

酵母乙醇脱氢酶电极的研究

吕跃钢 王际彰 张利平 张维成

(北京轻工业学院化学工程系 北京 100037)

摘 要 从面包酵母中筛选到一株乙醇脱氢酶活力高, 杂酶干扰小的菌株。对该菌株进行扩增培养, 在 72h 收获, 用此酵母制成测定乙醇浓度的生物电极, 该电极测量的线性范围为 $3.4 \times 10^{-5} \sim 2.04 \times 10^{-3}$ mol/L, $r = 0.9996$, 响应时间小于 2min, 甲醇、叔丁醇、异戊醇的干扰分别为 1.2%、2.0%、3.4%, 醋酸和葡萄糖不干扰。测定乙醇标准样品的相对标准偏差为 1.6% ($n = 6$), 测定白酒发酵样的相对标准偏差为 3.1% ($n = 6$)。

关键词 酵母, 乙醇脱氢酶, 酶电极

目前, 分析乙醇浓度的方法通常为蒸馏法, 这种方法费时费力, 操作复杂。特别是在发酵工业中, 使得对发酵过程的连续监测和控制无法进行。近年来, 以生物电极为传感器分析乙醇浓度的研究表明, 它具有选择性好、微型化、灵敏度高、测量简便、快速等优点, 因而, 受到科学工作者的重视, 各种酶电极应运而生。国内对乙醇脱氢酶电极的研究已取得成就, 但是, 该电极最大的弱点就是需要高价进口的乙醇脱氢酶, 其成本较高。而用面包酵母粉代替乙醇脱氢酶, 可以大大降低电极的成本, 为电极的批量生产提供了有利条件。

1 材料和方法

1.1 菌种

从国内外几种活性面包酵母粉和纯培养的面包酵母中进行筛选, 以乙醇脱氢酶活力高的菌种为首选菌。

1.2 培养基及方法

1.2.1 培养基: 新鲜麦芽汁, 波美度 6 度。

1.2.2 培养方法: 液体培养, 经扩增后, 28℃ 摇瓶培养 4~5d, 离心收集酵母细胞, 制成酵母干粉。

1.3 测定方法

1.3.1 乙醇脱氢酶 (ADH) 活力的测定方法见

文献 [1]。

利用测定 NAD 的还原速度来测定 ADH 活性, 采用测 OD 值的方法以 15s 和 45s 测得的 OD 值之差乘以 2 所得的酶促反应的初速度为酶活力, 定义为 1min 内 OD 值变化 0.001 为一个活力单位。

1.3.2 乙醇浓度的测定方法

(a) 仪器: 使用液体流动注射装置测定, 用毫伏表记录电压变化值。

(b) 计算方法: 用直接比较法计算, $v_1 : v_2 = C_1 : C_2$ 。

1.4 电极

1.4.1 电极的工作原理: 将此电极插入欲检测的液体中, 液体内的乙醇经渗透膜扩散到碳糊层, 该层中含有的经破壁的酵母粉和 NAD 与扩散至此的乙醇反应, 乙醇被氧化为乙醛, NAD 被还原为 NADH, 后者与媒体 (吩嗪-阳离子聚合物) 反应, 再生为 NAD, 而该媒体成为还原态媒体, 并在共固定碳糊层上进行电氧化再生为氧化态媒体。在上述的电化学氧化过程中产生氧化电流, 此信号电流由埋在未修饰碳糊层中的电极丝传到二次仪表上。所述氧化电流的值

与欲检测液体中的乙醇含量在一定范围内成线性关系,根据上述测得的数据,经换算便可得出该液体中的乙醇含量。

该电极的测量系统为三电极体系,除酵母电极外,微型饱和 Ag / AgCl 电极为参比电极, Pt 电极为对电极。

1.4.2 电极的结构(图 1)

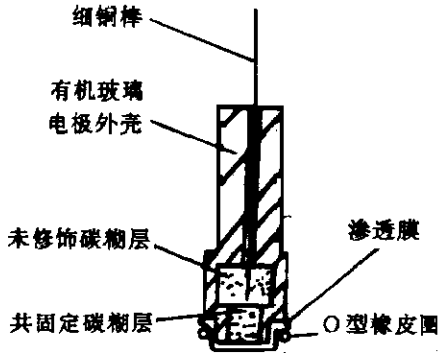


图1 电极结构示意图

1.4.3 电极的组成

(a) 未修饰碳糊:用 50mg 石墨粉和 20 μ l 石蜡油在研钵中混匀,研成糊状,备用。

(b) 媒体修饰电极:让吩噻染料和阳离子聚合物在一定量的石墨粉上进行聚合和固着,用水洗去未固定物,烘干备用。

(c) 酵母、NAD、媒体修饰碳糊的共固定:按多次正交实验所确定的最佳配比关系,将一定量的酵母粉、NAD 和媒体修饰碳粉用磷酸缓冲液溶解,加入聚合物,真空干燥,加入一定量的石蜡油研成糊状。

1.4.4 电极的制备:在电极的凹穴中先填入未修饰碳糊,再填入共固定碳糊,外包一层渗透膜,用橡皮圈固定。

2 结果和讨论

2.1 高产菌株培养时间的选择

该菌株在液体培养时,不同的收获时间,乙醇脱氢酶的活力不同,并且杂酶的干扰也有很大差异。预备实验结果表明,该酵母生长在 64h 以后,菌体个数达到 10⁸个 / ml,乙醇脱氢酶活力升高,并趋于平稳,但选择性出现差异,试验结果表明,培养时间为 72h 时,ADH 活性高,选

择性好,(表 1)。

表 1 高产菌株培养时间的选择

培养时间 (h)	ADH活性 (u/mg)	响应比		
		甲醇	叔丁醇	异戊醇
64	14.6	16.7	20.5	16.5
68	11.2	10.4	11.0	13.5
72	12.6	5.58	8.37	5.32
76	12.8	7.36	7.60	7.40
80	6.70	9.90	10.4	19.0
84	5.60	17.5	13.8	15.5

2.2 电极的性能

经选择,电极最佳的测试条件为:工作电压 200mV,磷酸缓冲介质 pH8.0,温度为室温,测定时间为 2min。

2.2.1 线性范围:实验结果表明,乙醇线性浓度范围为 3.4 $\times 10^{-5}$ ~ 2.04 $\times 10^{-3}$ mol / L。当乙醇浓度低于 3.4 $\times 10^{-5}$ mol / L 时,电极响应不明显;当乙醇浓度高于 2.04 $\times 10^{-3}$ mol / L 时, ΔE 与乙醇浓度的为非线性关系。当乙醇浓度在 3.4 $\times 10^{-5}$ ~ 2.04 $\times 10^{-3}$ mol / L 时, ΔE 与乙醇浓度呈线性关系,且相关系数 r 为 0.9996。在此线性范围内,所测乙醇的上限浓度为其下限浓度的 60 倍,(表 2)。

表 2 电极的线性范围

乙醇浓度(10 ⁻⁴ mol/L)	0.34	0.68	3.40	6.80	10.2	13.6	17.0	20.4
ΔE (MV)	1.9	3.9	19.7	40.0	63.6	84.0	104.1	121.8
线性方程和相关系数	$\Delta E = -0.17 + 6.08 \times 10^4 C_{Zn}$ $r = 0.9996$							

2.2.2 响应时间:对线性范围内的三个不同浓度的乙醇分别进行响应时间的测定,电流达到最大值的时间均在 2min 之内,结果见表 3。

表 3 响应时间

底物浓度(mol/L)	6.8 $\times 10^{-5}$	6.8 $\times 10^{-4}$	2.04 $\times 10^{-3}$
响应时间(Sec.)	105	105	92

2.2.3 选择性:分别以甲醇、叔丁醇、异戊醇、醋酸和葡萄糖为底物,用该电极测定其响应,并与乙醇的响应进行比较,结果见表 4。由表 4 可知,该电极对葡萄糖和醋酸不响应,对高于乙醇浓度的叔丁醇和异戊醇的响应比分别为 2.0% 和 3.4%。对于与乙醇等浓度的甲醇的响应比为 1.2%。此结果说明,该电极的选择性好,其它醇

类对它的干扰不大,适用于酒类等工业发酵过程的监控。

表 4 电极的选择性

干扰物	浓度 (mol/L)	响应比 (%)
甲醇	1.7×10^{-3}	1.2
叔丁醇	8.5×10^{-2}	2.0
异戊醇	9.3×10^{-2}	3.4
醋酸	8.5×10^{-3}	0
葡萄糖	4.3×10^{-3}	0

乙醇浓度为 1.7×10^{-3} mol/L

* 以乙醇响应为 100% 计算

2.2.4 电极的使用寿命: 用液体流动注射装置进行连续测定,乙醇的浓度为 3.4×10^{-4} mol/L,测定 5d,共测定样品 1125 次,响应保存率为 26.9%,此结果表明:该电极的使用寿命长,可用于实际生产。但是在测定过程中,响应保存率逐渐下降,这可能是由于 NAD 的泄漏所造成的,另一方面也可能是由于在使用过程中,酶活力受外界因素的影响而下降所造成的。

2.2.5 乙醇标样测定的精密度和准确度: 由表 5 可知,用 3.4×10^{-4} mol/L 的乙醇作为标准样

表 5 标样测定的精密度和准确度

样号	ΔE (mV)	测得样品浓度 (10 ⁻⁴ mol/L)	$\bar{X}$ (10 ⁻⁴ mol/L)	S (10 ⁻⁴ mol/L)	RSD (%)	RE (%)
1	15.0	29.3	6.64			
2	14.7	28.2	6.52			
3	14.0	27.9	6.78			
4	13.3	26.3	6.72	6.67	0.1079	1.6
5	13.9	26.9	6.58			1.9
6	13.9	27.7	6.78			

品, 6.8×10^{-4} mol/L 乙醇作为待测样品,测得的相对标准偏差为 1.6%,相对误差为 1.9%。结果表明,此电极具有良好的精密度和准确度,可用于实际检测中。

2.2.6 实际样品测定的精密度和准确度: 以红星酿造集团酒精分公司发酵 45h 时的发酵液为样品,稀释 5000 倍,比较样品浓度为 3.426×10^{-4} mol/L,加标回收率所用的加标的样品配制为 50.0ml 3.426×10^{-4} mol/L 标样 + 50.0ml 稀释样品。

结果表明,对浓度为 3.426×10^{-4} mol/L

表 6 白酒发酵样测定的精密度和准确度

样品号	ΔE (mV)		样品浓度 (10 ⁻⁴ mol/L)	ΔE (mV)		加标样品浓度 (10 ⁻⁴ mol/L)	加标回收率 (%)
	比较样品	样品		比较样品	样品		
1	11.1	21.2	6.54	10.4	15.3	5.04	103.2
2	10.6	20.3	6.56	10.4	15.0	4.94	96.9
3	9.9	20.1	6.96	9.8	14.8	5.17	98.7
4	9.6	19.8	7.07	9.8	15.1	5.28	102.0
5	9.5	19.2	6.92	9.9	14.7	5.09	95.2
6	9.4	18.8	6.85	9.3	13.8	5.08	96.8
$\bar{X}$	6.770×10^{-4} mol/L						
S	0.210×10^{-4} mol/L						
RSD	3.1%						

时,测定的相对标准偏差 RSD 为 3.1% (n = 6),加标回收率为 95.2~103.9%。此方法的精密度和准确度较好,完全能满足工业生产过程中对监测的要求。

参 考 文 献

- [1] Racker, E. Biochem J., 1949, 184: 313~319.
- [2] Wladyslaw, W Kubiak, Joseph Wang. Anal Chem Acta, 1989, 221: 43.

(下转第 217 页)

STUDY ON YEAST ELECTRODE FOR DETERMINING ALCOHOL

Lü Yuegang Wang Jizhang Zhang Liping Zhang Weicheng

(Beijing Institute of Light Industry Beijing 100037)

Abstract A strain of yeast with higher activity of alcohol dehydrogenase (ADH) and small interference of miscellaneous enzymes, acquired after cultivating 72 hours, was selected from various baker's yeasts. A yeast-modified carbon paste electrode for ethanol was prepared based on the selected yeast, its linear response to alcohol was in the range of $3.4 \times 10^{-5} \sim 2.04 \times 10^{-3}$ mol / L, $r = 0.9996$, its response time was within 2min. It responded to methanol, tertiary butanol and isoamyl alcohol, and their response ratios to alcohol were 1.2%, 2.0% and 3.4%, respectively. It didn't respond to glucose and acetic acid. The yeast electrode was used to determine the alcohol standard sample and alcohol fermentation sample, which relative standard deviations were 1.6% ($n = 6$) and 3.1% ($n = 6$) correspondingly.

Key words Yeast, Alcohol dehydrogenase, Electrode