

核微孔膜为基础的乳糖 - 葡萄糖双功能酶电极的研制

李家鹏, 庞广昌*

(天津商学院生物技术与食品科学学院, 天津 300134)

摘 要: 利用酵母破碎液改性后的核微孔膜作为固定载体, 戊二醛为交联剂, 通过固定葡萄糖氧化酶(GOD)和 β -半乳糖苷酶(GAL)构建出过氧化氢双电极系统。研究了该酶电极的性质, 以及不同来源 GAL 抗干扰性的差异。乳糖电极在 0.2%~2% 和 4%~10% 内有良好的线性关系, 响应时间 40s, 半衰期 15~20d。葡萄糖电极的线性范围 0~1%, 分辨率达到 0.001%, 响应时间 20s, 半衰期大于 60d。该系统可同时测定样品中乳糖和葡萄糖的含量, 乳糖电极的葡萄糖干扰用差分法消除。

关键词: 乳糖传感器; 葡萄糖传感器; 核微孔膜; 酵母破碎液

Manufacture of Lactose-glucose Bi-function Enzymic Electrodes Based on Nuclear Pore Film

LI Jia-peng, PANG Guang-chang*

(Department of Bioengineering, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

Abstract: Hybrid biosensor for the detecting of lactose and glucose simultaneously was developed. This biosensor consisting of two electrodes was based on the nuclear pore films modified by the yeast broken liquid and H_2O_2 electrodes. Glucose oxidase (GOD) and β -galactosidase (GAL) were immobilized on the membranes by using the glutaric dialdehyde as crosslinking agent. Having studied the response characteristics of the two electrodes, the biosensor shows good linearity among the ranges of 0.2~2 g/100ml and 4~10 g/100ml of lactose and 0~100mg/100ml glucose respectively. The response time is less than 40s for lactose and less than 20s for glucose. The self (half-life)-life of the galactosidase-electrode is between 15 and 20 days while the glucose oxidase-electrode is more than 60 days. The interference of glucose in lactose detecting can be removed through the subtractive operation between the response datas of the two electrodes.

Key words lactose biosensor; glucose biosensor; nuclear pore membrane; fragmentized liquid of the yeast

中图分类号: Q814

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)03-0285-05

乳糖是牛乳中主要的碳水化合物, 其含量在 4.5% 左右, 是衡量乳品质量和反映奶牛生理状况的重要指标。乳糖含量的检测无论是对乳品工业和还是奶牛饲养业都具有不可替代的作用。例如, 针对乳糖不耐症^[1]开发的低乳糖产品的质量评价, 乳清发酵^[3]过程的监控和牛场的管理中都需要及时提供乳糖含量的信息。乳糖传统的测定方法有还原糖测定法(碘量法)、旋光测定法、近红外光谱法^[2]、核磁共振法和高效液相色谱^[3]等, 这些方法耗时、繁琐, 检测起来既费时又费力。因此开发出快速、准确、便捷的乳糖检测方法是必要的。目前普遍看好酶的测定法即乳糖传感器法, 这种方法具有灵敏、快速、简便、特异性强等特点而且对样品几

乎不用任何预处理。

酶的固定化技术是生物传感器得以开发和改进的重要技术基础, 通常分为直接法和间接法, Jüger 和 Eshkenazi 等人^[4-5], 分别将酶分子直接固定到石墨电极、铂电极和玻碳电极上构建出了乳糖传感器, 但由于直接固定法有一定的局限性, 有制作烦琐、不便更换、酶分子固定量小且容易漏失等缺点, 对传感器的商品化造成了障碍。因此, 近年来人们多用间接固定法, 将酶分子固定到特定的载体上制成酶膜后, 再与电极联用, 收到了良好的效果。此时载体的选择就至关重要, 它的传质阻力、表面吸附和交联能力都直接影响到传感器的性能。Sandeep K 等, 李海虹等, 琐

收稿日期: 2006-03-24

*通讯作者

基金项目: 天津市重点基础研究资助项目(033803911)

作者简介: 李家鹏 (1979-), 男, 硕士, 研究方向为酶与酶工程。

孙康等^[6-8]分别研制了基于LB膜、 β -环糊精和Nafion膜的乳糖酶膜。利用核微孔膜作载体的乳糖膜还未见报道,核微孔膜厚度只有 $10\mu\text{m}$,能够极大地降低传质阻力,而且具有良好的机械强度和耐化学腐蚀性,是一种良好的固定载体,它在传感器的研制和分析中都有应用^[9-10]。但核微孔膜是一种聚碳酸酯材料膜,其表面光滑、具有强疏水性,实验证明很难将酶直接固定在其表面,本试验作了酵母破碎液对其表面改性的尝试,发现经过预处理后,膜片表面吸附和交联能力得到了大幅度的提高,利用LBL自组装技术^[11]在其表面固定上 β -半乳糖苷酶(GAL)和葡萄糖氧化酶(GOD)后便构建出性能良好,成本低廉、便于装卸和储藏的乳糖酶膜片。并考察了不同来源的GAL对乳糖传感器专一性的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

葡萄糖氧化酶(GOD, 190000U/g)、 β -半乳糖苷酶(GAL, 3000U/ml)、 β -半乳糖苷酶(来源于*Aspergillus oryzae*, 8U/mg solid) Sigma公司;戊二醛(50%);乳糖;无水葡萄糖;蔗糖;果糖(分析纯) 天津化学试剂一厂;麦芽糖(分析纯) 中国医药集团上海化学试剂公司;所有的溶液均用重蒸水配制;核微孔膜 Whatman 公司。

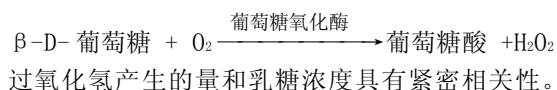
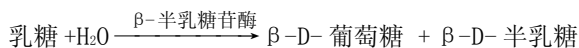
1.2 菌种

Kluyveromyces lactis CICC 1773-1 本实验室保藏。

1.3 仪器设备

SBA-40C生物传感分析仪 山东省科学院生物研究所;HWS24型电热恒温水浴锅 上海一恒科技有限公司;FA2004A电子天平 上海精天电子仪器有限公司;JY92-II超声波细胞粉碎机 宁波新芝科器研究所;PHS-3CW pH计 上海理达仪器厂。

1.4 测定原理



1.5 酶膜的制备

称取制备好的冻干酵母0.05g溶于50ml pH7.0的磷酸缓冲液中,超声波破碎(400W, 2s, 2s, 50min),透析袋浓缩到一定体积。将膜产品剪成直径为0.8cm的膜片,在膜片滴加破碎液室温干燥后滴加4%的戊二醛交联并室温下干燥,用蒸馏水清洗后备用。用磷酸缓冲液将GOD配制成50U/50 μl 的酶溶液,用破碎液将液体乳糖酶进行1:4的稀释,用磷酸缓冲液将固体乳糖酶配制成100U/50 μl 升的溶液。在6张预处理过的膜片上滴加GOD酶液20 μl ,

室温干燥2h后滴加4%戊二醛,室温干燥2h清洗、干燥后备用。取其中4张膜片分别滴加两种GAL液10 μl ,并涂抹均匀,4度干燥2h后滴加2%戊二醛交联20min,用缓冲液冲洗膜片。分别将制好的GOD酶膜片和GAL膜片安装在左右两个过氧化氢电极头端,用“O”圈固定滴加上电极缓冲液后就制成了酶电极。

1.6 测定方法

按照SBA-40C的操作指南^[12]用微量进样针吸取25 μl 样品,注射到400 μl 的反应池中,记录基础相应值。测定条件为18~25 $^{\circ}\text{C}$,缓冲液为0.02mol/L的磷酸缓冲液,含有0.001mol/L Mg^{2+} ,每次进样25 μl ,记录基础响应值。每个样品测三次取平均值。

2 结果与分析

2.1 最佳反应时间的确定

酶传感器的响应时间是反映传感器性能的重要指标之一,也是影响测定结果的主要因素,我们研究了乳糖酶系统和葡萄糖酶系统的反应进程的规律(图1),发现乳糖酶系统的在30~40s内就能达到最大反应速度进入稳定期,而葡萄糖酶系统在20s内就能达到最大反应速度进入稳定期,本实验中乳糖的测定时间定为40s。

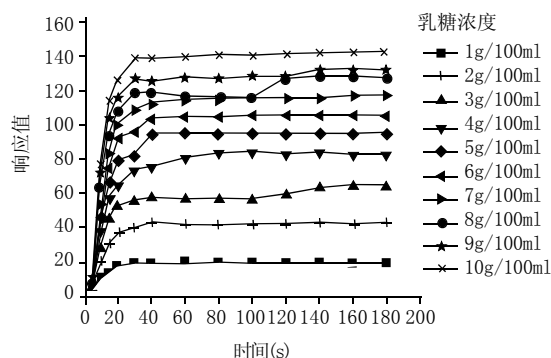


图1 乳糖传感器反应时间进程曲线
Fig.1 Kinetic curve of lactose biosensor

2.2 pH 值对酶电极响应值的影响

由于该酶电极固定的是复合酶(GOD和GAL),两种GAL的最适pH值为7.5和4.5,GOD的最适pH值为5.1。而且酶分子经过固定化后pH值通常会发生改变,因此需要确定传感器缓冲液系统的最适pH值,本实验研究了pH6.0~8.5之内,不同pH值缓冲液对酶电极相应值的影响,由图2可以看出固定化的GOD在pH6.0~8.5之内表现出了良好的稳定性,GAL受到pH值的影响要比GOD大些,但在pH6.5~8.0之内也具有稳定性,且两种酶的最适pH值都出现在7.0附近,因此本实验的缓冲液系统的pH值定为7.0。

2.3 Mg^{2+} 离子对酶电极响应值的影响

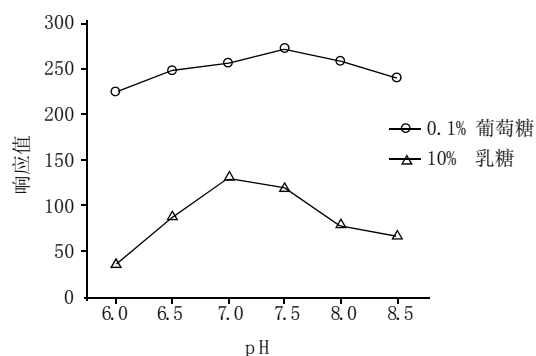
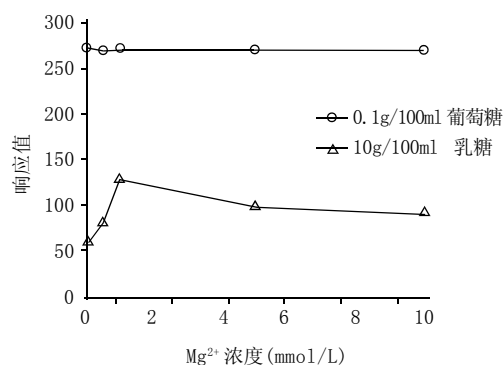


图2 pH值对酶电极响应值的影响

Fig. 2 Influence of pH on sensitivity of enzymic electrode

图3 Mg^{2+} 镁离子对酶电极响应值的影响Fig.3 Influence of concentration of Mg^{2+} on enzymic electrode

Mg^{2+} 是 GAL 常见的激活剂, 用含有不同浓度 Mg^{2+} 的磷酸缓冲液做缓冲液系统对酶电极进行测试(图3), 结果表明, 一定浓度 Mg^{2+} 的能够显著提高乳糖酶电极的相应值, 对葡萄糖酶电极影响不大。但较高浓度 Mg^{2+} 会使响应值降低可能是因为较高的离子强度使酶分子的催化中心发生了不利的构型变化。

2.4 温度对传感器的影响

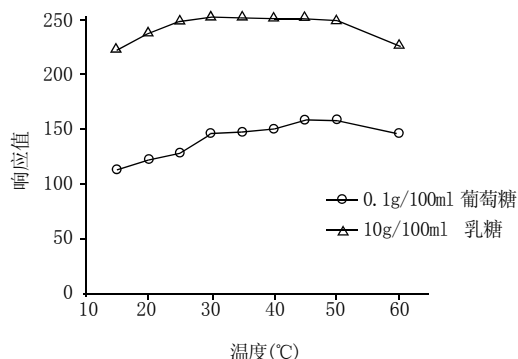


图4 温度对酶电极响应值的影响

Fig.4 Influence of temperature to sensitivity of enzymic electrode

温度是影响酶活性的重要因素, 本实验考察了不同

温度下传感器对同一样品响应值的变化(图4)。将缓冲液和样品都放入设定好温度的水浴锅中来实现对温度的控制。结果表明, 传感器对乳糖的响应值虽然会随着温度的升高而逐步升高, 但变化幅度不大, 说明通过此方法固定的酶分子具有良好的热稳定性。

2.5 传感器的稳定性实验

用系列浓度(0.2%~10%)的乳糖和葡萄糖(0.02%~0.1%)标准液对传感器进行连续30d(间隔2d)的测试。测定条件: 18~20℃, pH7.0, 测定时间40s, 冲洗时间25s, 每次测定100个样品, 不测样品时膜片处于缓冲溶液系统中。结果表明在每次测定的开始阶段, GOD的响应值会逐渐有所升高, 升高幅度在20%~40%, 之后就达到了稳定期, 并显示出良好的稳定性和线性关系。这可能是由于膜片表面固定了一层酵母破碎物, 在传感器不工作期间会有一些新的细胞生长从而增大了传质阻力, 当重新测定样品时, 反应过程中产生的 H_2O_2 的扩散会改变膜孔的通透性, 并最终达到稳态。表1是达到稳态时连续测样20次的响应值, 图5是传感器连续30d活性的变化曲线, 虽然酶电极的活性在不断下降, 但其线性关系能够保持相对稳定(数据未列出), 结果表明传感器具有良好的稳定性和理想的使用寿命, 乳糖电极可达20d左右, 葡萄糖电极到60d时还没有达到其半衰期。

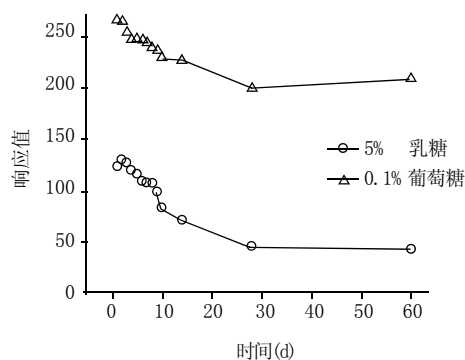


图5 传感器活性变化时间曲线

Fig.5 changing trend of sensitivity of biosensor

表1 传感器的稳定实验
Table 1 Stability experiment of biosensor

	GAL电极	GOD 电极
10% 乳糖	n=20 x=120.5 s=1.0305 CV=0.85%	n=20 x=0.5 s=0.0041 CV=0.82%
0.1% 葡萄糖	n=20 x=189.8 s=2.4096 CV=0.74%	n=20 x=178.6 s=2.2606 CV=1.27%

2.6 传感器的线性关系及准确度

待稳定后先用0.1%葡萄糖定标, 再用系列浓度的乳糖和葡萄糖标准溶液测定其线性关系(图6)。测定条件同1.6, 结果表明, 传感器的响应值同乳糖的浓度成明

表2 传感器的线性关系(乳糖和葡萄糖的混合液)

Table 2 Linear relative curve of biosensor(with lactose and glucose mixed solution)

样品	M L	M G	ML-MG	样品	M L	M G	ML-MG	样品	M L	M G	ML-MG
0.2L+0.1G	35	10	25	0.4L+0.1G	54	12	42	0.6L+0.2G	77	21	56
0.2L+0.2G	45	20	25	0.4L+0.2G	62	20	42	0.6L+0.4G	96	40	56
0.2L+0.3G	57	30	25	0.4L+0.3G	72	30	42	0.6L+0.6G	116	60	56
0.2L+0.4G	65	40	25	0.4L+0.4G	83	41	42	0.6L	57	1	56
0.2L+0.5G	76	50	25	0.4L+0.5G	92	51	41				
0.2L+0.6G	85	60	25	0.4L+0.6G	102	60	42	0.8L+0.2G	89	22	67
0.2L+0.7G	96	70	24	0.4L+0.7G	112	70	42	0.8L+0.4G	109	42	67
0.2L+0.8G	105	80	25	0.4L+0.8G	123	81	42	0.8L+0.6G	129	62	67
0.2L	25	0	25	0.4L	42	0	42	0.8L	69	2	67

注：测定条件：20℃，pH7.0，测定时间40s，冲洗时间25s，含10mmol/L硫酸镁，0.1g/100ml葡萄糖定标。ML：乳糖酶膜(左电极)，定标值为173；MG：葡萄糖酶膜(右电极)定标值为181；测定值为基础响应值与定标值的百分比；L:10g/100ml乳糖1；G:0.1g/100ml葡萄糖。

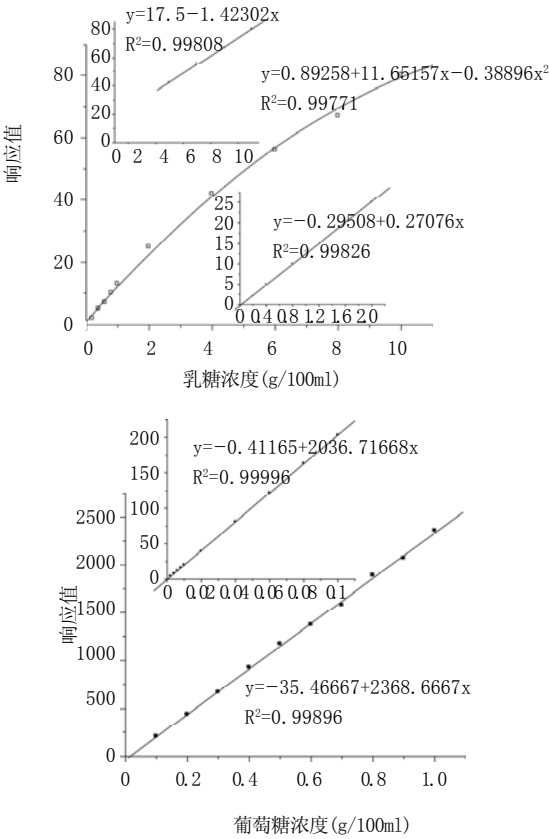


图6 传感器对乳糖响应值的线性关系曲线(乳糖或葡萄糖单一成分样品)
Fig.6 Linear relative curve of biosensor(with simplex component solution of lactose or glucose)

显的线性关系，随着乳糖浓度的增加，斜率成下降趋势，在0.2%~2%和4%~10%内响应值和乳糖浓度分别具有良好的线性关系， R^2 都达到0.998以上。对葡萄糖响应的线性范围是0~2g/100ml， R^2 值达到了0.9989，在0~0.1g/100ml内达到0.9999，其良好的线性响应和高灵敏度构成了乳糖线性响应的基础。

表2表明在有葡萄糖存在的情况下，通过级差法能够成功的去除葡萄糖的干扰，并具有良好的稳定性。预测值与测定值的回收率在99%以上，说明该电极具有较

高的准确度。

2.7 干扰实验

用常见的一些糖类做了酶电极响应的干扰实验。结果表明，葡萄糖电极的特异性较好，除了麦芽糖外对其他糖的响应值都很低。两种不同来源的酶制成的GAL电极表现出了较大的差异，用液体包装的来源于*Kluyveromyces lactis*的乳糖酶制作的电极特异性不够理想，对半乳糖、麦芽糖、蔗糖等一些常见的双糖都有不同程度的响应，其中对蔗糖的响应最高。用来源于*Aspergillus oryzae*的乳糖酶制成的电极则表现出了良好的专一性，乳糖外其他双糖的响应很小。

表3 干扰实验
Table 3 Interferential experiment of biosensor

	GAL 电极 ¹	GAL 电极 ²	GOD 电极
乳糖	120	110	0
果糖	-10	-2	1
半乳糖	19	5	5
麦芽糖	80	48	101
鼠李糖	0	0	-3
蔗糖	198	5	0
葡萄糖	691	580	780

注：乳糖浓度为10g/100ml，其他糖类均为1mmol/100ml，上标1表示从酵母中提取，2表示从曲霉中提取。

3 结论

本实验用酵母破碎液预处理过的核微孔膜为固定载体，以戊二醛为交联剂，构建了乳糖和葡萄糖两种酶膜，将其安装在SBA-40C生物传感分析仪上经测定表现出良好的性能，说明经过改性后，膜片表面性能得到了很大的改观，成为酶分子很好的固定载体。酵母破碎液中含有丰富的细胞壁碎片，这些碎片能够牢固地吸附在膜片表面，而酵母细胞壁^[13]上具有大量的糖蛋白，为酶分子提供了丰富的交联位点，由于吸附和交联的共同作用，酶分子能够稳定地固定在膜片表面，通过此方法固定，不用加上保护膜，因此能够极大限度的减

少酶膜的传质阻力和酶分子固定的需求浓度,从而有效提高了传感器的灵敏度,缩短了响应时间并降低了制作成本。不同来源的两种 GAL 构建的乳糖电极在其他方面没有太大区别,但在专一性上具有较大差异,来源于 *Aspergillus oryzae* 的乳糖酶显示出良好的特异性。由于乳制品尤其是原料乳中其他糖类的含量很低,所以利用双酶膜法可以同时、准确地检测乳制品、发酵液中乳糖和葡萄糖的含量,如果样品中含有抗坏血酸等一些过氧化氢电极的干扰物时,可以在膜片上加一层醋酸纤维素膜来去除干扰^[14]。但其乳糖响应值与葡萄糖响应值之比还比较小,本实验室正在继续对酶膜的制作方法进行深入研究来进一步提高乳糖酶的固定效果。

参考文献:

- [1] 吕晓英. 乳糖不耐受研究动态[J]. 现代预防医学, 2005, 32(4): 319-321.
- [2] BUCKTON G, YONEMOCHI E, HAMMOND J, et al. The use of near infra-red spectroscopy to detect changes in the form of amorphous and crystalline lactose international [J]. Journal of Pharmaceutics, 1998, 168: 231-241.
- [3] 甘宾宾, 蒋世琼. 高效液相色谱法测定乳糖酶水解产物中的糖类[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(12): 39-40.
- [4] ESHKENAZI, MALTZ E, ZION B, et al. A three cascaded enzymes biosensor to determine lactose concentration in raw milk[J]. Journal of Dairy Science, 2000, 83(9): 1939-1945.
- [5] JAN TKAC, STWRDIKA E, GEMEINERB P. Novel glucose non-interference biosensor for lactose detection based on galactose oxidase-peroxidase with and without co-immobilised b-galactosidase[J]. Analyst, 2000, 25: 1285-1289.
- [6] 孙康, 项永福. Nafion膜固定的麦尔多拉蓝为介体的过氧化氢、葡萄糖和乳糖生物传感器[J]. 分析测试学报, 2003(2): 43-47.
- [7] 李海虹, 严少华, 漆德瑶, 等. 环糊精交联固定酶的生物传感器及临床应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25(1): 162-166.
- [8] SHARMA S K, SINGHAL R, MALHOTRS B D, et al. Lactose biosensor based on Langmuir-Blodgett films of poly(3-hexyl thiophene) [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2004, 20(3): 651-657.
- [9] 冯德荣, 李梅, 李思荣, 等. 适用于食品工业中的蔗糖-葡萄糖双功能生物传感分析仪的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(6): 117-121.
- [10] 段莉, 冉均国, 苟立, 等. 新型氟碳化合物封端的聚碳酸酯聚氨酯材料制备葡萄糖传感器的研究[J]. 化学传感器, 2002, 22(1): 37-43.
- [11] 陈志春, 徐善浩, 林汉枫, 等. LBL分子沉积法制备葡萄糖氧化酶电极[J]. 物理化学学报, 2004, 20(10): 1267-1270.
- [12] 冯德荣, 尚雪芹. 适用于发酵生产过程的SBA-40L-谷氨酸-葡萄糖双功能分析仪的研制[J]. 食品与发酵工业, 1993(4): 117-121.
- [13] 张西平, 黄昆, 黄磊, 等. 酵母细胞壁主要结构蛋白CWP33的纯化与研究[J]. 武汉大学学报: 自然科学版, 1998, 144(12): 245-248.
- [14] 王顺光, 吉鑫松, 袁中一. 醋酸纤维素膜为基础的葡萄糖生物传感器的研制[J]. 生物工程学报, 1995, 11(3): 260-265.



信息

美科学家揭示物种间相互作用重要性

一个拥挤的“空间”怎么看也不像适合生物生长的最佳环境,然而两种土壤细菌似乎让一切都成为了可能。近日,据《科学》杂志在线报道,一项新的实验显示了两类生物物种是如何在这种难以捉摸的环境下达到进化、共存并迅速发展为一个整体的。

生物膜是微生物群落专门的生存环境,在这种环境中,它们通过一种自身分泌的细胞外聚合物材料与外界隔绝。美国奥克兰大学进化遗传学家 Paul Rainey 说:“这种无处不在的微生物垫也称生物膜,而这个由成百上千个微生物组成的生物群体甚至“武装”到了人的牙齿。这样形成的微生物垫在复杂性和生物多样性方面可以与热带雨林相比。它所承受的选择压力很可能要求各种细菌之间要有强烈的相互作用,而利用一个只含有两个物种,即土壤中的恶臭假单胞菌和不动杆菌的简单群落所作的一个实验正好反映了这种关系有多么紧密。”

而若以对两个物种都有利的方式改变该群落的物理结构,会导致其中一个物种的基因组发生一个简单的突变。在缺少一个伙伴的情况下,这种突变将是有害的。这一体系说明了物种间相互作用的重要性,并且对关于这些相互作用演化方式的研究工作也可能有用。这项实验由 Rainey 和丹麦科技大学的 Susse Kirkelund Hansen 等人组成的研究团队完成。

该研究团队确切估算了这些微生物在各种条件下的生理状况以及生存条件。在对比实验中,研究人员分别将一些微生物放在一个 300ml 大小的定向循环容器和一个 4ml 大小的密闭容器中,结果发现恶臭假单胞菌以不动杆菌为食。在大多数情况下,研究人员给这些微生物的营养物是苯甲醇,经过实验,研究人员发现不动杆菌可以处理这些苯甲醇,而恶臭假单胞菌则必须通过代谢变化处理这些有机化合物(苯甲醇)。

研究人员对这两种微生物的生长和形态变化进行了持续观察,结果发现单向循环容器内的微生物没有太多变化,恶臭假单胞菌仅仅生存在苯甲醇高度聚集以吸引不动杆菌的地方。但在载玻片上,一群生物体开始生长起来;起初这两种生物并没有混合生长,而是各自生长并聚合,10d 后,恶臭假单胞菌和不动杆菌簇叶丛生。

值得注意的是,这种交互作用是可以遗传的。当研究人员将这两种微生物重新混合放在一个新的流动容器中,仅过一天,这两类微生物就开始簇叶丛生。通过在恶臭假单胞菌基因中引进变种基因, Kirkelund Hansen 发现,即使是低氧状态或加入其他外力也无法阻滞基因变化的恶臭假单胞菌的生长动机。

美国普林斯顿大学生态学家 Simon Levin 说:“这是一项激动人心的发现,它阐释了生物群体快速进化的时间量程。同时对进化生态学研究一系列基本问题的解决也有着潜在影响。”