

中華民國第 60 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 工程學(二)科

佳作

052404

印刷微電極晶片量測酵母菌濃度研究

學校名稱：新北市立中和高級中學

作者： 高二 宋婕柔 高二 鄭舒方 高三 林政維	指導老師： 趙孟軒 王一哲
---	-----------------------------

關鍵詞：指叉電極、生物快篩、酵母菌

摘要

食品快篩廣泛運用在生活當中，而受到這種機制的發想，本實驗想運用阻抗頻譜推估酵母菌的未知濃度，讓民眾了解自己平日所攝取的物質是否有過量而影響身體健康。本實驗利用網版印刷做出四種不同規格的銀膠晶片感應溶液的阻抗及導電率，用 LCR 掌上型電錶測量不同濃度的強電解質 NaCl（食鹽水）確認晶片能有效的使用，再測量弱電解質醋酸的平衡常數，最後擴大至大分子味精及生物酵母菌，成功得到生物溶液酵母菌的阻抗頻譜和檢量線，如指叉數目為 8、指叉間隔為 0.1mm 的指叉電極，其對酵母菌溶液的檢量線 R^2 值為 0.9958，靈敏度為 $3.08 \times 10^{-6} \pm 1 \times 10^{-8}$ ，在 98% 信心區間下之偵測極限為 0.0125 (顆/1mm²)，為生物快篩檢測提供了新的可能。

壹、研究動機

酵母菌檢測傳統方法是利用培養基、試劑配置來檢驗，過程繁複需要三到七天時間，雖現今已經有酵母菌快篩片，但酵母菌必須培養兩到三天的時間才能運用到快篩片上，且使用菌數有限。本實驗希望利用網版印刷製作出指叉電極，利用許多正負電極在狹小空間中交錯排列的特性增加靈敏度，除了能夠量測電解質溶液，還能測量微帶電的生物細胞，得到待測物的阻抗頻譜，好建立檢量線提供未知物快篩量測的基準。本實驗先對食鹽、葡萄糖、醋酸、味精進行量測，再對酵母菌做測試。同時，我們也印製了四種不同規格的電極，希望了解靈敏度在不同指叉根數與指叉間距下的差異。

貳、研究目的

- 一、利用網版印刷製作指叉電極晶片。
- 二、量測不同濃度食鹽水之阻抗、確認印刷微電極晶片可以有效使用。
- 三、量測不同濃度酵母菌之阻抗、建立酵母菌溶液之檢量線。
- 四、比較用不同規格的電極量測溶液差異。

參、研究設備及器材

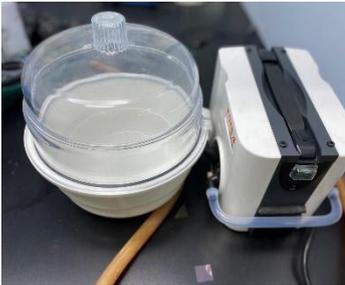
一、藥品

PBS 緩衝溶液(10X, pH 7.4) (ref:70011-004, Life Technologies)、去離子水、氯化鈉(碘鹽)、葡萄糖、酒釀酵母菌(Lesaffre)、麩胺酸鈉(味精)、醋酸、PDMS。

二、器材

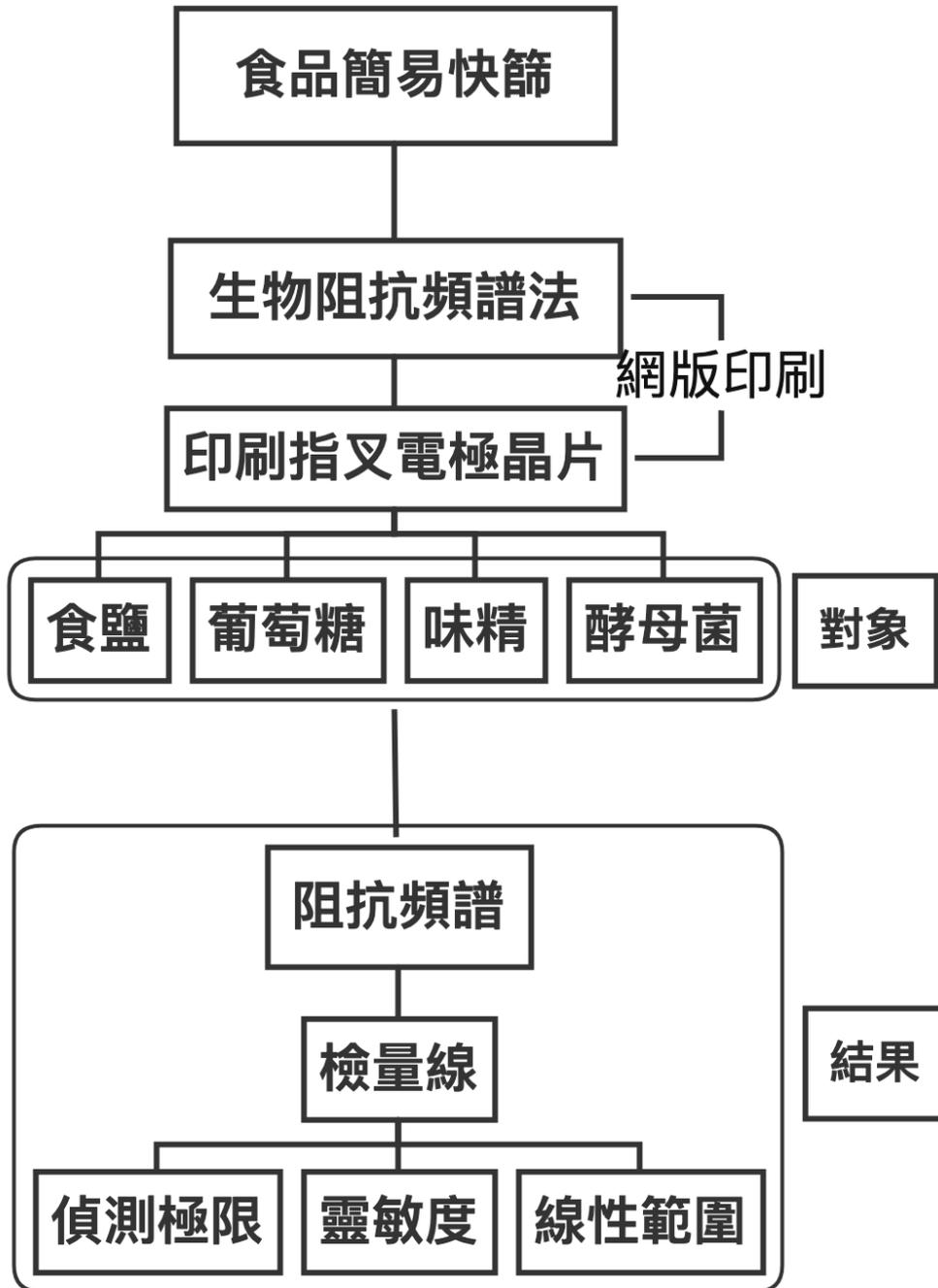
燒杯、玻棒、加熱板、定量瓶、塑膠洗滌瓶、塑膠真空乾燥機、計時器、微量離心管、離心管架、擦拭紙、鋁箔紙、投影膠片、相片紙，和表 1 中的器材

表 1 實驗設備及器材

			
酒釀酵母菌	塑膠真空乾燥機	試管振盪器	可調式微量吸管
			
Uhandy 手機顯微鏡頭	LCR-916 掌上型電錶	刮刀	銀墨

肆、研究過程或方法

一、研究架構



二、酵母菌研究概述

酵母菌為單細胞真菌(直徑 3-10um)，除了沒有鞭毛外，一般都具有細胞壁、細胞膜、粒線體、核糖體、液泡等細胞器。生長方式有出芽、分裂兩種，可生長於高糖、偏酸性的環境，pH 值 4.5-6.0 是最適合生長的條件。過往要量環境中酵母菌濃度時，必須利用培養基、試劑配置來檢驗，過程繁複需要三到七天時間。即使現今已經有酵母菌快篩片，但酵母菌必須培養兩到三天的時間才能運用到快篩片上，或者利用質譜儀做檢測，手續非常繁複[1]。目前若要達到生物分子的快速篩檢，以生物阻抗法為主流[1]。如酵母菌表面的細胞壁為多醣聚合物，其上有許多官能基(如-OH 基或-COOH 基)具帶電性，使水溶液中的帶電粒子會往酵母菌靠近，形成電雙層而微帶電荷，讓酵母菌可感應到指叉電極交流電壓的變化，而在電極之間移動，進而量到不同濃度酵母菌溶液的阻抗變化。國際上，有實驗團隊為了能測量酒品製作過程中特定菌種(*Brettanomyces*)的濃度，利用化學蝕刻所做出的金指叉電極，在其上修飾抗體，以生物阻抗法偵測 *Brettanomyces* 的存在，確認酒品是否遭到汙染 [2]。在本實驗，也同樣以生物阻抗法，快速量測酵母菌種 *Saccharomyces* 的濃度，不一樣的是本實驗跳脫以化學蝕刻做指叉電極的方法，改以網版印刷快速做出指叉電極，不僅省錢省時，更省去繁複化學製程對環境的汙染，相信能成為往後生物檢測的偵測標竿。

三、研究方法

(一) 指叉電極製作

1.指叉電極設計

- (1)以 adobe illustrator 設計指叉電極尺寸。
- (2)交由美工設計公司製作網版。
- (3)指叉電極規格如圖 1。

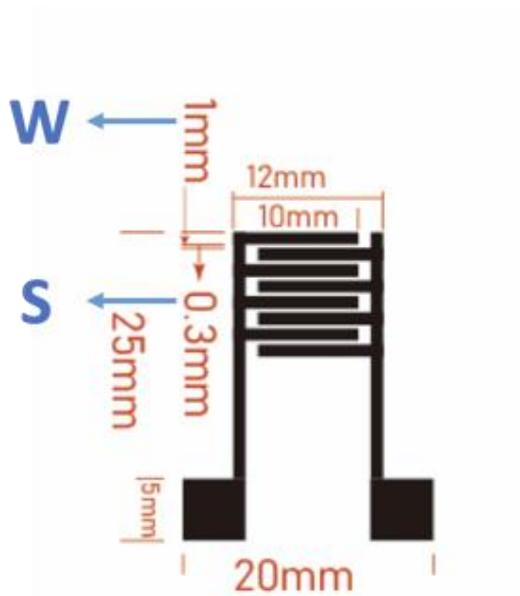


圖 1 本實驗所用的指叉電極簡圖。紅字所列尺寸為指叉電極大小。網版印刷用指叉電極根數為 8 根與 12 根，指叉寬度 W 為 1mm，指叉間距 S 則為 0.1mm 或 0.3mm。

2. 以網版印刷製作指叉電極

- (1) 用玻片墊在網版印刷平台底下調整網版呈水平（**圖 2**）。
- (2) 將投影片紙放在網板下方，並用膠帶固定。（**圖 3-a**）
- (3) 用刮杓將銀墨塗在網版左側，再用刮刀把銀墨由左至右填滿網版。（**圖 3-b**）
- (4) 印製好的電極放在 80°C 的加熱板上 30 分鐘。（**圖 3-c**）
- (5) 規格如**圖 1**，分別印製出 8 根和 12 根的指叉，指叉寬度 W 為 1mm，指叉間距 S 分別為 0.3mm 和 0.1mm。

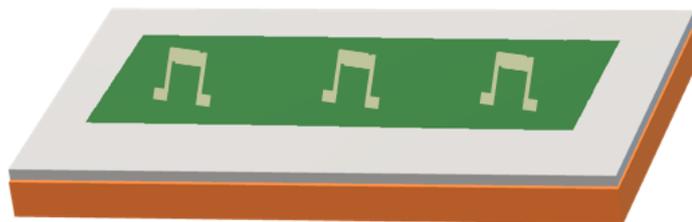
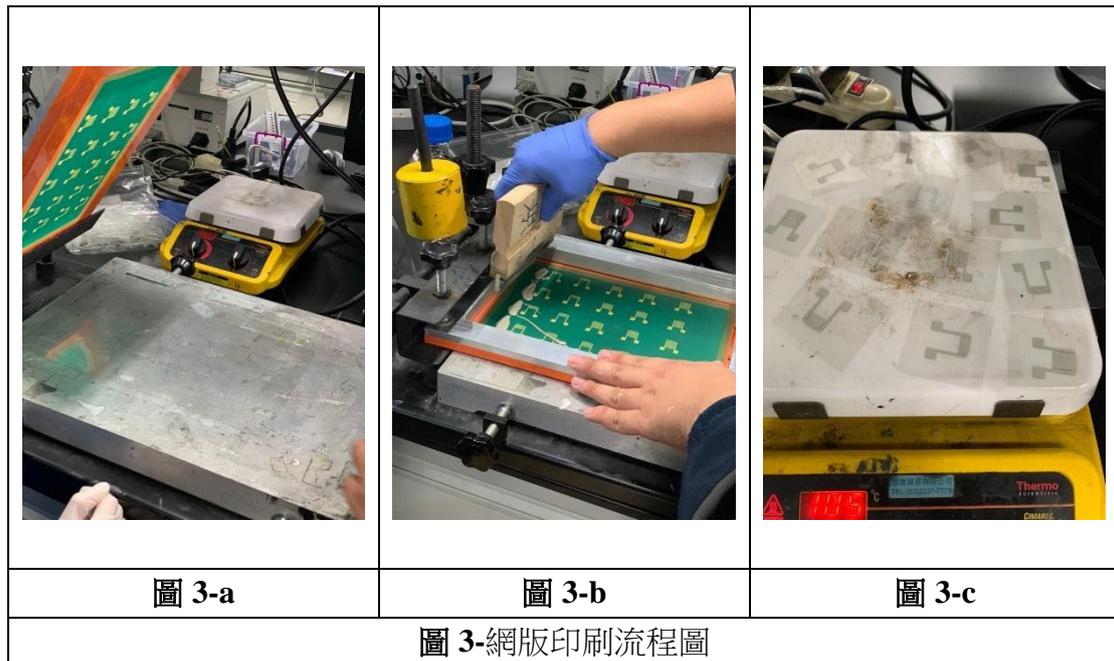


圖 2 佈有指叉電極圖騰的網版示意圖。



(二) 製作盛裝溶液的 PDMS 透明容器於指叉電極上

1. 將鋁箔紙摺成長方形模具，在底部放置一片載玻片。(圖 4-a)
2. 以重量比 10:1 的 PDMS (A)和 PDMS (B)倒在塑膠杯子中，用塑膠吸管攪拌到出現氣泡、變乳白色。
3. 用真空幫浦把 PDMS 中的氣泡抽出，倒入模具中。
4. 把模具放在 120 度的加熱板上兩小時。
5. PDMS 凝固後，將外層的鋁箔紙及載玻片取下，可看到變成口字型的透明 PDMS 模塊，將有空隙的那面黏貼在投影片紙上。此過程須小心不要壓到印好的指叉電極(圖 4-b)。
6. 做好的 PDMS 槽即可用來盛裝溶液，使每次觸碰電極晶片的溶液量都是固定的。



圖 4-a PDMS 模具製作

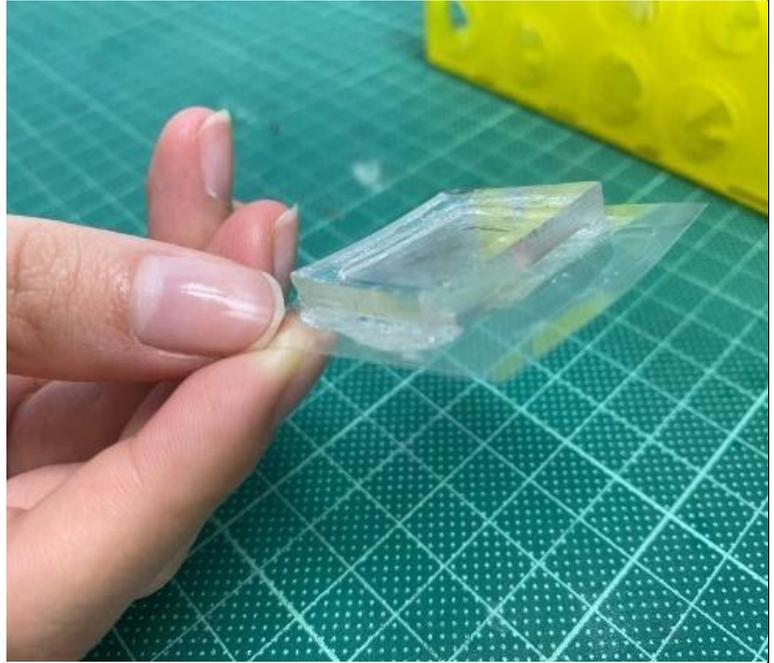


圖 4-b 將 PDMS 槽固定於指叉電極片上

(三) 溶液配置

1. 氯化鈉

- (1) 將 5.85 克的氯化鈉和去離子水混合，攪拌至完全溶解，再把去離子水加至 100 毫升，配置成 1 M 氯化鈉溶液。
- (2) 吸取 100 μL 的 1M 氯化鈉溶液和 900 μL 的去離子水到離心管中，配置成 0.1 M 的氯化鈉。
- (3) 重複(2)配置 0.1 M~ 10^{-5} M 的氯化鈉溶液。
- (4) 將 800 μL 1 M 的氯化鈉溶液和 200 μL 去離子水加至離心管中，配置成 0.8 M 氯化鈉溶液。
- (5) 將 500 μL 0.8 M 的氯化鈉溶液和 500 μL 去離子水加至離心管中，配置成 0.4 M 氯化鈉溶液。

2. 葡萄糖

- (1) 將 18 克的葡萄糖和去離子水混合，再把去離子水加至 100 毫升，配置成 1 M 葡萄糖溶液。
- (2) 吸取 100 μ L 的 1M 葡萄糖溶液和 900 μ L 的去離子水到離心管中，配置成 0.1 M 的氯化鈉溶液。
- (3) 重複(2)配置 0.1 M~ 10^{-5} M 的葡萄糖溶液。

3. 醋酸

- (1) 將 2.4 克純醋酸和去離子水加入燒杯中溶解，再把去離子水加至 100 mL，配置成 1M 醋酸溶液。
- (2) 將 100 μ L 1 M 醋酸溶液和 900 μ L 去離子水加至離心管中，配置成 0.1M 溶液。
- (3) 重複(2)配置 0.1 M~ 10^{-5} M 醋酸溶液。
- (4) 將 800 μ L 0.1M 的醋酸溶液和 200 μ L 去離子水加至離心管中，配置成 0.08 M 醋酸溶液。
- (5) 將 500 μ L 0.08M 的醋酸溶液和 500 μ L 去離子水加至離心管中，配置成 0.04 M 醋酸。

4. 味精

- (1) 將 1 克味精和 10 克去離子水加至燒杯中溶解，配置成 0.534 M 味精溶液。
- (2) 900 μ L 去離子水和 100 μ L 味精溶液加至離心管中，配置成 10x 溶液為 5.3×10^2 M。
- (3) 將 500 μ L 去離子水和 10x 溶液加至離心管中，配置成 20x 溶液，為 2.7×10^2 M。
- (4) 重複(3)配置 20x~160x 味精溶液。

5. 酵母菌

- (1) 將 0.1 克的酵母菌和 4 克的水或緩衝溶液混合，攪拌至溶解。
- (2) 吸取 100 μL 的酵母菌溶液和 900 μL 的水或緩衝溶液到離心管中，配置成酵母菌溶液(V)。
- (3) 吸取 500 μL 的 10x 酵母菌溶液和 500 μL 的水或緩衝溶液到離心管中，配置成酵母菌溶液(IV)。
- (4) 重複(3)配置 (I)~(III) 酵母菌溶液。

(四) 酵母菌濃度測量

1. 下載 app 軟體 uHandy，在手機鏡頭前裝上高倍顯微鏡。(圖 5-a)



圖 5-a 高倍手機顯微鏡頭夾於手機上之側拍照。

2. 將各濃度的酵母菌溶液用貼紙採樣，黏貼在載玻片下方。
3. 將手機倍率調到 300x，每幅面積為 0.1645 mm^2 。
4. 用手機截圖，得酵母菌濃度比較圖和算出不同溶液的酵母菌個數。
5. 每個濃度都在不同區塊拍出五張酵母菌截圖，和所計算出的酵母菌數目的平均值列於如圖 5-c。

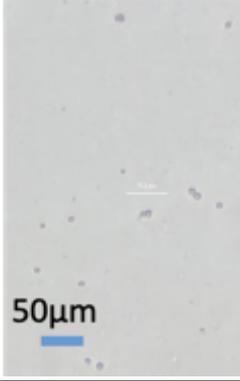
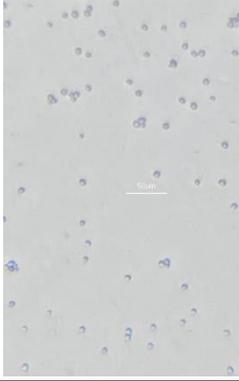
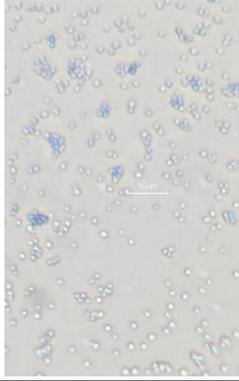
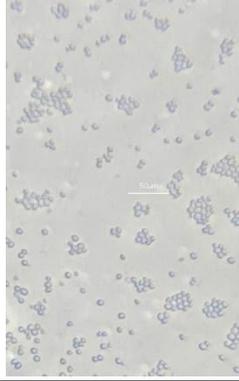
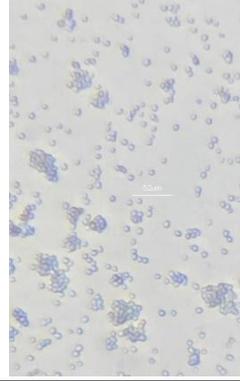
				
編號 I	II	III	IV	V
240 ± 55 (顆 /mm ²)	374 ± 52	543 ± 173	815 ± 48	877 ± 161

圖 5-c 手機顯微鏡下酵母菌濃度比較圖

(五) 利用 LCR meter 測量電容與電阻(C_P 、 R_P)，再求得阻抗(Z)

1. 電極

- (1) 先觀察微電極是否有相連的情況，如有則會造成短路而無法使用。
- (2) 利用三用電表測試電極是否短路，如發生蜂鳴則為短路無法使用。

2. 氯化鈉

- (1) 在測量 8 指叉時，將待測溶液 200 μ L 放在容器裡；測量 12 指叉時，則將待測溶液 350 μ L 放在容器裡。
- (2) 把電極放在容器中，溶液超過所有的微電極，並確認需用探針測量的地方沒有被溶液沾濕。
- (3) 將探針放在電極兩端的方塊中測量。
- (4) 換成下一個濃度前，先用 200 μ L 待測溶液洗過容器，再做測量。
- (5) 重複(2)~(4)分別在 8 指叉，間距為 0.1mm 及 0.3mm，12 指叉間距為 0.1mm 及 0.3mm；共四種規格的指叉上依序測量 10^{-5} M~0.1 M 及 0.4 M、0.8 M、1 M。

3. 葡萄糖

- (1) 在測量 8 指叉時，吸取 200 μ L 待測溶液在容器裡；測量 12 指叉時，則吸取 350 μ L 待測溶液在容器裡。
- (2) 將碳針放在電極兩端的方塊中測量。
- (3) 換成下一個濃度測量前，用 200 μ L 的待測溶液洗過放置溶液的位置。
- (4) 重複(2)~(4)分別在 8 指叉，間距為 0.1mm 及 0.3mm，12 指叉間距為 0.1mm 及 0.3mm；共四種規格的指叉上依序測量 10^{-5} M~1 M。

4. 醋酸

根據葡萄糖的(1)~(4)依序量測 10^{-5} M~ 10^{-2} M 及 0.04 M、0.08 M，再量測 0.1M、1 M。

5. 味精

根據葡萄糖的(1)~(4)依序量測 10x~160x 味精溶液。

6. 酵母菌

- (1) 用試管震盪器搖晃離心管，讓酵母菌不會沉澱在底部。
- (2) 在測量 8 指叉時，吸取 200 μ L(I)；測量 12 指叉時，則吸取 350 μ L(II)裝在 PDMS 溶液槽裡。
- (3) 測量方法同葡萄糖的(3)(4)。
- (4) 依序測量(I)~(V)的酵母菌溶液。

伍、結果與討論

一、指叉電極之阻抗頻譜模擬

本實驗中所用的印刷微電極晶片是將一指叉電極印在投影膠片上，藉由待測物阻抗的量測，達到環境物質偵測的效果。指叉電極為由二組形狀如同叉子的電極組、彼此相間組合而成（圖 1）。當施加交流電壓於電極二端時，每個電極間的空腔就好像有個小電容，不同待測溶液各有自己的介電係數，擁有不一樣的電容值 C_{cell} 。此外，電壓也會驅動溶液中的離子往電極二端移動，當待測物濃度改變或者種類不同時，就可以偵測到電阻 R_{sol} 的變化。電容和電阻可進一步合併成阻抗，且阻抗會隨著頻率而改變，描繪阻抗與頻率的關係圖即稱為「阻抗頻譜」。每個物質都各有其特殊的阻抗頻譜，若設計得當，就可以利用指叉電極得到的阻抗頻譜，分辨所偵測的溶液為何種物質，使得指叉電極成為一種可以靈敏於環境變化的偵測工具。

欲理解指叉電極的運作原理可先從等效電路開始認識，其電路圖如圖 6 [3-4][8-9]。

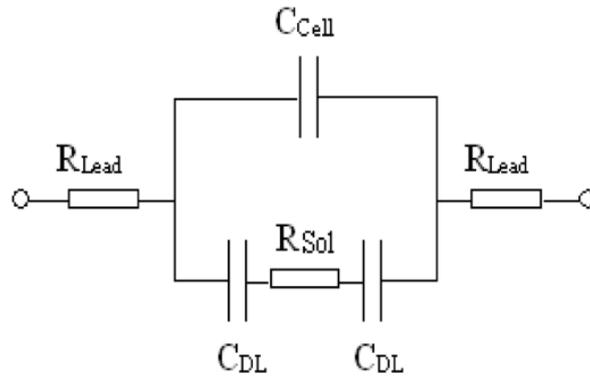


圖 6 指叉電極之等效電路圖。

交流電施加下，溶液分子偶極矩重新排列和移動是同時存在的，因此電容 C_{cell} 與電阻 R_{sol} 必須以並聯的方式來表達；圖 6 中的 C_{DL} 為溶液中的物質附著在電極表面上形成的電雙層而有的電容。電容 C_{cell} 由溶液的介電係數 $\epsilon_{r,sol}$ 決定，可以式(1)表示；電阻

Rsol 則受溶液導電常數決定，可以用式(2)表示，電極參數 Kcell 皆會影響 Ccell 與 Rsol 的變化。

$$R_{Sol} = \frac{K_{Cell}}{\sigma_{Sol}} \quad (1)$$

$$C_{Cell} = \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_{r,Sol}}{K_{Cell}} \quad (2)$$

Kcell 與電極的設計方式有關，主要由指叉數目 N、電極寬度 W、與電極間隙 S 決定，如式(3)。

$$K_{Cell} = \frac{2}{(N-1)L} \cdot \frac{K(k)}{K(\sqrt{1-k^2})}$$

$$K(k) = \int_0^1 \frac{1}{\sqrt{(1-t^2)(1-k^2t^2)}} dt \quad \text{and} \quad k = \cos\left(\frac{\pi}{2} \cdot \frac{W}{S+W}\right)$$
(3)

在並聯狀態下，整體電路的阻抗可以寫成式(4)。

$$Z(j\omega) = 2R_{Lead} + \frac{Z_1}{j \cdot \omega \cdot C_{Cell} \cdot Z_1 + 1}$$

$$Z_1 = R_{Sol} + \frac{2}{j \cdot \omega \cdot C_{DL}}$$
(4)

交流電為低頻率時，阻抗的大小可以用式(5)表達，

$$Z \approx \frac{2 + j\omega \cdot C_{DL} \cdot R_{Sol}}{j \cdot \omega \cdot C_{DL}}$$

$$F_{Low} \approx \frac{1}{\pi \cdot R_{Sol} \cdot C_{DL}}$$

(5)

其阻抗對頻率的模擬變化如圖 2 所示。由圖可知，阻抗會隨著頻率的增加而減少，在頻率超過低限頻率 F_{Low} (式(6))時而趨緩變得平滑，此時的阻抗約略會與 R_{sol} 相等。藉由阻抗圖譜中所得的 R_{sol} 和 F_{Low} ，可反推每個物質的導電參數。因此，利用導電參數與濃度關係的檢量線，可以成功回推 NaCl、酵母菌等待測物的濃度。所得的 C_{DL} 則非常敏感於物質與電極表面的作用，每種物質皆有其自己的 C_{DL} ，使得阻抗圖譜具有辨識不同純物質的功能。

圖 7 為印刷微電極晶片之阻抗頻譜模擬圖。此模擬所用之程式為利用 Python 根據式(1)~式(4)撰寫，並在 google colab 環境下執行。所用尺寸為本實驗之電極尺寸大小，待測溶液導電率設為 0.7s/m， $\epsilon_{r,sol}$ 設為 80， R_{LEAD} 為夾具之電阻，因遠小於溶液之電阻，故設為 0。本實驗所用的指叉電極 K_{cell} 可藉由模擬和式 3 得到為 33.1746 (8 指叉 0.3mm)。

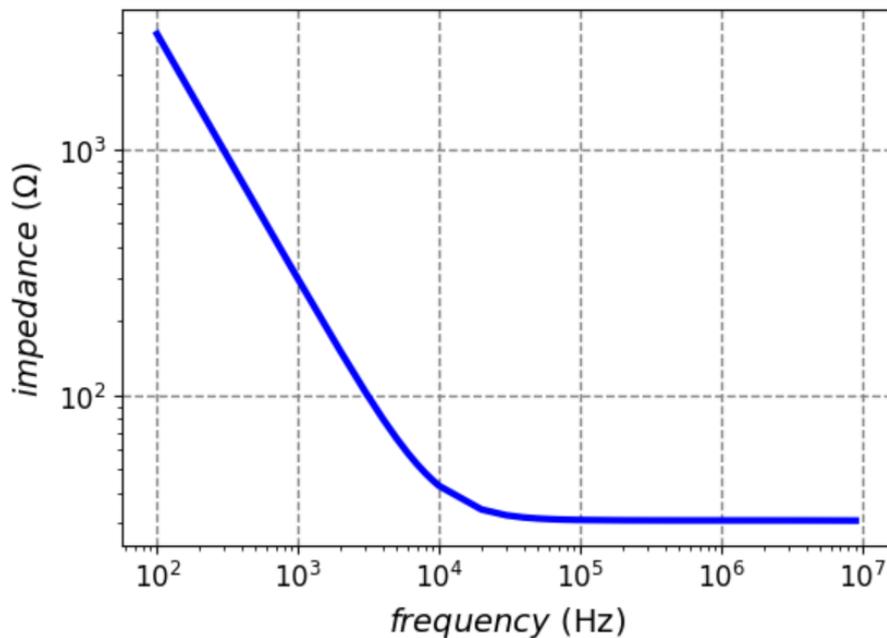


圖 7 阻抗頻譜模擬圖。

二、阻抗頻譜-葡萄糖

葡萄糖溶於水時，其分子是均勻分散在溶液裡的，不會形成膠體溶液，且分子不帶電，因此葡萄糖溶液感應不大到指叉電極二端電壓的變化，因此阻抗值不隨頻率而改變，12 指叉間隔 0.3mm 實驗結果如圖 8 所示，其餘指叉阻抗頻譜見附錄 1。

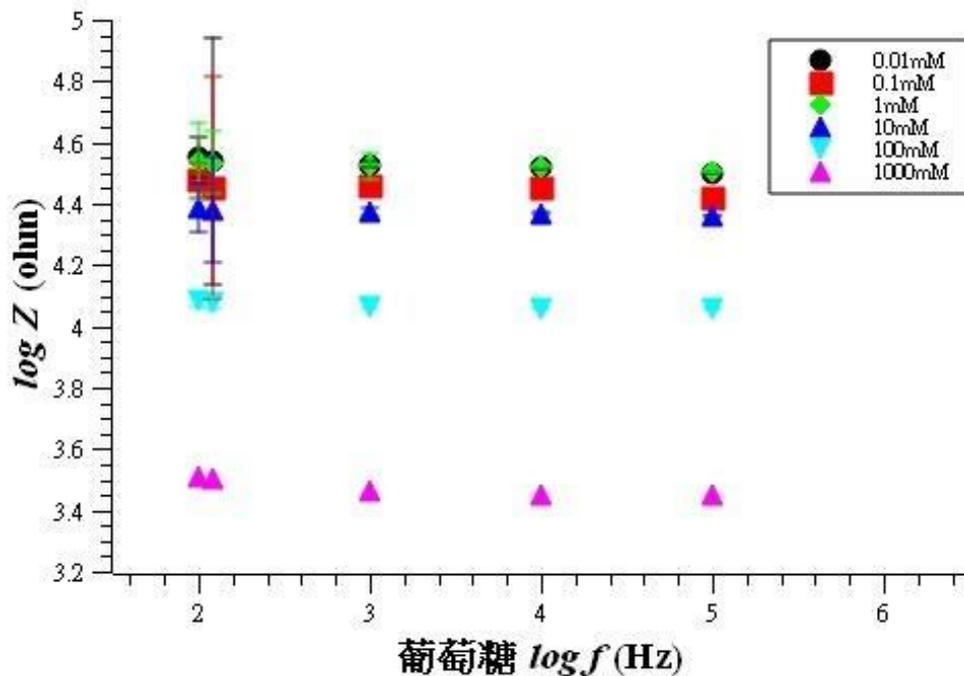


圖 8 印刷微電極晶片(指叉數目 12、指叉間隔 0.3mm)用於葡萄糖偵測之頻譜分析圖。因葡萄糖分子本身不帶電，故其阻抗不隨頻率而變。

三、阻抗頻譜- NaCl 水溶液

NaCl 在水中完全解離後，氯離子和鈉離子皆能有效感應電極二端的電壓變化，使阻抗隨著交流電頻率而改變，其實驗結果如 12 指叉間隔 0.3mm 圖 9 所示，其餘指叉阻抗頻譜見附錄 2。在阻抗頻譜中，可看到阻抗由陡峭變成趨緩的現象，發生轉折時的頻率被稱為低限頻率 F_{Low} 。本實驗的低限頻率大約發生在 $10^{3.5} \sim 10^{4.5}$ Hz 之間，與用 Python 所繪的模擬(圖 7)大致符合，但因本實驗所用的 LCR 電錶只有 5 個特定頻率可以選擇，若之後能用連續頻率掃過待測溶液，可以較精準得知低限頻率 F_{Low} 的實際數值。

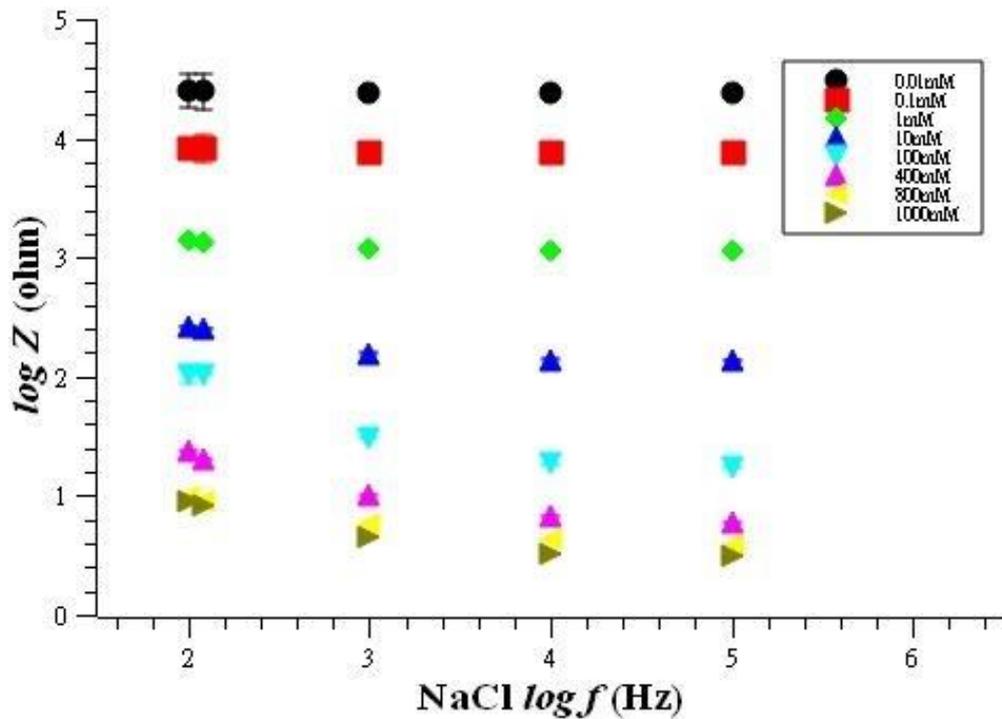


圖 9 印刷微電極晶片用於 NaCl 水溶液偵測之頻譜分析圖(指叉數目 12、指叉間隔 0.3mm)，縱軸與橫軸皆取對數。低限頻率約為 $10^{3.5} \sim 10^{4.5}$ Hz 之間。阻抗在 100kHz 時，因圖形變得平滑，此時阻抗 Z 接近 NaCl 溶液的 Rsol。

當頻率超過低限頻率 F_{low} 時，阻抗會有一段變得平緩的區域，此時電極表面上電雙層所形成的電容開始穩定下來，阻抗受電容影響因素變小，開始能夠真實反映出溶液的電阻 Rsol。利用此特性，本實驗定 100kHz 所測得的阻抗為溶液的電阻 Rsol，利用式(1)回推不同 NaCl 溶液的導電率 σ ，並製作導電率隨濃度的變化圖。因 1M NaCl 水溶液的導電度為 3.74209 S/m [5]，因此不同規格的指叉電極所得的導電率，都以前述數值作為基準來校正。本實驗由圖 10 可發現，氯化鈉水溶液導電率在寬廣的線性範圍內皆跟濃度有正線性相關，成為印刷微電極晶片的檢量線。當指叉數為 12、指叉間隔為 0.3mm 時，氯化鈉水溶液檢量線 R^2 值為 0.9538、靈敏度為 5.206 ± 0.003 、98%信心區間之偵測極限為 1.89mM，凸顯出本印刷微電極晶片的實用性與可靠性。

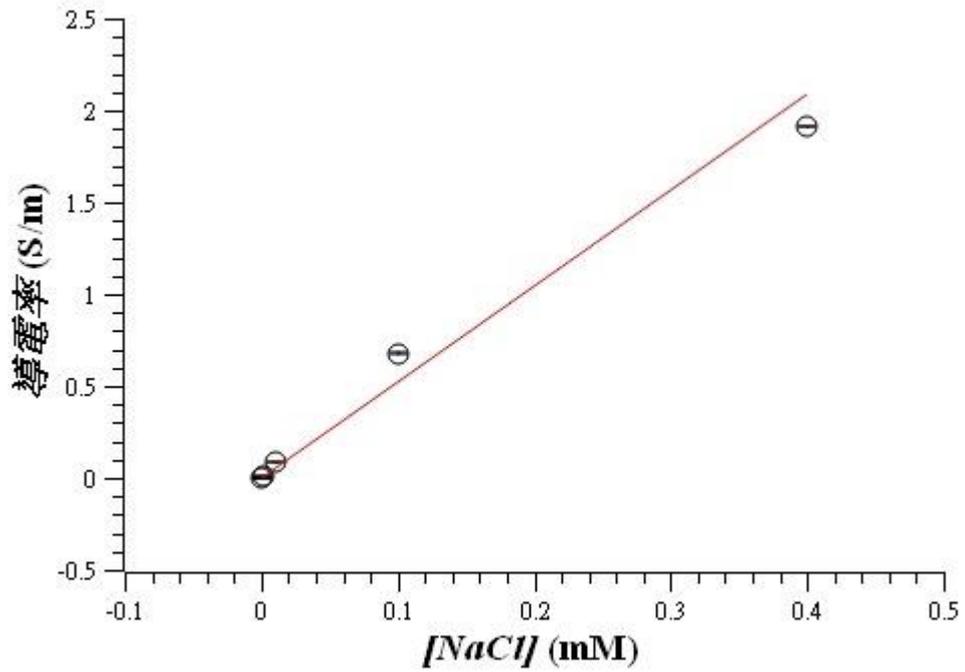


圖 10 印刷微電極晶片(指叉數目 12、指叉間隔 0.3mm)所得之 NaCl 水溶液之檢量線。

四、阻抗頻譜-醋酸水溶液

醋酸的阻抗頻譜如圖 11 所示(12 指叉、間隔 0.3mm)，其餘指叉阻抗頻譜見附錄 3。

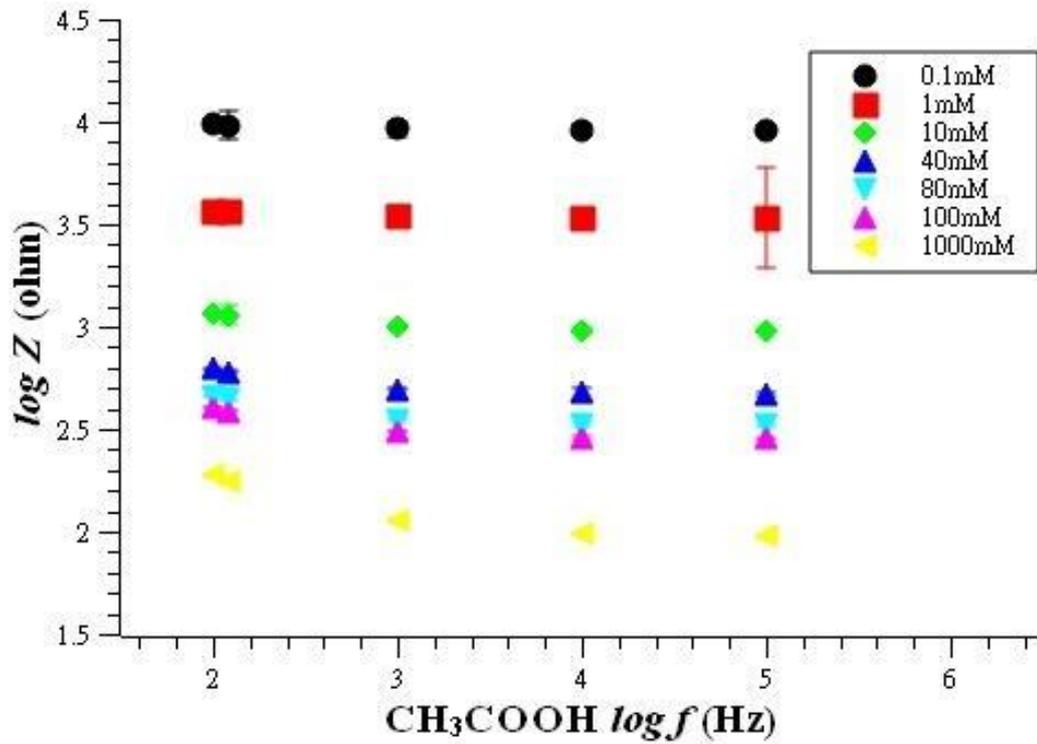


圖 11 印刷微電極晶片(12 指叉、間隔 0.3mm)用於醋酸水溶液偵測之頻譜分析圖。

得到阻抗頻譜後，與氯化鈉水溶液相似，定 100kHz 所測得的阻抗為溶液的電阻 R_{sol} ，可測量到醋酸在溫度 T 時的導電率 σ ，又因為醋酸為弱電解質，所得之導電率與濃度不會是線性相關。因此，若要理解醋酸濃度與導電度的關係、可以從醋酸的平衡常數來切入 [7]。

體積莫耳濃度為 C 時，解離百分率 α 隨溶液的稀釋而增加，單質子弱酸的平衡常數維持不變，其平衡常數 K_a 可寫成式(7)

$$K_a = \frac{C\alpha^2}{1-\alpha} \quad (7)$$

透過指叉電極可測量到醋酸在溫度 T 時的導電率 σ ，定義莫耳導電率 λ_c 如式(8)

$$\lambda_c = \sigma C \quad (8)$$

當醋酸無限稀釋時，可得一極限莫耳導電率 λ_0 ，與溫度的關係可寫成[6-7]

$$\lambda_0 = 0.0587T + 2.444 \quad (9)$$

λ_0 與解離度 α 的關係可寫成下式

$$\lambda_0 = \sigma C \quad (10)$$

將式(10)代入式(7)可得到醋酸溶液莫耳導電率與 K_a 值的關係式(11)

$$\frac{1}{\lambda_c} = \frac{1}{\lambda_0} + \frac{C\lambda_c}{K_a\lambda_0^2} \quad (11)$$

接著，用莫耳導電率 $1/\lambda_c$ 對 $C\lambda_c$ 作圖，可得一線性關係圖如圖 12 (指叉數目為 12、指叉間距為 0.3mm)，將線性擬合後所得的斜率用式(11)反推可得醋酸解離的平衡常數 K_a 。本實驗所得之 K_a 約為 $2 \times 10^{-5} \sim 3 \times 10^{-5}$ 之間(表 2)，不大隨指叉規格而有規律的變動，與熟悉之醋酸平衡常數 1.8×10^{-5} 數量級相當，雖然實驗值與理論值略有不同，但相信能因著實驗設計的精進而得到更好的結果。

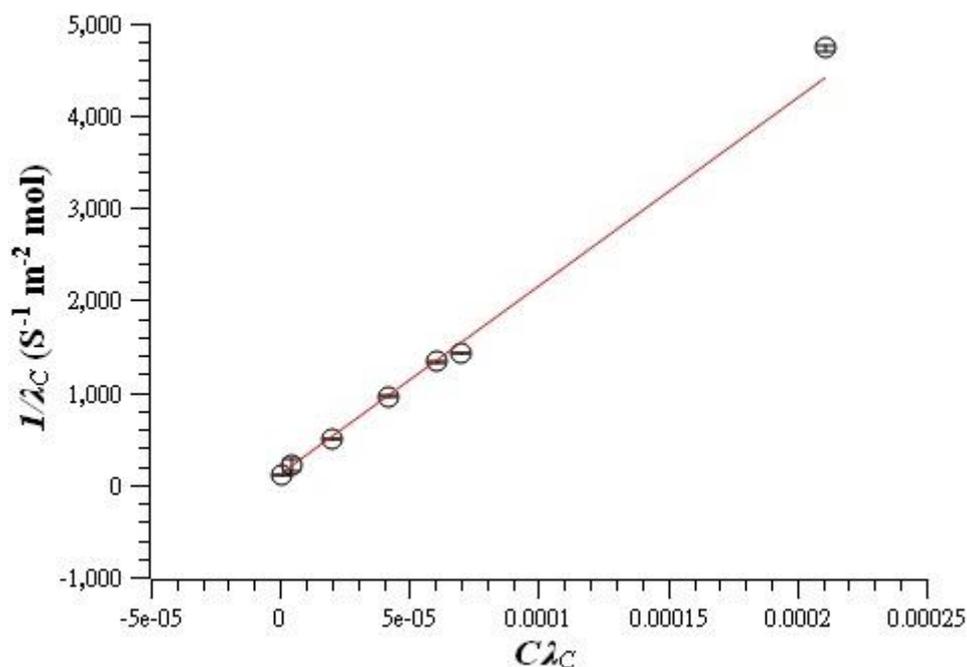


圖 12 印刷微電極晶片(指叉數目 12、間隔 0.3mm)所得之醋酸的 $1/\lambda c$ 對 $C\lambda c$ 的關係圖。

表 2 不同規格指叉量測量測醋酸 K_a 。

指叉規格	斜率	醋酸 K_a
8 指叉、間隔 0.1mm	$1.930 \times 10^7 \pm 2 \times 10^4$ ($R^2 : 0.9968$)	2.93×10^{-5}
8 指叉、間隔 0.3mm	$1.600 \times 10^7 \pm 7 \times 10^4$ ($R^2 : 0.9990$)	3.52×10^{-5}
12 指叉、間隔 0.1mm	$1.710 \times 10^7 \pm 1 \times 10^4$ ($R^2 : 0.9988$)	3.31×10^{-5}
12 指叉、間隔 0.3mm	$2.040 \times 10^7 \pm 4 \times 10^4$ ($R^2 : 0.9981$)	2.77×10^{-5}

五、阻抗頻譜-味精

味精為強電解質，因此在阻抗頻譜中可看到明顯的趨勢變化，且同樣在頻率變大時，阻抗趨勢變得平滑，實驗結果如圖 13 所示(指叉數 12、指叉間隔 0.3mm)，其餘指叉阻抗頻譜見附錄 4。

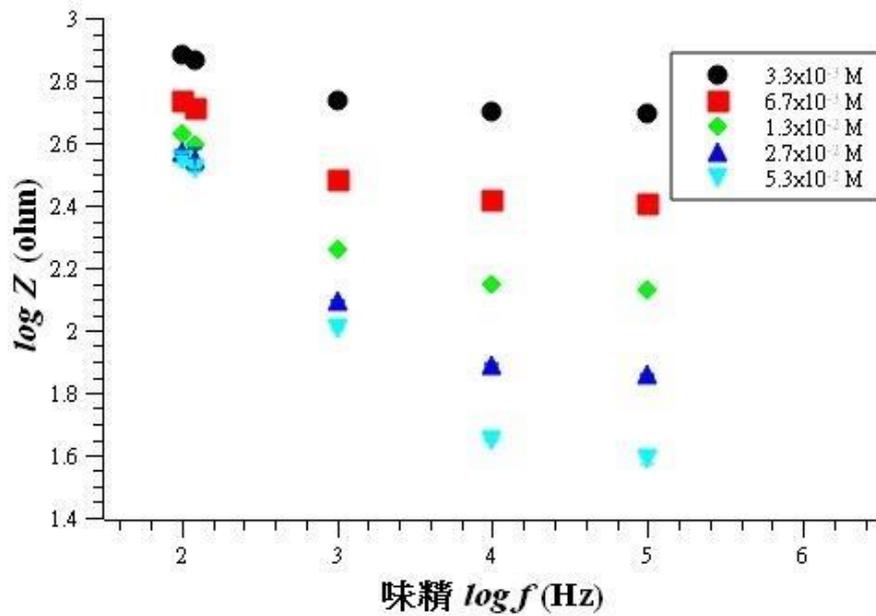


圖 13 印刷微電極晶片(指叉數目 12、間隔 0.3mm)用於味精水溶液偵測之頻譜分析圖。

得到阻抗頻譜後，與氯化鈉相似，定 100kHz 所測得的阻抗為味精溶液的電阻 R_{sol} ，利用式(1)回推不同濃度溶液的導電率 σ ，並製作導電率隨濃度的變化圖。由圖 14 可發現，味精水溶液導電率在寬廣的線性範圍內皆跟濃度有正線性相關，成為印刷微電極晶片的檢量線。味精水溶液檢量線 R^2 值為 0.9961、靈敏度為 $6.26 \times 10^3 \pm 1 \times 10^1$ 、98% 信心區間之偵測極限為 6.41mM，表現出本印刷微電極晶片的可靠性佳之外，更可從氯化鈉等微小物質、擴充到大分子味精的偵測，證明指叉電極在偵測領域上的應用廣度極大。

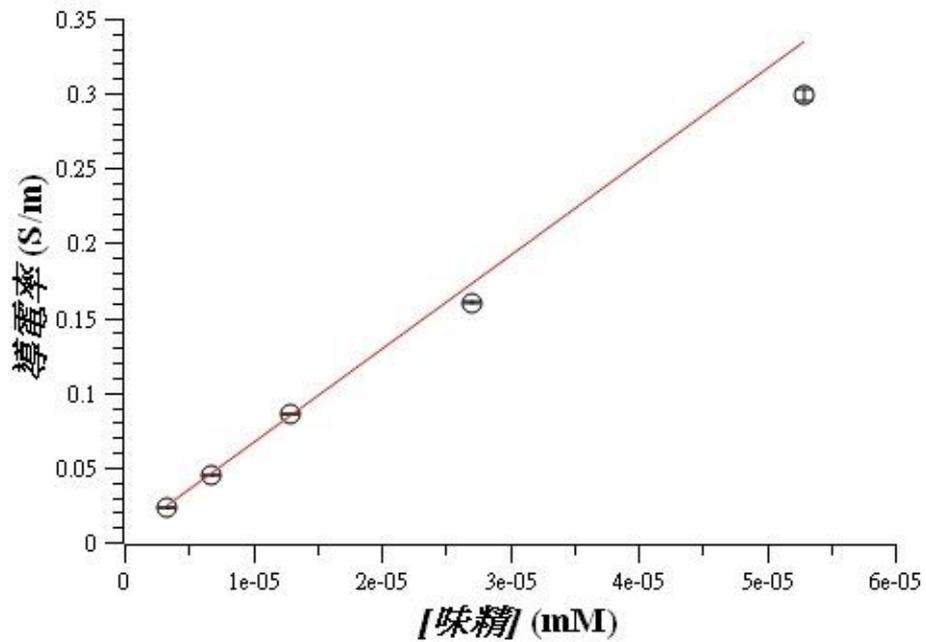


圖 14 印刷微電極晶片(指叉數目 12、間隔 0.3mm)用於味精水溶液偵測之檢量線。

六、阻抗頻譜-酵母菌

酵母菌溶在水裡後，因其表面帶有電荷的特性，使酵母菌能感應電極二端電壓的變化，而觀察到阻抗隨著頻率轉變。其阻抗頻譜分析方法與 NaCl 溶液相同，藉由阻抗的變化而得到酵母菌溶液的 R_{sol} 、和導電率 σ ，阻抗頻譜如圖 15 所示。

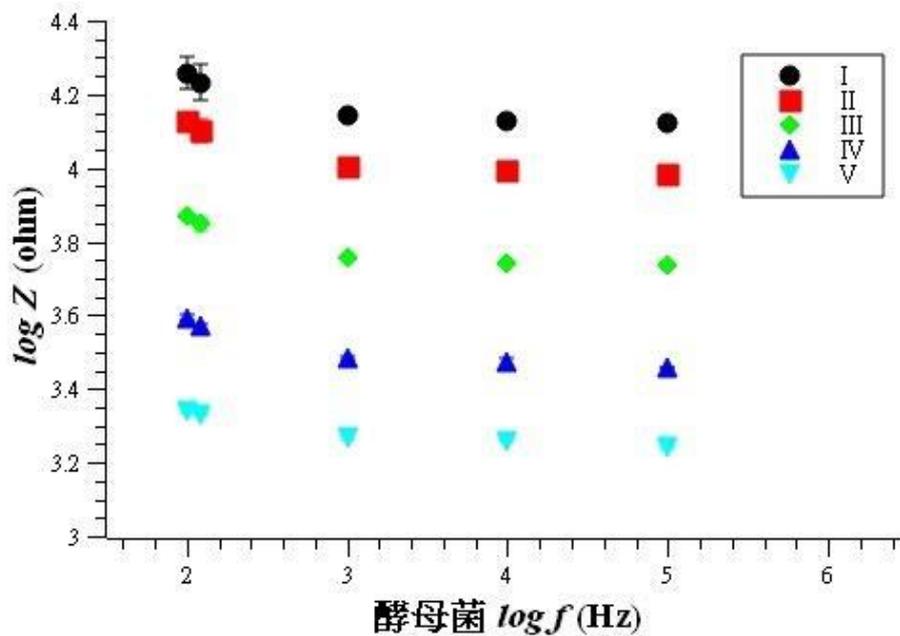


圖 15 印刷微電極晶片(指叉數目 12、間隔 0.3mm)用於酵母菌水溶液偵測之頻譜分析圖。

與氯化鈉相似，定 100kHz 所測得的阻抗為酵母菌溶液的電阻 R_{sol} ，利用式(1)回推不同濃度溶液的導電率 σ ，並製作導電率隨濃度的變化圖。由圖 16 可發現，酵母菌水溶液導電率與濃度有正線性相關，成為印刷微電極晶片的檢量線。酵母菌水溶液檢量線 R^2 值為 0.9681、靈敏度為 $5.51 \times 10^{-6} \pm 3 \times 10^{-8}$ 、98% 信心區間之偵測極限為 $0.019(1/\text{mm}^2)$ ，表現出本印刷微電極晶片的可靠性佳之外，更可從氯化鈉、味精等電解質，擴充到生物分子的偵測，證明指叉電極在偵測領域上的應用廣度極大，連細胞的數量都可以得知。又指叉電極並沒有針對待測生物做任何的標定或染色，屬於非侵入性的方法，讓實驗可以在真實的環境下進行，相信在往後各樣的生物檢測中將更能廣泛應用。

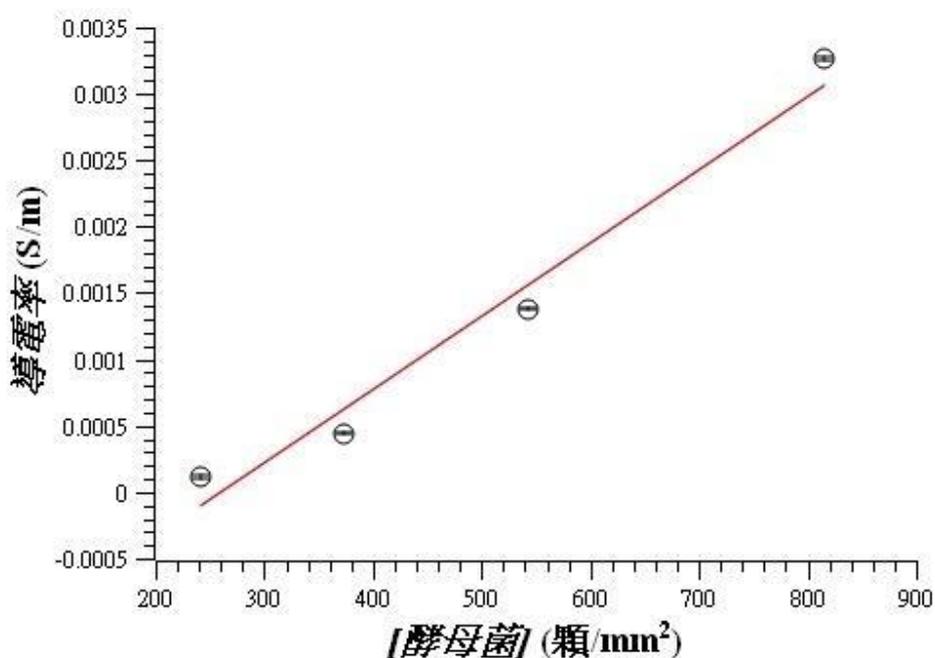


圖 16 印刷微電極晶片(指叉數目 12、間隔 0.3mm)所得之酵母菌水溶液之檢量線。

七、不同規格指叉電極之差異

本實驗所用之指叉電極、依據指叉數目(8 根與 12 根)和指叉間距(0.1mm 與 0.3mm)不同，共有四種不同規格，如表 3 所示。當指叉數目提升、指叉間距變小時，可看到氯化鈉水溶液的檢量線斜率由 2.988 上升至 6.343，約 100%之多，代表指叉電極對溶液感測的靈敏度增加，而偵測極限則沒有因為指叉電極規格不同而有明顯的趨勢。

表 3 不同規格指叉量測溶液的 R^2 、靈敏度、偵測極限。

指叉規格	溶液	R^2	靈敏度	偵測極限
8 指叉 指叉間隔 0.1mm	氯化鈉	0.9904	5.633 ± 0.002	1.14 mM
	味精	0.9973	$6.30 \times 10^3 \pm 2 \times 10^1$	12.7 mM
	酵母菌	0.9958	$3.08 \times 10^{-6} \pm 1 \times 10^{-8}$	0.0125 (1/mm ²)
8 指叉 指叉間隔 0.3mm	氯化鈉	0.9999	$2.988 \pm 2 \times 10^{-5}$	0.025 mM
	味精	0.9824	$8.51 \times 10^3 \pm 2 \times 10^1$	7.47 mM
	酵母菌	0.8984	$1.486 \times 10^{-3} \pm 5 \times 10^{-6}$	0.0122 (1/mm ²)
12 指叉 指叉間隔 0.1mm	氯化鈉	0.9976	6.343 ± 0.001	0.582 mM
	味精	0.9971	$7.36 \times 10^3 \pm 1 \times 10^1$	6.06 mM
	酵母菌	0.8831	$3.97 \times 10^{-6} \pm 2 \times 10^{-8}$	0.0142 (1/mm ²)
12 指叉 指叉間隔 0.3mm	氯化鈉	0.9538	5.206 ± 0.003	1.89 mM
	味精	0.9961	$6.26 \times 10^3 \pm 1 \times 10^1$	6.41 mM
	酵母菌	0.9681	$5.51 \times 10^{-6} \pm 3 \times 10^{-8}$	0.019 (1/mm ²)

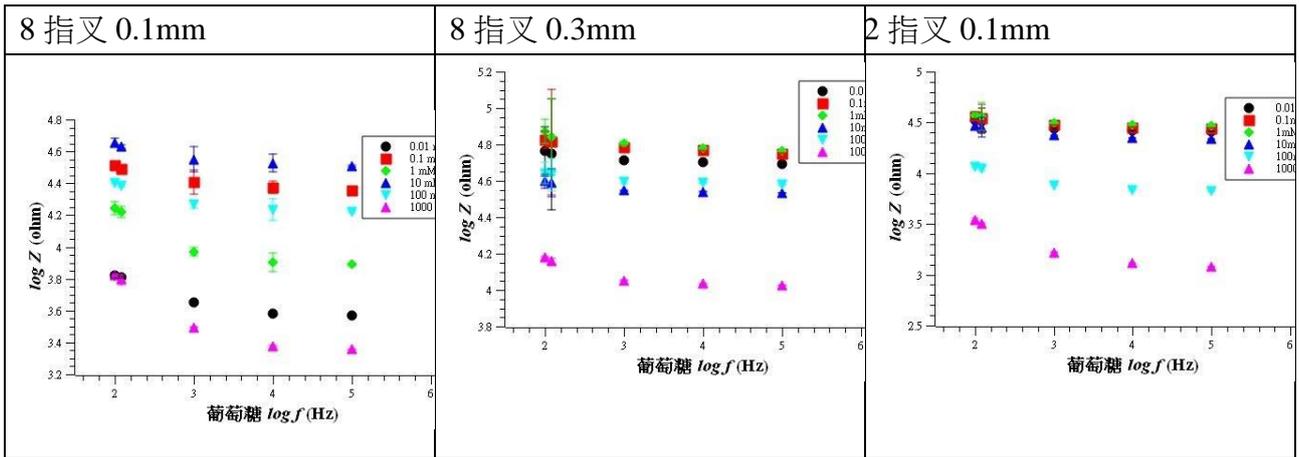
陸、結論與未來展望

- 一、本實驗成功利用網版印刷發展出可偵測環境物質的指叉電極，不只對強電解質氯化鈉水溶液成功得到 R^2 值為 0.95~0.99 之檢量線，更能夠偵測像酵母菌這種生物溶液之細胞數量，得一 R^2 值為 0.88~0.99 之檢量線。根據我們的實驗，只要利用阻抗頻譜分析，即可推算出未知酵母菌溶液的菌含量有多少，不必用顯微鏡觀測，只要花數分鐘即可以估算菌物數量，能夠節省不少時間。
- 二、以印刷方式製作的指叉電極，不必要用到化學蝕刻，且能夠快速複製印出大量的電極晶片，從網版架設開始、至銀膠塗佈、到最後加熱固化完成，所花費之時間不到 2 小時，其效率遠勝過化學蝕刻繁複的手段，且對環境傷害低，為未來製作生物晶片提供有利之可能方向。
- 三、透過增加指叉電極指叉插數成功增加靈敏度，其中以 12 指叉間隔 0.1mm 的靈敏度最高，較適合用來做生物檢測使用。
- 四、希望之後能嘗試在不同溫度下測量菌物濃度，也可以試多種的菌物或微生物，確認電極是否可以運用在所有食品檢測當中。

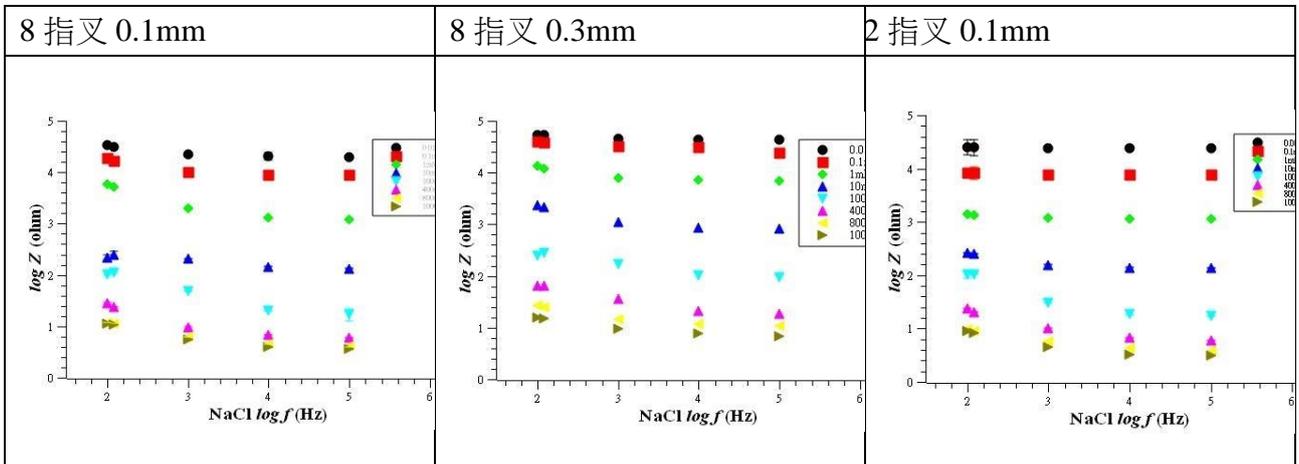
柒、參考資料及附錄

- [1] I. Tubía *et. al* (2018) Beverage spoilage yeast detection methods and control technologies: A review of *Brettanomyces*. *International Journal of Food Microbiology*, **2018**, 283, 65–76.
- [2] I. Tubía *et. al* (2018) Antibody biosensors for spoilage yeast detection based on impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, 102, 432–438.
- [3] Björn Timmer *et. al* (2002) 'Optimization of an electrolyte conductivity detector for measuring low ion concentrations. ' *Lab chip*. **2002**, 2, 121..
- [4] M. Ibrahim *et. al* (2013) 'Geometric parameters optimization of planar interdigitated electrodes for bioimpedance spectroscopy. ' *J. Electr. Bioimp.* **2013**, 4, 13.
- [5] H. Golnabi *et. al* (2009) 'Investigation of electrical conductivity of different water liquids and electrolyte solutions. ' *ResearchGate* **2009**, 3, 27.
- [6] 張松涵、蔡博宇、王彥慎、葉育睿。利用導電度求醋酸水溶液的解離常數研究。
<https://www.shs.edu.tw/works/essay/2014/09/2014092511210377.pdf>
- [7] Ling Xiaohong, Liu Chengzhi. (2006). An Approach to Limiting Molal Conductivity of Acetic Acid Solution --- Linear Regression Analysis. *Journal of Capital Normal University (Natural Science Edition)*., 27(1), pp 55 – 58.
- [8] 侯心宇，李明哲，黃韶顏，洪小芳，陳國維，呂旭峰，周沛宜，魏蜀珍(2019)'檢驗及品保雜誌 2019;8:146~151 電阻'桃園:治平高中教材'取自
http://www.sphs.hc.edu.tw/ischool/public/resource_view/open.php?file=de55020a445535c799aa2ed8df0d2d36.pdf
- [9] 鄭力(102)以二氧化錳參雜碳奈米纖維作為電雙層電容器之電極材料'高雄:國立中山大學材料與光電科學學系
- [10] 林轟蔚(2013)'多孔矽橫向感測器之研製及其電漿改質之研究(碩士論文)'臺北：中國文化大學工學院化學工程與材料工程學系.

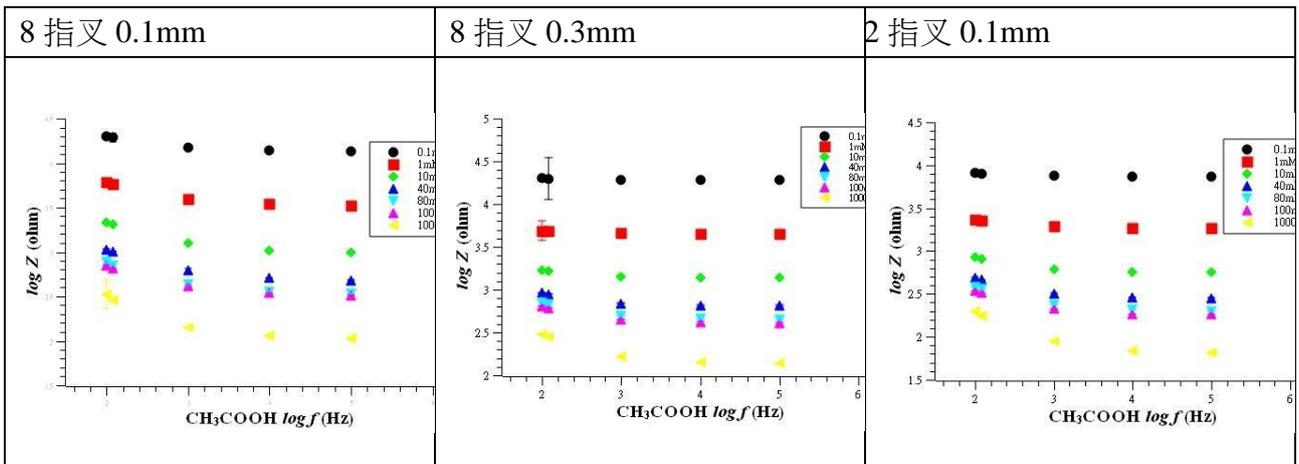
附錄 1



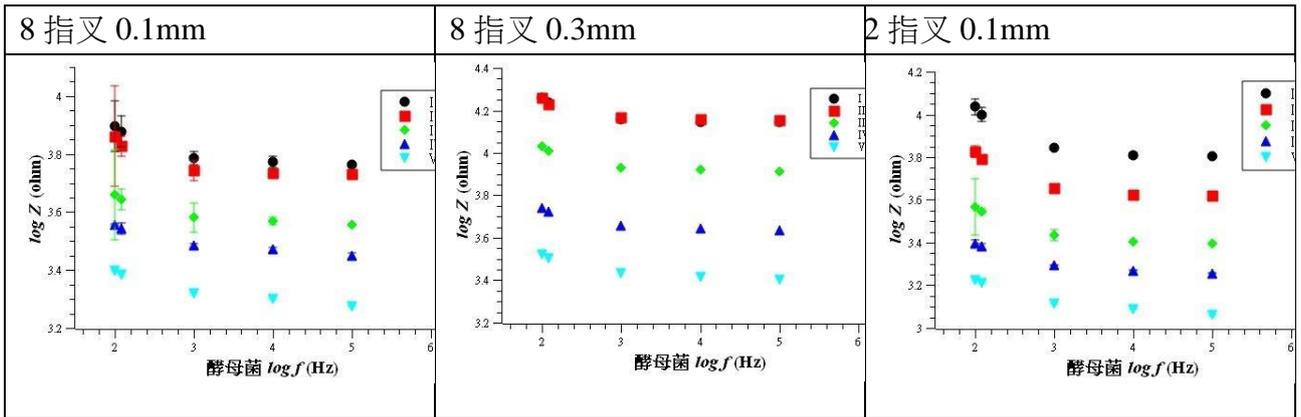
附錄 2



附錄 3



附錄 4



【評語】 052404

本作品利用網版印刷製作指叉電極，藉 LCR 掌上型電錶測量生物溶液中氯化鈉、味精、酵母菌的阻抗頻譜和檢量線，作為生物快篩檢測工具。本作品延伸自第 59 屆科展作品可饒式指叉電極的製備與應用，改變以網版印刷方式製作指叉電極，測量溶液亦不同。本作品的亮點之一是利用網版印刷製作出指叉電極，利用許多正負在狹小空間中交錯排列的特性，可提高其靈敏度。作者使用所發展電極並逐步由簡單的食鹽水葡萄糖最後也成功得到生物酵母菌溶液的阻抗頻譜和檢量線數。本作品共製作 4 種指叉電極，指叉數(8 或 12)與指叉間隔(0.1 或 0.3 mm)，結論三認為增加指叉數增加靈敏度，惟由表 3 對量測不同溶液的靈敏度與偵測極限有不同的影響，宜進一步研究。

整體而言，本研究以生物阻抗法，快速量測酵母菌種的濃度，研究目標明確，實驗規劃與分析亦屬完整，惟實驗的穩定性宜再強化。

壹、摘要

本實驗利用網版印刷做出四種不同規格的銀膠晶片感應溶液的阻抗及導電率，用掌上型LCR錶測量不同濃度的強電解質NaCl（食鹽水） 確認晶片能有效的使用，再測量弱電解質醋酸，最後測量味精和酵母菌，成功得到酵母菌的阻抗頻譜和檢量線；四種不同規格的指叉電極對偵測極限沒有顯著的差異。指叉數目為 8、指叉間隔為 0.1 mm 的指叉電極，其對酵母菌溶液的檢量線 R^2 值為 0.9810，靈敏度為 $8.0 \times 10^{-1} \pm 5.5 \times 10^{-2}$ ，在 95% 信心區間下之偵測極限為 381.1 (顆/mm²)。本品片導電率量測範圍可橫跨三個級數，故從電解質到生物細胞皆能檢測，為食品檢測提供一個新的方向。

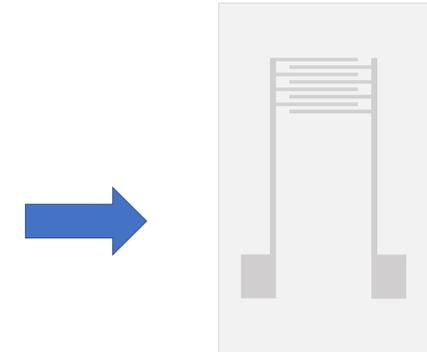
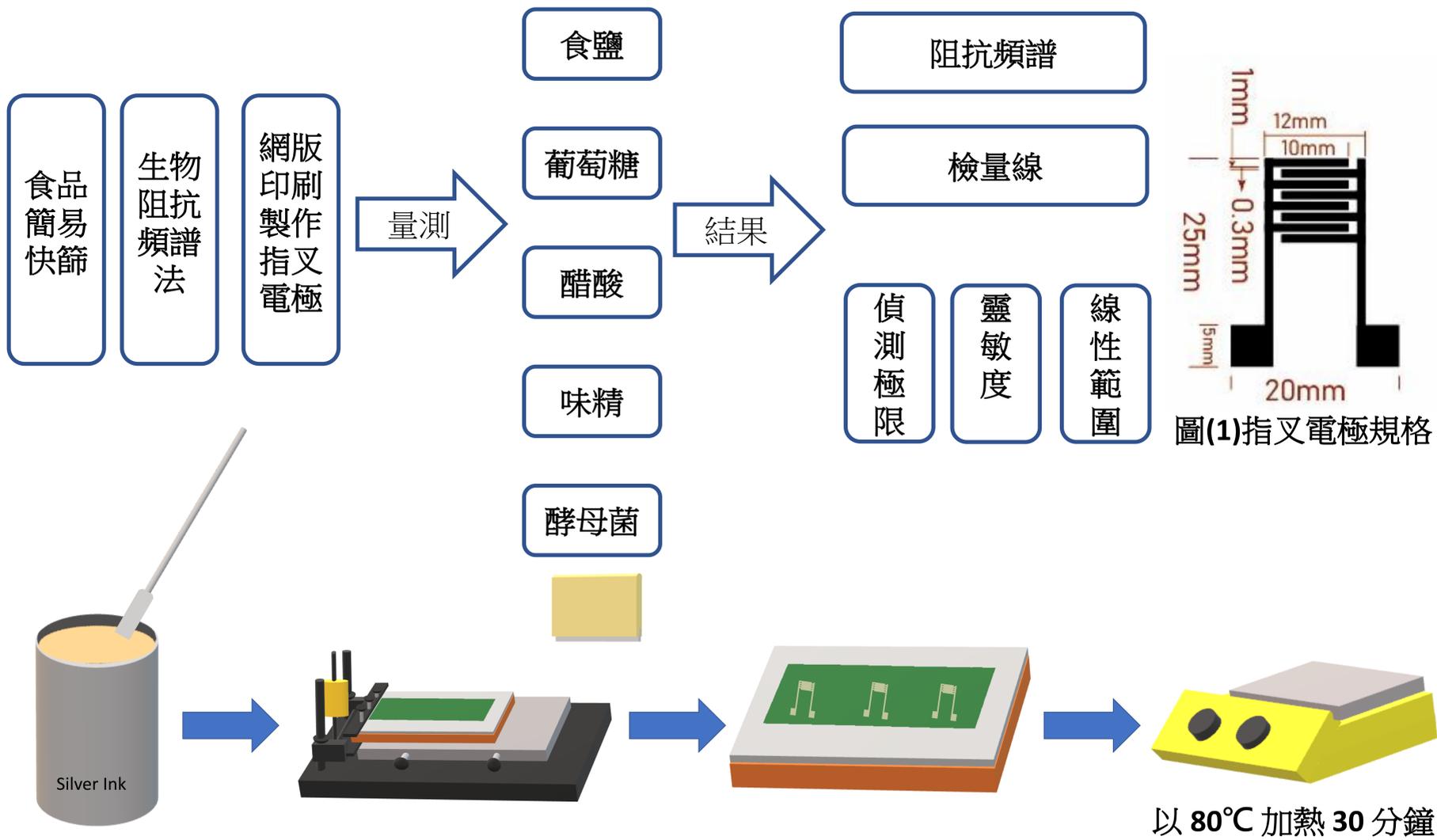
貳、研究動機

食品快篩中檢測酵母菌的方法繁複、耗時長，因此我們希望可在指叉電極中利用許多正負電極在狹小空間中交錯排列的特性增加靈敏度，除了能夠量測電解質溶液，還能測量微帶電的生物細胞，得到待測物的阻抗頻譜，好建立檢量線提供未知物快篩量測的基準。

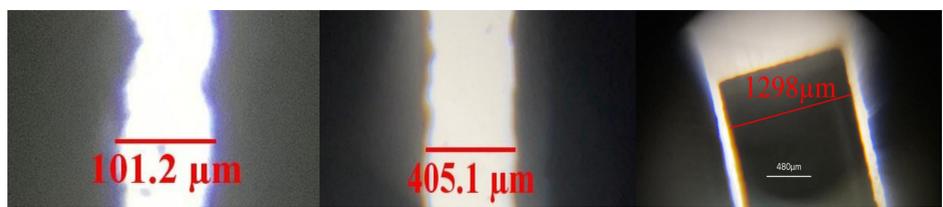
參、研究目的

- 一、利用網版印刷製作指叉電極。
- 二、量測不同濃度食鹽水之阻抗、確認印刷微電極可以有效使用。
- 三、量測不同濃度酵母菌之阻抗、建立酵母菌溶液之檢量線。
- 四、比較用不同規格的電極量測溶液差異。

肆、研究架構

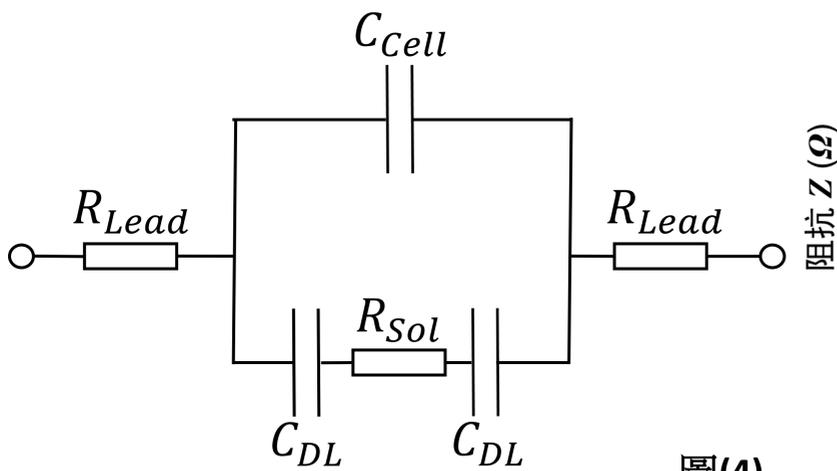


圖(2)印刷指叉電極流程



圖(3)顯微鏡下指叉間距(0.1 mm、0.3 mm)與指叉寬度。

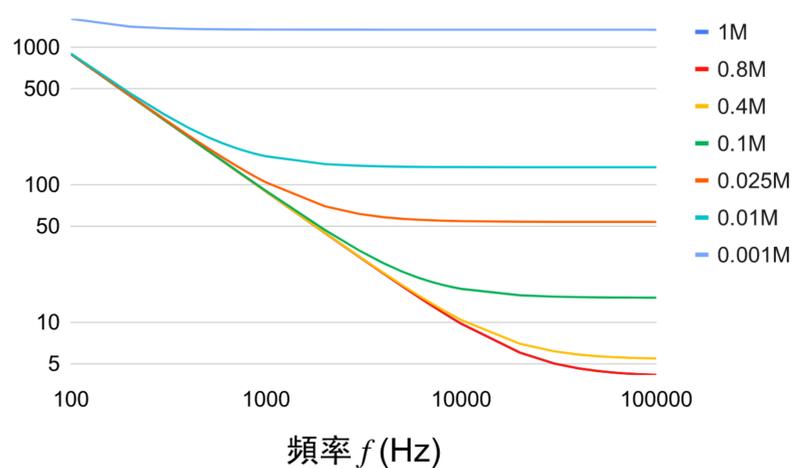
伍、研究原理



圖(4)

$$R_{Sol} = \frac{K_{Cell}}{\sigma_{Sol}} \quad \text{式(1)}$$

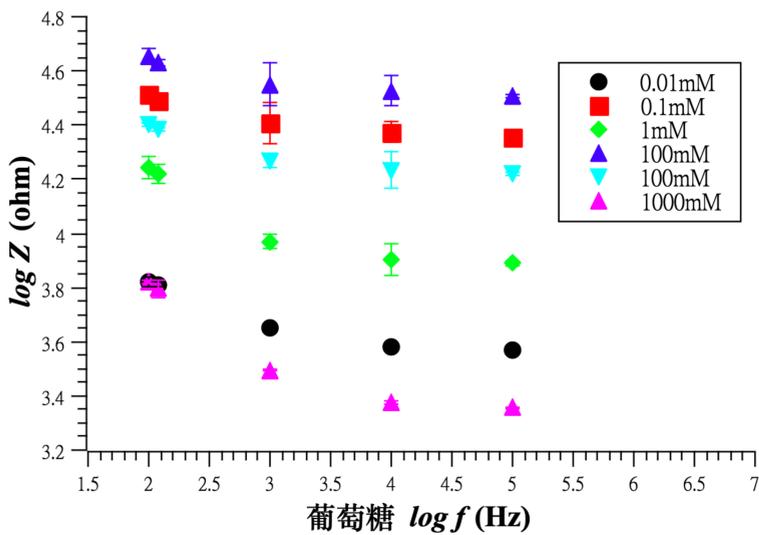
$$Z(j\omega) = 2R_{Lead} + \frac{Z_1}{j \cdot \omega \cdot C_{Cell} \cdot Z_1 + 1} \quad \text{式(2)}$$



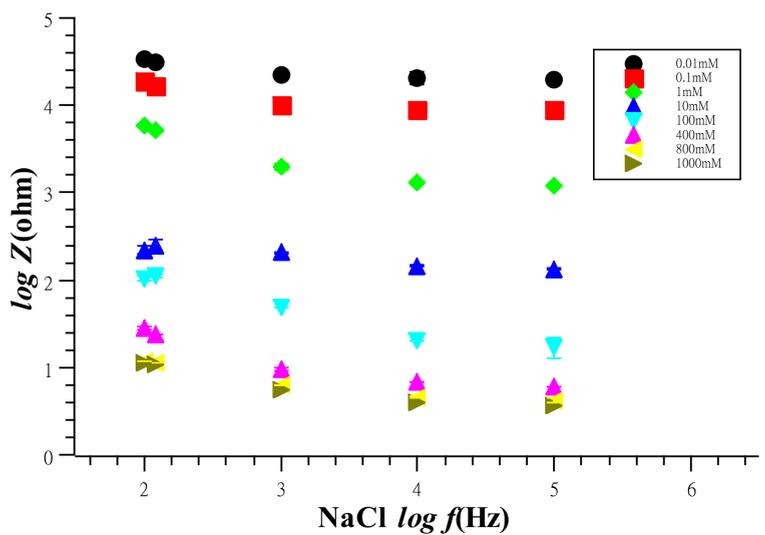
圖(5)阻抗頻譜模擬圖。

陸、研究結果和討論

葡萄糖 (非電解質)

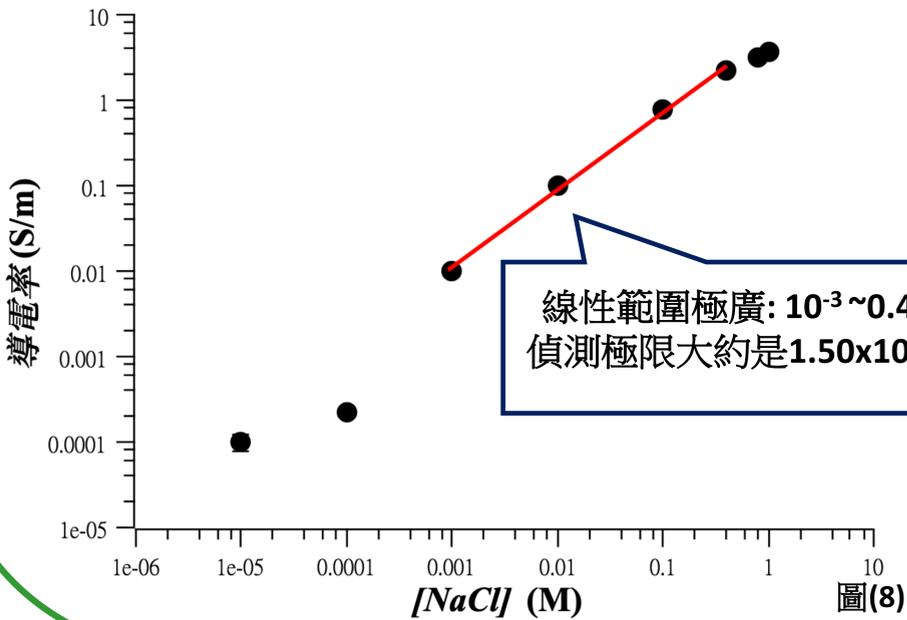


氯化鈉 (強電解質)



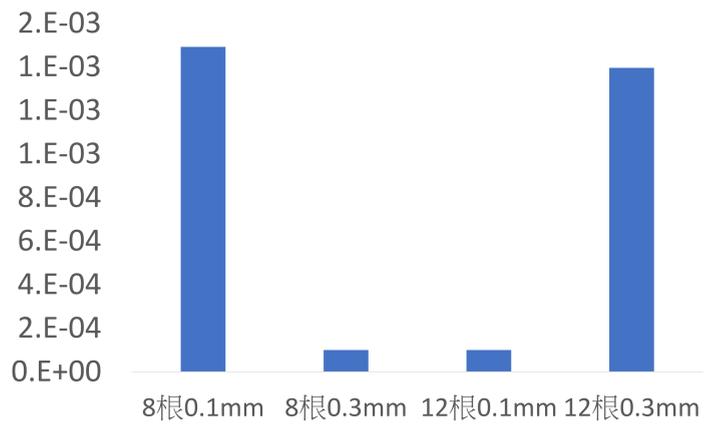
圖(6)

圖(7)



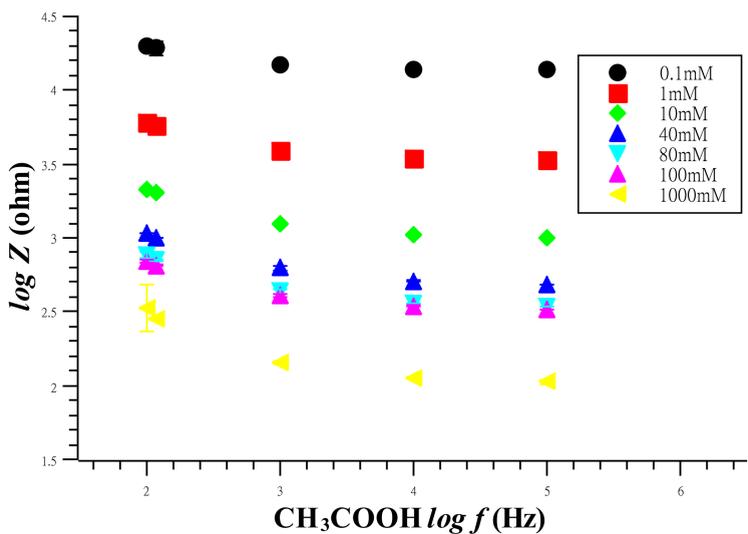
圖(8)

氯化鈉偵測極限(M)



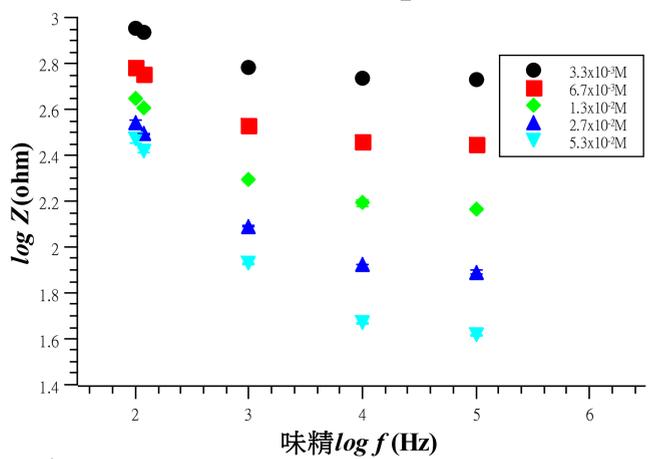
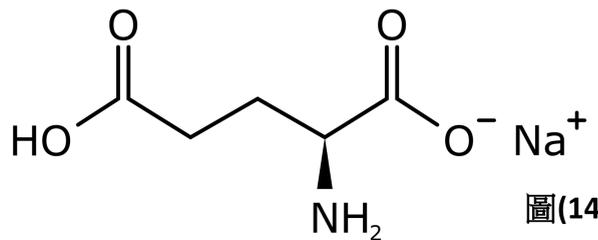
圖(9)各指叉下氯化鈉溶液的偵測極限。

醋酸 (弱酸)

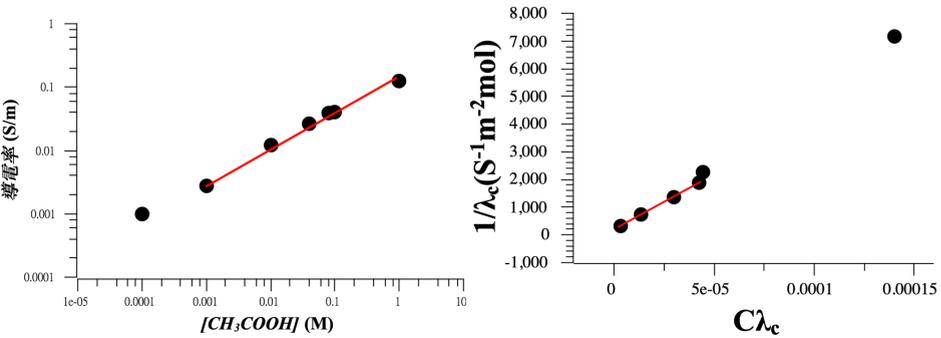


圖(10)

味精 (大分子)



圖(15)



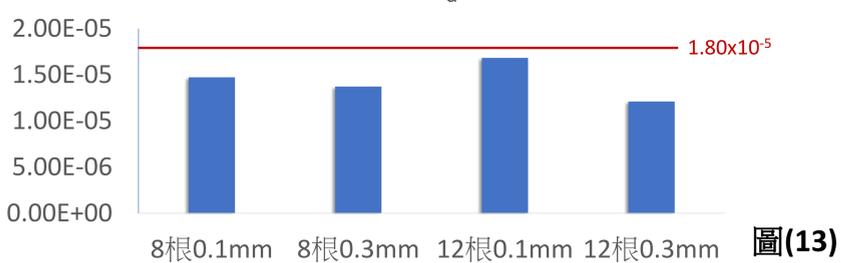
圖(11) 圖(12) $1/\lambda_c$ 和 $C\lambda_c$ 線性關係圖。

線性範圍極廣: $10^{-3} \sim 1M$
 偵測極限大約是 $1.02 \times 10^{-3} M$

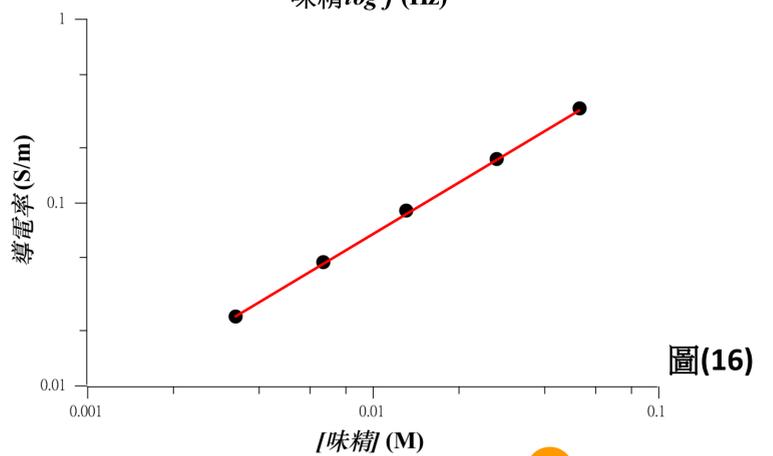
$$\frac{1}{\lambda_c} = \frac{1}{\lambda_0} + \frac{C\lambda_c}{K a \lambda_0^2} \quad \text{式(3)}$$

線性擬合後的斜率代入(式3)可求出 K_a ，將各指叉所得 K_a 列於圖(13)。

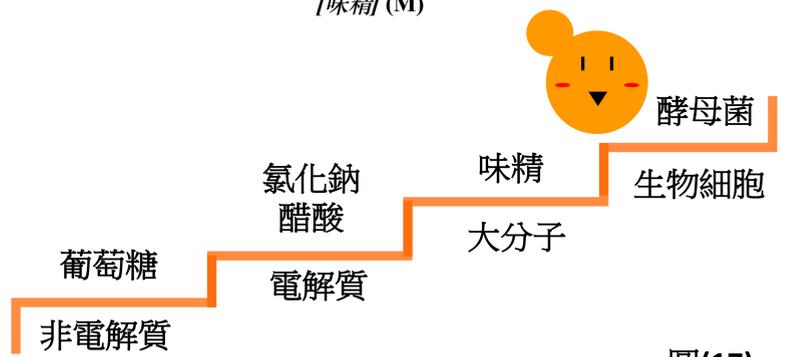
各指叉下醋酸 K_a 值。



圖(13)

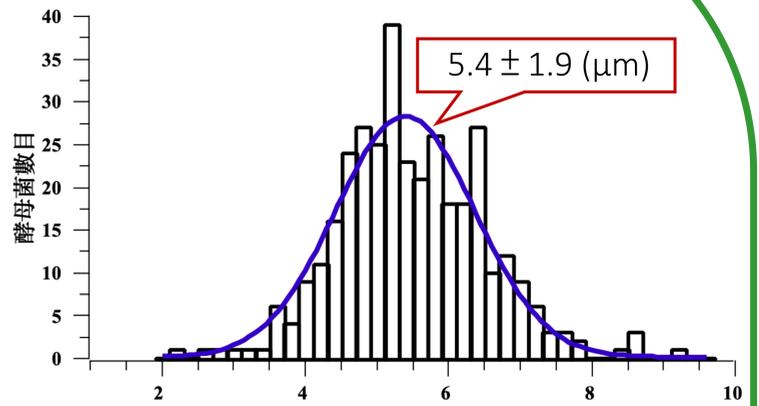
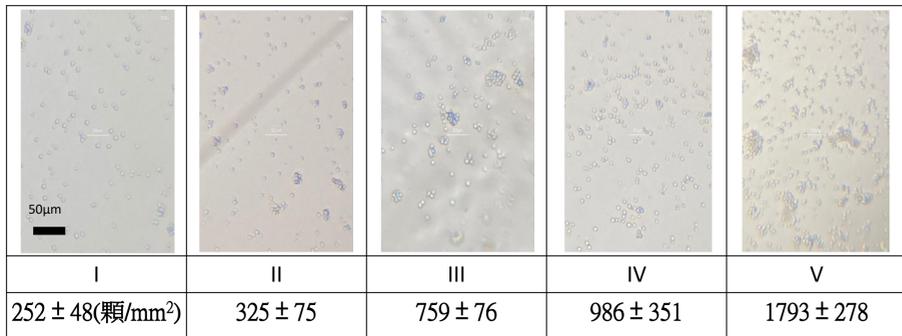


圖(16)



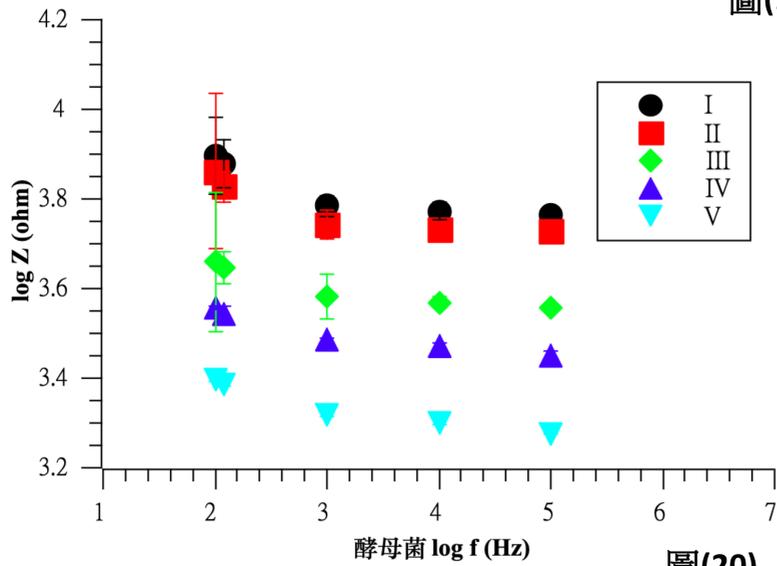
圖(17)

酵母菌(生物分子)

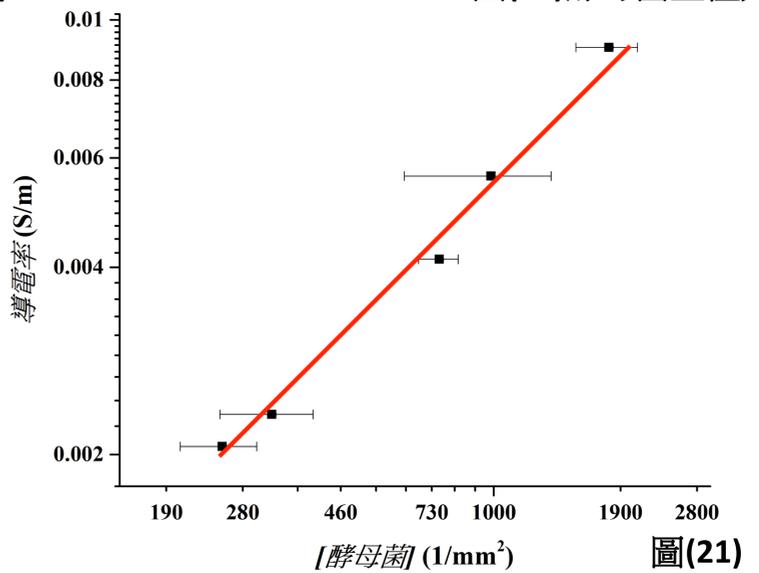


圖(18)

圖(19)酵母菌直徑分佈

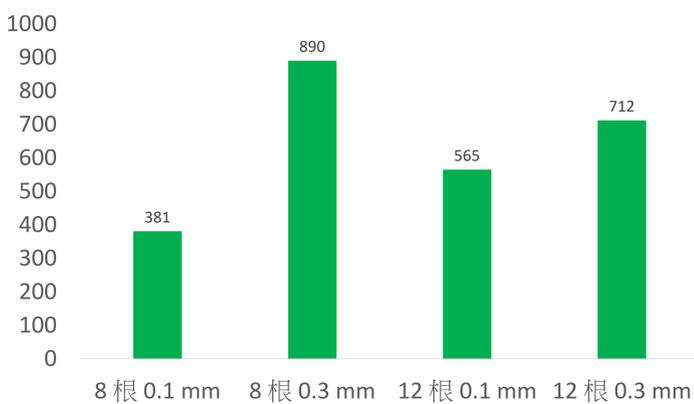


圖(20)

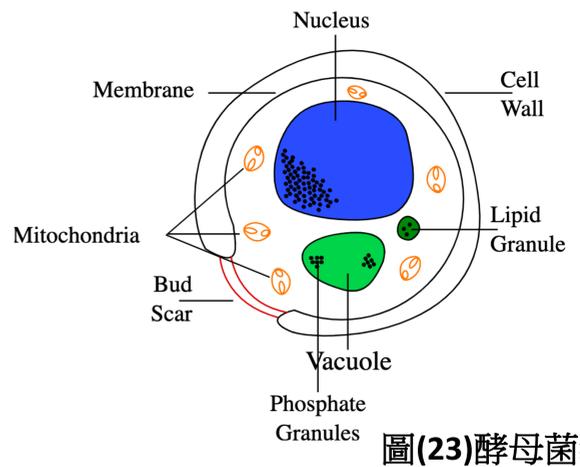


圖(21)

酵母菌偵測極限(顆/mm²)

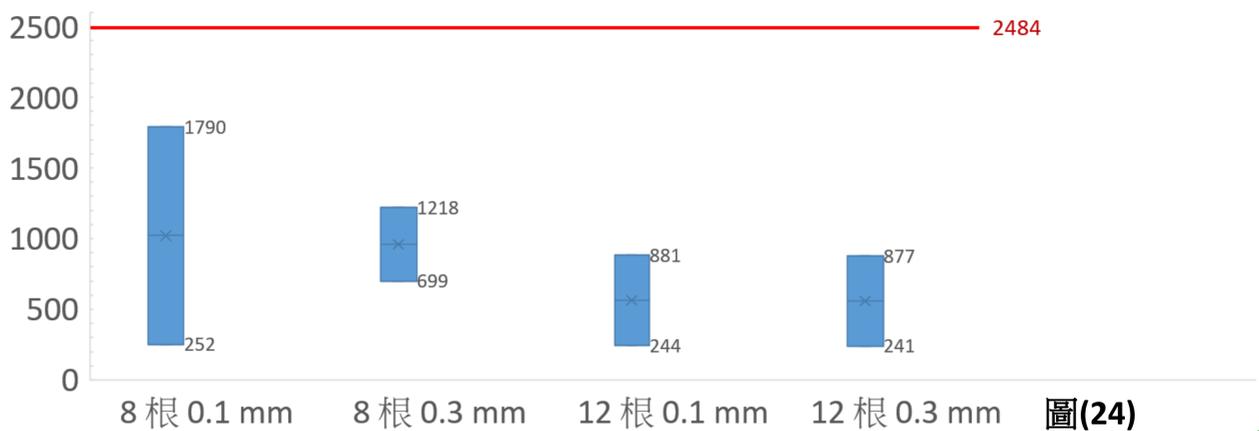


圖(22)



圖(23)酵母菌結構

酵母菌線性範圍(顆/mm²)



圖(24)

柒、結論與展望

- 一、本實驗成功利用網版印刷發展出可偵測環境物質的指叉電極，不只對強電解質氯化鈉水溶液成功得到 R^2 值為 0.997~0.999 之檢量線，更能夠偵測像酵母菌這種生物溶液之細胞數量，得一 R^2 值為 0.894~0.981 之檢量線，以及偵測極限 381 (顆/mm²)。
- 二、以印刷方式製作的指叉電極，不必要用到化學蝕刻，且能夠快速複製印出大量的電極晶片。
- 三、檢測時不必用顯微鏡觀測，只要利用阻抗頻譜分析，花幾分鐘就能估算出菌物數量，大大提升檢測效率。
- 四、希望之後能嘗試在不同溫度下測量菌物濃度，也可以試多種的菌物或微生物，確認電極是否可以運用在所有食品檢測當中。

捌、參考資料及其他

[1]I. Tubía et. al (2018) Beverage spoilage yeast detection methods and control technologies: A review of Brettanomyces. *International Journal of Food Microbiology*, **2018**, 283, 65–76

[2]I. Tubía et. al (2018) Antibody biosensors for spoilage yeast detection based on impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, 102, 432–438

[3]Björn Timmer et. al (2002) Optimization of an electrolyte conductivity detector for measuring low ion concentrations. *Lab chip*. **2002**, 2, 121.

[4] M. Ibrahim et. al (2013) Geometric parameters optimization of planar interdigitated electrodes for bioimpedance spectroscopy. *J. Electr. Bioimp.* **2013**, 4, 13.

[5] H. Golnabi et. al (2009) Investigation of electrical conductivity of different water liquids and electrolyte solutions. *Iranian Physical Journal*, **2009**, 3-2, 24-28.