

以二茂铁为介质的谷氨酸电流型传感器的研究

李友荣 储 炬 李青山

(华东化工学院 生化工程研究所, 上海)

本文研究了一种用于测定发酵液谷氨酸含量的介质电流型谷氨酸电极。这种电极是由谷氨酸氧化酶同以二茂铁为介质的化学修饰电极复合构成。研究了各种因素对此电极响应的影响和电极本身的性能与实测验证, 结果表明本电极在搅拌反应室(CSR)系统中响应的最适pH为6.8, 最适温度为30℃, 使用寿命为6天, 电极专一性较好。在流通注射分析(FIA)系统中响应的最适pH为7.0, 最适温度为27℃, 测量范围为0.0125—0.125mol/L(注射20μl), 精度(CV)为1.3%, 响应时间为1min, 校正曲线相关系数 $r = 0.998$, 使用寿命为8天, 经实际测量发酵液中谷氨酸含量, 与瓦氏呼吸仪对照, 相对误差为±6%。

关键词 谷氨酸测定; 生物传感器; 谷氨酸氧化酶; 化学修饰; 酶电极

谷氨酸发酵过程中谷氨酸浓度的测量一般采用瓦氏呼吸仪法。此法费时费力, 分析成本较高, 难以发展在线测量。为此, 近年国内外积极研究各种生物传感器来快速测定样品中的谷氨酸含量^[1-3]。

谷氨酸生物传感器的测定原理是基于专一性酶同基质反应, 其产物再由电化学传感器测量, 而将输出的电量与谷氨酸浓度关联。研究过的方法主要有以下几种, 见表1。

表1 基于不同原理的谷氨酸生物传感器
Table 1 Glutamate biosensors based on various principles

生物催化剂 Biocatalyst	检测的反应产物 Reaction products	传感器 Sensors	参考文献 Reference
1 谷氨酸脱羧酶 Glutamate decarboxylase	CO ₂	CO ₂ 电极 CO ₂ electrode	(1)
2 谷氨酸脱氨酶 Glutamate deaminase	NH ₄ ⁺	NH ₃ 电极 NH ₃ electrode	(2)
3 谷氨酸氧化酶 Glutamate oxidase	O ₂	溶氧电极 DO electrode	(3)
4 谷氨酸氧化酶 Glutamate oxidase	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ 电极 H ₂ O ₂ electrode	(4)

方法1的酶特异性较强, 比较灵敏, 但CO₂电极响应虽然较快, 而测定一个样品后使电极的基线恢复到测样前的位置较慢, 需20 min左右。方法2-4受样品溶液中NH₃和O₂的影响, 且要求精密度高的电化传感器才能避免较大误差。我们曾以葡萄糖氧化酶复合在化学修饰电极上成功地测定发酵液中葡萄糖的含量。本文报导

以谷氨酸氧化酶同以二茂铁为介质的化学修饰电极复合构成谷氨酸生物传感器的研究结果。

材料与方 法

(一) 试剂

L-谷氨酸测定试剂盒, Yamasa 酱油

本文于1991年4月6日收到。

株式会社；二茂铁, Sigma 公司；石墨粉, 光谱纯, 上海碳素厂；液体石蜡, C.P.; KH_2PO_4 , A.R.; K_2HPO_4 , A.R., 上海化学试剂总厂；谷氨酸, 上海试剂二厂；半透膜, 截留分子量为 10000；铂, 99.9% 上海化学试剂采购供应站。

(二) 仪器设备

501型超级恒温槽, 重庆实验设备厂；

721型分光光度计, 上海分析仪器厂；pH S-4型酸度计, 杭州亚美电子仪器厂；81-2型恒温磁力搅拌器, 上海曹行无线电元件厂；SV-1型溶出伏安仪, 复旦大学科教仪器厂；VZI 200型微量泵, 华东化工学院机械工厂；XWC-100型自动平衡记录仪, 大华仪表厂；对电极, 自制, 将直径为 0.5 cm 的铂金园片烧接于玻璃管一

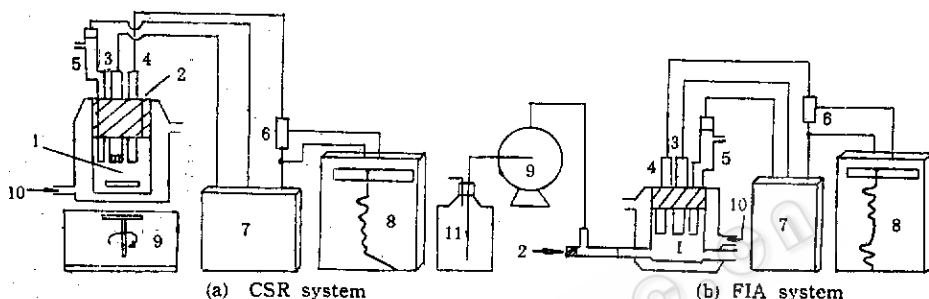


图 1 测量谷氨酸的三电极装置示意图

Fig.1 Schematic diagram of a 3-electrode system for glutamate analysis

1, 反应室 Reaction cell; 2, 加样口 Injection port; 3, 工作电极 Working electrode; 4, 对电极 Counter electrode; 5, 参比电极 Reference electrode; 6, 电位器 Potentiometer; 7, 溶出伏安仪 Voltammeter; 8, 记录仪 Recorder; 9, (a), 电磁搅拌器 (a) Electromagnetic stirrer, 9(b), 微量泵 (b) Micro pump; 10, 循环保温水 Thermostat water; 11, (b) 贮液瓶 Stock solution

端, 用铂金丝引出, 参比电极, 232型, 上海电光器件厂。

(三) 试验装置

测量谷氨酸的装置是三电极搅拌反应瓶(CSR)测量系统和流通注射分析(FIA)系统, 其结构如图 1 所示。

谷氨酸化学修饰电极的结构(见图 2)是由直径为 0.5 cm 的白金园片、石墨糊(二茂铁 135mg, 石墨 2.9 克, 石蜡 1.5 ml)^[6], 谷氨酸氧化酶和半透膜构成, 白金园片用环氧树脂封固在玻璃管内, 靠近管口一端留有一定空隙, 内填满石墨糊, 并将酶固定在石墨糊表面, 在其上复盖一层半透膜, 用 O-型硅胶圈固定。

(四) 测定步骤

1, CSR系统: 开启溶出伏安仪, 设

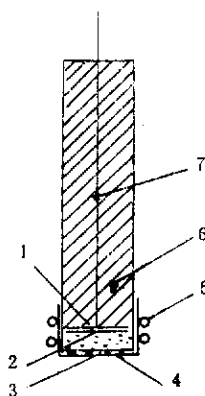


图 2 谷氨酸电极的结构

Fig.2 Structure of glutamate electrode

1, 白金园片 Pt-disc; 2, 石墨糊 Graphite paste; 3, 谷氨酸氧化酶 Glutamate oxidase; 4, 半透膜 Dialysis membrane; 5, O-型圈 O-silicone rubber ring; 6, 环氧树脂 Epoxy resin; 7, 导线 Cable

置电积电位 200mV 作为三电极系统的电源,反应瓶夹层内通入恒温循环水,瓶内加入一定量缓冲溶液,插入三电极,按图 1 (a)接线,开启电磁搅拌和记录仪,待基线走平后,用微量注射器加入样品,待重新获得电流稳定值为止。两次稳定电流值之差在一定范围内与样品中谷氨酸含量成正比。测定一个样品,需将瓶内溶液倒掉,用缓冲液洗涤三次,再测第二个样品。

2. FIA 系统,操作步骤基本上与 CSR 系统相同,只是用微量泵以一定流速将缓冲液打入反应室内,待基线走稳后,再从加样口注入样品,这一方法的优点是操作简便,样品中的谷氨酸被检测后很快又被缓冲液自动冲洗干净。

结果与讨论

(一) 影响谷氨酸电极测定的各种因素

1. 磷酸盐浓度:用CSR和FIA两个系统分别测定不同浓度的磷酸盐缓冲液对电极响应的影响,结果如图 3 所示,在 0.05—0.5mol/L 范围内磷酸盐对CSR系统中电极响应影响不大,却对 FIA 系统中电极响应影响较大,但响应值高峰两者都在 0.2—0.3mol/L。在 0.1mol/L 处两者响应值也较大,考虑到节约试剂和便于比较,两个系统皆以 0.1mol/L 作为测试条件。FIA 系统中的电极响应时间几乎都恒定在 1 min,上下波动很小,所以所有图中都没有给出。

2. pH 的影响:配制不同 pH 的磷酸盐缓冲溶液(0.1mol/L),在 CSR 和 FIA 两个测量系统中分别测定不同 pH 对电极响应的影响,结果(见图 4)表明,在两个测量系统中均以 pH6.8—7.0 电极对谷氨酸的响应最大,故以下的试验以 pH7.0 为

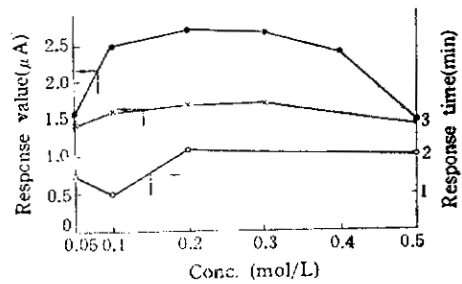


图 3 磷酸盐浓度对电极响应的影响
Fig.3 The effect of phosphate concentration on the response of the electrode

注:谷氨酸浓度 0.1mol/L, 20μl, 0.1mol/L glutamate 20μl, 测定温度 27.5℃ temperature, 27.5℃;

—·— 电极在 FIA 系统中的响应, The response of the electrode in FIA;
—x— 电极在 CSR 系统中的响应, The response of the electrode in CSR;
—o— 电极在 CSR 系统中的响应时间, The response time of the electrode in CSR;

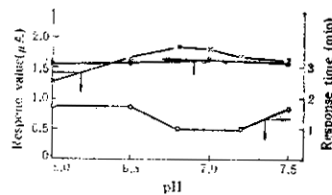


图 4 pH对电极响应的影响
Fig.4 The effect of pH on the response of the electrode

注:谷氨酸浓度 0.1mol/L, 20μl, 0.1 mol/L glutamate 20μl

测定温度 27.5℃
—·— 电极在 FIA 系统中的响应 The response of the electrode in FIA
—x— 电极在 CSR 系统中的响应 The response of the electrode in CSR
—o— 电极在 CSR 系统中的响应时间 Response-time of the electrode in CSR

工作条件。

在 25—32℃ 范围内影响不大,在 CSR 系统中以 30℃ 的响应值最大, 33℃ 便下降。在 FIA 系统中以 27—29℃ 响应值最大。为了延长酶的使用寿命, 尽可能采用较低的测量温度。故以下选择 25℃ 为测量温度。

3. 温度的影响:

于反应室的夹层内通入超级恒温槽的水,维持所需温度,测定不同温度对电极响应的的影响,结果如图 5 所示。

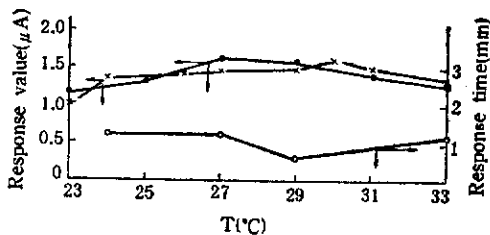


图 5 温度对电极响应的的影响

Fig.5 The effect of temperature on the response of the electrode

注:谷氨酸 0.1mol/L,20 μ l,pH7.0 0.1mol/L glutamatae 20 μ l, pH7.0

—•—电极在FIA系统中的反应 The response of the electrode in FIA

—×—电极在CSR系统中的反应 The response of the electrode in CSR

—○—电极在CSR系统中的响应时间 The response time of the electrode in CSR

4. 金属离子的影响:在谷氨酸溶液中分别加入各种金属离子,浓度均为 0.25%,进行测试,观察对电极响应是否有影响,结果如表 2 所示。在 CSR 系统中, Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、和 Zn^{2+} 对测定几乎无影响,而 Pb^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Hg^{2+} 和 Ag^+ 略有影响。在 FIA 系统中只有 Fe^{2+} 对测量影响程度降低,其它同 CSR 系统。但在发酵液样品中这些金属离子浓度不可能达到这样高的浓度,一般要比所测试的浓度低 2 个数量级,故其影响可忽略。在 FIA 系统中,按 CSR 系统中加入的谷氨酸与金属离子比例混合后加入 70 μ l。

5. 谷氨酸生物传感器的专一性:试验了此电极对各种基质的响应,结果如表 3 所示,电极对七种糖和七种有机酸类基质均无响应。测试的 11 种氨基酸中,在 CSR 系统中,除精氨酸和丙氨酸外其余均

表 2 金属离子对电极输出的影响

Table 2 The effect of metal ions on the response of the biosensor

Metal ions	Relative CSR	Response FIA
Control	14.0	34.0
Mg^{2+}	14.3	35.0
Cu^{2+}	14.0	33.5
Zn^{2+}	13.9	32.5
Pb^{2+}	12.3	32.0
Fe^{2+}	11.8	32.5
Ba^{2+}	11.0	29.0
Hg^{2+}	10.9	25.0
Ag^+	10.0	21.0

注:谷氨酸(0.1 mol/L)20 μ l,金属离子浓度(1mg/ml)50 μ l

Glutamate(0.1mol/L)20 μ l,metal ions concn.(1mg/ml)50 μ l were added

无或略有响应。在 FIA 系统中,精氨酸和天冬氨酸有一定响应,丙氨酸响应较小。一般在谷氨酸发酵液中 L-精氨酸、丙氨酸和天冬氨酸的含量甚微,故本电极对谷氨酸发酵液的谷氨酸含量测定是适用的,尤其是 FIA 系统。

(二) 谷氨酸电极的性能测试

1. 线性响应范围:以同一浓度、不同量的谷氨酸标准溶液注射到含有谷氨酸化学修饰电极的 FIA 系统中观察电极的响应,结果如图 6 所示,电极在 2.5—25 μ l 0.1mol/L(相当于 0.0125—0.125mol/L,注射 20 μ l)谷氨酸范围内呈线性关系,其中线性相关系数 $r=0.998$ 。由上海市测试技术研究所生产现场测试的校正曲线相关系数 $r=0.983$,精密度 $CV=1\%$,响应时间为 1 min。

2. 重现性:在 FIA 系统中,注射 20 μ l 0.1 mol/L 的谷氨酸标准液,重复七次,测量电极响应电流,结果见表 4。表中 $\bar{I}_{0.1}$ 为电极响应平均电流值,SD 为标准偏差,CV 为精密度,由表 4 可知重复性较好。

表3 谷氨酸酶电极的特异性
Table 3 The specificity of glutamate biosensor

Sample (control)	Response(rel.value)		Sample	Response(rel.value)	
	CSR	FIA		CSR	FIA
Glutamate	100	100	DL-Asp	0	20.5
Glucose	0	0	L-Cys	10	8.9
maltose	0	0	Glycine	0	0
D-Fructose	0	0	Valine	0	0
D-Galactose	0	0	Tryp	9	0
Rhamnose	0	0	Alanine	50	10.7
Inulin	0	0	Na-Pyr	0	0
Refinose	0	0	α -Ketoglutaric acid	0	0
L-Phe	0	0	Butyric acid	0	0
L-Arg HCl	44	32	Na-Acetate	0	0
Isoleucine	0	0	Succinic acid	0	0
Tyrosine	0	0	Na-Propionate	0	0
Leucine	0	0			

注: 葡萄糖为100 μ l, 所有添加的基质均为(0.1mol/L)50 μ l, 谷氨酸为20 μ l. 反应条件: 25 $^{\circ}$ C, pH7.0 0.1mol/L磷酸盐缓冲液

Glutamate (0.1mol/L) 20 μ l, all substrates(0.1mol/L) 50 μ L except Inulin 100 μ L were added, 0.1mol/L phosphate buffer(pH 7.0) and 25 $^{\circ}$ C for assay were used.

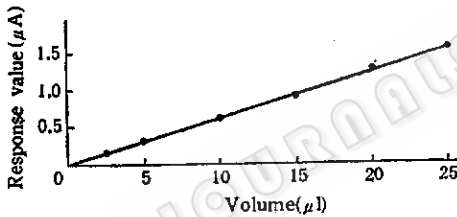


图6 线性响应
Fig.6 Linear response of the electrode
0.1 mol/L glutamate, pH 7.0, 21 $^{\circ}$ C

表4 谷氨酸化学修饰电极 FIA 系统对 0.1 mol/L 谷氨酸标准液注射 20 μ l 的重现性
Table 4 Response reproductivity of the electrode in FIA to 0.1 mol/L, 20 μ A L-glutamate solution.

Response value (μ A)	Number							\bar{I}_{out} (μ A)	SD (μ A)	CV (%)
	1	2	3	4	5	6	7			
	2.11	2.05	2.10	2.06	2.13	2.08	2.04	2.081	0.033	1.3

量,在FIA系统中,电极可使用到第八天,仍有足够的响应灵敏度。

(三) 谷氨酸电极的相关实证

我们将研制的谷氨酸电极及 FIA 系统装置搬到生产现场来测定发酵罐中谷氨酸浓度的变化。发酵液经稀释 25—50 倍后,

3. 使用寿命: 将制备好的含谷氨酸氧化酶的工作电极一直置于室温中使用,在 CSR 系统中,每 15min 测定一个样,每天约测定 30 个样,在 FIA 系统中,每 6 min 测定一个样,每天约测 80 个样,取当天连续测定的七个样平均值列入表 5,由表 5 结果可知,在 CSR 系统中,电极经过 6 天使用,仍然具有足够的响应用于测

用微量注射器吸取 5—25 μ l 直接注入 FIA 系统中测定。

1. 回收率: 同一批号不同发酵时间的发酵液的回收率列于表 6。可见不同发酵时间的发酵液对电极响应值影响不同,发酵前期回收率偏低,发酵后期回收率偏

表 5 电极的测量寿命

Table 5 Usage life of the biosensor

Time (d)	Response value	
	CSR	FIA
1	35.7	43.8
6	28.4	37.2
8	16.3	26.3

注:谷氨酸, 0.0125mol/L, 100 μ l, 21 $^{\circ}$ C
Glutamate (0.0125mol/L)100 μ l, 21 $^{\circ}$ C were used.

表 6 不同发酵时间谷氨酸发酵液的回收率

Table 6 Recovery test of the electrode to glutamate fermentation broth

Fermentation time(h)	Recovery rate(%)
18	94.20
26	93.75
28	99.09
32	97.34
34	103.48

高。

2. 将电极 FIA 系统测定发酵液中谷氨酸含量的数值与瓦氏呼吸仪测定的数值进行比较, 两者比较接近, 现将跟踪的一个批号测试结果示于图 7。对这批数据进行回归分析与线性相关分析。设 y 为 FIA 系统电极响应值, x 为瓦氏呼吸仪测定值。由图 7 数据可得出:

回归方程: $y = 0.9821x + 0.0939$

线性相关系数: $r = 0.993$

由此可见两者测试结果相当一致。

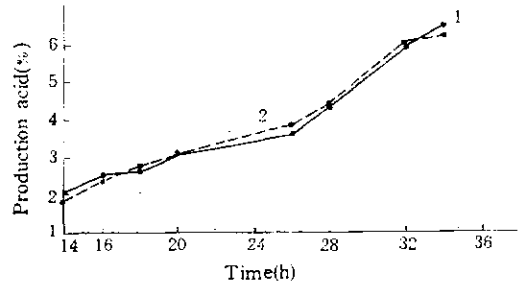


图 7 用酶化学修饰电极 FIA 系统测定发酵液谷氨酸含量同瓦氏法比较

Fig. 7 Comparison between the results using current electrode FIA system and Warburg method for the determination of glutamate during fermentation

1. Current method,
2. Warburg method

结 语

本电极具有测定手续简便, 显示结果快速, 专一性较好, 分析成本低的优点。其测量范围为 0.0125—0.125mol/L (注射 20 μ l), 响应时间为 1 min 左右, 校正曲线相关系数为 0.998。使用寿命约 1 周, 精度 (CV) 1.3%, 测定结果与瓦氏呼吸仪对照, 相对误差为 $\pm 6\%$, 两者的线性相关系数 $r = 0.993$, 回归系数为 0.9821。以上结果说明采用谷氨酸氧化酶同以二茂铁为介质的化学修饰电极复合用于测定发酵液中的谷氨酸含量是可行的。经过进一步的改进可望用于生产实际。

参 考 文 献

- [1] 黄予良等, 华东化工学院学报, 14(3):365—373, 1988.
- [2] Hikuma, M. et al., Anal Chem. Acta., 116:61—87, 1980.
- [3] 大泽久男, 酵素センサの開発上应用, 4:130—138, 1988.
- [4] Karube, I. et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 8:256—264, 1987

Study on Ferrocene Based Amperometric Sensor for Glutamate Determination

Li Yourong Chu Ju Li Qinshan

*(Research Institute of Biochemical Engineering East China University of
Chemical Technology, Shanghai)*

The study on a new glutamate biosensor, which was mainly composed of glutamate oxidase, ferrocene, graphite and platinum disc was presented. Various factors which influence the response of the biosensor to glutamate and the performance of the electrode were studied. The results show that the optimum pH and temperature for the electrode in CSR were 6.8 and 30°C respectively, then in FIA 7.0 and 27°C respectively. Among 25 substrates tested, no apparent response were observed for sugars, organic acids and amino acids, except arginine and alanine. Good linear relationship was obtained within the range of 2.5—25 μ l(0.1mol/L) glutamate. The correlation coefficient of the calibration curve, $r=0.998$, the response time was 1 min, and the useful life of the sensor was about one week. Satisfactory results were obtained when the biosensor was applied to the determination of glutamate in fermentation process.

Key words

Glutamate determination, biosensor, glutamate oxidase, chemically modified electrode, enzyme electrode