

测糖微生物传感器的研究

张先恩 张 兴

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

由酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和氧电极组成的微生物传感器用于蔗糖等低分子糖的测定。响应动力学过程分析表明, 动态测定法比稳态测定法优越。对胶液中蔗糖浓度测定, 响应时间小于1min, 线性范围0—100mg/L, 相对误差为 $\pm 4\%$, 平均回收率为97%。乙醇和精氨酸对测定有较大干扰, 22种氨基酸混合液对测定干扰不明显。传感器经连续使用一个月, 500次测定, 活力仍稳定, 无线性漂移现象。

该微生物传感器对低分子糖类的响应选择性顺序为: 果糖>麦芽糖>葡萄糖>蔗糖, 在以上述糖作为唯一生长碳源培养微生物时, 可采用本方法测定其含量。

关键词 微生物传感器; 糖测定; 酿酒酵母

在微生物发酵和生理学研究中需要及时了解培养基中糖含量的变化以调整生产或细胞代谢; 在临床上则常常根据体液的含糖水平帮助诊断某些疾病。因此需要快速准确的测定方法。传统的化学法、比色法、旋光法等各具特点, 但均为手工操作, 过程较繁琐、耗时, 且不易实现自动化。

Updike等^[1]创立了酶电极法, 其特点是测定迅速、简便, 有足够的精确度。迄今已报道了一大批用于测糖的生物传感器^[2-8], 包括酶电极和微生物电极。前者已有商品, 优点是响应快(1—2min), 滞后弱, 误差小, 但工作寿命较短, 如葡萄糖酶电极寿命一般为20天, 蔗糖酶电极寿命为10天^[8], 因此代价较高; 后者工作寿命长达数月, 但响应慢(10min左右), 洗脱恢复时间长, 加之专一性较差, 误差较大, 实际应用受到限制。鉴于上述原因, 仍须探索更完善的方法。

本实验设计了酵母菌传感器, 用于发酵糖的测定, 研究了传感器的响应规律, 采用动态测定法, 为实现长寿命实用型测

糖生物传感器提供了基础数据。

材料与 方法

(一) 工作菌株

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*), 为本实验室保存菌株。

(二) 细胞的培养与固定化

将细胞从PYG斜面接种到 PYG液体培养基(g/L): 蛋白胨1.25, 酵母膏1.25, 葡萄糖3.0, pH6.0, 于30℃摇床培养24h (150rpm), 离心10min (3000rpm), 收集菌体, 用0.01mol/L 磷酸缓冲液(pH5.8) 洗涤菌体两次, 通过吸滤将0.15mg细胞固定在 Teflon 膜与多孔混合纤维素膜(0.45 μ m 孔径)之间, 即所谓夹层固定法^[9]。

(三) 酵母菌传感器组成及工作系统

酵母菌传感器由氧电极和生物膜两部分组成(图1A)。氧电极部分包括 Pt 阴极、Ag-AgCl阳极, 0.5mol/L KCl 内充

本文于1988年4月12日收到。

张素琴和朱湘民同志曾协助本研究, 特此致谢。

液和聚四氟乙烯膜。微生物膜紧贴在氧电极头表面, 覆盖以尼龙网并用橡胶圈固定。

传感器工作系统(图1B)由CY-2测氧仪、微生物传感器、测量槽(容积5ml)、恒温水浴、控温磁力搅拌器和XWT自动平衡记录仪组成。

(四) 测定条件

以0.01mol/L磷酸缓冲液(pH5.8)为稀释液, 控温 $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 恒速搅拌维持测量槽中溶解氧饱和, 待传感器内源呼吸输出电流值稳定后加入待测试样, 采用动态或稳态测定法。

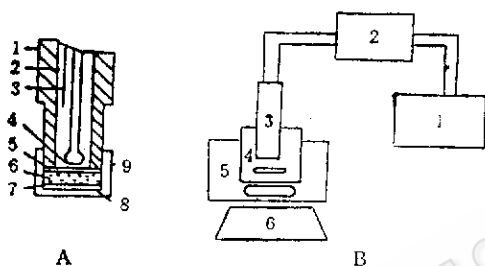


图1 测糖微生物传感器和工作系统

Fig.1 Microbial sensor (A) and its working system (B) for sugar estimation

A: 1. 绝缘套 Insulation jacket 2. 电解质 Electrolyte 3. Ag/AgCl阳极 Anode 4. Pt阴极 Cathode 5. 气透膜 Teflon membrane 6. 固定化酵母细胞 Immobilized yeast cells 7. 微孔膜 Porous membrane 8. 尼龙网 Nylon net 9. 橡皮圈 oring

B: 1. 记录仪 Recorder 2. 放大器 Amplifier 3. 微生物传感器 Microbial sensor 4. 测量槽 Measuring cell 5. 恒温水浴 Water bath 6. 磁力搅拌器 Magnetic stirrer

结果和讨论

(一) 酵母菌传感器响应动力学分析

图2为传感器对蔗糖等糖类物质的典型响应曲线。当传感器中细胞内源呼吸稳定后, 电流输出为恒值, 此时加入测试样品, 底物经扩散作用进入细胞膜层, 立即诱发细胞的外源呼吸。响应曲线可分为三

个阶段(图2): (1) 一级响应阶段, 从内源呼吸转为外源呼吸, 传感器膜界面氧分压恒速下降, 表现为输出电流直线下跌, 这一阶段大约维持40—60s; (2) 混合响应阶段, 细胞呼吸速率逐渐减弱, 传感器输出电流的变化为非线性; (3) 零级响应阶段, 细胞呼吸水平达最大值, 此时氧扩散与细胞耗氧之间建立动态平衡, 传感器输出电流在新的水平上重新稳定。整个响应过程约需5—15min。

从一级响应阶段曲线和二级响应阶段曲线之间的拐点处引出切线, 该切线斜率为初始响应变化速率, 记为 dI/dt , 它与响应底物浓度 $[S]$ 有关, 即 $dI/dt \sim [S]$ 。用响应斜率对底物浓度作图称为动态法。

当响应达零级阶段时, 膜界面相对氧分压的改变(ΔpO_2)亦取决于底物浓度, 于是又有传感器输出电流的变化 $\Delta I \sim \Delta pO_2 \sim [S]$ 。用这种方法计算底物浓度称为稳态法。

本研究包括两种方法的比较与选择。

(二) 动态法与稳态法的比较

用动态法和稳态法测定蔗糖浓度有不同的线性响应范围(图3)。动态法响应范围高至100mg/L, 稳态法仅达75mg/L。这种差异可归咎于细胞与环境的综合效应, 与测试搅拌速度、外部溶液的供氧能力, 底物在传感器膜界面和细胞内的传质速率等因素有关。用两种方法分别对标准蔗糖溶液测定, 就其结果进行综合比较(表1), 动态法具有响应迅速, 洗脱时间短, 分析误差较小和线性范围较宽等特点, 相比之下, 稳态法显然不具备这些特点。至此本实验采用动态测定法。

(三) 底物专一性

由于细胞含有全酶系统, 专一性成了细胞传感器的另一个突出问题^[10]。本传感器对十几种常见氨基酸和发酵用糖类测

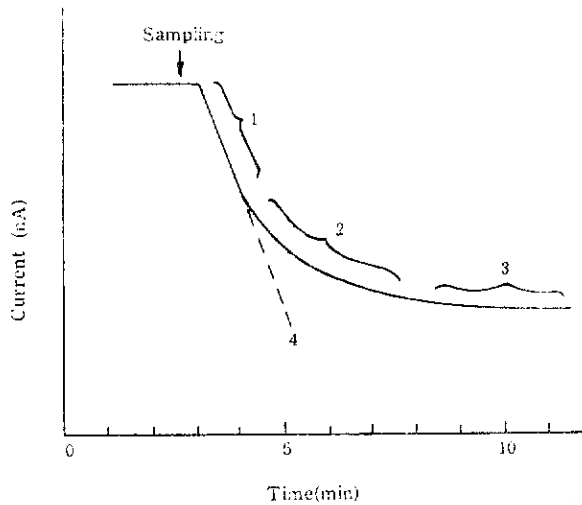


图2 典型的响应过程动力学曲线

Fig. 2 Typical kinetic response curve (current change v.s. time, min)

1. 一级响应阶段 First-order response 2. 混合或二级响应阶段 Second-order response 3. 零级响应阶段, 传感器输出电流改变值与底物浓度成比例 Zero-order response, the current change is proportional to concentration of substrate 4. 一级响应阶段的切线, 其斜率与底物浓度成比例 Tangent line of first-order response, the slope of this line is proportional to concentration of substrate

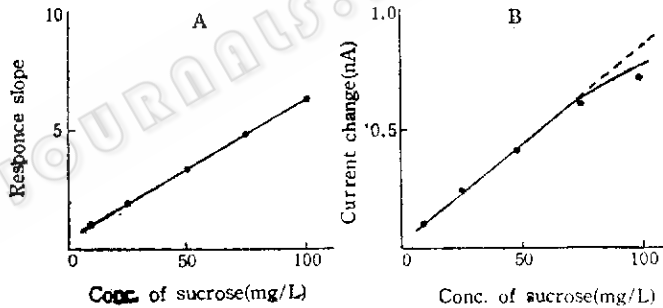


图3 动态法与稳态法的工作曲线的比较

Fig. 3 Comparision of linear response between kinetic mehtod and steady state method

A. 动态法响应线性范围为0—100mg/L, B. 稳态法响应线性范围为0—75mg/L

The linear range is up to 100mg/L for kinetic method (A) and up to 75mg/L for steady state method (B)

表1 动态法与稳态法的比较

Table 1 Comparisons between kinetic and steady state methods

	响应时间 Response time(min)	洗脱时间 Wash time(min)	线性范围 Linear range(mg/L)	相对误差 ^a Relative error(%)
动态法 Kinetic method	< 1	5—15	0—100	± 4.6
稳态法 Steady state	5—12	15—25	0—75	± 5.7

^a 对50mg/L蔗糖样品连续测定10次的结果

10 times of response to 50mg/L of sucrose

定结果见表2。

在被测试的底物中, 约50%氨基酸能

引起酵母菌传感器的微弱响应, 40mg/L浓度的样品响应值<0.15; 另约50%氨基酸

表2 酵母菌传感器对氨基酸和糖类的响应
Table 2 Response to amino acids and sugars by the yeast sensor

底物 Substrate	浓度 Concentration (mg/L)	响应 Response (slope)	底物 Substrate	浓度 Concentration (mg/L)	响应 Response (slope)
蔗糖 Sucrose	40	2.50	天冬氨酸 Asp	40	0.61
	25	1.80	色氨酸 Try	40	0.18
葡萄糖 glucose	40	9.80	赖氨酸 Lys	40	0.36
果糖 Fructose	40	5.80	苯丙氨酸 Phe	40	0.37
淀粉 Starch	40	0	脯氨酸 Pro	40	0.36
22种混合氨基酸	25	0.60	精氨酸 Arg	40	1.03
22 mixed amino acids	40	0.60	苏氨酸 Thr	40	0
蔗糖 + 混合氨基酸	25 + 25	1.90	异亮氨酸 Ile	40	0.14
Sucrose + mixed AA			半胱氨酸 Cys	40	0.13
谷氨酸 Glu	40	0.12	乙醇 Ethanol	20	3.20
甘氨酸 Gly	40	0.38	乙醇 + 蔗糖	20 + 25	5.14
蛋氨酸 Met	40	0.32	Ethanol + sucrose		

引起较弱响应, 响应值在0.3—0.4之间; 唯精氨酸能导致较强响应信号(1.03); 22种氨基酸等量混合液的响应值为0.6, 介于较强与较弱之间。然而将混合氨基酸与蔗糖溶液均匀混合后再进行测定, 响应值仅比单纯蔗糖的响应值高出0.1(而不是预期的0.6), 体现了传感器中细胞对糖类物质的利用优先于某些氨基酸, 这对提高对糖类物质测定的专一性是非常有利的。然而氨基酸的干扰是存在的, 因而要避免传感器用于高含氨基酸的环境, 至于一

发酵液, 氨基酸含量低于1000mg/L, 稀释100倍以上基本不干扰对糖的测定, 此外, 乙醇产生预期的强干扰信号, 使该传感器不能用于产生酒精的环境。

传感器对几种低分子糖类有强的响应, 其响应的 K_s (单底物响应米氏常数)和 V_m (最大响应速率, 以斜率表示)见表3。根据 V_m/K_s 值比较^[11], 该传感器测糖的适宜顺序为果糖>麦芽糖>葡萄糖>蔗糖, 对淀粉全无响应。所以, 传感器适合低分子糖底物发酵液的测定。

表3 酵母菌传感器对低分子糖类响应的 K_s 和 V_m 值
Table 3 Kinetic parameters of response to sugars

底物	K_s (mg/L)	V_m (斜率, Slope)	V_m/K_s
蔗糖 Sucrose	500	25	0.05
葡萄糖 Glucose	203	57	0.28
麦芽糖 Maltose	4	8.6	2.15
果糖 Fructose	4	11	2.75

(四) 发酵液的蔗糖浓度测定

传感器用于以蔗糖为唯一碳源的类胡萝卜素微生物发酵过程监测, 样品需要量为50 μ l, 测定结果显示蔗糖消耗与生物量增长有明显的异向同步性(图4)将已知浓度的标准蔗糖溶液加入已知蔗糖浓度的发酵液样品中, 用传感器测定, 平均回收率为97.5%(表4), 故认为测定结果可

靠。

(五) 稳定性

酵母菌传感器的稳定性考查包括误差分析, 线性漂移和工作寿命等指标。表5为连续三次对不同加样体积生物色素发酵样品的测定结果。

表5数据表明, 测定同一样品的误差包含了测试系统误差($\pm 4-5\%$)和不

表4 回收率实验
Table 4 Recovery test

样 品 Samples	添加蔗糖 Sucrose added (mg/L)	预期值 Expected value (mg/L)	实测值* Practical value (mg/L)	回收率 Recovery (%)
发酵液 (含22mg/L蔗糖) Fermentation broth containing 22mg/L of sucrose	20	42	44.3	101
发酵液 (含48mg/L蔗糖) Fermentation broth containing 48mg/L of sucrose	20	68	64	94

* 3次测定平均值 Average of 3 measurements

表5 传感器误差分析
Table 5 Error test of the sensor

样 品 Samples	加样体积 Volume of (μ l)	测得蔗糖浓度 Tested sucrose concent. (mg/L)			平均值 Average (mg/L)	相对误差 Relative (\pm %)
发酵液 (含蔗糖) Fermentation broth containing sucrose	10	10000	10500	9500	10000	$\pm 5\%$
	25	11400	12200	11600	11733	$\pm 4\%$

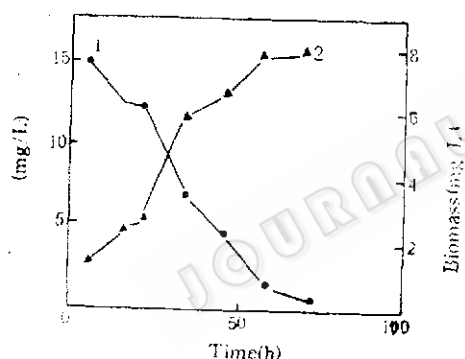


图4 传感器用于发酵液中蔗糖浓度测定, 观察到底物消耗与生物量增长的同步性

Fig. 4 Sucrose estimation in fermentation broth using the yeast sensor, showing that the consumption of sucrose is synchronized to the growth of biomass

1. 蔗糖 Sucrose 2. 生物量 Biomass

同加样体积所测结果之间的相对误差 (约 $\pm 8\%$)。可见选择并确定合适的加样体积是减少分析误差的手段之一。

所谓“线性漂移”, 指随使用时间的延长, 传感器的工作线性范围发生变

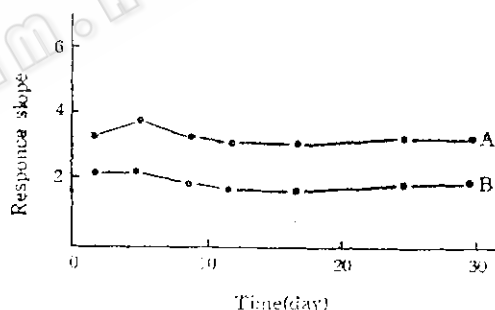


图5 微生物传感器输出的稳定性

Fig. 5 Stability of the microbial sensor calibrated with sucrose solution

蔗糖 Sucrose, A. 50mg/L, B. 25mg/L

化^[9], 但该酵母菌传感器对蔗糖的测定过程中未出现这种现象, 反应了工作菌株细胞中蔗糖呼吸酶系的组成酶特性。

用浓度为25mg/L和50mg/L的蔗糖溶液进行隔日标定, 如图5所示, 酵母菌传感器输出电流值至少在一个月中变化不大, 总的使用次数超过500次。

参 考 文 献

- [1] Updike, S.L. et al.: *Nature*, 214:986, 1967.
- [2] Satoh, I. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 18:269, 1976.
- [3] Karube, I. et al.: *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 7:343, 1979.
- [4] Hirose, S. et al.: *J. Molec. Catal.*, 6:251, 1979.
- [5] Enfors, E.J., et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, 3:29, 1981.
- [6] Graham, A. et al.: *Biotech. Advance*, 3:209, 1985.
- [7] Wollenberger, U. et al.: *Analytica Chimica Acta*, 187:39, 1986.
- [8] Satoh, I. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 18:296, 1976.
- [9] 张先恩等: 环境科学学报, 6 (2):184, 1986
- [10] 张先恩: 工业微生物, 18 (2):38, 1988.
- [11] 陶慰孙等编著: 蛋白质分子基础, 人民教育出版社, P.342, 1981.

STUDY ON MICROBIAL SENSOR FOR SUGAR DETERMINATION

Zhang Xianen Zhang Xing

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, China)

A microbial sensor consisted of immobilized yeast cells (*Sacchomyces cerevisiae*) and an oxygen electrode was used for the determination of sugar. Kinetic method had been developed in the study. For sucrose determination in fermentation broth, the relationship between sucrose concentration and response slope was linear up to 100mg/L, with a response time less than 1 min, a relative error of $\pm 4\%$, and an average recovery rate of 97%. Ethanol and arginine could cause interruption, but no obvious influence of 22 mixed amino acids was observed. The sequence of the sensor selection was as follows: fructose maltose glucose sucrose, according to V_m/K_s .

Key words

Microbial sensor; sugar determination; *Sacchomyces cerevisiae*; kinetic response