                     | 0,30                                     |
|        | 3. Messung | 0,02                                     | 0,30                                     |
| 3. Tag | 1. Messung | 0,01                                     | 0,29                                     |
|        | 2. Messung | 0,01                                     | 0,28                                     |
|        | 3. Messung | 0,01                                     | 0,30                                     |
| 6. Tag | 1. Messung | 0,01                                     | 0,28                                     |
|        | 2. Messung | 0,01                                     | 0,28                                     |
|        | 3. Messung | 0,02                                     | 0,29                                     |

Erfindungsanspruch

- 1) Verfahren zur Bestimmung von Naturstoffen (Kohlenhydraten, organischen Säuren, Alkoholen, Aminosäuren usw.) in komplexen Gemischen oder Lösungen mit Mikroorganismenelektroden, dadurch gekennzeichnet, daß die für die Analytik eines bestimmten Stoffes in mikrobiologischen Elektroden benutzten Mikroorganismen in Nährlösungen mit diesem Naturstoff angezogen werden und die Änderungsgeschwindigkeit der Atmung nach Dosierung des bestimmten Stoffes als Maß für dessen Konzentration als Stromstärkeänderung pro Zeit gemessen wird.
- 2) Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß nach o. g. spezifischer Anzucht erhaltene Mikroorganismen immobilisiert bzw. fixiert in den mikrobiologischen Elektroden eingesetzt werden.
- 3) Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere selektive mikrobiologische Elektroden zur simultanen Substratbestimmung eingesetzt werden.