

# Gut zu wissen, was drin ist!

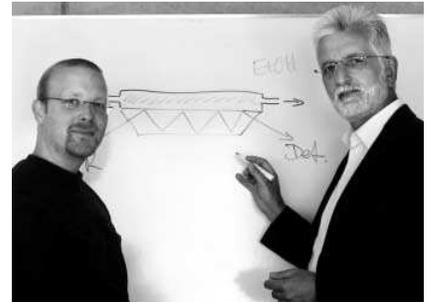
## Infrarot-Sensorik in der Biotechnologie und in der Lebensmittelchemie

Die genaue Kenntnis der Inhaltsstoffe einer Prozessflüssigkeit oder eines Produkts interessiert den Chemiker genauso wie den Biochemiker, den Biotechnologen, den Lebensmittelchemiker oder den Bierbrauer. Vor allem bei Lebensmitteln sind wir Endabnehmer oft diejenigen, die die Inhaltsangaben am kritischsten lesen. Gesetzliche Regelungen oder Steuervorschriften erfordern, dass Inhaltsstoffe beim Prozess oder im fertigen Produkt präzise bestimmt werden können. Bei Fermentationen möchte man gerne einen Schritt weiter gehen und Ausgangs-, Zwischen- oder Endprodukte im Prozess in Echtzeit kontrollieren („in-line“), um so die Produktion zu optimieren.

Neben der ganzen Palette der Methoden im Analysenlabor, mit denen „off-line“ eine Prozesskontrolle nach einer Probenentnahme möglich ist, gibt es auch Messverfahren, die direkt an Fermentern, Gär tanks oder Misch- und Abfüllanlagen eingesetzt werden können und zur dauerhaften Überwachung geeignet sind. Dazu gehören beispielsweise optische Farb-, Trübungs- oder Brechzahlmessungen, pH- und Sauerstoffelektroden, Leitfähigkeitsmessungen oder ionenselektive Elektroden, die mit unterschiedlich langen Standzeiten an Reaktionsgefäßen oder Leitungen eingesetzt werden können. Weit verbreitet sind auch Dichtemessungen mit Biegeschwingern oder Messvorrichtungen zur Bestimmung der Schallgeschwindigkeit, mit denen nach entsprechender Kalibrierung für ein bestimmtes Produkt die Konzentration der Inhaltsstoffe ermittelt werden kann. Viele dieser Messgrößen sind jedoch unspezifisch und können von verschiedenen Inhaltsstoffen unterschiedlich beeinflusst werden. Variiert deren Konzentration unabhängig voneinander, kann das Ergebnis vieldeutig sein.

### Infrarotspektroskopie als hochspezifische Methode

Wesentlich spezifischer und selektiver sind spektroskopische Methoden, insbesondere die Infrarotspektroskopie, da sie Inhaltsstoffe anhand ihres Schwingungsspektrums erfasst. Im Nahinfrarotbereich (ca. 1–3  $\mu\text{m}$ ), der vergleichsweise einfach zugänglich ist, können Moleküle anhand ihrer Oberschwingungen detektiert und quantitativ bestimmt werden. Nachteil ist hier jedoch die starke Temperaturabhängigkeit und Überlappung der Beiträge einzelner Inhaltsstoffe, was insbesondere bei wässrigen Systemen erhebliche Probleme bereitet. Im mittleren Infrarotbereich (ca. 3–20  $\mu\text{m}$ ) zeigen die meisten Moleküle ein detailliertes Bandenspektrum, das selektiv wie ein molekularer Fingerabdruck die Identifika-



Oliver Klein und Werner Mäntele

tion erlaubt. Selbst Varianten von Inhaltsstoffen, z.B. verschiedene Zucker, können hier noch klar getrennt und bestimmt werden. Der Nachteil der IR-Spektroskopie in diesem Bereich ist die starke Absorption des Wassers, die bei Transmissionsmessungen sehr geringe Schichtdicken (wenige  $\mu\text{m}$ ) erzwingt, so dass Prozessmessungen kaum möglich sind. Für den Einsatz der Infrarotspektroskopie in der Qualitätssicherung, in der Prozesskontrolle oder in der Biotechnologie haben wir einen anderen Weg entwickelt, der hier anhand eines F+E Projekts für die Getränkeanalytik beschrieben werden soll. Der Prototyp dieses Infrarotsensors für die Bieranalyse hat seine Feuerprobe in Brauereien mit großem Erfolg bestanden, so dass der Sensor jetzt in die Produktion geht.

Warum Bier? Es ist ein weit verbreitetes Genussmittel und gilt in Bayern sogar als Lebensmittel. Mit rd. 4.000 Jahren Tradition ist seine Herstellung wohl der älteste biotechnologische Prozess. Seine Qualität wird durch EU-Richtlinien, die deutsche Bierverordnung von 1990 und das Reinheitsgebot von 1516 festgelegt. Steuerliche und gesetzliche Regelungen bestimmen den Alkoholgehalt. Um alle diese Richtlinien einhalten zu können und mit gleich bleibender Qualität die Kundenbindung zu sichern, werden in Brauereien beim Produktionsprozess, beim Abfüllen und im fertigen Produkt engmaschig Stichproben untersucht. Die Analysenlabors nutzen dabei weitgehend unspezifische Methoden für die Bestimmung einzelner Parameter wie Alkoholgehalt, Extrakt, Stammwürze oder Kohlendioxidgehalt, die mit einem erheblichen personellen Aufwand für die Probenvorbereitung (Entgasen, Filtrieren, Volumenabmessung, Pipettieren, Temperieren,...) verbunden sind.

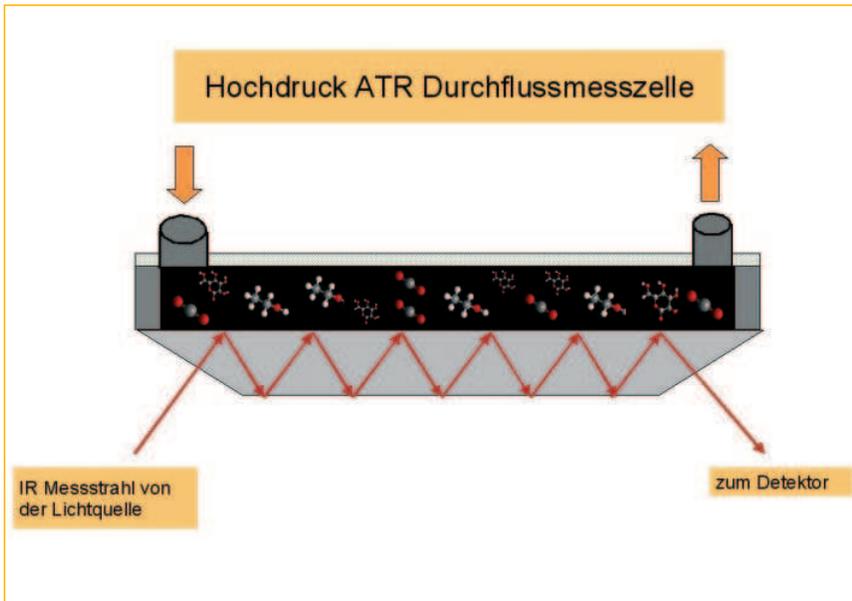


Abb. 1: Schematische Darstellung des Messprinzips der ATR-Durchflusszelle

### Infrarotmessungen im Prozess und am fertigen Produkt

Unser Ziel war es, alle genannten Inhaltsstoffe von Bieren mit einer einzigen Meßmethode schnell, mit sehr hoher Genauigkeit, und ohne jegliche Probenvorbereitung zu bestimmen. Wir haben dazu eine Messzelle für die Infrarotspektrosko-

pie entwickelt, die das Prinzip der abgeschwächten Totalreflexion (ATR) nutzt (Abb. 1). Dabei wird der Messstrahl in einem infrarotdurchlässigen Material mit hoher Brechzahl wie in einem Lichtleiter geführt. Abhängig von der Wahl des Materials und der Abmessungen ergibt sich eine bestimmte Anzahl von Totalreflexionen. An diesen Stellen tritt der Infrarot-

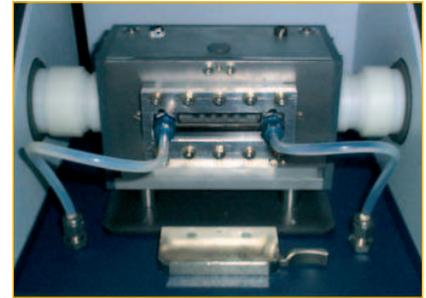


Abb. 2: a) Druckfeste ATR-Messzelle; b) Liquilyzer mit Anstechvorrichtung

strahl eine kleine Strecke ( $\approx \mu\text{m}$ ) in das andere Medium aus und liefert Informationen über die darin gelösten oder suspendierten Moleküle. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Schichtdicke der Zelle – anders als in Transmission – frei gewählt und dem Messproblem angepasst werden kann. Wenn eine der aktiven Oberflächen des ATR-Materials in Kontakt

mit der zu untersuchenden Lösung gebracht wird, sind auch in-line Messungen an Fermentern oder an Rohrleitungen möglich. Aufgrund der verwendeten IR-Wellenlängen (ca. 3–15  $\mu\text{m}$ ) ist die Lichtstreuung bei trüben Proben kein Problem, so dass auf Filtration verzichtet werden kann. Eine druckfeste ATR-Zelle mit einer Flüssigkeitsführung, die zur Minimierung von Ablagerungen optimiert wurde (Abb. 2a), wurde bei unserem Sensor mit einem modifizierten Infrarotspektrometer und einem Probengeber so kombiniert, dass Getränkeproben direkt aus der Flasche oder der Dose unter Druck ( $\text{N}_2$ ) entnommen und im Durchfluss analysiert werden können (Abb. 2b). Dazu wird der Kronenkorken bzw. der Dosenboden unter Druck ( $\text{N}_2$ ) angestochen und der Inhalt durch die Zelle befördert. Ein Grobpartikelfilter verhindert, dass Metall- und Kunststoffteile, die beim Anstechen der Gefäße abgelöst werden können, in die Zelle gelangen. Ventile und Durchflussregler kontrollieren den Fluss. Der eigentliche Messvorgang, d.h. die Aufnahme der Infrarotspektren, dauert nur etwa eine halbe Minute.

### Kalibrierung und Auswertung

Für die Auswertung der Spektren wird der gesamte MIR-Bereich verwendet. Dabei bilden sich bestimmte Inhaltsstoffe in bestimmten Spektralbereichen besonders deutlich ab. Abbildung 3 zeigt ein Spektrum eines Bieres (Schöffelhofer Kristallweizen), von dem ein Wasserspektrum abgezogen wurde. Während das gelöste  $\text{CO}_2$  sich als intensive Bande bei ca. 2.350  $\text{cm}^{-1}$  abbildet, überlagern die Absorptionen des Alkohols und der sehr heterogenen Extraktstoffe. Wenn nur eine dieser Größen variiert, so können im Prinzip einfache univariate Analysenmethoden zur Auswertung benutzt werden. Abbildung 4 zeigt dies als Beispiel an einer Serie von Absorptionsspektren, bei denen ein alkoholfreies Bier künstlich durch Zugabe von Alkohol „aufgespritzt“ wurde. Für die Alkoholbestimmung würde hier ein Auswerten der Absorptionsbanden (es sind die Moden der C-O-H Gruppe) genügen.

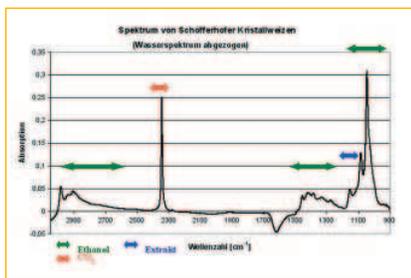


Abb. 3: IR-Spektrum eines Bieres (Schöffelhofer Kristallweizen) mit abgezogenen Wasserbanden. Deutlich zu erkennen sind die überlappenden Alkohol- und Extraktbanden um 1.100  $\text{cm}^{-1}$

Bei der Analyse im Prozess und bei verschiedenen Produkten variieren aber die Konzentrationen von Alkohol, Extrakt und  $\text{CO}_2$  unabhängig voneinander, so dass man auf eine multivariate Kalibrierung angewiesen ist. Eine multiple lineare Regression (MLR), bei der die Absorptionswerte ( $A_1, A_2, A_3, \dots, A_n$ ) bei verschiedenen Wellenlängen genutzt werden, führt dabei zu Problemen: Da die Zahl der zur Kalibrierung verwendeten Proben i.d.R. kleiner ist als die Zahl der gemessenen Wellenlängen, treten lineare Abhängigkeiten im Gleichungssystem auf, die zu Instabilitäten führen. Einen Ausweg bietet die Auswahl charakteristischer Wellenlängen, aus denen die Konzentration eines Inhaltsstoffs bestimmt werden kann. Diese Möglichkeit ist dann besonders attraktiv, wenn diskrete Wellenlängen zur Messung verwendet werden. Wir verfolgen diese Methode mit neuartigen Quantenkaskaden-Infrarotlasern (QCL), die in Zukunft zu besonders einfachen und zuverlässigen IR-Sensoren führen werden. Ein zweiter Ausweg ist die Hauptkomponentenregression (principal component regression, PCR) oder partial least square (PLS) -Regression, bei der aus den Absorptionswerten zunächst Linearkombinationen gebildet werden, die mit den Konzentrationen korreliert werden.

Für die PCR oder PLS-Regression musste zunächst ein Ensemble von Kalibrierproben erstellt werden, das die Variation der zu messenden Parameter gut abdeckt. Im vorliegenden Fall mussten dazu die strengen Vorgaben der Brauereien beachtet werden (s. Tab. 1). Zur Kalibrierung haben wir zum einen Modellsysteme („Kunstbier“) verwendet. Ein realistischeres Kalibriersystem war ein Ringversuch mit rund 30 Brauereien und rund 100 verschiedenen Biersorten, die das gesamte Spektrum vom alkoholfreien Bier zum Starkbier sowie traditionelle Biermischgetränke (z.B. Radler) einschlossen. Exotische Biermischgetränke (z.B. Bier mit Bananensaft oder Rotwein) können ebenfalls erfasst werden, wurden aber von uns bewusst ausgeschlossen (beide Autoren sind Biertrinker !). Die Analyse des Hersteller-

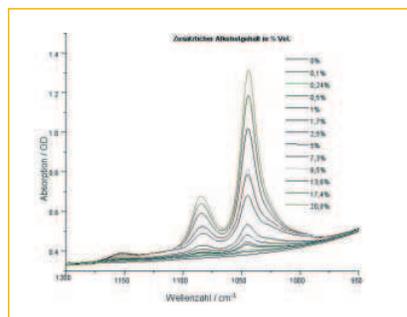


Abb. 4: IR-Spektrum eines alkoholfreien Bieres mit künstlich erhöhtem Alkoholgehalt

labors wurde für jedes Bier zur Erstellen eines Kalibriermodells benutzt. Trotz der unterschiedlichen Fehler der jeweiligen Analysenlabors war dieses Kalibriermodell außerordentlich stabil und lieferte präzise Ergebnisse. Um die Fehler weiter zu reduzieren, wurde ein Kalibriermodell mit den verschiedenen Bieren einer einzigen Großbrauerei erstellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 in Form von Korrelationsdiagrammen gezeigt, bei denen der aus den Infrarotspektren bestimmte Wert gegen den Wert der Referenzanalyse aufgetragen ist. Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Infrarotmessung erreicht bzw. übertrifft die Anforderungen der Brauereien problemlos. Hier muss beachtet werden, dass der Fehler der konventionellen Laboranalyse bei der beschriebenen Bildung des Kalibriermodells in die Infrarotbestimmung eingeht. Mit noch genaueren Laboranalysen als Basis für ein Kalibriermodell ließe sich die Präzision der Methode weiter steigern.

### Fazit

Mit der Infrarotmessung lässt sich bei der Getränkeanalytik eine unabhängige Bestimmung von Alkohol, Extrakt und gelöstem  $\text{CO}_2$  in einem Schritt durchführen. Die Methode benötigt keinerlei Probenvorbereitung und erlaubt die direkte Probenentnahme aus Flaschen, Dosen und anderen Gebinden. Alternativ kann der Messvorrichtung die Probe aus einem Tank oder einem Rohrleitungssystem zugeführt werden, so dass eine Prozessüberwachung in Echtzeit möglich ist. Das Verfahren lässt sich auch bei sehr trüben Bieren anwenden und benötigt mit weniger als 1 Minute nur einen Bruchteil des Zeitaufwands herkömmlicher Methoden.

### Perspektiven:

Die Bestimmung von Inhaltsstoffen ist nicht auf die hier genannten Parameter beschränkt. Mit geeigneten Kalibriermodellen können beispielsweise verschiedene Zucker, Fruchtsäuren oder Vitamine bestimmt werden, ebenso Fette in Milch oder Zuckerzusatzstoffe in Lösung. Unter Verwendung von ATR-Zellen, die für Fermenter angepasst werden („ATR-Flansch“), kann die Methode zur in-line Überwachung von Fermentationsprozessen verwendet werden. Bislang verwen-

Tab. 1

Inhaltsstoffe	Messbereich	geforderte Genauigkeit
Alkohol	0–10 Vol.-%	$\pm 0,02$ Vol.-%
Gelöstes $\text{CO}_2$	0–10 g/l	$\pm 0,05$ g/l
Extrakt	0–10 Gew.-%	$\pm 0,02$ Gew.-%

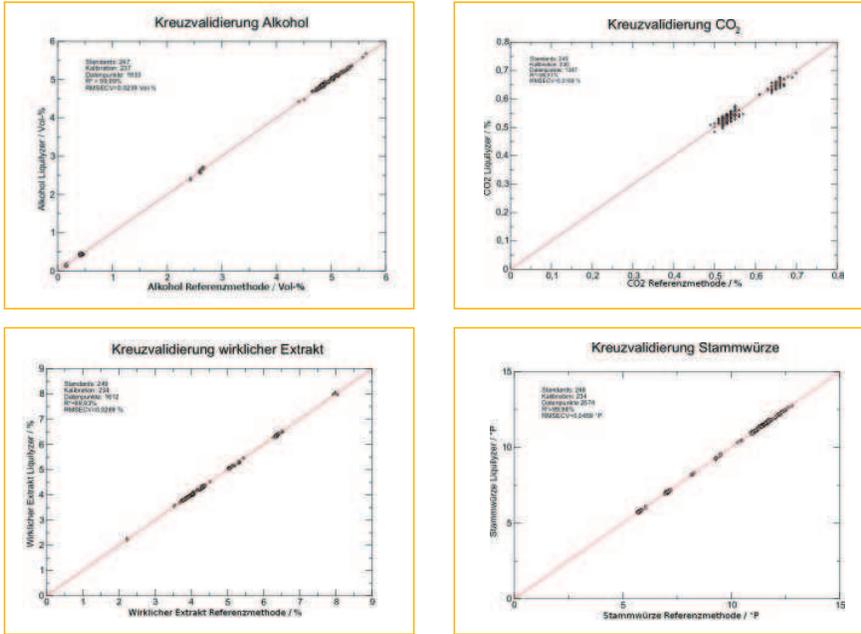


Abb. 5: Korrelationsdiagramme für Alkohol, Extrakt, CO<sub>2</sub> und Stammwürze

den wir zur spektroskopischen Messung modifizierte Fourier-Transform Infrarotspektrometer. Die ersten Ergebnisse mit Infrarotlasern bei diskreten Wellenlängen in Verbindung mit einem ATR-Probeninterface zeigen jedoch, dass diese Methoden in der Sensorik ausgezeichnete Chancen haben werden.

### Danksagung

Das vorliegende F+E Projekt wurde im Rahmen einer Industriekooperation mit der Fa. Centec GmbH (Maintal) unter dem Management der Innovectis-GmbH, dem Tochterunternehmen der Johann Wolfgang Goethe-Universität, durchgeführt und von

der Technologiestiftung Hessen gefördert. Die Autoren danken Herrn Dr. O. Schöller und Herrn Prof. Dr. H. Offermanns (Innovectis GmbH) sowie Herrn Dr. Hubert Koukol und Herrn Robert Koukol (Centec GmbH) für die Kooperation im beschriebenen F+E Projekt, Herrn Braumeister Winter (Binding-Brauerei, Frankfurt) für die Hilfe bei der Erstellung von Kalibriermodellen sowie der Technologiestiftung Hessen für die Förderung des Gesamtprojekts.

### Prof. Dr. Werner Mäntele

Prof. für Biophysik im Fachbereich Physik der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main; Direktor des Inst. für Biophysik; Studium der Physik an der TU Karlsruhe und der Uni Freiburg; 1982 Promotion in Physikalischer Chemie; 1988 Habilitation für Biophysik; 1990–1993 Heisenbergstipendiat der DFG; 1994–1997 Prof. für Physikalische Chemie an der Universität Erlangen. Seit 1997 an der JWG-Uni.

### Dr. Oliver Klein

Wissenschaft. Mitarbeiter am Inst. für Biophysik der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main; Studium der Physik an den Universitäten Marburg und Frankfurt; 2004 Promotion in Physik.

Institut für Biophysik

Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Max von Laue-Str. 1, 60438 Frankfurt am Main  
maentele@biophysik.uni-frankfurt.de