

乙醇的微生物传感体系研究

张 俊^{1,2}, 张益霞², 董 川¹

1. 山西大学环境科学与工程研究中心, 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 太原 030006

摘要 为寻找一株专一性更强的乙醇氧化菌 (*Methylobacterium* sp.), 确立最佳微生物固定化方法, 最终建立微生物乙醇检测体系, 采用有利于微生物细胞生长的 PVA-海藻酸盐溶胶-凝胶包埋法, 对筛选、分离得到的乙醇氧化菌进行固定化, 将其制备成固定化小球。考查了海藻酸钠、氯化钙等固定化添加剂浓度对固定化微生物细胞成球难易和活性的影响。研究了固定化颗粒机械强度和通透性。在乙醇菌的不同固定化条件下进行了实验比较, 得出最佳固定化方法: 10% 聚乙烯醇、1.5% 海藻酸钠、4% CaCl_2 、4% 硼酸溶液固定化微生物细胞, 其活性最高、机械强度较强。固定化小球与溶解氧电极组合成乙醇微生物传感体系, 用于乙醇检测。考查了温度、pH 值、盐离子浓度、菌种保存时间等因素对该传感体系的影响。用该体系测得乙醇线性响应范围为 0.002%~0.2% (V/V), RSD 为 6.3%。实验证明该体系适合于微量乙醇检测, 具有精密度高、重现性良好、无毒害、响应快、方便及成本低的特点。

关键词 生物传感器; 微生物传感器; 溶胶-凝胶包埋法; 溶解氧电极

中图分类号 TP212.3

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)23-0086-05

Study on Ethanol Microbial Sensing System

ZHANG Jun^{1,2}, ZHANG Yixia², DONG Chuan¹

1. Center of Environmental Science and Engineering Research, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract The determination of ethanol content finds fairly wide applications in different fields, such as clinical, pharmaceutical, liquor, beverage and fermentation industries. An accurate determination of the concentration of ethanol is of great significance for the control of production targets during the fermentation process and the quality assurance for children's drinks. The method of microbial sensor for the ethanol determination is a simple, rapid, accurate, inexpensive and tracking detection method. This study is to find a strain of ethanol-oxidizing bacteria (*Methylobacterium* sp.) with greater specificity, to determine the best method for the microbial immobilization, and finally to construct a micro-alcohol test system by combining immobilized cell with dissolved oxygen

electrode, as a simple, non-toxic method, which can be used for the determination of micro-samples. The selected ethanol-oxidizing bacteria is immobilized with the PVA-alginate sol-gel entrapment method, which is conducive to the growth of microbial cells. The immobilized small balls with good air permeability and high mechanical strength are prepared, which can be repeatedly used and easily be unloaded. The mechanical strength and the permeability of immobilized particles are studied. Optimized conditions of immobilization are determined by comparing different methods and materials. The best result is: 10% polyvinyl alcohol, 1.5% sea alginic acid sodium, 4% CaCl_2 , and 4% boric acid solution. Effects of the sensing system are tested, including temperature, pH, salt ion concentration, retention time and so on. The linear response to the ethanol of this system is 0.002%~0.2% (V/V), with relative standard deviation of 6.3%. It is shown that the system is suitable for detection of trace ethanol, with advantages including high-precision, nontoxic, fast-response, convenient, low-cost and good reproducibility.

Keywords biosensor; microbial sensor; sol-gel embedding methods; dissolved oxygen electrode

0 引言

乙醇含量的测定在临床、医药、制酒、饮料及发酵工业中都非常重要。传统测定乙醇的方法主要有物理方法和化学方

收稿日期: 2009-07-22

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (50534100)

作者简介: 张俊, 博士研究生, 研究方向为分析生物化学, 电子信箱: dc104@sxu.edu.cn; 董川 (通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: S060006275M), 教授, 研究方向为分析化学与环保新材料, 电子信箱: dc@sxu.edu.cn

法。物理方法有密度瓶法^[1-2]、酒精计法^[1-2]、折射计测定法^[1]。已有的化学方法有重铬酸钾比色法^[1-2]、莫尔氏盐法^[3]、碘量滴定法^[3]、分光光度法^[4]、气相色谱法^[5]、荧光光纤乙醇传感器^[6]、模式滤光检测法^[7-8]、纳米催化化学发光乙醇传感器^[9]等。上述这些方法中,分光光度法一般操作繁琐、费时、准确度差;荧光光纤乙醇传感器、模式滤光检测、气相色谱法虽然准确,但需要昂贵的仪器,因此,不适用于快速、连续、简便测定的要求。

20 世纪 50 年代,随着科技发展和酶学的诞生,鉴于酶对底物有高效、专一的催化活性,开始用酶测定乙醇。王向阳^[10]基于乙醇氧化酶氧化乙醇产生乙醛和 H_2O_2 , 偶联 Trinder 反应生成醌亚胺,可在 500 nm 波长下比色测定,通过优化反应体系中各主要成分和测定条件,建立了乙醇氧化酶测定乙醇的方法。该实验方法灵敏度为:在乙醇浓度为 0.5 g/L 时, $\Delta A_{500nm,1cm} > 0.08$;线性范围为 0.125~5.0 g/L。该方法(Y)与气相色谱法^[11](X)比较: $Y=1.06X+0.12$, $r=0.989$,灵敏度较高、线性范围宽、精密度和准确性较好,适合临床实验室急诊测定。然而在用游离酶进行催化反应时,酶的使用是一次性的,存在分离、纯化程序复杂,稳定性差,价格昂贵等缺点。为了克服游离酶的不足之处,得到相对稳定、可简单重复利用的检测乙醇的方法,研究人员开始采用固定化酶进行测定。目前常用的氧化乙醇的酶有两种:乙醇氧化酶和乙醇脱氢酶(ADH)。Wen 等^[12]将乙醇氧化酶采用壳聚糖包埋法,固定于鸡蛋膜上,研制出固定化酶乙醇传感器,对乙醇浓度响应范围为 60 $\mu\text{mol/L}$ ~0.80 mmol/L,检测限为 30 $\mu\text{mol/L}$,信噪比为 3,响应时间为 1 min,已用于实际样品中乙醇含量检测。乙醇脱氢酶广泛存在于大自然中,具有底物特异性,能可逆地催化氧化醇为相应的羧基化合物,因其特殊的催化性质,应用日益增加。虞浔等^[13]报道了以壳聚糖为载体,戊二醛为交联剂对乙醇脱氢酶固定化并进行酶催化动力学性质研究,以找出将其用于酶法测定的条件。在不同温度下分别对游离酶和固定化酶活力进行测定,结果表明,游离酶的最适动力学反应温度为 37℃,固定化酶为 40℃;游离酶与固定化酶动力学反应的最适宜 pH 值均为 8.2。将固定化酶在室温下与底物重复多次反应,重复使用 6 次后,固定化酶的活力只下降了 50% 左右,说明该固定化酶具有较好的操作稳定性。固定化酶传感器的研制成功,在很大程度上提高了乙醇检测系统的稳定性,缩短实验响应时间,降低成本,同时一定程度上实现了重复利用,但仍存在使用寿命短、活性低、稳定性差等缺点。

使用全活细胞,如从活性污泥、河水、腐质中分离出来的细菌、酵母和真菌等,将其固定化后制成的传感器,称为微生物传感器。其原理是利用微生物体内的酶系或代谢系统来检测物质。与固定化的酶相比,由于微生物细胞中含有多种天然酶系,且微生物细胞中酶处于自然生理环境中,生理活性高、稳定性好,省去了酶的分离、纯化等过程,大大降低了实验成本。关于微生物传感器测定乙醇的研究已有报道,王晓辉等^[14]从土壤中分离得到一株同化乙醇能力强的微生物,并

将其固定化后制成膜与氧电极结合,组成微生物乙醇传感器,测得该传感器对乙醇的线性响应范围为 0.3~12.0 mg/L,响应时间为 2~5 min。将该传感器应用于啤酒、香槟、白葡萄酒中乙醇含量的测定,获得较满意的结果。该方法简便、快速、准确、廉价,并可连续跟踪检测,不适用于乙醇含量较低(通常低于 1%)的环境,例如乳酸发酵、化妆品、儿童饮用乳酸饮料等中乙醇含量测定。

本实验在前人研究结果基础上,寻找一株专一性更强的乙醇氧化菌(*Methylobacterium* sp.),对其进行固定化后,制备一种微生物乙醇检测体系。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

DZF-150 型数显自控可调真空干燥箱(郑州长城仪器厂);循环水浴锅(北京德天佑科技有限公司);电子天平(北京赛多利斯仪器有限公司);SYZ-A 型石英亚沸高纯水蒸馏器(江苏勤华玻璃仪器厂);TDL-50B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);78HW-I 恒温磁力搅拌器(杭州仪表电器厂);上海雷磁 PHS-3C 精密 pH 计(DZ-1 型滴定装置);KQ-2200 型超声波清洗器(巩义市英峪予华仪器厂);Dissolved Oxygen model 862A;Dissolved Oxygen sensor Xplorer GIX 溶解氧测定仪;THZ-D 台式恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂);数显恒温水浴,HH-4(国华电器有限公司)。

聚乙烯醇,日本进口分装(AR)(上海化学试剂公司分装厂);硼酸(AR)(天津化学试剂三厂);无水氯化钙纯(CP)(北京化学化工厂);海藻酸钠(CP)(天津市光复精细化工研究所);碳酸钙(CP)(上海化学试剂采购供应站经济泗联化工厂);二氧化硅(AR)(上海市奉贤奉城试剂厂);磷酸氢二钠(AR)(北京益利精细化学品有限公司);磷酸二氢钾(AR)(成都化学试剂厂);碳酸氢钠(CP)(上海虹光化工厂)。

无机盐培养基(g/L): KH_2PO_4 0.5, Na_2HPO_4 0.5, $NaCl$ 0.4, KNO_3 1.0, NH_4Cl 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0, $CaCl_2$ 0.2, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.004, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.004, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.004, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.004, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.000 24, CH_3COOH 6 mL。

缓冲液: KH_2PO_4 1/15 mol/L, Na_2HPO_4 1/15 mol/L。

1.2 实验装置

实验装置见图 1,实验在 pH 值为 6.68 的 KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (浓度为 1/15 mol/L)缓冲液体系中,于恒温条件下进行。

1.3 实验原理

检测原理:溶液中的 O_2 分子扩散透过氧电极表面选择透过性膜,进入到电极的内电解质溶液中,在电解质溶液中发生反应(1),产生 OH^- :



产生的 OH^- 与钯电极表面的 Ag 发生反应(2),产生自由电子,成为可输出的电信号:



当体系中存在乙醇时,被乙醇氧化菌同化,细菌呼吸活

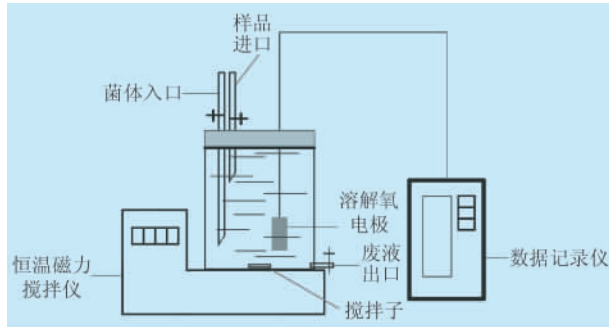


图 1 实验装置

Fig. 1 Set-up of experiment

性增强,消耗体系中的氧,导致扩散进入氧电极表面的 O_2 分子减少,进而电极的输出值降低。溶解氧的消耗量由溶解氧电极检测并转化为可输出信号。

1.4 实验方法

固定化小球机械强度评价通过在两块玻璃之间放置一定数量、制备好的固定化小球,在上层玻璃上加压一定重量砝码,在一定时间内考查小球的变形情况。固定化小球的活性通过测定一定个数小球在一定实验条件下氧化乙醇的量和速度量衡量。

恒温搅拌条件下,将固定化微生物小球,经实验装置(图1)的菌体入口,浸入到 pH 值为 6.68 的磷酸盐缓冲检测体系中,待体系中溶解氧达到稳态,此时电极输出一个稳定的初始溶解氧值,为传感器的空白溶解氧值。然后,用微量移液器经实验装置(图1)的样品进口,向测量池中加入不同浓度乙醇标准溶液。乙醇经扩散作用进入微生物细胞,进而被微生物细胞同化。微生物细胞呼吸活性增强,消耗溶液中溶解氧,导致测量体系中溶解氧下降。经过几分钟后,体系中溶解氧下降达到新的稳态,电极测得一个新稳定的溶解氧值,两次稳态之间差值,即溶解氧的降低量,在一定浓度范围内与乙醇的浓度成线性关系。可由记录仪记录传感器的响应值-时间关系曲线,用标准曲线法求得样品中乙醇的浓度。

2 微生物乙醇传感体系的研制

2.1 乙醇氧化菌培养方法

将分离得到的乙醇氧化菌培养于盛有 100 mL 无机盐培养基的 600 mL 盐水瓶中,加入 1% 的乙醇作为碳源,120 r/min 摇床振荡,于 30℃ 培养。

2.2 菌悬液的获得

- 1) 将实验室扩大培养后的菌体在 8 000 r/min, 离心 5 min。
- 2) 用无菌水洗涤,8 000 r/min,离心 5 min,重复 2 次。
- 3) 细菌密度测定:收集离心后的菌体,定容到细菌光密度 OD 值为 0.9。

2.3 菌体固定化

第 1 步 PVA-海藻酸钠溶胶的制备。分别称取 3.0 g 聚

乙烯醇(PVA)、0.3 g 海藻酸钠、1.2 g SiO_2 、0.09 g $CaCO_3$ 。在实验前将聚乙烯醇在二次水(重量:体积=1:10)中浸泡 24 h,然后在 120℃ 下,待其完全溶解成胶状,将 SiO_2 和 $CaCO_3$ 添加到 PVA 胶体中,混合均匀,即得 PVA-海藻酸钠溶胶。

第 2 步 菌体吸附液制备。将 0.01 g 经过化学处理的碳纳米管加入 3 mL OD 值为 0.9 的菌悬液中,混合均匀,在室温下吸附 10 min 左右。

第 3 步 交联液制备。用 $NaHCO_3$ (0.1 mol/L) 调节含 2% $CaCl_2$ 的饱和硼酸溶液(硼酸质量浓度为 4%),使其 pH 值为 6.7。

第 4 步 固定化过程。将制备好的 PVA-海藻酸钠溶胶温度降至 40℃ 左右,与制备好的菌体吸附液充分混合,将混合液用蠕动泵滴加到交联液中,滴加过程中不断搅拌,以防止生成的固定化小球相互交联。在 4℃ 固定化交联 24 h,取出后用去离子水洗 2~3 次,4℃ 保存在生理盐水中,供实验用。

3 结果与讨论

3.1 包埋法固定化试剂对细胞活性的影响

1) 海藻酸钠浓度对细胞活性和成球难易的影响。海藻酸钠是一类天然高分子多糖类,对微生物没有毒害作用。但海藻酸钠的浓度会影响固定化细胞的机械强度、质量传递等,进而影响到微生物的活性。海藻酸钠浓度对固定化细胞活性和固定化细胞成球性影响的实验结果如表 1 所示。

表 1 海藻酸钠浓度对细胞活性和成球性的影响

Table 1 Effect of sea alginic acid sodium to cell activeness and immobilization

海藻酸钠浓度/%	细胞相对活性/%	成球难易程度
1.0	56.2	易
1.5	57.3	易
2.0	55.4	易
2.5	52.3	易
3.0	45.6	较难

从表 1 可以看出,海藻酸钠浓度为 1.5% 时,细胞的相对活性为 57.3%,达到最高。海藻酸钠浓度在 1.0%~2.5% 时,成球性效果较好。而当海藻酸钠浓度大于 3.0% 时,溶胶难以形成规则的小球。

2) $CaCl_2$ 浓度对细胞活性的影响。在海藻酸钠包埋固定化过程中,凝胶化试剂 $CaCl_2$ 中的 Ca^{2+} 与海藻酸钠根离子螯合形成不溶于水的海藻酸钙凝胶,从而将细胞固定。实验表明,随着 $CaCl_2$ 浓度的增加,微生物细胞的活性降低。当 $CaCl_2$ 浓度低于 5% 时,细胞活性可以保持在 80% 以上;但当 $CaCl_2$ 浓度达到 10% 时,细胞活性下降到 60% 左右,主要原因可能是:① 由于盐的渗析作用,引起细胞脱水,致使微生物活性部分丧失;② 在 PCR 技术中, $CaCl_2$ 是使细胞处于感受态的物质,此时微生物是最脆弱的,很容易被外界的干扰破坏。

3.5 盐离子浓度对微生物乙醇传感体系的影响

无机盐对细菌细胞生理代谢活力的影响,主要是影响其环境渗透压。细胞在进行正常生理活动时,需要一定的环境渗透压,过低或过高的渗透压对细胞内酶活性的发挥都不利。故选择不同浓度的 NaCl 溶液进行盐离子浓度影响测定。实验在 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 值为 6.68) 中加入不同浓度的 NaCl,考查微生物传感器在不同渗透压下的响应特性曲线。从图 5 可看出,当 NaCl 浓度小于 0.6% 时,对细菌膜的活性几乎没有影响,但大于 0.6% 后,微生物细胞的活性开始下降;(NH₄)₂SO₄ 浓度小于 5% 时,基本没影响;当 KNO₃ 浓度小于 1% 时,对细菌膜的活性有促进作用,大于 4% 后有抑制作用。

选择不同浓度的 NaCl 溶液进行微生物传感器的影响测定。在 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液中,随着 NaCl 浓度的增加,传感系统响应值明显下降。从图 5 可观察到,NaCl 浓度为 0.4%~0.6% 时,传感器响应值几乎没有变化。

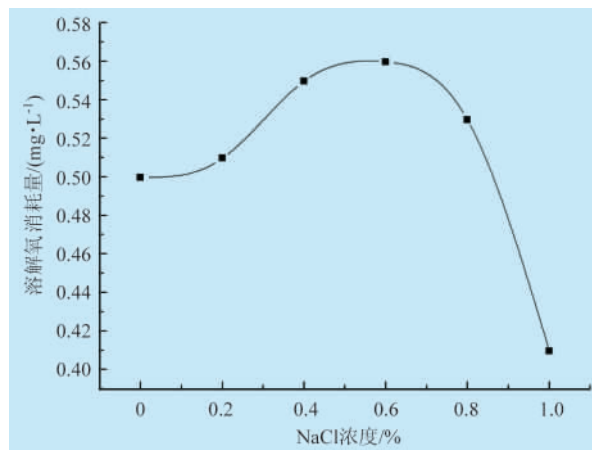


图 5 盐离子浓度对微生物乙醇传感体系的影响

Fig. 5 Effect of NaCl concentration on ethanol microbial sensing system

3.6 标准曲线

不同含量乙醇测量的标准曲线见图 6。随着通入体系中的乙醇含量增大,细菌对溶氧的消耗量增多,以乙醇含量对相应的溶氧消耗量作图,体系溶氧的消耗量 (Y) 与通入乙醇的含量 (X) 在 0.002%~0.2% (V/V) 范围内呈函数关系,采用 Origin 6.1 软件拟合方程为: $Y=1.4-1.349\exp(-X/3.88)$, $R^2=0.99471$ 。

在 pH 值为 6.68 的磷酸盐缓冲测量体系中,加入 2 μ L 乙醇,室温下重复实验 6 次,得到相对标准偏差 RSD 为 6.3%,平均值为 0.828 57,说明该传感系统对同一浓度的溶液具有重现性。

3.7 干扰实验

分别用含有 0.2% 的甲醇、丙醇、丁醇、甲酸、乙酸、0.2 g/L 的苯酚、葡萄糖、麦芽糖和氨基酸溶液进行测定。乙醇微生物传感系统均无响应,不干扰乙醇含量的测定。

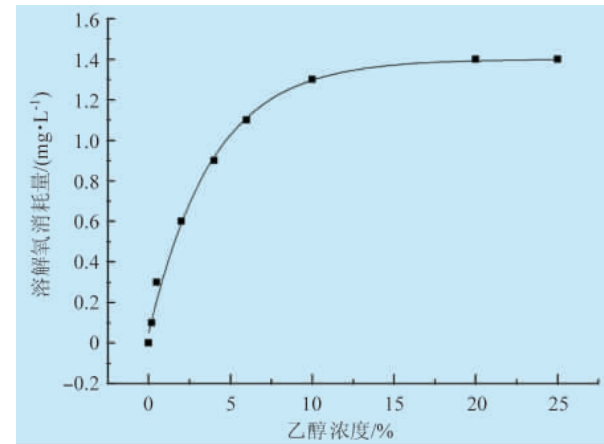


图 6 标准曲线

Fig. 6 Calibration curve

4 结论

实验分离得到一株乙醇氧化菌,用 PVA 溶胶包埋法制备固定化小球。功能化的碳纳米管作为固定化菌体吸附材料,适当添加助球剂,制备出透通性好、机械强度高、高菌体包埋量的固定化小球,与溶解氧电极组合成乙醇微生物检测的体系,实验证明该体系适合于微量乙醇检测,精密度高、重现性良好且无毒害、响应快、方便、成本低。

参考文献 (References)

- [1] 夏金池, 牟文利. 食品中的有害物质 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992.
Xia Jinchi, Mou Wenli. Traditional and non-traditional foods[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1992.
- [2] Dumestre A, Bousserhine N, Berthelin J. Biodegradation of free cyanide by the fungi *Fusarium solani*: Relation to pH and cyanide speciation in solution[J]. *C R Acad Sci Paris, Sci Terye planetes*, 1997, 325: 133-138.
- [3] 常永强, 姜涛. 含氰废水研究动态[J]. 工业水处理, 1996, 16(6): 6-7.
Chang Yongqiang, Jiang Tao. *Industrial Water Treatment*, 1996, 16(6): 6-7.
- [4] 罗平. 饮料分析与检验[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1972.
Luo Ping. Beverage analysis and testing[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1972.
- [5] 杨惠芳, 李明元, 沈文. 食品卫生理化检验标准手册[S]. 北京: 中国标准出版社, 1997.
Yang Huifang, Li Mingyuan, Shen Wen. Handbook of food hygiene standards of physical and chemical inspection [M]. Beijing: Standards Press of China, 1997.
- [6] 侯延民, 唐江宏, 宋书香, 等. 乙醇荧光光纤传感器的研究 [J]. 光谱实验室, 2001, 18(2): 201-204.
Hou Yanmin, Tang Jianghong, Song Shuxiang, et al. *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory*, 2001, 18(2): 201-204.
- [7] Wang K, Zhou L, Mao D, et al. Preparation and application of a novel chemical sensor based on mode-filtered light detection [J]. *Sensors and Actuators B*, 2000, 66: 4-5.

- [8] Yuan H, Choi Martin M F, Chan W H, *et al.* Dual-light source excitation for mode-filtered light detection[J]. *Analytical Chimica Acta*, 2003, 481: 301-310.
- [9] 刘国宏, 王瑾琳. 纳米催化化学发光传感器 [J]. 长治学院学报, 2007, 24(2): 10-13.
Liu Guohong, Wang Jinglin. *Journal of Changzhi University*, 2007, 24(2): 10-13.
- [10] 王向阳. 乙醇氧化酶法测定血清中乙醇含量[J]. 临床检验杂志, 2002, 20(4): 208-210.
Wang Xiangyang. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*, 2002, 20(4): 208-210.
- [11] Jain N C. Direct blood -injection method for gas chromatographic determination of alcohols and other volatile compounds [J]. *Clin Chem*, 1971, 17(2): 82-85.
- [12] Wen G M, Zhang Y, Shuang S, *et al.* Application of a biosensor for monitoring of ethanol[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 23: 121-129.
- [13] 虞浔, 何秋蔚, 柳畅先. 壳聚糖固定化醇脱氢酶的制备及其酶学性质研究[J]. 分析科学学报, 2007, 33(6): 720-723.
Tuo Xun, He Qiuwei, Liu Changxian. *Journal of Analytical Science*, 2007, 33(6): 720-723.
- [14] 王晓辉, 李新, 孙浴生, 等. 微生物乙醇传感器的研究[J]. 化学传感器, 1998, 18(3): 35-39.
Wang Xiaohui, Li Xin, Sun Yusheng, *et al.* *Chemical Sensors*, 1998, 18 (3): 35-39.

(责任编辑 吴晓丽)

第19届全国桥梁学术会议

时间：2010年6月

地点：上海

主办单位：中国土木工程学会

桥梁安全、耐久与管养
基于性能的桥梁设计
桥梁概念设计与美学
轨道交通、高速铁路桥梁
桥梁设计、施工的新理论与新技术
桥梁抗风与抗震研究新进展
桥梁监测、检测与加固
桥梁施工技术与设备

通信地址：上海四平路1239号同济大学桥梁馆
中国土木工程学会桥梁及结构工程分会 (200092)

联系电话：021-65983116-2709

传 真：021-65983116

电子信箱：paper@bscces.com