

技术与方法

流动注射复合酶电极法测定麦芽糖的研究*

曲红波 张先恩**

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

摘要 利用聚乙烯醇(PVA)包埋法共固定糖化酶和葡萄糖氧化酶(GOD)制成酶膜, 与氧电极结合成为复合酶电极. 该电极可以用于流动注射分析系统中测定溶液中麦芽糖. 对酶电极的pH效应和温度效应作了研究. 酶电极的线性范围为0.5—35mmol/L. 响应周期小于2min. 变异系数(CV)为1.8%. 在半连续使用状态下, 酶电极可以使用10d以上. 糖化酶保持活力为60%. 对延长酶电极寿命和克服共存葡萄糖的干扰的方法作了探讨.

关键词 麦芽糖测定, 麦芽糖传感器, 聚乙烯醇(PVA), 复合酶电极, 流动注射分析(FIA)

麦芽糖是一种重要的发酵性双糖. 它存在于多种天然物质及淀粉水解液中. 快速而准确地测定麦芽糖, 对于利用淀粉水解液作为底物的发酵过程有重要的意义. 在各种测定麦芽糖的方法中, 酶电极法快速, 方便, 需样品量少, 专一性强, 重复性好, 且可以与其它装置联用, 实现在线监测, 因此越来越受到重视^[1-7]. 存在的问题是酶膜的活性和稳定性不能满足需要, 而且酶电极的线性范围低, 难以直接测定原始样品. 文献中, 麦芽糖电极的制作中用到的固定化方法有: 戊二醛交联法, 共价键结合法和吸附法.

我们的目的是研制一种具有实用价值的麦芽糖传感器. 我们选择了糖化酶/葡萄糖氧化酶(GOD)复合酶电极方法. 为了获得活力较高的酶膜, 增大酶量是一种有效的途径, 但是需要合适的固定方法. 为此, 我们选用了聚乙烯醇(PVA)包埋法. PVA包埋法是80年代中期发展起来的一种酶固定化方法^[8]. 由于它操作简单, 条件温和, 且不易造成酶流失而受到重视. 我们利用PVA包埋法共固定糖化酶和GOD, 获得了活性较高的酶膜, 本文报道有关结果.

1 材料和方法

1.1 试剂

糖化酶(江西酶制剂厂, 3000 U/g), 1g酶以3ml蒸馏水配成溶液. 葡萄糖氧化酶(GOD, Sigma), 配成 2×10^6 U/L的溶液. 聚乙烯醇(PVA, $M_r = 40\ 000$, Sigma), 配成7%的溶液. 其它试剂均为分析纯. 所有溶液都用蒸馏水配制.

1.2 酶膜制作

在玻璃板上滴一滴PVA溶液, 向其中加入5 μ l GOD溶液和适量的糖化酶溶液, 用细玻璃棒混匀, 涂布成直径7cm的圆形区域. 将玻璃板放在4℃冰箱中过夜, 使PVA固化成膜. 酶膜可在冰箱中干燥保存数天, 活性基本保持不变.

1.3 酶电极的制作

待PVA成膜后, 将膜润湿, 取下, 平铺在Teflon薄膜上, 盖上透析膜. 将此三层夹心膜置于氧电极端部, 用橡皮筋固定, 即成为复合

*国家“八五”攻关生物技术项目: “重要传感器的研制”专题. **联系人.

收稿日期: 1994-01-03, 修回日期: 1994-03-30

酶电极.

1.4 实验系统

酶电极流动注射分析系统由葡萄糖分析仪 (GA-1 型, 中国科学院武汉病毒研究所), 高精度恒温浴槽 (GHY-1 型, 国营泰州仪器厂), 记录仪 (Type 3066, Yokogawa Hokushin Electric, Japan), 和自制的进样混合室组成 (图 1).

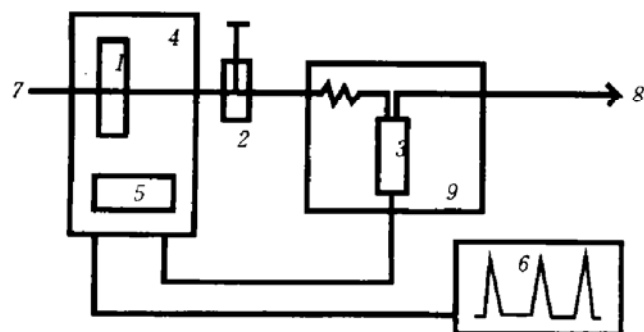


图 1 实验系统示意图

1: 蠕动泵; 2: 进样混合室; 3: 酶电极; 4: 葡萄糖分析仪; 5: 显示屏; 6: 记录仪; 7: 载流液; 8: 废液; 9: 恒温水浴。

1.5 实验过程

载流液以 2.86ml/min 的恒定速度在管道中流动。将一定量的样品溶液注入样品混合室, 样品溶液随载流流经酶电极表面时, 发生酶促反应, 使电极表面区域氧分压下降, 引起电极电流的下降。取电流下降峰值作为响应值。电极的输出信号经葡萄糖分析仪的电子系统处理后, 响应值可以直接从屏幕上读出。放大后的模拟信号输出到记录仪, 记录响应峰形。

工作条件如无特殊说明均为 $30 \pm 0.05^\circ\text{C}$, 进样量 50 μl , 以蒸馏水 (pH5.5) 为载流。

2 结果与讨论

2.1 酶电极的典型响应峰

图 2 显示了酶电极的典型响应峰, 从图 2 中可以看出, 酶电极一个完整的响应周期在 2min 以内, 这与传统的测定方法相比, 大大地缩短了测定周期。

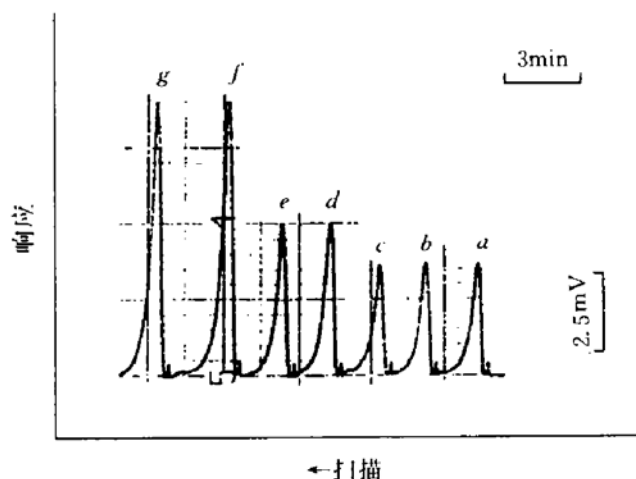


图 2 酶电极的典型响应峰

a, b, c: 10mmol/L 葡萄糖; d, e: 10mmol/L 麦芽糖; f, g: 10mmol/L 葡萄糖; 10mmol/L 麦芽糖。

2.2 酶电极的温度效应

改变工作温度, 观察电极在不同温度下的响应。结果见图 3, 所用的溶液是 20mmol/L 的葡萄糖溶液和 20mmol/L 的麦芽糖溶液。图 3 中的相对响应值是以 30°C 时电极对葡萄糖和麦芽糖的响应值作为 100% 计算的。本系统对葡萄糖响应的温度系数是 $0.021/^\circ\text{C}$, 对麦芽糖响应的温度系数是 $0.027/^\circ\text{C}$ 。

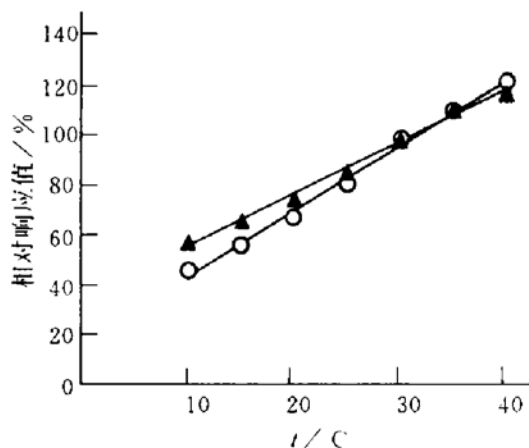


图 3 酶电极的温度效应

○—○, 麦芽糖; ▲—▲, 葡萄糖。

2.3 酶电极的 pH 效应

以 pH3.0—5.8 的醋酸缓冲液为载流液, 测定电极的 pH 效应, 结果见图 4, 所用的溶液是 20mmol/L 的葡萄糖溶液和 20mmol/L 的麦

芽糖溶液. 图 4 中的相对响应值是以 pH4.6 时对麦芽糖的响应和 pH5.0 时对葡萄糖的响应作为 100% 计算的. 这样可以更清楚地反映出酶电极对两种底物的响应值随 pH 值的变化趋势. 从图 4 中可以看出, 双酶电极对葡萄糖的最适 pH 在 5.0 左右, 对麦芽糖的最适 pH 在 4.6 左右. 因为固定化载体 PVA 是惰性的, 本身不带电荷, 而在固定过程中又没有加入任何其它试剂, 所以酶仍旧保持了它们在游离状态下的特性. 因此电极对葡萄糖响应的最适 pH 值与游离 GOD 的最适 pH 值是一致的. 电极对麦芽糖的响应, 由于是糖化酶和 GOD 二者共同作用的结果, 所以最适 pH 值略高于糖化酶的最适 pH 值.

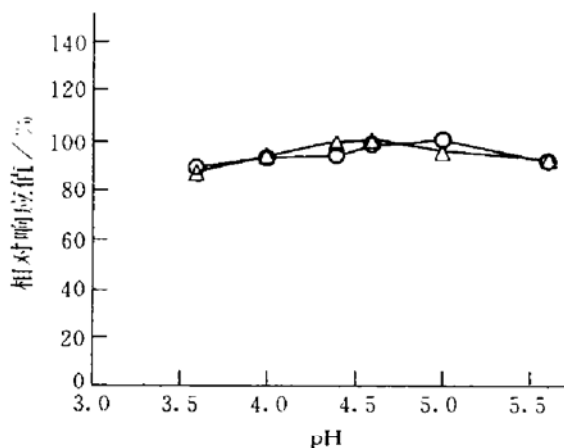


图 4 酶电极的 pH 效应

○—○: 葡萄糖, △—△: 麦芽糖.

2.4 酶电极对葡萄糖及麦芽糖的响应

酶电极对葡萄糖的响应与葡萄糖浓度成正比, 对麦芽糖的响应与酶膜中的糖化酶量有关. 图 5 和图 6 是不同的糖化酶用量下酶电极的响应曲线. 从图 5 中可以看出, 当酶膜中糖化酶量较少 (10 μ l) 时, 电极对麦芽糖的响应低于对同浓度的葡萄糖的响应, 麦芽糖的响应曲线在高浓度下偏离直线, 向下弯曲, 在 0—40mmol/L 范围内曲线符合幂函数关系, 即:

$$R = a \cdot C^b$$

式中, R 为电极的响应值; C 为溶液中麦芽糖浓度; a, b 为常数, $0 < b < 1$. 在低浓度下, 曲

线近似为直线. 当酶膜中糖化酶量较高 (25 μ l) 时, 电极对麦芽糖的响应高于对同浓度的葡萄糖的响应, 在氧电极的响应范围内, 麦芽糖的响应曲线是一条直线, 符合正比例函数关系, 即:

$$R = a \cdot C$$

式中, R 为电极的响应值; C 为溶液中麦芽糖的浓度; a 为常数.

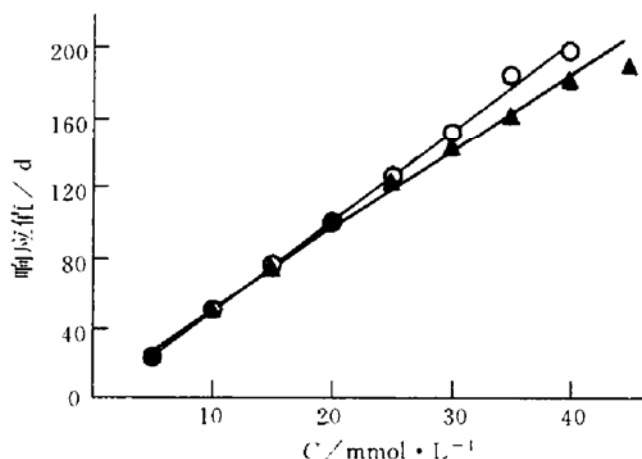


图 5 糖化酶活性较低的酶电极的响应曲线

○—○: 葡萄糖, ▲—▲: 麦芽糖.

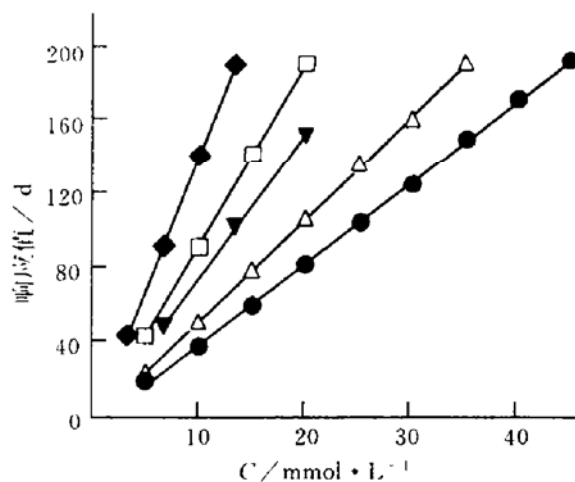


图 6 糖化酶活性较高的酶电极的响应曲线

●—●: 葡萄糖; △—△: 麦芽糖; □—□: 麦芽糖: 葡萄糖=1:1 的混合液; ◆—◆: 麦芽糖: 葡萄糖=1:2 的混合液; ▼—▼: 麦芽糖: 葡萄糖=2:1 的混合液.

2.5 酶电极对混合糖溶液的响应

图 6 中显示了酶电极对不同比例的葡萄糖和麦芽糖混合溶液的响应, 混合糖溶液的浓度是以其中麦芽糖的含量表示的. 酶电极对几种

糖溶液的响应-浓度 (R-C) 曲线的直线部分的斜率之间的关系表示在表 1 中. 从表 1 中可以看出, 酶电极在线性响应区间对麦芽糖和葡萄

糖混合溶液的响应具有加和性, 等于电极对同浓度的麦芽糖溶液和葡萄糖溶液的响应之和.

表 1 酶电极对混合糖溶液的响应

糖溶液	R-C 直线斜率	理论值	相对误差
麦芽糖	5.58	K	
葡萄糖	4.42	K'	
麦芽糖: 葡萄糖=1:1 混合液	9.90	$K + K' = 10.00$	1.0%
麦芽糖: 葡萄糖=1:2 混合液	14.77	$K + 2K' = 14.42$	2.4%
麦芽糖: 葡萄糖=2:1 混合液	7.80	$K + K' / 2 = 7.79$	0.1%

酶电极对混合糖溶液响应的加和性, 对麦芽糖的测定有着特别重要的意义. 它使双电极同步测定样品中共存的麦芽糖和葡萄糖成为可能.

2.6 酶电极的线性响应范围

酶电极的线性响应范围与氧电极的响应范围、酶膜活性和进样量有关. 在我们采用的工作条件下, 酶电极的线性响应范围为 0.5—35mmol/L.

2.7 重复性

将 20mmol/L 的麦芽糖溶液连续注射 10 次, 以 10 次的响应值计算变异系数 (CV), 结果为 1.8%.

2.8 酶电极的使用寿命

酶电极在半连续使用过程中, 在不同的时间测定电极对麦芽糖和葡萄糖的响应情况并计算二者的比值. 电极对麦芽糖的响应值在最初的 3d 中起伏变化比较大; 3d 后, 趋于平缓下降趋势. 到第 10 天, 电极对麦芽糖的响应值降至最初响应值的 60%. 但是通过使用过程中的标定, 电极仍可以进行测定, 并有足够的响应活性. 在此期间, 酶电极对葡萄糖的响应值并没有下降的趋势. 改变固定化载体 PVA 的分子量对酶电极的寿命并没作用. 因此, 我们认为酶电极对麦芽糖响应值的下降是由于糖化酶的失活引起的.

对于游离的溶液中的糖化酶, 可以通过向

酶溶液中加入酶的稳定剂, 如右旋糖酐及其衍生物的方法增加保存期^[9]. 对于酶电极中糖化酶的失活, 可以通过在酶膜中共固定酶的大分子稳定剂来改善.

2.9 透析膜的作用

几乎所有种类的测定小分子待测物的酶电极都在酶膜外覆盖一层透析膜. 这层透析膜可以保护酶膜免受微生物和大分子蛋白质的影响. 对于麦芽糖电极, 透析膜还有另一项更为重要的作用. 它将溶液中的淀粉阻隔, 使之不能与酶膜中的糖化酶接触, 因而不能产生响应. 本酶电极对淀粉不响应. 这就使它可以用于淀粉水解液的测定.

2.10 葡萄糖对麦芽糖测定的影响及解决途径

由于复合酶电极对葡萄糖也响应, 所以在测定含有葡萄糖和麦芽糖的混合样品时, 酶电极的响应是葡萄糖和麦芽糖的响应之和. 葡萄糖对其它待测物测定的干扰是所有以 GOD 电极为基础的测定方法中都会遇到的问题. 对于这个问题, 有四种可供选择的解决方法: 一是通过在复合酶电极前加上一个固定化 GOD 反应器, 或在酶膜前加上一层另外的 GOD 酶膜, 使样品中的葡萄糖在到达酶电极之前即被除去. 二是在系统中另加一个并行的 GOD 电极, 通过两个电极的响应值计算出葡萄糖和麦芽糖各自的浓度. 三是将糖化酶固定成酶反应器, 置于 GOD 电极之前, 通过流路转换装置先将

反应器排除在流路之外,然后再将其包括在流路之中,这样由同样量的样品两次流过 GOD 电极的响应值可以计算出葡萄糖和麦芽糖各自的浓度. 四是根据两种底物扩散速率和反应速率的差异,只用一个复合酶电极,通过记录精细的响应-时间曲线,从曲线上计算出两种反应物的浓度. 在这四种方法中,第二^[5,7]和第三^[10]种方法已被建议用于含葡萄糖的麦芽糖样品的测定,但是还没有实验数据报道. 在下一步的实验中,我们试验了双电极同步测定麦芽糖和葡萄糖的方法,具体情况见以后的报道.

在本工作中,我们尝试了用 PVA 包埋法共固定糖化酶和 GOD 制作复合酶电极. 这种方法简便、价廉、酶活损失小、固定的酶量大,酶电极对麦芽糖、葡萄糖及混合糖溶液的响应值对浓度具有依赖性,线性范围接近于一般样品的深度范围,因此具有一定实用价值.

致谢 胡伟平、张治平先生为本工作提供了宝贵意见和热情帮助. 张晓梅女士在电子技术方面的协作使本工作得以顺利进行. 在此表示衷心感谢.

参 考 文 献

- 1 Bertrand C, Coulet P R, Gautheron D C. *Anal Chim Acta*, 1981; **126**: 23
- 2 Cordonnier M, Lawny F, Chapot D *et al.* *FEBS Lett*, 1975; **9**: 263
- 3 Kawakami M, Koya H, Gondo S. *Fukuoka Kogyo Daigaku Erektoronikusu Kenkyusho*, 1992; **9**: 65
- 4 Mascini M, Palleschi G, Moscone D. *Rass Chim*, 1984; **36**: 75
- 5 Pfeiffer D, Scheller F, Janchen M *et al.* *Anal Lett*, 1980; **13**: 1179
- 6 Pfeiffer D, Scheller F, Janchen M *et al.* *Biochimie*, 1980; **62**: 587

- 7 周 慧, 刘 辉, 查 晓等. *分析化学*, 1990; **18**: 370
- 8 张先恩著. *生物传感技术原理与应用*. 长春: 吉林科学技术出版社, 1991: 40
- 9 马 林, 罗贵民, 黄仲立等. *生物化学杂志*, 1992; **8**: 364
- 10 Dullau T, Reinhardt B, Schugerl K. *Anal Chim Acta*, 1989; **225**: 253

Maltose Determination by a Multi-enzyme Electrode in a Flow Injection System. Qu Hongbo, Zhang Xianen (*Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China*).

Abstract Amyloglucosidase was coentrapped with glucose oxidase (GOD) in a poly vinyl alcohol membrane. The multi-enzyme membrane was combined with an oxygen electrode to form a bienzyme electrode, which could be incorporated in a flow injection system to determine maltose. Temperature effect and pH effect on the bienzyme electrode system were investigated. The linear responses range for the multi-enzyme electrode was 0.5—35mmol/L of sugar. The entire response cycle was less than 2min. The variation coefficient (CV) was 1.8%. The bienzyme electrode was used semi-continuously for 10 days, at the end of which period its responses to maltose remained 60% of its initial value. Methods to extend the life time of the bienzyme electrode and to eliminate the interference of coexisting glucose are discussed.

Key words maltose determination, maltose sensor, poly vinyl alcohol (PVA), multi-enzyme electrode, flow injection analysis (FIA)