

# 应用 FIA 型微生物传感器 测定谷氨酸含量的研究

屠春燕 戴庆成 欧阳平凯

(南京化工大学 南京 210009)

目前应用酶或微生物细胞作为分子识别元件构建生物传感器测定谷氨酸含量的研究引起了广泛的兴趣,并陆续有实例报道<sup>[1~3]</sup>。在这些报道中人们依据不同的酶催化反应选择相应的离子选择性电极,如 CO<sub>2</sub> 电极、NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 电极等,而测量对象有直接的测定谷氨酸,也有测定谷氨酸单钠的间接测定法。本文选用了可固定大量细胞的固定化细胞柱与流动注入法相结合的测量方法,并根据细胞柱的动力学模型分析动态响应曲线,计算测量结果,提高了测量精度,扩大了测量范围。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌种:大肠杆菌 (*Escherichia coli*) NE-4, 本系保存。

1.1.2 试剂:L-谷氨酸(上海试剂二厂),海藻酸钠(上海化学试剂分装厂),戊二醛(25%水溶液上海,化学试剂分装厂),氯化钙(金山县兴塔化工厂)。

1.1.3 培养基(%):牛肉膏 0.5,蛋白胨 1.0,氯化钠 0.5。

### 1.2 方 法

1.2.1 菌体的固定化:选用海藻酸钠作为固定化载体<sup>[4]</sup>,固定化过程如下:将一定量的 *E. coli* 悬浮液 35~37℃ 保温,同时将海藻酸钠(4%)溶于蒸馏水中,在 35~37℃ 保温,以一定比例将两者充分混和,海藻酸钠溶胶的最终浓度为 2.0% 左右,最后用针头将溶胶注入 0.3mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液中制成球状固定化物,再用 0.5% 的戊二醛交联后,放入 4℃ 冰箱待用。

1.2.2 实验流程和仪器:图 1 所示为谷氨酸检测系统 B 实验流程。所用仪器有:502 型 CO<sub>2</sub> 气敏电极(江苏电分析仪器厂),PXJ-1B 型数字式离子计(江苏电分析仪器厂),XWT 台式记录仪(上海大华仪表厂)。恒流泵(上海沪西仪表厂),固定化细胞柱(自制),信号放大器(自制),计算机 IBM-PC/286。

1.2.3 测量步骤:在细胞柱中加入固定化 *E. coli* 颗粒,插入电极后启动恒流泵,使缓冲液(pH5.8)以恒定流速流过固定化细胞柱,待检测条件稳定后,迅速进样,由计算机采集数据,并给出计算结果。图 2 为由记录仪记录的工作曲线。

## 2 数 学 模 型

固定化细胞填充柱反应器的体积很小(约 40cm<sup>3</sup>),经前人研究认为可简化成一级全混流模型,因此可假定体系满足下列条件:(1)液相为全混流,反应体系处于恒温状态;由(1)又可得假定(2)、(3)如下,(2)体系溶液中无底物浓度梯度;(3)在任一时刻各颗粒外表面底物浓度相同;在严格掌握固定化操作条件下,可认为:(4)细胞在颗粒内分布均匀,且在动力学研究的时间内无变性现象发生;(5)载体内部和外部之间不存在屏障效应;(6)反应体系遵循 Michaelis-Menten 动力学行为;则无因次的质量衡算方程如下:

$$\tau_L \frac{du_{iL}}{dt} = - (1 + \mu_i) u_{iL} + \mu_i u_{iL} + u_i(1, t) \quad (1)$$

本文于 1994 年 9 月 9 日收到。

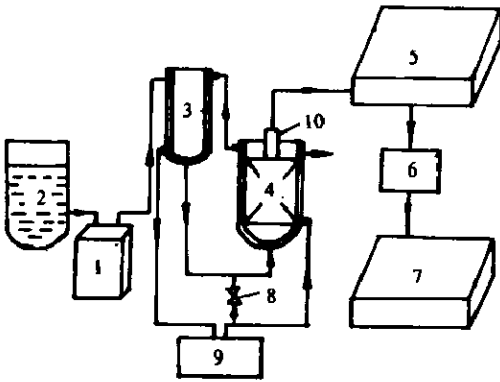


图 1 实验装置图

- 1. 蠕动泵; 2. 缓冲液贮瓶; 3. 缓冲柱; 4. 固定化细胞柱; 5. 离子计; 6. 信子放大器; 7. 计算机; 8. 进样口; 9. 恒温水浴; 10. CO<sub>2</sub> 气敏电极

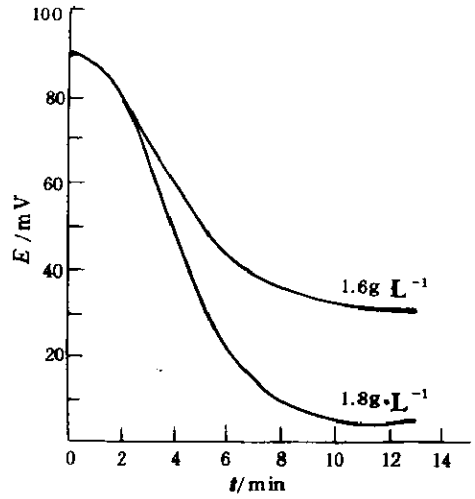


图 2 电极响应曲线

$$\tau_i \frac{\partial u_i}{\partial t} = v^2 u_i + \alpha \varnothing^2 \beta \frac{u_i}{\beta + u_i} \quad (2)$$

$$\text{边界条件为: } -\frac{\partial u_i(1,t)}{\partial r} = \text{Bim}, i[u_i(1,t) - u_i] \quad (3)$$

$$\frac{\partial u_i(0,t)}{\partial r} = 0 \quad (4)$$

$$\text{初始条件为: } u_{iL}(0) = u_{iL}^0 \quad (5)$$

$$u_i(r,0) = u_i^0(r,0) \quad (6)$$

本方程组采用正交配点法求解<sup>(7)</sup>。

### 3 结果和讨论

#### 3.1 操作条件

微生物传感器的检测灵敏度不仅受固定化细胞量、进样量、检测温度、载流速度等诸多因素影响, 同时也要受到检测电极的使用温度及检测范围限制。综合考虑各因素的相互作用, 选择采用 L<sub>25</sub>(5<sup>4</sup>) 正交表安排实验, 获取最佳操作条件。图 3 为固定化细胞量与电极响应值的关系, 图 4 为载流速度与电极

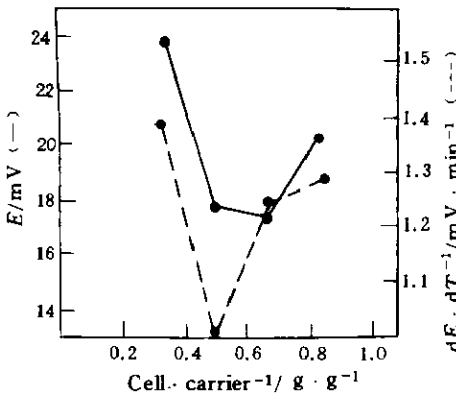


图 3 固定化细胞量与响应值的关系

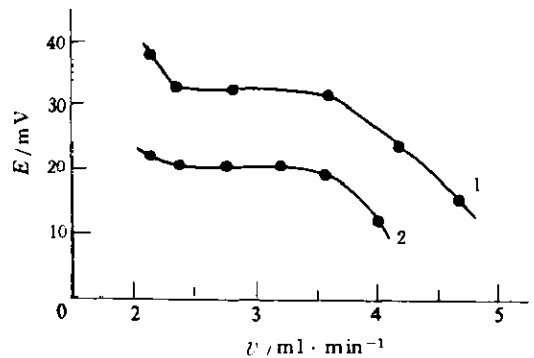


图 4 载流速度与响应值的关系

Conc. of glutamate. (g · L<sup>-1</sup>), 1. 1.8, 2. 16

响应值的关系。

### 3.2 谷氨酸浓度测量的计算方法及结果

3.2.1 计算方法<sup>[4]</sup>：在 CO<sub>2</sub> 气敏电极的线性响应范围内 ( $10^{-2} \sim 10^{-5}$  mol/L) 对谷氨酸进行了检测。为克服电极不稳定给测量及计算带来的误差，预先以细胞柱的数学模型为基础，采用数值方法模拟底物浓度响应曲线，进行了检测。为克服电极不稳定给测量及计算带来的误差，预先以细胞柱的数学模型为基础，采用数值方法模拟底物响应曲线，进行系统参数如有效扩散系数  $D_e$ 、米氏常数  $V_m$  等的估算。实测时只需输入系统参数及实验值，假定被测溶液的初始浓度范围，被测浓度值即可用单参数寻优法计算。

3.2.2 计算结果：在微生物传感器的适用工作范围内，根据浓度测量值的计算方法，可以得到测量精度如表 1 所示，其最大相对误差为 11.8%，平均误差为 3.85%。

表 1 谷氨酸微生物传感器精度表

配制标准值/mg · L <sup>-1</sup>	计算值/mg · L <sup>-1</sup>	误差
400	420	5
600	529.2	-11.8
800	747.2	-6.6
1000	976.4	-2.4
1200	1176	-2.0
1400	1376.4	-1.69
1600	1576.4	-1.48
1800	1776.4	-1.31
2000	1952.8	-2.36

### 3.3 性能测定

3.3.1 专一性测定：传感器在相同的操作条件下重复测试各种常见氨基酸样品，并用相对于谷氨酸响应值的百分率作比较，结果是见表 2。

表 2 谷氨酸微生物传感器专一性试验

氨基酸	活力/% *	氨基酸	活力/% *
L-谷氨酸	100	L-苯丙氨酸	0
L-谷氨酰胺	68.18	L-甲硫氨酸	0
L-缬氨酸	0	L-组氨酸	0
L-异亮氨酸	0	L-缬氨酸	0
L-亮氨酸	0	L-精氨酸	15.15
L-色氨酸	0	L-甘氨酸	0
L-苏氨酸	0	L-丝氨酸	0

\*，活力 (%) =  $\frac{\text{响应值}(X)}{\text{L-谷氨酸响应值}} \times 100\%$ ，X—某种氨基酸，响应值为稳态值。

3.3.2 稳定性：用谷氨酸传感器在相同的条件下测试同一浓度的谷氨酸标样，发现 4 周内其输出响应值几乎没有变化。

## 4 结 论

只要更换因固定化经细胞柱中的固定化细胞或酶颗粒，变换数学模型中的系统参数，即可用于其它

物质的检测,因此本文所开发的生物探针系统及动态响应曲线的处理方法具有一定的一般性。对谷氨酸测定的应用表明,该法明显优于瓦勃氏法,具有检测范围宽、选择性与准确性好的优点。

### 符 号 说 明

- $u_i, u_{iL}, u_{iL}^*$ ——分别为固体颗粒、液相主体、入口液流中  $i$  组分的无因次浓度  
 $t$ ——无因次时间  
 $r$ ——无因次空间坐标  
 $\mu_i$ ——无因次数组  $\frac{F_L/V}{k_i a_i}$   
 $Bim, i$ —— $i$  组分的传质 Biot 准数,  $K_L i R / De, i$   
 $\beta$ ——无因次米氏常数,  $K_m / c_k$   
 $\phi$ ——西勒模数,  $R(V_m / De, i K_m)^{1/2}$   
 $\tau_i, \tau_{iL}$ ——无因次数组, 分别为  $\frac{\varepsilon_L / K_{L, i a_i}}{t_R}, \frac{\varepsilon_p R^2 / D_{e, i}}{t_R}$

### 参 考 文 献

- [1] Hikuma M, Obana H, Yasuda T. Anal Chem Acta, 1980, 116 (1): 61~67.
- [2] 黄子良, 严德明, 李友荣. 华东化工学院学报, 1988, 14 (3): 365~373.
- [3] Wollenberger U, Scheller F W, Boehmer A *et al.* Biosensors, 1989, 4: 381~391.
- [4] 杨庆玲, 毕可万. 生物工程学报, 1993, 9 (3): 277~281.
- [5] 大泽久男. 酵素セソツ——の開発と応用, 1985, 4: 130.
- [6] 刘 健. 应用微生物, 1988, 4: 1~6.
- [7] Villadsen J, Stawart W E. Chem Eng Sci, 1967, 22: 1483~1501
- [8] 屠春燕. 南京化工学院学报, 1995, 17 (4): 40~45.

## The Study of a FIA Microbial Probe System—a Microbial Sensor for the Measurement of Glutamate

Tu Chunyan Dai Qingcheng Ouyang Pingkai  
*Nanjing University of Chemical Technology, Nanjing 210009*

**Abstract** A FIA microbial sensor system combined with an immobilized *E. coli* cell column, a CO<sub>2</sub> gas sensitive selectrode was made for measurement of glutamate. The system working range (concentration of Glu) is from 400 to 2000 mg/L and it has high specificity for glutamate (among the amino acid) except L-arginine and L-glutamine. The measuring time for each sample is about 20min. The half life of the immobilized *E. coli* is more than 4 weeks. A mathematic model was constructed for a immobilized cell column. The calculation method of the measurement value and its results are given in a L-glutamate microbial sensor process.

**Key words** Glutamate, biosensor, CO<sub>2</sub> gas electrode, mathematic model