

谷氨酸氧化酶电极的研究

杨庆玲 毕可万

(中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116012)

用戊二醛作交联剂将谷氨酸氧化酶和牛血清白蛋白共交联, 置于内层醋酸纤维素抗干扰膜和外层聚碳酸酯扩散控制膜之间, 制成酶膜, 将其与过氧化氢探头复合制成了扩散控制型谷氨酸氧化酶电极, 并构建了采用该电极的流动注射分析系统。酶电极线性范围 0—1 000 mg/L。50s 响应电流达稳态值的95%。流动注射分析系统响应时间 20s, 检测速度60次/h, 线性范围 5—8 000mg/L, 酶膜使用寿命两周以上。系统选择性好, 仅对干扰物 L-谷氨酰胺和L-天冬氨酸有微弱响应。对同一样品连续测定41次的变异系数 2.8%。测量味精发酵液和瓦勃呼吸计的结果相吻合。可望应用于味精发酵及食品工业中。

关键词 L-谷氨酸; 谷氨酸氧化酶; 酶电极; 流动注射分析

谷氨酸的测定在味精生产、食品工业及临床检验中都十分重要。国内味精生产厂家均采用传统的瓦勃呼吸计分析谷氨酸单钠。该法手续繁、耗时长, 且数据准确性差。随着味精生产的发展和实现在线检测与控制的要求, 采用酶(或微生物)电极分析谷氨酸早已引起广泛注意。国外先后研究了采用谷氨酸合成酶、谷氨酸脱羧酶和谷氨酸脱氢酶的酶电极, 但其性能离实用尚有距离。八十年代初Hikuma, M. 等成功地研制出采用含有谷氨酸脱羧酶活性的大肠杆菌的微生物传感器, 并应用于生产。但该电极为电位测量型, 响应及返洗时间较长, 用于测定味精发酵液时, 须先除去二氧化碳, 使其推广应用受到限制。近年来德国的 Wollenberger^[1]等研制出基于谷氨酸氧化酶的酶电极, 其响应时间短, 选择性好, 具有明显的优点, 但其线性范围窄, 仅达到 0.8m mol/L。日本的Karube^[2]应用集成电路技术制成了微型氧电极, 并以此为基础电极研制出谷氨酸氧化酶电极, 线性范围 5—50m mol/L, 但响应时间长达 5min。国内研究

工作多采用脱羧酶电极和微生物电极, 响应时间较长, 谷氨酸氧化酶电极尚未见文献报道。

本文研制了一种适用于味精生产过程中谷氨酸分析的扩散控制型谷氨酸氧化酶电极, 并构建了采用该电极的流动注射分析(FIA)系统, 成功地用于谷氨酸分析。

实验部分

(一)材料、试剂及仪器设备

谷氨酸氧化酶(GLOD): 8u/mg, 日本Yamasa Shoyu Co. Ltd.; 牛血清白蛋白(上海试剂厂); 戊二醛 25% (丹东化工二厂进口分装); 醋酸纤维素(上海纤维素厂); 味精 99% (沈阳味精厂); 聚碳酸酯微孔膜(美国Nuclepore Co.); 恒电位仪(Model 173美国EG & G); 台式自动平衡记录仪(上海大华仪表厂滁州分厂); LZ-101蠕动泵(沈阳电影返光镜厂); 六通取样阀(大连化学物理研究所仪器厂)。

(二)酶电极的制作

将醋酸纤维素配制成 3% 的丙酮溶

本文于1991年11月5日收到。

液，在玻璃板上浇铸成厚度约为 $1\mu\text{m}$ 的薄膜。

称取 5mg 固体的谷氨酸氧化酶，溶于 $30\mu\text{l}$ 牛血清白蛋白的水溶液($22\mu\text{g}/\mu\text{l}$)，将 $0.8\mu\text{l}$ 该酶溶液与 $0.7\mu\text{l}$ 12.5% 的戊二醛溶液混匀，于醋酸纤维素薄膜上均匀展开，再用聚碳酸酯微孔膜覆盖酶层，放置交联 10min ，将此三合一夹层从玻璃板上取下，此即固定化谷氨酸氧化酶酶膜，置冰箱中备用。这样制备的酶膜每片约含谷氨酸氧化酶 1 单位。

过氧化氢探头以铂丝为阳极，银环为阴极，电解液为 1% 的 KCl 。将固定化酶膜与表面用 KCl 溶液润湿了的过氧化氢探头复合，使醋酸纤维素薄膜的一侧和探头接触，组装成谷氨酸氧化酶电极。

(三) 测量系统

采用谷氨酸氧化酶电极的流动注射分析系统如图1所示。载液($\text{pH } 7.3$ 的磷酸缓冲液)由蠕动泵输入检测池(体积为 0.35ml)，样品经六通采样阀进入载液流。在检测池中，载液和样品由气动硅胶膜进行搅拌，该膜透气性好，可补充酶促反应过程中消耗的氧。恒电位仪控制过氧化氢探头的铂电极相对于银电极为 700mV 。产生的响应电流由台式自动平

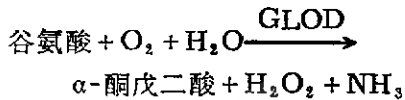
衡记录仪记录。

电极本身的工作特性由流通式分析装置进行测试，其结构与图1基本相同，只是不经六通阀取样，由蠕动泵将含有试样的磷酸缓冲溶液直接输入检测池内。

结果与讨论

(一) 谷氨酸氧化酶电极响应特性

谷氨酸氧化酶催化下列反应：



该电极通过测量反应生成的过氧化氢的氧化电流，来检测谷氨酸的浓度。

用流通型装置测得电极的响应电流 50s 达到稳态值的 95% 。图2为典型的响应电流随时间的变化图。谷氨酸的浓度在 $0-1000\text{mg/L}$ (6.8mmol/L)范围内与电极的响应电流值之间呈线性关系，如图3所示，线性相关系数 0.9955 。其上限值

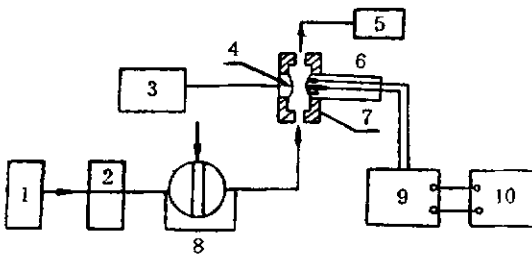


图1 流动注射分析系统示意图

Fig.1 Schematic diagram of the FIA system

1. Buffer solution; 2. Carrier pump;
3. Stirring pump; 4. Silicone diaphragm;
5. Waste; 6. Enzyme electrode;
7. Sample chamber; 8. Sampling valve;
9. Potentiostat; 10. Recorder

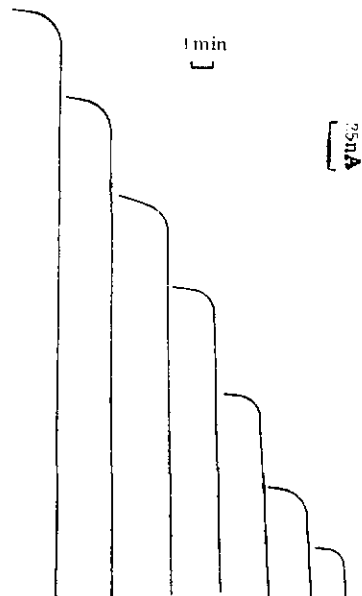


图2 电极的响应曲线

Fig.2 Response curves of the electrode

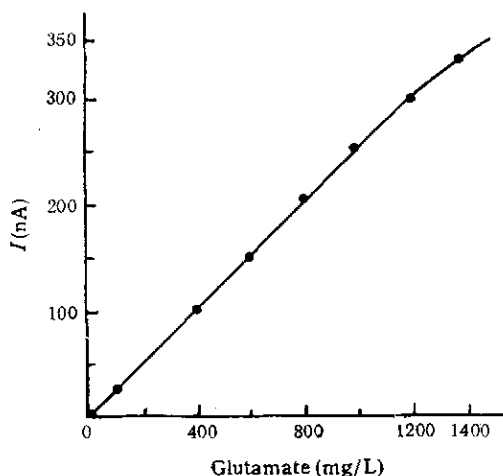


图3 电极响应电流和谷氨酸浓度之间的关系

Fig.3 Calibration curve of the glutamate electrode

T = 25℃

是德国Wollenberger报道的0.8m mol/L的8.5倍。这是根据扩散控制型酶电极的原理,选择适当的外层微孔膜,改进酶的固定化工艺,增大底物在酶膜内向酶层的扩散阻力,使谷氨酸的酶促氧化反应由米氏动力学控制变为扩散控制,从而使电极的线性范围加宽。

(二)采用谷氨酸氧化酶电极的流动注射分析系统的工作特性

流动注射分析技术已广泛用于仪器分析,为了给电极的仪器化提供实验依据,构建了采用谷氨酸氧化酶电极的流动注射分析系统。根据载液流速、进样量等对系统响应电流影响的实验结果,选定载液流速为2.4ml/min,进样量为25 μ l。该系统的工作特性如下:

1. 响应特性和线性范围:系统进样10s出现响应电流,20s电流达到极大值。检测速度不小于60次/h。系统的响应电流和L-谷氨酸浓度的关系如图4所示的校正曲线。该系统线性检测区间5—8000 mg/L,线性相关系数0.9998,检测下限

5mg/L。在具体应用中,可以根据不同要求,调整载液流速和进样量,进一步扩展系统的线性范围,但检测灵敏度也随之改变。

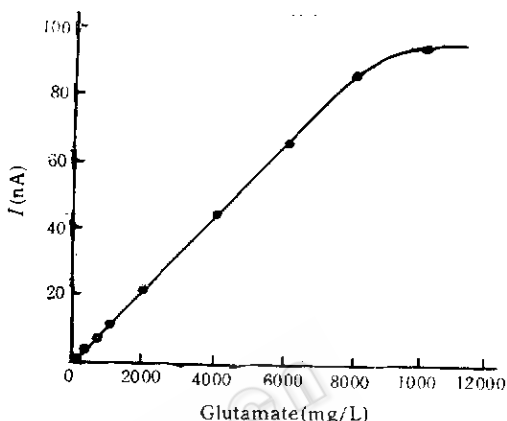


图4 FIA系统的校正曲线

Fig.4 Calibration curve of the FIA system

T = 25℃

2. 载液 pH 值的影响:谷氨酸氧化酶稳定的pH范围为5.5—7.5,最佳pH在7.4左右^[4]。考察了载液pH值对系统响应电流的影响。如图5所示,在pH7.3附近,响应电流有极大值,这个值和谷氨酸氧化酶的最佳pH值相吻合。

3. 工作稳定性:系统的工作稳定性

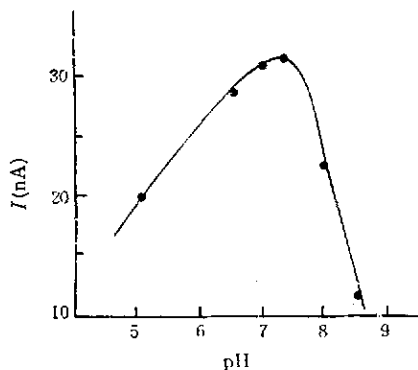


图5 pH对响应电流的影响

Fig.5 pH-dependence of the FIA system glutamate, 3000mg/L, T = 25℃

决定于谷氨酸氧化酶电极的稳定性。为考察电极的性能,在不更换酶膜的情况下,流动注射分析系统连续工作两周,每天测量20—30个样品,观察响应电流的变化。图6为系统对4 000mg/L的谷氨酸溶液的

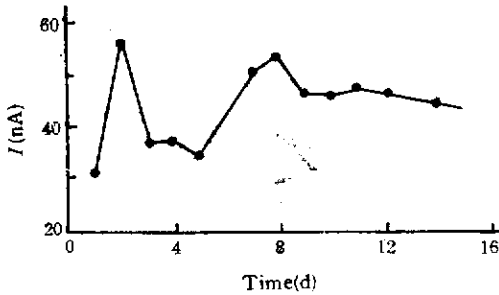


图6 FIA系统的工作稳定性

Fig.6 Stability of the FIA system
glutamate: 4 000mg/L, T=25℃

响应电流随时间的变化。两周内系统的响应电流没有很大下降,酶膜的使用寿命在两周以上。在更频繁的使用条件下,15天共测定3 000次,响应电流下降约为50%。在第十五天测定系统的线性范围可达到5—8 000mg/L。

4. 测定结果的再现性:对浓度为4 000mg/L的L-谷氨酸样品进行了41次测

定,平均响应电流值为42.02nA,变异系数(CV)为2.8%,表明再现性良好。

5. 选择性:考察了人的血液和味精发酵液中其它物质对电极响应值的影响。L-谷氨酰胺、L-天冬氨酸、甘氨酸、L-丙氨酸、L-丝氨酸、DL-色氨酸、L-亮氨酸、抗坏血酸、尿酸、葡萄糖、果糖、L-山梨糖等十余种物质,当其浓度为6 000mg/L时的响应电流和同浓度的谷氨酸响应电流之比,L-谷氨酰胺为1.2%,L-天冬氨酸为0.5%,其余均为0。这说明这种谷氨酸氧化酶有良好的特异性,同时电极的内层醋酸纤维素薄膜起到了阻碍在电极上有活性的干扰物质的作用。

6. 味精发酵液的测定:为考察电极的实用性,用该系统测定了味精发酵液,与常规的瓦勃呼吸计测定的结果进行了比较,发酵液及瓦勃呼吸计法测定结果由大连酒厂味精车间提供。结果如表1所示。二者线性回归方程为:

$$y = 0.11 + 0.98x$$

$$r = 0.992$$

其中 y 为酶电极测定值, x 为瓦勃呼吸计测定值, r 为线性相关系数。

表1 电极法和瓦勃呼吸计对照

Table 1 Comparison between the enzyme electrode and Warburg apparatus

Number of specimens	1	2	3	4	5	6	7
$x(\%)$	2.39	2.50	3.36	3.65	4.51	4.78	5.19
$y(\%)$	2.40	2.64	3.28	3.60	4.72	4.88	5.00

表1结果表明酶电极对味精发酵液的测量结果与瓦勃呼吸计相吻合。

基于谷氨酸氧化酶的扩散控制型酶电极及所构建的采用该酶电极的流动注射分

析系统,线性范围宽,响应速度快,选择性好,工作稳定,测量结果再现性好,有工业实用价值,可用作发酵、食品工业以及临床检验的分析系统。

参 考 文 献

- [1] Wollenberger, U. et al., *Biosensors*, 4(6):381, 1989.
[2] Karube, I., *Biosensors*, Oxford University Press, New York, p.471, 1987.
[3] 于中一等, *工业微生物*, 20(5): 6, 1990.
[4] Kusakabe, H. et al., *Agric. Biol. Chem.*, 47(6):1323, 1983.

Study of the Enzyme Electrode Based on Glutamate Oxidase

Yang Qingling Bi Kewan

(*Dalian Institute of Chemical Physics, Academia Sinica, Dalian 116012*)

A diffusion-controlled enzyme electrode was constructed for L-glutamate determination. The glutamate oxidase was immobilized between the cellulose acetate membrane and polycarbonate membrane using serum albumine and glutaraldehyde. The enzyme membrane was attached on the hydrogen peroxide probe surface moistened with electrolyte. The linear range of the enzyme electrode extends up to 1 000mg/L. A FIA system using the enzyme electrode was developed. The system exhibited good linearity (5—8 000mg/L with $r=0.9998$), rapid response time (less than 20s) and good selectivity. The electrode can be used continually for more than 2 weeks. The coefficient of variation (CV) of 41 times measurements at the glutamate concentration of 4 000mg/L is 2.8%. So its application to fermentation process control and food analysis is very promising.

Key words L-glutamate; glutamate oxidase; enzyme electrode; flow injection analysis