

双乙酰生物传感器的研究

张介驰 于德水 沙长青 田小光 彭万霖

(黑龙江省科学院应用微生物研究所 哈尔滨 150010)

摘要 试验研究了粪肠杆菌(*Enterococcus faecalis*)中双乙酰还原酶的提取纯化,以及双乙酰生物传感器制备和测定性能。以双乙酰还原酶和还原型辅酶 I(NADH)共固定作为工作酶膜,用 Fe^{2+}/Fe 和双乙酰还原过程中产生的 NAD^+/NADH 组成生物传感器,可准确测定 0.1~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内的双乙酰含量,响应时间小于 2min。9d 内传感器工作性能稳定。研究表明,啤酒内典型的金属离子和有机物在相应浓度内不影响传感器工作性能。同时,试验初步解决了辅酶的再生和溶氧干扰问题。

关键词 双乙酰,双乙酰还原酶,生物传感器

分类号 Q503 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0327-31

双乙酰(Diacetyl)即 2,3-丁二酮,是奶制品中重要的挥发性风味物质,而在啤酒、果汁饮料中会引起异味,影响产品质量,因此对双乙酰的测定十分重要。目前对双乙酰的检测一般使用比色法或色谱法,这些方法费时,样品量大,难于在线检测。国内外的有关研究都集中于理化检测方法的改进^[1-3],生物法检测等^[4]。双乙酰生物传感器方面的研究很少^[5]。本文利用粪肠杆菌(*Enterococcus faecalis*)中纯化的双乙酰还原酶(Diacetyl reductase DR)与还原型辅酶 I(NADH)共固定组成工作酶电极,构建传感器检测双乙酰,同时解决了辅酶再生问题,而且在排除溶氧干扰方面也做了初步探讨。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

石墨粉,光谱纯,上海碳素厂;液体石蜡,化学纯,上海化学试剂总厂;铂片 99.9%,中科院有色材料部;双乙酰,化学纯,北京化工厂;NADH,上海丽珠东风生物技术有限公司。

1.2 主要仪器设备

501 型超级恒温水浴,上海实验仪器厂;UV-120-02 型分光光度计,日本岛津公司;超高频兆欧检测检流仪,日本 TAKEN-RIKEN 工业有限公司。

1.3 双乙酰还原酶的制备^[4]

1.3.1 粗酶的制备: 摇床培养菌悬液离心收集的菌体,缓冲系统下经 B. Brawn 匀浆器破碎,离心,得到菌酶的粗酶液。鲜鸡肝经液氮冷冻后,再与冰冷水混合,经组织捣碎机处理,离心上清液即为肝酶的粗酶液。

1.3.2 粗酶的纯化: 菌酶粗酶液经过两次 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析后,透析 3 次。经 DEAE 柱

纯化,收集高活力馏分,真空冷冻干燥后备用。肝酶粗酶液经两次丙酮处理(-15℃),粗酶沉淀先后经 Sephadex G-100 色谱柱和 DEAE 柱纯化,收集高活力馏分。双乙酰还原酶制备过程在 4℃ 条件下完成。

1.4 固定化酶膜的制备

1.4.1 明胶包埋法: 2mL 10% 明胶溶液 + 2mg 酶 → 混匀, 适量取出在培养杯中形成厚约 2mm 的液层 → 冷冻成型(-15℃, 30min) → 加入 10% 戊二醛溶液浸泡(4℃, 16h) → 淡黄色透明固化酶膜。

1.4.2 PVA 包埋法: 2mL 10% PVA 溶液 + 2mg 酶 → 混匀, 取出适量放于培养杯中形成厚约 2mm 的液层 → 冷冻成型(-150, 30min) → 加入饱和硼酸溶液浸泡(4℃, 16h) → 白色韧性的固定化酶膜。

1.4.3 石墨包埋法^[6]: 1g 石墨粉 + 2mg 酶 + 0.5mL 液体石蜡 → 搅匀, 固化成型(4℃)。

1.5 酶活力测定方法

在含有一定量的游离双乙酰还原酶的 100mmol/L 磷酸缓冲液(菌酶 pH7.0, 肝酶 pH6.1)中, 加入 NADH 和双乙酰, 使其浓度分别为 0.25mmol/L 和 5.8mmol/L, 25℃ 反应 15~20min 后, 测定该溶液在 340nm 的光密度值(OD₃₄₀)变化量, 对应标准曲线确定 NADH 变化量, 计算出游离双乙酰还原酶活力。

固定化双乙酰还原酶活力的测定则是取适量体积的固定化酶膜用上述方法测定酶活力, 再用排水体积法测定固定化酶膜的体积, 确定单位体积的固定化酶活力。

在测定条件下, 每分钟氧化 1μmol NADH 的双乙酰还原酶量为一个酶活力单位(IU)。

1.6 传感器实验装置及测定步骤

传感器装置如图 1。将无氧水制备的阳极液和阴极缓冲液分别轻轻倒入阳极室和阴极室, 阳极室注满后用胶塞封闭, 阴极室则持续吹入 CO₂ 保护。开启恒温水浴和磁力搅拌, 较准检流计, 读数稳定后, 加入双乙酰样品, 再读取稳定电流值。2 次电流值之差在一定范围内与阴极液中双乙酰浓度成正比。

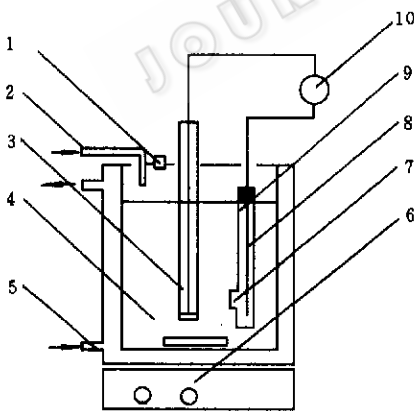


图 1 测定双乙酰生物传感器示意图

Fig. 1 Schematic diagram of a biosensor for diacetyl
1. Sample inlet; 2. CO₂ gas; 3. Working electrode; 4. Phosphate buffer (100mmol/L, pH7.0); 5. Thermostat water; 6. Electromagnetic stirrer; 7. Exchange membrane; 8. Anode (Fe); 9. Saturated FeSO₄ solution; 10. Ultra-high megohmmeter.

2 结果与讨论

2.1 酶来源的选择

对 4 种细菌, 5 种酵母菌及鸡肝中的双乙酰还原粗酶进行比较(见表 1)。后又对酶含量较高的粪肠杆菌 AS1.595 的胞内酶(菌酶)及鸡肝酶(肝酶)纯化处理, 见表 2。比较后选用粪肠杆菌 AS1.595 扩大培养, 提取纯化其胞内双乙酰还原酶, 用于传感器研制。

2.2 双乙酰生物传感器

2.2.1 工作电极的制备: 试验 PVA, 明胶, 石墨等几种固定化材料, 结果表明 PVA 和明

表 1 不同来源的粗酶的酶活力比较

Table 1 Activity of crude enzyme from different sources(IU/mL)

Bacteria				Yeast					Chicken liver
AS1.876	AS1.489	AS1.595	AS1.53	AS2.1396	GX9212	LQ16	2.16	2.420	
0.02	0.09	0.12	0.04	0.03	0.01	0.02	0.02	0.01	0.38

表 2 酶的提取纯化

Table 2 Enzyme purification (IU/mg protein)

Supernatant	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitate	Dialysis	Crude acetone precipitate	Sephadase G-100	DEAE	Yield/%
AS1.595 E.	0.33	0.39	0.91	—	14.7	18.5
Liver E.	0.016	—	—	0.72	4.2	14.3

胶都与酶中存留的硫酸铵有不同程度的反应,影响固化。同时包埋过程中的冷冻成型使硫酸铵部分结晶析出造成固定化酶膜孔隙过大,引起酶泄漏。而石墨包埋则效果较好。试验中将双乙酰还原酶和辅酶 I 混匀后,用石墨包埋法在铂片上固化成型,再与铂电极组成工作电极。固化过程酶活力存留为 66.2%。

2.2.2 双乙酰生物传感器的原理及构建:双乙酰被酶还原同时,辅酶 I(NADH)被氧化成 NAD⁺。在双乙酰还原酶量足够大的情况下,NAD⁺生成速度和生成量与底物双乙酰浓度成正比。因此在 NAD⁺/NADH 和 Fe²⁺/Fe 的原电池中,即 -)Fe|FeSO₄|NAD⁺,NADH|Pt(+,产生电流的大小在一定范围内与阴极液中的双乙酰浓度呈线性关系,可测定双乙酰含量。在测定过程中 NAD⁺同时被还原为 NADH,一定程度上解决了辅酶 I 的再生问题。

分光光度计检测表明,测定范围内的双乙酰在与工作电极同等活力的酶作用下,5s 内 95% 以上发生反应,酶反应过程不影响传感器的电流检测,同时说明电子在电极上的释放成为限制步骤。先后选择吩嗪,2,6-二氯酚靛酚作为电子传递介体。据文献报道二者一般用于阳极反应中,本实验应用于阴极,效果不明显。

为排除浓度变化和溶氧对电极电位的影响,阳极液采用饱和 FeSO₄ 溶液,使其浓度在测定中保持恒定。阴极固定化酶膜内则共固定充分过量的 NADH。溶液配制均使用煮沸 1h 的无氧水,测定时 CO₂ 气氛保护,停用时封闭,空间用胶管与盛有焦性没食子酸的碱性溶液的洗瓶连接,隔绝氧气。

2.3 传感器的测定性能

2.3.1 线性响应范围:同样条件下,测定不同双乙酰浓度对应的电流响应,结果表明在 0.1~0.5μg/mL 范围内,双乙酰浓度与电流响应值呈线性关系。如图 2。经最小二乘法回归,得到二者关系方程 $I = 1.06 + 2.2C$,单位分别为 μA 和 μg/mL,相关系数 $r = 0.998$,响应时间小于 2min,如图 3。

2.3.2 精密度:同样条件下,多次重复测定 0.3μg/mL 的双乙酰溶液的电流响应(见表 3)。结果表明该传感器有较高的精密度。

2.3.3 稳定性:应用该生物传感器连续测定 0.2μg/mL 双乙酰溶液样品,每天测定 10 个样,观察响应电流平均值的变化,并测定无 NADH 存在的对照固定化酶膜活力变化,见图 4。

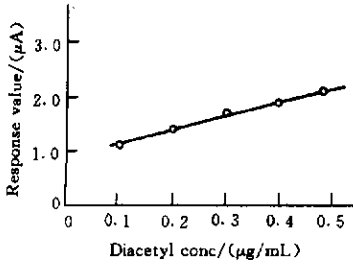


图 2 线性响应

Fig.2 Linear response

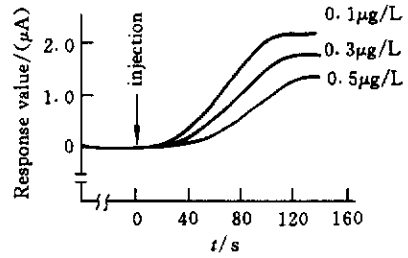


图 3 响应时间曲线

Fig.3 Response time curve

表 3 测定 0.3μg/mL 双乙酰溶液的电流响应值

Table 3 Response values of biosensor for 0.3μg/mL diacetyl solution(μA)

Number							I	SD	CV/(%)
1	2	3	4	5	6	7			
1.70	1.70	1.66	1.72	1.68	1.70	1.72	1.70	0.02	0.8

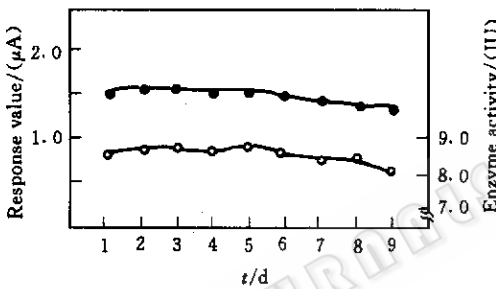


图 4 传感器的工作稳定性

Fig.4 Stability of the biosensor

- • - Response value; - ○ - Enzyme activity

运行情况表明,传感器经 9d 使用,仍能基本满足测定要求。

2.3.4 金属离子和有机物对传感器测定的影响: 根据啤酒的物质组成,研究金属离子和有机物对传感器的影响,见表 4、表 5,其中各组分浓度均远大于啤酒中相应组分浓度。

从结果看,在相应浓度下无论是金属离子还是有机物,对传感器值均无明显影响。

2.3.5 啤酒样品的测定: 对 8 个批次的啤酒样品蒸馏抽提后,分别用比色法^[7]和传感器法进行测定,比较结果如表 6。

均数差异显著性检验, $t = 0.145$, 远小于 $t_{0.05} (t_{0.05} = 2.365)$, 可见 2 种测定方法并无明显差异。啤酒样品经过蒸馏抽提,可部分排除氧及其它物质的影响,提高双乙酰的浓

表 4 金属离子对传感器测定值的影响

Table 4 Effect of metal ions on the response value of the biosensor (μA)

Blank*	K ⁺ (0.45%)	Na ⁺ (0.02%)	Ca ²⁺ (0.03%)	Mg ²⁺ (0.09%)	Fe ²⁺ (1.0%)
1.50	1.52	1.52	1.50	1.48	1.52

* Blank: 100mmol/L phosphate buffer (pH7.0) + 0.2μg/mL diacetyl

表 5 有机物对传感器测定值的影响

Table 5 Effect of organics on the response value of the biosensor(μA)

Blank*	Ethanol(5.0%)	Glycerol(0.2%)	Pentanol(0.1%)	Maltose(20%)
1.50	1.52	1.48	1.48	1.50

* Blank: 100mmol/L phosphate buffer (pH7.0) + 0.2μg/mL diacetyl

表 6 比色法和传感器法测定比较

Table 6 Comparison between the measurements from colorimeter and biosensor

	Number							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Colorimeter	0.18	0.09	0.32	0.16	0.15	0.12	0.20	0.17
Biosensor	0.20	0.10	0.32	0.17	0.14	0.12	0.22	0.16

度,利于传感器的测定。但同时也提高乙醇等物质的浓度,抑制固定酶膜的活力。文献[8]报道 3.3% 的乙醇浓度可抑制双乙酰还原酶活力的 42%, 10% 乙醇则抑制酶活力达 69%。所以传感器中使用的酶是充分过量的,否则将影响响应时间和响应值。啤酒中有 400 多种化合物,这必然对传感器在线使用产生影响。如要准确在线测定,还须在排除干扰,提高双乙酰还原酶纯度及其稳定性方面作深入的研究。

致 谢 全国高校传感技术研究会理事、哈尔滨医科大学许春向教授对本文提出宝贵意见,特此致谢!

参 考 文 献

- [1] 蔡心尧,刘 峰,陆久瑞等. 食品与发酵工业,1991,4:46~51.
- [2] 李 艳,郭小宇,王庆堂等. 食品工业科技,1991,91(5):52~56.
- [3] 叶 青. 酿酒,1990,90(3):44~47.
- [4] Timothy D. Gibson, M. Simon. *Enzyme Microb. Technol.*, 1991, 13:171~178.
- [5] L. Tarhan, W. Hummel. *Process Biochem.*, 1995, 30(1):49~55.
- [6] 吕跃钢,王际彰,张利平等. 微生物学通报,1997,24(4):218~220.
- [7] 管敦仪. 啤酒工业手册,1985,北京:轻工业出版社,234.
- [8] T. N. Tolls, J. Shovers, W. E. Sandine *et al.* *Appl. Microb.*, 1970, 19(4):649~657.

Study on Biosensor for Diacetyl

Zhang Jiechi Yu Deshui Sha Changqing Tian Xiaoguang Peng Wanlin

(Institute of Applied Microbiology, Heilongjiang Academy of Science, Harbin 150010)

Abstract The purification of diacetyl reductase, preparation and performance of the biosensor were studied. With diacetyl reductase and reduced coenzyme I (NADH) co-immobilized as working membrane, NAD^+/NADH produced in the course of diacetyl reducing was connected with Fe^{2+}/Fe to build the biosensor. The biosensor could determine diacetyl concentration within the range from 0.1 to $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ and the response time was less than two minutes, and its performance was stable within 9 days. The experiments showed that typical metal ions and organics of corresponding concentration didn't affect the performance of the biosensor, meanwhile, the problems of interference of dissolved oxygen and regeneration of coenzyme I (NADH) were solved to some extent.

Key words Diacetyl, diacetyl reductase, biosensor