

研究工作

L-赖氨酸脱羧酶电极的研制

吕东津 周润琦 陈石根

(复旦大学生物化学系,上海)

提 要

将赖氨酸脱羧酶直接固定于 CO₂ 电极的硅橡胶气透膜上制成的赖氨酸脱羧酶电极,性能如下:(1)酶电极对赖氨酸的线性响应浓度范围为 0.0025—0.1%;极差为 50—55mV; CV 值小于 5%;(2)连续使用寿命超过 30 天;(3)高度专一;(4)用于测定发酵过程赖氨酸浓度变化,结果与瓦氏呼吸仪的数据平行,相关性良好。

酶电极由选择性电极感应器和覆盖在它上面的酶膜组成,通过酶膜层的作用使底物转化为产物,然后借助感应器进行检测,因此具有专一、灵敏和简便等特点。六十年代 Updike 和 Hicks 首先提出了酶电极这一概念^[1],以后酶电极的研究发展十分迅速,并已广泛应用于临床、发酵、食品工业和环境保护等领域。

氨基酸发酵工业中,它们的产量或浓度变化通常是通过氨基酸脱羧酶的作用,例如赖氨酸通过赖氨酸脱羧酶的作用,产生 CO₂,然后再借助瓦氏呼吸仪加以检测^[2] 1976年, Tong 和 Rechnitz 报道将赖氨酸脱羧酶作成酶电极应用于赖氨酸测定^[3];以后 White 和 Guilbult 以及 Tran 等人分别改进了赖氨酸脱羧酶电极的制备方法,扩大了测定的线性范围,提高了酶电极的稳定性,并应用于不同样品的分析测定^[4,5]。

我们比较了不同的酶膜制备方法,最后选择交联法制成了赖氨酸脱羧酶电极。本文报道该电极的一些基本性能以及应用它测定赖氨酸发酵样品获得的结果。

daveris AS 1.1009 之丙酮粉末,由上海天厨味精厂惠予供给;磷酸吡哆醛为 Sigma 产品;其余试剂均为分析纯或化学纯级。

二、pH M84 离子计为丹麦雷度公司产品;502 型 CO₂ 气敏电极为江苏电分析仪器厂产品;3036X-Y 记录仪为日本 YEW 公司产品;时控输液装置由上海医疗器械研究所惠予提供。

三、酶膜制备:赖氨酸脱羧酶、牛血清白蛋白和戊二醛以适当之比例配制于 0.2mol/L 磷酸缓冲液 pH 6.2 中,然后涂布交联于硅橡胶气透膜,室温静置 35 分钟使其固化,制成的膜

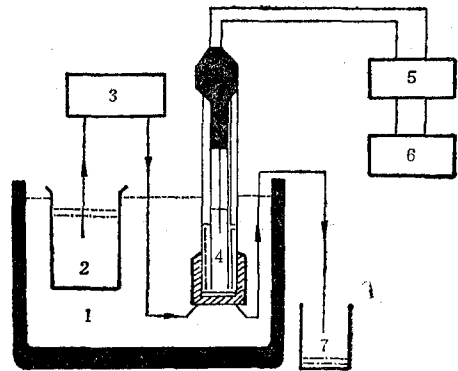


图 1 赖氨酸脱羧酶电极装置图

1.水浴; 2.样品溶液; 3.时控输液泵; 4. CO₂-酶电极; 5. pH 计; 6.记录仪; 7.废液

材 料 和 方 法

一、L-赖氨酸脱羧酶采用 Bacterium Ca-

在去离子水中浸泡 15 分钟,再转入 0.1mol/L 甘氨酸水溶液中浸泡 15 分钟,然后再在去离子水中浸泡 15 分钟,最后安装于 CO₂ 电极上,并保存于含有 1 × 10⁻⁴mol/L NaN₃、1 × 10⁻³mol/L 磷酸吡哆醛之 0.2mol/L 磷酸缓冲液 pH 6.2 中备用。

四、实验装置: 本文采用的实验装置如图 1 所示。其中酶促脱羧的反应介质为含有 1 × 10⁻³mol/L 磷酸吡哆醛之 0.2mol/L 磷酸缓冲液, pH 6.2; 反应温度为 37°C。

结果与讨论

一、酶电极的线性响应浓度范围

应用上述实验装置和反应条件,对不同浓度的赖氨酸溶液进行了检测。酶电极的电极响应与赖氨酸浓度的关系可以采用稳态法求得,即以电极电位变化达到稳态时总的电位变化表示,这种测定法一般需时 5 分钟以上;也可以通过动力学法求得,即以电极响应过程中线性区段的斜率表示,这种测定法需时约 2—3 分钟。图 2 为该酶电极的响应曲线。

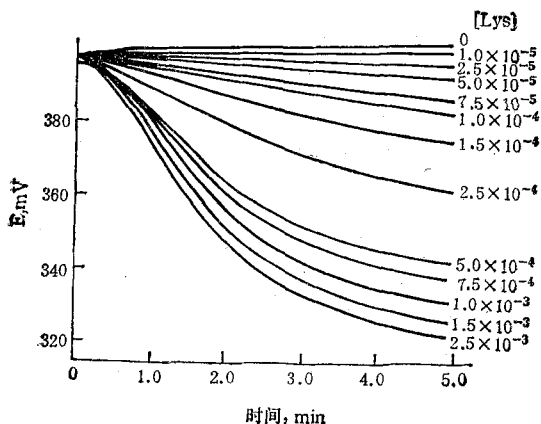


图 2 赖氨酸脱羧酶电极对不同浓度的赖氨酸的响应曲线

图 3 为稳态法测得的电极响应与赖氨酸浓度的相关曲线。

但是不管用哪种方法测定,结果都表明,该酶电极表现线性响应的赖氨酸浓度范围为 0.0025—0.10%;两种测定方法的线性相关系数

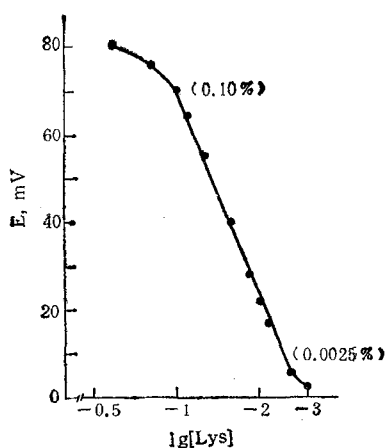


图 3 稳态法测得的电极响应与赖氨酸浓度相关曲线

分别为 0.999 (稳态法)和 0.994 (动力学法),就准确性而言,稳态法略优。稳态法测得的极差,即赖氨酸浓度改变 10 倍时,电极电位变化的差值为 50—55mV。

二、酶电极测定的波动系数 (CV 值)

在酶电极的线性响应范围内,选取了 0.025% 和 0.050% 两种浓度的赖氨酸溶液,在一天内进行连续测定,结果得到图 4 所示的酶电极响应曲线。经过计算表明,这两种浓度的赖氨酸溶液用酶电极测定的波动系数 (CV 值) 和标准偏差 (SD) 分别为 2.4% 和 ± 0.0003 与 4.6% 和 ± 0.0010。

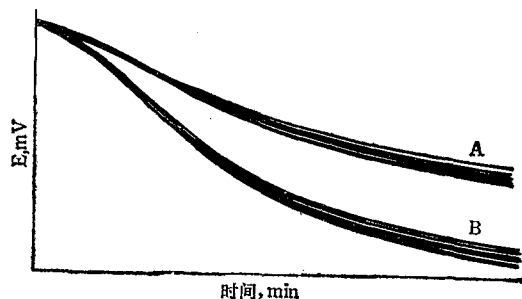


图 4 相同样品在一天内连续用酶电极重复测定得到的响应曲线

A. 赖氨酸浓度为 0.025%; B. 赖氨酸浓度为 0.050%

三、酶电极的使用稳定性和保存稳定性

为了检验该酶电极的使用稳定性,在 30 多天内连续进行了 300 次以上的测定;在测定的间歇时间,酶电极一直置于室温 (平均 28°C 左

右)中存放。图5为该电极在30天内对0.025%和0.050%两种浓度的赖氨酸溶液连续测定的结果。

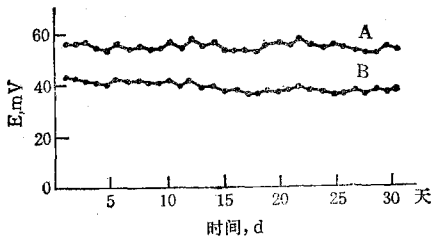


图5 酶电极使用稳定性曲线

A. 赖氨酸浓度为0.025%; B. 赖氨酸浓度为0.050%

在上述检验时间范围内,酶电极的活性无明显下降。与此相对应的是,溶液酶在28°C中仅存放三天,活力几乎全部丧失。在上述检验时间内,酶电极响应的线性范围以及Nernst作图的斜率也均无明显变化。

另一方面,该酶电极在4°C中存放,结果表明,至少在60天内,酶电极的活性没有丝毫下降(图略)。

四、酶电极的测定专一性

在相同浓度或更高浓度的其它氨基酸存在条件下,检验了它们对该酶电极测定赖氨酸的影响,得到表1所示的结果。

表1 各种氨基酸对赖氨酸脱羧酶电极测定赖氨酸的影响

测定样品	0.050%K	0.050%K +	0.050%K +	0.050%K +
		0.050%D	0.050%M	0.050%T
E(mV)	39.95	39.25	39.60	38.90
%变化	100	98.1	99.1	95.1
测定样品	0.050%K +	0.050%K +	0.050%K +	0.050%K + D, M, T, I, E, G 各 0.050%
	0.050%I	0.050%E	0.050%G	
E(mV)	39.75	40.05	36.80	37.95
%变化	97.4	100.3	92.1	93.7

注: K. 赖氨酸; D. 天冬氨酸; M. 甲硫氨酸; I. 异亮氨酸; T. 苏氨酸; E. 谷氨酸; G. 甘氨酸。

可见,该酶电极对赖氨酸具有高度的专一性,在检验过的各种氨基酸中仅甘氨酸能导致8%左右的读数降低外,其它氨基酸的影响一般在±5%以内。

五、酶电极对辅酶的需要

磷酸吡哆醛是氨基酸脱羧酶的辅助因子,为了检验酶电极对它的需要情况,在反应系统中不外加磷酸吡哆醛的条件下,应用酶电极进行了连续测定,结果如图6所示。

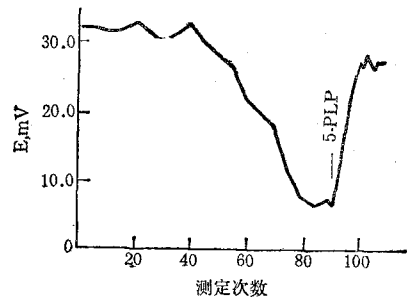


图6 磷酸吡哆醛对赖氨酸脱羧酶电极的影响

5-PLP 为磷酸吡哆醛

可见随着测定次数增加,酶电极的响应逐渐下降;添加磷酸吡哆醛,响应逐渐恢复,但不能回升至原来水平,估计这是由于在没有磷酸吡哆醛存在的条件下,部份酶失效了的缘故,因为磷酸吡哆醛不仅和酶的催化活性有关,它和酶蛋白结合也可能有助于酶活性结构的稳定^[6,7]。

六、酶电极测定的最适温度和最适 pH

为了了解酶电极测定的最适温度和 pH,本文分别在10—50°C、pH 5.4—7.0的范围内逐一地检定了酶电极的响应性能,结果表明该酶电极的最适温度约为40°C,最适 pH 约6.2(图略)。

以上结果都与已有文献报道相近^[8,9]。为了检验该酶电极在实际应用上的可能性,本文用此酶电极和瓦氏呼吸仪对摇瓶发酵过程中的赖氨酸浓度变化进行了跟踪测定。结果表明这两种仪器测得的数据基本平行,表现良好的相关性(图7,8)。

本文也同时进行了“回收率”实验,“回收率”平均为100.5%,说明发酵液组成对酶电极

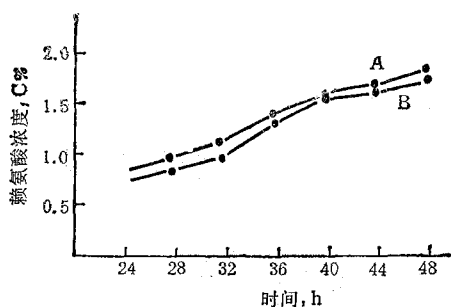


图7 应用瓦氏呼吸仪(A)和酶电极(B)分别跟踪发酵液中赖氨酸浓度变化曲线

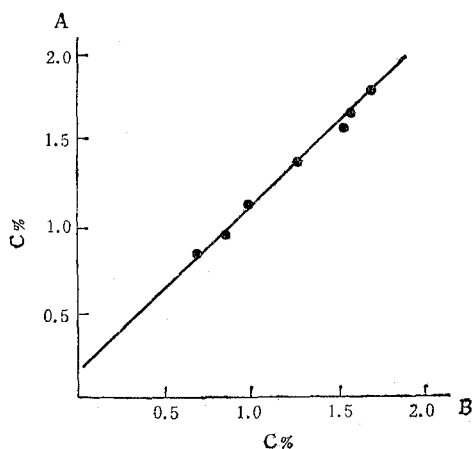


图8 酶电极法(B)和瓦氏呼吸仪法(A)的相关性曲线
C%为赖氨酸浓度

测定没有明显影响(表2)。

和瓦氏呼吸仪等测压法或量气法相比,酶电极法具有简便、快速、灵敏和可反复使用等特点,无论用稳态法测定或动力学法测定,加上洗净恢复等,全过程共需时10分钟左右。

赖氨酸脱羧酶电极的进一步改进方向是解

表2 酶电极测定的“回收”实验结果

待测样品 ([K]: 赖氨酸 浓度)	发酵液 [K]:X%	发酵液 +[K]1% [K]:(X+1)%	发酵液 +[K]2% [K]:(X+2)%
待测样品稀释 50倍后测定值 E(mV)	32.8	47.0	54.8
根据测定值换算 为稀释前原样 品浓度 [K]	0.84%	1.88%*	2.78%*
“回收值”		(1.88-0.84)% =1.04%**	(2.78-0.84)% =1.94%**
“回收率”		104%	97%
平均“回收率”		100.5%	

* 理论值应分别为1.84%和2.84%。

** 理论“回收值”应分别为1%和2%。

决磷酸吡哆醛反复使用问题,为此本实验室正着手进行该辅助因子的共固定研究。

参 考 文 献

- [1] Updike, S. J. & Hicks, G. P.: *Nature*, 1966, 214, 486.
- [2] Gale, E. F.: *Biochem. J.*, 1944, 39, 44.
- [3] Tong, S. L. & Rechnity, G. A.: *Anal. Lett.*, 1976, 9(1), 1.
- [4] White, W. C. & Guilbault, G. G.: *Anal. Chem.*, 1978, 50(11), 148.
- [5] Tran, W. D. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 1983, 25, 329.
- [6] Guilbault, G. G.: *Handbook of Enzymatic Methods of Analysis*, Pergamon Press, 1976.
- [7] Wada, H. & Snell, E. E.: *J. Biol. Chem.*, 1966, 237, 127.
- [8] Skogberg, D. & Richardson, T.: *Cereal Chem.*, 1979, 56(3), 147.
- [9] 大泽久男:《蛋白质,核酸,酵素》,1985,30(4),264。

[本文于1988年1月4日收到]