

酶电极法测定发酵酒中尿素的含量

马力辉, 孙辉, 齐明君, 赵志磊, 马凯, 侯晓华

(河北大学质量技术监督学院, 河北保定 071002)

摘要: 为实现准确、快速检测发酵酒中尿素含量, 本文以明胶和壳聚糖为包埋材料, 透析膜为载体, 戊二醛为交联剂, 用包埋交联吸附相结合的方法制作了固定化脲酶膜, 结合铵离子选择性电极实现了尿素含量的快速测定, 研究了脲酶固定化的条件和尿素传感器的响应性能, 并应用于实际样品的测定。实验表明: 脲酶固定化最适戊二醛浓度为0.05%, 最适交联时间为1.5 h; 尿素传感器最佳使用环境为温度40 ℃, 最适溶液 pH 值5.0, 线性范围为2~50 mg/L, 最低检测限为0.5 mg/L, 线性良好 ($R^2 > 0.999$), 重复性好 (RSD=1.45%), 可靠性较高。此方法每片脲酶膜可进行多次测量, 且可更换, 降低了测量成本, 可用于实现酸性环境下发酵酒中尿素含量的快速检测, 为控制发酵酒的营养、质量及食用安全提供技术支持。

关键词: 尿素; 传感器; 脲酶; 电极; 发酵酒

文章编号: 1673-9078(2013)9-2258-2261

Detection of Urea Content in Fermented Wine by the Enzyme Electrode

MA Li-hui, SUN Hui, QI Ming-jun, ZHAO Zhi-lei, MA Kai, HOU Xiao-hua

(College of Quality and Technical Supervision, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: A rapid and accurate detection method for urea in fermented wine was developed by preparation of immobilized urea membrane using gelatin and chitosan as embedding materials, dialysis membrane as the carrier, and glutaraldehyde as crosslinking agent. The membrane was then applied to determinate actual samples, combined with the ammonium ion selective electrode. The urease immobilized conditions and the response performance of the urea sensor were also studied. For urease enzyme immobilization process, the most suitable glutaraldehyde concentration was 0.05% and the optimum crosslinking time was 1.5 h. The urea sensor showed good linearity ($R^2 > 0.999$), good repeatability (RSD=1.45%), and high reliability, the most suitable temperature and pH were 40 ℃ and 5.0, respectively. In addition, the linear response range and detection limit of this method were found as 2~50 mg/L and 0.5 mg/L, respectively. The multi-usage urease membrane can be renewed, thus reducing the measurement cost and realizing the urea rapid determination in fermented wine under the fermented acidic environment, and providing a technical support for the control of, nutrition, quality and safety of fermented wine.

Key words: urea; sensor; urease; electrode; fermented wine

在食品发酵工业中, 研究发现, 发酵酒中含有致癌性化学物质氨基甲酸乙酯, 这种物质是在酒的发酵过程中尿素和乙醇经化学反应形成的^[1], 因此, 发酵酒中尿素含量的多少直接关系到饮用人员的健康问题。可见研究建立酒的发酵过程中尿素含量的快速、准确检测是十分必要的, 监测发酵酒中尿素的含量也成为涉及食品安全的重要检测指标, 对于控制发酵酒的营养及质量是非常必要的。

酶电极法最初设想的提出距今只有50年, 而用于测定尿素的方法研究时间更短, Guilbault 等将脲酶覆盖在铵电极外, 并用另一个铵电极作为参考电极制作了简易的尿素传感器^[2]; Nilsson 等用包埋法将脲酶固

化在聚丙烯酰胺凝胶上结合 pH 玻璃电极制作了尿素传感器^[3]; 王厚行等用 PVC 固定脲酶膜结合国产 231 型玻璃电极构建了一种尿素传感器用于检测血浆中尿素的浓度^[4]; 李长江等利用 2-氨基乙基三甲氧基硅烷直接修饰 pH 玻璃电极, 再与戊二醛和尿素酶在温和条件下交替交联, 制成了电位型尿素酶电极^[5]。现已有的酶电极法测定尿素的方法大多是将脲酶直接固化在电极上, 这样会造成固化的脲酶膜不能更换, 当脲酶膜酶活降低不能使用时需重新将脲酶再一次固化在电极上, 较为繁琐, 且一般用于检测血清和尿液中的尿素浓度, 目前尚未有用于酸性环境下如发酵酒中尿素含量检测的报道。

本方法拟用灵敏性好, 响应速度快, 结构简单的铵离子选择性电极结合由包埋交联吸附相结合的方法制作的固定化脲酶膜构建一种可简便更换脲酶膜的尿素传感器, 可实现酸性环境下尿素含量的快速检测,

收稿日期: 2013-05-21

作者简介: 马力辉 (1967-), 男, 博士, 教授, 主要从事产品创新设计、制药装备、检测技术等研究

通讯作者: 马凯 (1967-), 女, 副教授, 主要从事生物化学相关学科

对控制发酵酒的营养、质量及食用安全提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

壳聚糖、25%戊二醛、明胶、乙酸、脲酶、尿素、甘油、十二水磷酸氢二钠、二水磷酸二氢钠、氯化钾、乙二胺四乙酸二钠、透析膜、橡胶圈、橡胶管。试剂均为分析纯，水为超纯水。

1.2 实验仪器

铵离子选择性复合电极，PHS-3C 型酸度计，高阻抗电子毫伏计，磁力搅拌器，电子天平，恒温水浴锅

1.3 尿素传感器制备

1.3.1 缓冲液的配制

缓冲液采用磷酸缓冲液，母液 A: 0.2 mol/L Na₂HPO₄，母液 B: 0.2 mol/L NaH₂PO₄。取不同比例母液 A 和母液 B，可配置不同 pH 的磷酸缓冲液。在配置好 pH 的磷酸缓冲液中还需加入 0.01 mol/L EDTA₂Na₂，0.1 mol/L KCL 和 ISA 离子强度调节剂。

1.3.2 脲酶膜的制备

酶膜的制作已有的报道有吸附法、共价键合法、交联法、包埋法等，这几种方法各有优缺点，故采用包埋、交联和吸附相结合的方法来制作酶膜，既不降低酶的活性，也能使酶很好的固化在载体上^[5]。

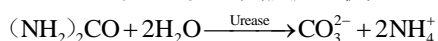
称取 0.4 g 壳聚糖和 0.4 g 明胶溶于 50 mL 质量浓度为 1% 的乙酸中，置于磁力搅拌器上搅拌均匀，将 100 mg 脲酶溶于其中得到酸性脲酶溶液，再加入 8% 的甘油作为稳定剂，经磁力搅拌器搅拌均匀脱泡，均匀涂于剪成与电极感应膜大小相当的透析膜圆片上，自然脱水成膜后浸泡在戊二醛溶液中 4 ℃ 下交联反应，再用去离子水多次洗涤，去除游离的戊二醛，得到固定化酸性脲酶膜，置于缓冲液中贮存在 4 ℃ 冰箱中待用。

1.3.3 酶电极的制备

将橡胶管套在电极上，把准备好的脲酶膜覆盖在电极感应膜表面，再用 O 型橡胶圈固定，保证脲酶膜与铵离子感应膜接触良好且无气泡，即制成尿素酶电极。

1.4 实验原理

尿素是一种化合物，在脲酶的催化作用下可发生分解，产生 NH₄⁺ 和 CO₃²⁻，其反应式为：



溶液中的尿素在经过酶膜的催化作用下分解生成了 NH₄⁺，导致溶液中 NH₄⁺ 的浓度发生了变化，铵离子选择性电极感应膜对 NH₄⁺ 敏感，NH₄⁺ 的浓度变化导致电极输出的电压信号发生变化。由能斯特方程

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{Red}}$$

可知，电位值与溶液中尿素浓度的对数在一定范围内成线性关系，即：

$$E = K + A \lg C_{\text{尿素}}$$

注：K：与电极感应膜及内部溶液有关系；A：常数。

通过对输出电压信号的分析可得出相对应溶液中的尿素浓度，从而达到检测试样中尿素浓度的目的。

原理如下图：

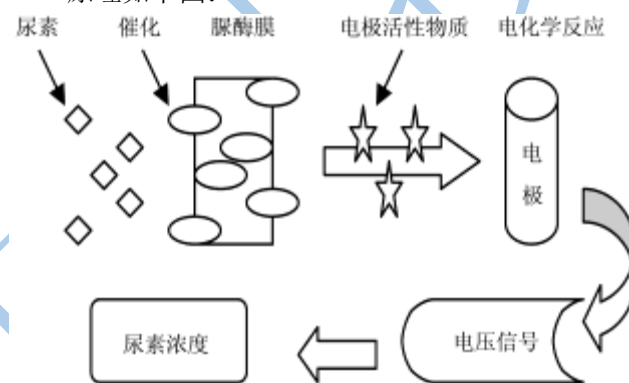


图 1 尿素传感器原理图

Fig.1 Schematic diagram of urea sensor

1.5 实验方法

称取一定量的尿素放入 50 mL 烧杯中，加入配置好的缓冲液，放入磁力搅拌芯子，在磁力搅拌器上搅拌均匀，将制作好的酶电极插入溶液中，待电极电位稳定后读取电位，记录电位，为减小误差，每个浓度的尿素标准溶液测 6 次，取电压值的平均数。将酶电极用去离子水清洗，再用试纸吸干后，进行下一次测试。将记录的数据制作工作曲线。

2 结果与分析

2.1 酶膜的制备条件的优化

2.1.1 戊二醛浓度对酶膜活性的影响

戊二醛是一种交联剂，如果浓度过高会使酶的结构发生变化，降低脲酶膜中酶的活性；浓度太低，脲酶交联反应较低，大量脲酶游离走，脲酶膜中酶较少，活性低。采用不同浓度的戊二醛溶液分别对相同脲酶膜交联相同的时间，去离子水清洗后安装到电极上，分别对标准尿素溶液进行测试。

由图 2 可容易看出，在戊二醛浓度为 0.05% 时，

脲酶交联反应较充分,而且也没有使脲酶结构发生变化,脲酶膜中固定化酶有最高活性。

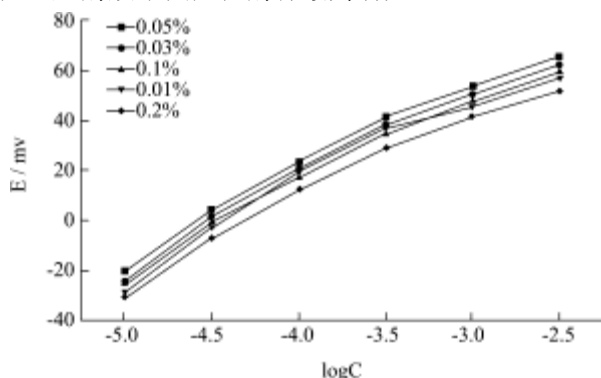


图2 不同戊二醛浓度交联下尿素传感器 E-IgC_{尿素}曲线

Fig.2 E-IgC_{urea} curve of urea sensor in different glutaraldehyde concentration to cross-linking

2.1.2 交联时间对酶膜活性的影响

交联时间和戊二醛浓度对脲酶的影响相似,交联时间短,交联不完全,酶膜中酶的活性较低;交联时间长,戊二醛会使酶失去活性,同样酶膜中酶活性低。用浓度为 0.05%的戊二醛对相同脲酶膜交联不同的时间,去离子水清洗后安装到电极上,分别对标准尿素溶液进行测试。

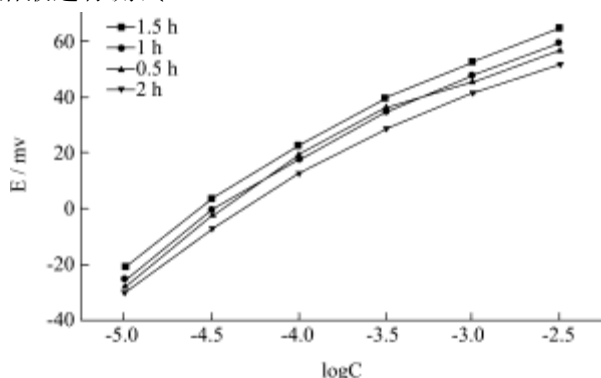


图3 不同交联时间下尿素传感器 E-IgC_{尿素}曲线

Fig.3 E-IgC_{urea} curve of urea sensor in different cross-linking times

由图3可容易看出,用浓度为 0.05%的戊二醛对脲酶膜交联 1.5 h,脲酶膜的活性最好。

2.2 尿素传感器的使用条件

2.2.1 温度对电极检测的影响

酶在较高温度下具有较高活性,随着温度的升高,酶的活性变高,电极的响应也会增大,但是温度过高,酶蛋白变性,酶活丧失,所以需要确定脲酶膜反应的最佳温度。在30℃~50℃范围内,每隔5℃,分别用酶电极对标准尿素溶液进行测试。

由图4可以看出,脲酶膜在40℃时,活性达到最大值,电极响应也有最大值。

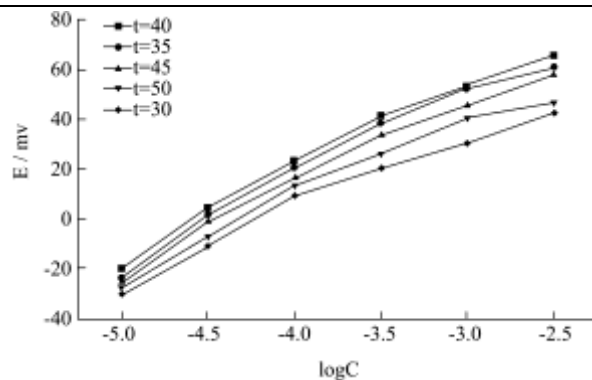


图4 不同温度下尿素传感器 E-IgC_{尿素}曲线

Fig.4 E-IgC_{urea} curve of urea sensor at different temperatures

2.2.2 pH 对电极检测的影响

pH 值对脲酶膜活性有很大影响,也直接影响了电极的响应值,所以电极的测试环境 pH 对测试结果影响很大,这就需要确定最佳 pH 环境。取不同比例的磷酸缓冲液母液 A 和 B,配置不同 pH 值的缓冲液,在 pH 值4.0~8.0范围内,每隔1.0,分别对尿素标准溶液进行测试,

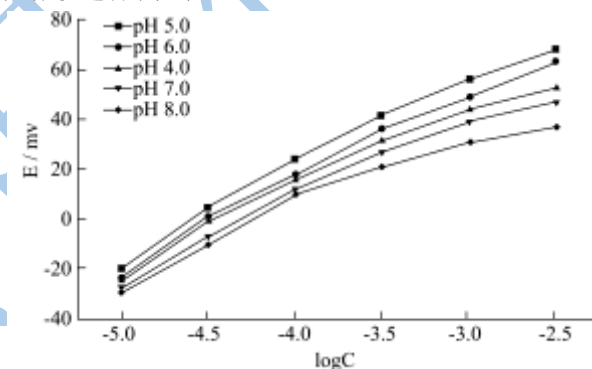


图5 不同 pH 环境下尿素传感器 E-IgC_{尿素}曲线

Fig.5 E-IgC_{urea} curve of urea sensor in different pH

不同 pH 环境下,对电极响应的影响如图所示。由图5可见,电极测试环境最适 pH 为5.0。

2.2.3 尿素传感器 E-IgC_{尿素} 曲线的绘制

将酶电极分别与 PHS-3C 酸度计和电子毫伏计连接,对尿素标准溶液进行测试,作图得到尿素传感器的 E-IgC_{尿素} 曲线,见下图6。

将脲酶电极分别连接 PHS-3C 酸度计和电子毫伏计对同样的试样进行测试,所测得的电压值有所不同,从图6和图7中可以看出,用电子毫伏计所测数据有更好的线性度。电子毫伏计比 PHS-3C 酸度计有更高的阻抗,可以减少电极本身的干扰,所以尿素传感器应该采用脲酶电极搭配电子毫伏计进行测量。

在电子毫伏计所测电压值的 E-IgC_{尿素} 曲线中,2~50 mg/L 浓度区间线性关系良好,最低检测限可达 0.5 mg/L,所以尿素传感器在尿素浓度为 2~50 mg/L 范围内测量更加精确,此区间回归直线方程为

$E=254.87+61.27\lg C_{\text{尿素}}$, 相关系数 $R=0.9996$ 。

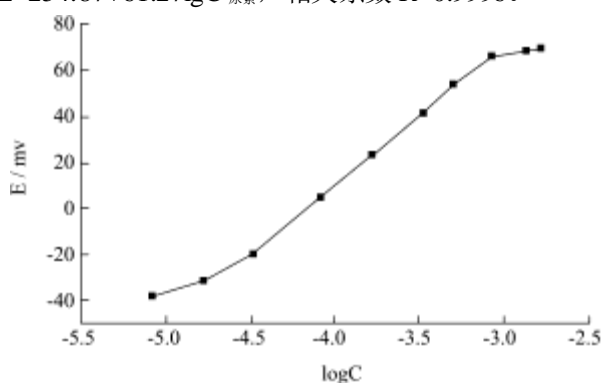


图6 尿素传感器 E-IgC_{尿素}曲线 (PHS-3C 酸度计)

Fig.6 E-IgC_{urea} curve of urea sensor

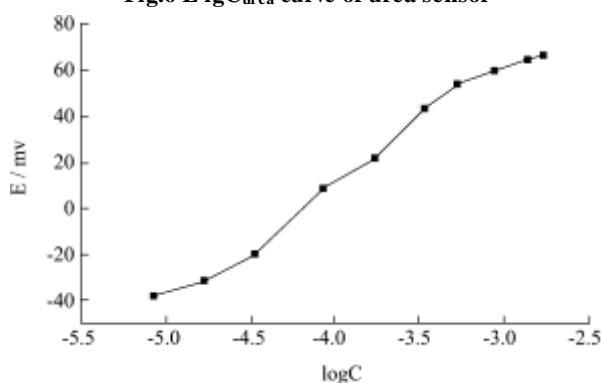


图7 尿素传感器 E-IgC_{尿素}曲线 (电子毫伏计)

Fig.7 E-IgC_{urea} curve of urea sensor (millivoltmeter)

2.3 样品的测定

根据制作的标准曲线,用制作好的脲酶电极连接电子毫伏计,对市场上售的一种绍兴黄酒进行尿素含量的测定,重复测定6次,结果见表1。

表1 黄酒中尿素含量

Table 1 The urea content in rice wine

	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD/%
尿素含量/(mg/L)	21.4	20.8	21.3	21.5	20.9	20.1	21	1.45

在表1中的测定结果可以看出,用制作的尿素传感器对市售一种绍兴黄酒进行6次重复检测,检测结果相对标准偏差1.45%,准确性好,可靠性较高。

3 结论

通过一系列实验对制备的铵电极尿素传感器进行了测试,在测试使用的磷酸缓冲液中加入了EDTA₂Na₂增强稳定性,并加入了ISA离子强度调节剂以减少其他例子的干扰。结果表明所制作的铵电极

尿素传感器,脲酶固定化最适戊二醛浓度为0.05%,最适交联时间为1.5 h;尿素传感器线性响应范围为2~50 mg/L,最低检测限为0.5 mg/L,最佳使用环境为温度40℃,溶液pH值5.0,测量结果准确,并且操作简单,酶膜可进行更换,测量成本降低,有望用于发酵酒中酸性环境下尿素含量的快速检测。

参考文献

- [1] 管政兵. 酿造酒中氨基甲酸乙酯控制的研究进展及对中国黄酒的借鉴[J]. 食品工业科技, 2012, 33(20): 374-378
Guan Zheng bing. Research progress in the control of ethyl carbamate in fermented alcoholic beverages and its references giving for Chinese rice wine [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(20): 374-378
- [2] G G Guilbault, Montalvo J G. Journal of American Chemistry Society, 1970, 92(8): 2533-2538
- [3] Nilsson H, Akerlund A C, Mosback K, et al. Determination of glucose, urea and penicillin using enzyme-pH-electrodes [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1973, 320(2): 529-534
- [4] 王厚行, 李青. 新型尿素传感器的研究[J]. 生物工程学报, 1988, 4(4): 331-334
Wang Houxing, Li Qing. the Study on a new kind of urea sensor [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 1988, 4(4): 331-334
- [5] 李文江, 孙长青. 电位型尿素酶电极的研制[J]. 吉林大学自然科学学报, 1998, 3: 89-92
Li Changjiang, Sun Changqing. Preparation of Potentiometric Enzyme Electrode for Urea [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Jilinensis, 1998, 3: 89-92
- [6] J P Chen, SHChiu. Preparation and characterization of urease immobilized onto porous chitosan beads for urea hydrolysis [J]. Bioprocess Engineering, 1999, 21: 323-330
- [7] 吴召惠, 田亚平. 包埋吸附法固定化酒用酸性脲酶的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(3): 437-441
Wu Zhaohui, Tian Yaping. Immobilization of Acid Urease Via Adsorption and Embedded [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2010, 29(3): 437-441
- [8] Andrich L, Esti M, Moresi M. Urea degradation kinetics in model wine solutions by acid urease immobilised onto chitosan-derivative beads of different sizes [J]. Enzyme Microb Tech, 2010, 46(5): 397-405
Li Hui juan, Cao Zhikun, Gao Jun, et al. Immobilization of Acid Urease [J]. Chemical Industry and Engineering, 2011, 28(4): 50-54

- [10] Azahar Ali. Nanostructured zinc oxide film for urea sensor [J]. Materials Letters, 2009, 63(28): 2473-2475
- [11] Chen, Y P, Liu, B, Lian, H-T, et al. Preparation and Application of Urea Electrochemical Sensor Based on Chitosan Molecularly Imprinted Films [J]. Electroanalysis, 2011, 23(6): 1454-1461

现代食品科技