

微生物传感器测定维生素B₁₂的研究

王永祥

(中国科学院微生物研究所, 北京)

轻部征夫 铃木周一

(东京工业大学资源化学研究所, 东京)

将大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 215用吸附法固定于醋酸纤维素膜上, 与氧电极配合组成微生物电极, 建立了对维生素 B₁₂ 的快速测定系统。测定浓度范围 5×10^{-6} mg— 2.5×10^{-5} mg/ml; 测定温度范围在28—39℃; 最适pH为6.7—7.8; 测定一个样品所需时间为2h, 比常用的生物学测定方法所需时间缩短10倍以上。该系统对维生素B₁₂重复测定的相对误差为±3%。固定化菌体在-25℃保存25天后再进行测定, 应答电流不低于初始值的92%。

关键词 微生物电极; 生物传感器; 维生素B₁₂生物测定

对维生素和抗生素等的测定, 常采用基于比浊法或滴定法的生物学方法。这些方法往往需要较长的时间才能得到测定数据, 主要原因在于培养微生物需要的时间较长。例如, 对维生素 B₁₂ 用生物学法测定时需要在加样后至少培养24h^[1]。其他测定方法有时需要将样品先纯化, 这对某些工业过程是不适合的。

近年来, 许多包含微生物反应的分析手段已经发展, 并应用到有机化合物的测定中。微生物传感器就是其中之一。这类传感器已经应用来测定抗生素^[2,3]、维生素^[4]、氨基酸^[5]以及生物需氧量(BOD)^[6]。

本文报道一种由固定化细胞与氧电极配合组成的能对维生素 B₁₂ 进行微量、快速测定的微生物传感器。

材料与方法

(一) 试剂

酵母抽提液是Difco, Lab, Co. 产品,

维生素B₁₂来自于Kanto Chemical Co.。其余试剂均为分析纯或化学纯, 实验用水为重蒸水。

(二) 微生物及其培养

实验用一株对维生素 B₁₂ 生长依赖型细菌——大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 215。

培养条件: 30℃, 通气培养 30h。培养基组成(%): 酵母抽提液0.5, 葡萄糖1, 磷酸二氢钾0.3, 磷酸氢二钾0.7, 柠檬酸钠0.05, 氯化钠 0.05, 维生素 B₁₂ 10^{-7} mg/ml。将生长后的菌体在 5℃, 8000g 离心收集, 用生理盐水洗三遍后再用 0.1M 磷酸缓冲液 (pH7.0) 洗一遍, 并悬浮于相同缓冲液中备用。

(三) 细胞固定化

将1g湿菌体悬浮于 200ml pH7.0, 0.1M 磷酸缓冲液中 (通常控制菌悬液的 A_{660nm} 吸收值在0.48—0.5), 吸取一定量

本文于1985年6月3日收到。

本研究系第一作者在日本进修期间由轻部征夫教授指导完成。

的悬液滴于醋酸纤维素膜上 (Milipore公司产品, HA型, 孔径 $0.45\mu\text{m}$) 用合适的砂芯漏斗将水轻轻抽干, 使菌体成一薄层均匀附着于膜表面。

(四) 传感器系统组装

该系统的组装简图如图 1 所示。

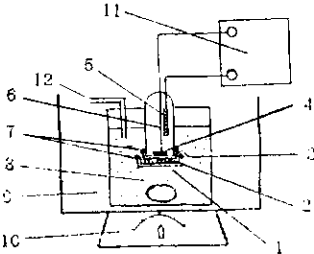


图 1 微生物传感器组装示意图

Fig. 1 The schematic diagram of the microbial sensor system

1. 醋酸纤维素膜 2. 固定化细胞 3. Teflon膜
4. 阴极(Pt) 5. 阳极(Pb) 6. 电解质溶液
7. “O”型圈 8. 检测溶液 9. 水浴
10. 磁力搅拌 11. 记录器 12. 空气
1. Acetylcellulose membrane 2. Immobilized cells 3. Teflon membrane
4. Cathode (Pt) 5. Anode (Pb) 6. Electrolyte
7. O-ring 8. Assay medium 9. Water bath
10. Stirrer 11. Recorder 12. Air

氧电极由铂阴极和铅阳极加上 Teflon膜(厚度 $12.5\mu\text{m}$) 组成。电解质溶液为 $30\%\text{NaOH}$ 。将附有细胞层的醋酸纤维素膜固定在氧电极表面的 Teflon膜上, 使细胞夹在两层膜之间, 组成微生物电极。

另外, 整个系统还包括一个 100ml 的反应池、带磁力搅拌的恒温水浴以及记录器。

(五) 维生素 B_{12} 含量的测定

用该系统对维生素 B_{12} 进行测定的步骤如下:

取灭菌后的测定反应液 25ml, [反应液成分 (g/100ml): 柠檬酸钠 0.1, 硫酸铵 0.2、氯化钠 0.1, 磷酸二氢钾 0.6, 磷酸氢二钾 1.4, 葡萄糖 2.0, $\text{pH}7.0$] 装于反应池中, 加入适当浓度灭菌后的维生素 B_{12} 溶液 25ml, 于反应池中混合后,

35°C 保温并保持恒定速度的磁力搅拌。

将微生物电极插入装有上述检测溶液的反应池中, 电极输出信号用带记录笔的放大器记录 (TOA 电子产品, 型号: EPR-200A)。

每测定一个样品, 带有固定化细胞的醋酸纤维素膜更换一次。

结 果

(一) 传感器对维生素 B_{12} 的应答

图 2 为传感器对检测溶液中含不同浓度的维生素 B_{12} 的应答曲线。当检测刚开始时, 在检测溶液的温度、通气量恒定的情况下, 应答电流的初始值表示固定化细胞的内生呼吸水平。当一定量的维生素 B_{12} 加入反应体系后, 微生物呼吸加速, 导致耗氧量增加, 应答电流随时间而迅速降低直至保持一稳定状态。此时的稳定态电流值取决于维生素 B_{12} 的浓度。

由于要获得相当于某一浓度维生素 B_{12} 的稳定态电流需要较长时间 (如图 2 所示, 至少需要 6h), 因此, 采用速率

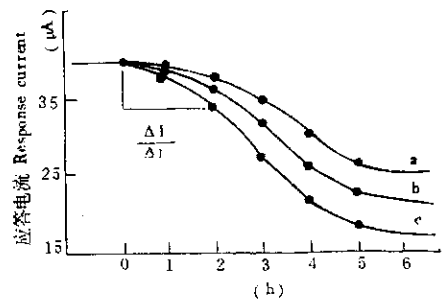


图 2 传感器对维生素 B_{12} 的应答曲线
Fig. 2 Response curves of the sensor for vitamin B_{12}

维生素 B_{12} 含量分别为 ($\times 10^{-6}\text{mg/ml}$): a. 5, b. 10, c. 20, 湿细胞 0.5mg, 测定条件 35°C , $\text{pH}7.0$ 。

Assay medium containing vitamin B_{12} (mg/ml): a. 5, b. 10, c. 20, Microbial cells immobilized on the membrane was 0.5mg.

Assay was performed at 35°C and $\text{pH}7.0$,

法，求检测进行到2h时，应答电流(I)对时间(t)的变化率 $\frac{\Delta I}{\Delta t}$ 。由图2可见，该变化率的大小取决于维生素_{B₁₂}的浓度，从而达到了对维生素_{B₁₂}的检测。

另外，用不带有固定化细胞的醋酸纤维素膜直接固定在氧电极表面的Teflon膜上作空白对照时，未见应答电流有明显下降。

(二) 葡萄糖浓度对传感器应答电流的影响

除了反应中维生素_{B₁₂}对该菌生长有影响外，一般说来葡萄糖的浓度也是影响细胞生长的因素。因此，考察了葡萄糖浓度对应答电流的影响。结果见表1。当检测溶液中的葡萄糖含量高于0.8%时，应答电流便稳定在同样水平，正常检测时，控制葡萄糖浓度为1%。

表 1 葡萄糖浓度对应答的影响*
Table 1 Glucose concentration effect on response

葡萄糖浓度 Glucose concentration (%)	应答电流变化率 Rate of current decrease (μA/h)
0.2	4.0
0.5	5.1
0.8	5.5
1.0	5.8
2.0	5.8

* 测定条件：35℃，pH7.0，维生素_{B₁₂} 10×10⁻⁶mg/ml，固定化细胞0.5mg
Assay condition: 35℃, pH 7.0, vitamin B₁₂ 10×10⁻⁶mg/ml and wet cells employed 0.5mg.

(三) 固定化细胞量对检测灵敏度的影响

用不同细胞含量的固定化细胞进行维生素_{B₁₂}测定时，细胞量对检测灵敏度有一定影响。如图3所示，当固定化细胞中湿菌体的含量为0.5mg时，维生素_{B₁₂}的浓度在5×10⁻⁶—2.5×10⁻⁵mg/ml范围

内与应答电流的变化率呈线性关系。若增加或减少固定化细胞中的菌体量，则影响检测范围和改变灵敏度。因此，确定0.5mg菌体为合适的量。

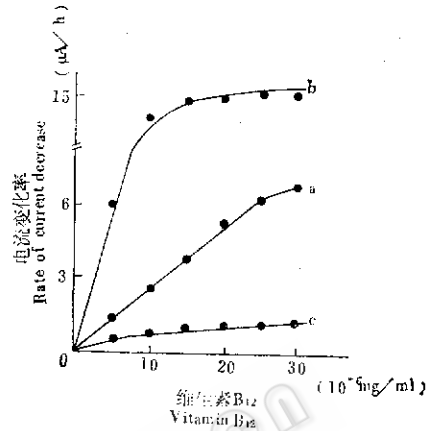


图 3 固定化细胞量对检测的影响
Fig. 3 Effect of amount of cells used on the calibration curves

湿细胞量(mg): a. 0.5, b. 2.0, c. 0.2, 测定条件: 35℃, pH 7.0.
Wet cells employed(mg): a. 0.5, b. 2.0, c. 0.2; assay performed at 35℃, pH 7.0.

(四) 检测温度对传感器应答电流的影响

应答电流受温度影响的结果见图4。

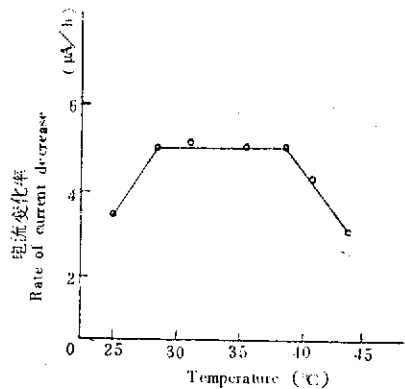


图 4 温度对传感器应答的影响
Fig. 4 Effect of temperature on the response of the sensor

检测溶液pH7.2，维生素_{B₁₂} 20×10⁻⁶mg/ml，湿菌体量0.5mg，电流为测定2h后的应答值
pH of assay medium at 7.2, vitamin B₁₂ 20×10⁻⁶mg/ml, wet cells employed 0.5mg, current measured at 2h.

该系统的适应温度范围为28—39℃。对相同浓度的维生素 B₁₂，当温度高于39℃或低于28℃时，应答电流变化率减小。这是因为检测溶液中溶氧量在较高温度下含量要低。同时，细胞活性在39℃以上会被抑制；当温度低于28℃时，细胞活性低，也是造成低应答的原因。

(五) 检测 pH 对传感器应答电流的影响

由于微生物的呼吸活性很大程度上依赖于环境的酸碱度。因此，考察了 pH 对该系统的影响。图 5 是考察结果。如图 5 所示，对维生素 B₁₂ 测定的最适 pH 为 6.7—7.8，进一步提高或降低检测溶液的 pH 值，都导致应答电流变化率的下降。

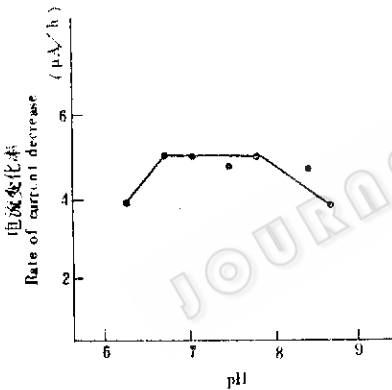


图 5 pH 对传感器应答的影响

Fig. 5 Effect of pH on the response of the sensor

测定温度35℃，除pH外，其他测定条件与图4相同
Assay was performed at 35℃. Other experimental conditions were the same as Fig. 4, except pH

(六) 稳定性和重复性考察

为考察固定化菌体使用稳定性，将其在-25℃保存，经常测定同批制品的活力，25天内细胞活性未见明显变化。对某一浓度的维生素 B₁₂ 测定时，应答电流不低于最初测定值的92% (图 6)。

另外，更换带有固定化细胞的醋酸纤维素膜对同一样品重复测定，考察了该系

统的测定重复性。当以初次测定值为100%时，重复测定5次，应答电流的变化率值，即相应的维生素 B₁₂ 的测定值相对误差未超过±3%。

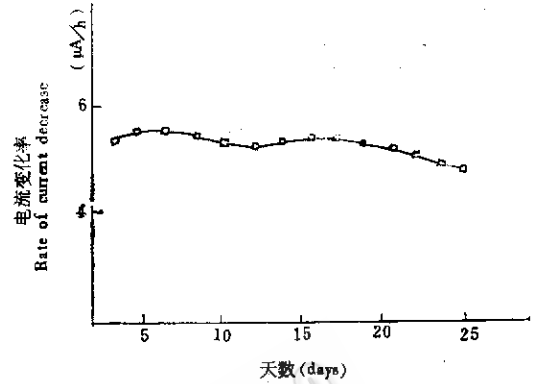


图 6 传感器的稳定性

Fig. 6 The stability of the sensor

测定条件: pH 7.0, 35℃; 维生素 B₁₂ 20 × 10⁻⁶ mg/ml

Assay was performed at pH 7.0, 35℃. Vitamin B₁₂ 20 × 10⁻⁶ mg/ml was employed

讨 论

有许多微生物要保持生长需要某种特别的化合物。因此，利用这些微生物对氨基酸、抗生素、维生素等都有可能进行生物测定。而传统的测定方法由于测定周期长而不能适应需要。利用生物传感器作快速测定，对诸如食品、发酵工业的控制以及作为医学临床诊断、环境监测指标的测定等是一项有开发利用价值的工作。已有许多生物传感器方面的研究报道和应用实例^[7]。关于对维生素用微生物传感器测定迄今只有一篇报道^[4]，即对维生素 B₁ 的测定。

本文提供了一个能对维生素 B₁₂ 进行快速、微量测定的微生物电化学方法。将一株维生素 B₁₂ 缺陷性大肠杆菌经固定化处理后，就可以配合氧电极进行维生素 B₁₂ 的含量分析。

因为所用的大肠杆菌215是好气菌,其呼吸过程可直接通过耗氧量来测定。又因为它是维生素 B₁₂ 缺陷株,因此,微生物电极插入含有反应溶液的反应池中后,能否进行微生物呼吸,即能否观察到耗氧量增加,这就取决于反应液中是否存在维生素 B₁₂。当反应液中不含维生素 B₁₂ 时,则传感器不作应答(即无应答电流的变化)。而当反应液含有维生素 B₁₂ 时,则随维生素 B₁₂ 含量的不同,而有不同的应答(即不同的电流变化率)。另外,在检测过程中,温度、pH、搅拌速度是相对固定的,这就限制了其余可能引起应答电流产生变化的因素,从而能准确地通过对细菌呼吸监测来测定维生素 B₁₂ 的含量。

测定中,现采用测定反应液(25ml)加相同体积的维生素 B₁₂ 溶液,为的是提供检测细菌代谢所需要的基本 C、N 及无机盐。如文中所述,当葡萄糖浓度在 1—2% 范围内时,对检测无影响,这就提供了对发酵液等检测溶液直接测定的可能性。在一般情况下,根据发酵液中 C、N 源及无机盐的含量,只要适当稀释即可用以测定。

另外,在制作固定化细胞中要注意菌体量,这一点似乎在批次之间比同批之中要难于控制,而这是关系到测定重复性的关键。在批次的更换中,可对标准曲线进行校正。

参 考 文 献

- (1) Skeggs, H.R.: *The Vitamins Chemistry*, Vol.7, 284, Academic press, New York, 1967.
- (2) Karube, I, et al.: *J. Ferment. Technol.*, 55:243, 1977.
- (3) Karube, I, et al.: *Anal. Chim. Acta*, 109:39, 1979.
- (4) Matsumoto, K, et al.: *Anal. Chim. Acta*, 105:429, 1979.
- (5) Matsunaga, T, et al.: *Anal. Chim. Acta*, 98:25, 1978.
- (6) Hikuma, M, et al.: *Anal. Chim. Acta*, 110:61, 1980.

MICROBIAL SENSOR FOR VITAMIN B₁₂ BIOASSAY*

Wang Yongxiang Isao Karube Shuichi Suzuki

A microbial sensor system consisting of immobilized *E. coli* 215 on acetylcellulose membrane and an oxygen electrode was investigated for vitamin B₁₂ bioassay. The assay range of vitamin B₁₂ was $5 \times 10^{-6} - 2.5 \times 10^{-5}$ mg/ml. The temperature range and optimum pH for assay were 28—39°C and 6.7—7.8, respectively. Assay could be completed in 2h for each sample.

The response of the sensor was reproducible within $\pm 3\%$ of relative error. The bacteria retained their activity for 25 days when the immobilized bacteria membrane stored at -25°C. During this period, the response of the sensor remains the value of 92% of the initial response.

Key Words

Microbial electrode; biosensor; vitamin B₁₂ bioassay

* This article was completed in Karube-Suzuki's Lab. the TIT, during 18th UNESCO course in Chemistry and Chemical Engineering.