

# 测蔗糖复合酶电极的研究

胡伟平 张先恩 张兴 胡松

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

采用酶电极流动注射分析系统(EFIA), 由固定化酶膜包括蔗糖转化酶(INV)、葡萄糖变旋酶(MUT)及葡萄糖氧化酶(GOD)与氧电极共同组成的复合酶电极用于蔗糖的快速测定。实验确定每张酶膜的最适酶量(IU比)为INV:MUT:GOD = 72:48:2.4。酶经固定化后, INV与MUT的综合回收活力>42.9%。其最适pH为5.8-6.5。最适温度范围是35-45℃。动态法和稳态法测试的线性范围分别为:  $5 \times 10^{-4}$ - $10^{-1}$ 和 $10^{-5}$ - $2 \times 10^{-3}$  mol/L, 响应时间分别<20s和<2min。实验的重复性良好, 变异系数<1.7%。用此酶电极测定以蔗糖为碳源的发酵液中的蔗糖含量, 平均回收率达到98%。发酵液中的蔗糖分解产生的葡萄糖对本电极的干扰可通过平行运行的GOD电极来校正。连续使用的寿命至少为120h。比前年报道的14h有了显著的提高。酶膜显示了较好的保存稳定性(30天, 保存于4℃蒸馏水中)和一定的抗热性(50℃, 30min)。

**关键词** 蔗糖传感器; 复合酶电极; 蔗糖测定

蔗糖广泛用作培养微生物底物。快速测定蔗糖对微生物生理代谢研究和发酵过程的调控十分重要。由于蔗糖不属于还原糖, 不能用普通的化学方法测定。直接用于蔗糖测定的方法有比重法和旋光法, 但测定误差较大。酶电极是迄今最为快速准确的测糖方法之一, 但还没有酶电极可直接供蔗糖的测定。一般是先将蔗糖酶解成葡萄糖, 再用葡萄糖酶电极定糖。从1976年开始已有蔗糖酶电极研究的报道<sup>[1-2]</sup>。利用蔗糖转化酶(INV)、葡萄糖变旋酶(MUT)和葡萄糖氧化酶(GOD)组成复合酶电极能够对纯的蔗糖溶液进行直接快速测定。存在的主要问题是酶膜工作寿命短(十几个小时)<sup>[2]</sup>; 若溶液中存在葡萄糖时, 会严重干扰电极对蔗糖的测定; 以及基础数据不够等。

本实验试图解决上述问题, 优化蔗糖酶电极工作条件, 为蔗糖酶电极实用化提供基础数据。

## 材料和方法

### (一) 主要试剂

Invertase (INV, Sigma, EC 3.2.1.26, 825 IU/mg) 溶于0.2 mol/L PBS(pH6.5), 浓度为24IU/μl; Mutarotase (MUT, Sigma, EC 5.1.3.3, 8200IU/mg), 浓度为24IU/μl; Glucose Oxidase (GOD, Sigma, EC 1.1.3.4, Type II, 23800IU/g), 溶于0.2mol/L PBS (pH6.5) 浓度2.4IU/μl; 牛血清白蛋白(BSA浙江黄岩人民化工厂, 生化级)溶于0.2 mol/L PBS (pH6.5), 浓度为20% (W/V); 戊二醛(上海化学试剂分装厂, 进口分装, 25%)用蒸馏水稀释至2.0%(V/V)。

### (二) 酶电极制作<sup>[3]</sup>

3 μl BSA溶液, 1-7 μl 酶溶液(按

本文于1990年6月26日收到。

实验要求) 和 2—4  $\mu\text{l}$  戊二醛溶液 (取决于酶量) 在直径 2 cm 的 Teflon 薄膜上混匀扩散, 静置交联反应 30 min 形成酶膜。将此附着有酶膜的 Teflon 薄膜紧贴氧电极端部的铂阴极, 并盖上尼龙网, 用橡圈固定, 即成为酶电极, 酶膜保存于 0.2 mol/L pH 6.5 PBS 中 (4  $^{\circ}\text{C}$ )。

### (三) 工作系统和测试过程<sup>[3]</sup>

由测氧仪 (CY-2) 电子蠕动泵 (LBD-M), 恒温浴槽 (CHY-1) 记录仪 (XWT), 自制进样混合器和电磁阀 (Pharmacia) 组成一连续流动测试系统 (图 1), 稳态法的洗脱液 (动态法的载流) 采用曝气过的蒸馏水 (pH 6.5)。

稳态法测试过程中, 通过三通电磁阀的作用阻断洗脱液, 接通样品溶液, 样品流经酶电极表面, 产生响应信号, 一个稳定的信号输出约需 1.5 min, 经过洗脱回复到起始状态, 再进行下次测试。

动态法测试过程中, 向进样器注入微量样品, 样品与载流混合流经酶电极表面, 产生响应信号 (脉冲峰), 约需 20 s。经载流连续洗涤, 电极很快回复到起始状态。随后即可进行下次测定。

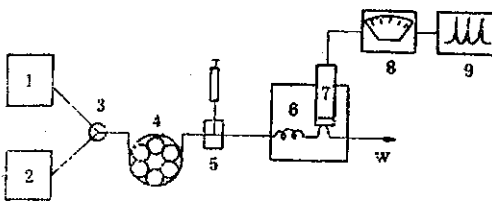


图 1 工作系统示意图

Fig. 1 Diagram of the working system

1. 载流 Carrier stream
2. 蔗糖溶液 Sucrose solution
3. 电磁阀 Electromagnetic valve
4. 蠕动泵 Peristaltic pump
5. 进样混合器 Injection mixer
6. 恒温器 Thermostat
7. 酶电极 Enzyme electrode
8. 放大器 Amplifier
9. 记录仪 Recorder

工作条件 (若无特殊说明): 液流速度 4 ml/min, 控温  $36 \pm 0.01^{\circ}\text{C}$ , 动态法进样量为 20  $\mu\text{l}$ 。

## 结果与讨论

### (一) 酶膜的最适组成

蔗糖酶膜是由三种酶组成的复合酶膜, 其中任一酶量的改变都会引起酶膜综合活力的变化, 同样, 任何一种酶的失活都会引起酶膜的失活。因此, 蔗糖酶膜的组成决定了酶电极的敏感性, 并且在很大程度上影响酶膜的使用寿命。找出酶膜的最适组成是十分重要的。通常情况下, 适当过量的酶对保证酶膜的敏感性及其使用寿命是必要的。

实验采取稳态法。糖溶液分别为 0.75 mmol/L 葡萄糖和 1 mmol/L 蔗糖。响应值相应为  $U_g$  和  $U_s$ 。实验结果见表 1。

表 1 酶膜组成的优化

Table 1 Optimisation of membrane composition

酶 Enzyme	膜类型 Membrane type	酶比率 Enzyme IU ratio (INV:MUT:GOD)	$U_g$ (mV)	$U_s$ (mV)	$\frac{U_s}{U_g}$
GOD	A	48:48:1.2	5.7	2.7	0.474
	B	48:48:2.4	7.9	5.0	0.633
	C	48:48:4.8	9.75	3.4	0.349
MUT	D	12:12:2.4	7.0	3.6	0.514
	E	48:12:2.4	6.75	5.05	0.748
	F	48:48:2.4	6.7	5.1	0.761
INV	G	24:48:2.4	6.5	2.9	0.466
	H	48:48:2.4	6.5	4.95	0.762
	I	72:48:2.4	6.5	5.35	0.823
	J	96:48:2.4	7.5	4.7	0.627

比较 A、B、C 三种酶膜, B 膜  $U_s$  及  $U_s/U_g$  值最大, 说明该膜对蔗糖的响应最大, 最敏感。因此 B 膜中的 GOD 酶量 (2.4

IU)是最适合的。

在D、E、F三种酶膜中，E膜与F膜的 $U_s$ 值及 $U_s/U_g$ 很接近，说明对于本实验系统来说，F膜的MUT酶量是过量的。为了使酶膜具有较长的使用寿命，过量的MUT是必要的。再从酶膜制作和应用等方面综合考虑，F膜的MUT酶量(48IU)是合适的。

比较G、H、I、J四种酶膜。I膜对蔗糖的响应最大、最敏感，并且从H→I膜，INV酶量由48IU增至72IU，而其对应的 $U_s$ 和 $U_s/U_g$ 值并未出现显著的增加。这说明I膜的INV酶是过量的。这两点正是实验所要求的。因此I膜的INV酶量(72IU)是最合适的。

实验表明，酶膜的最适组成INV，MUT及GOD分别为72IU、48IU和2.4IU。

## (二) 温度效应

实验采用稳态法，糖溶液为：0.75 mmol/L葡萄糖和1 mmol/L蔗糖。

图2为酶电极在不同温度(10→50℃)条件下对葡萄糖(A)和蔗糖(B)的响应曲线。蔗糖酶电极的最适温度范围为：35—45℃，从酶膜的使用寿命及实际应用的角度考虑，我们选择36℃为工作条件。

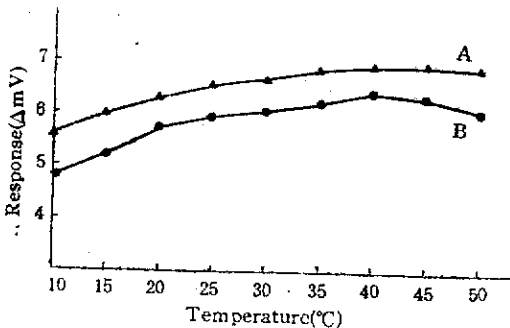


图2 酶电极温度效应

Fig.2 Effect of temperature on the response of enzyme electrode  
A. 葡萄糖 Glucose B. 蔗糖 Sucrose

## (三) pH 效应

实验采用稳态法，将糖溶于不同pH的PBS溶液中，浓度分别为：0.75 mmol/L葡萄糖和1 mmol/L蔗糖。

图3为蔗糖酶电极在不同pH条件下对样品的响应值。对蔗糖的响应，最适pH范围为pH5.8—6.5。实验中酶电极对葡萄糖的响应值变化很小，是因为在本实验系统中，对0.75mol/L葡萄糖来说，蔗糖酶电极的GOD酶量是过量的，而仪器的响应极限为10mV，较大的葡萄糖浓度会使响应接近仪器检测极限，分辨率很低。在一定范围内pH的变化对电极的响应不产生显著影响。

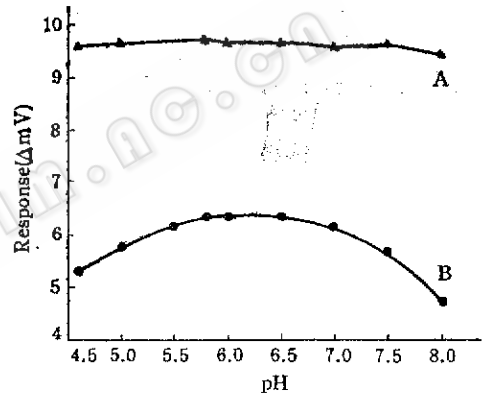


图3 酶电极的pH效应

Fig.3 Effect of pH on the response of enzyme electrode  
A. 葡萄糖 Glucose B. 蔗糖 Sucrose

## (四) 线性范围

1. 动态法的线性范围：向EFIA注加标准的蔗糖溶液，其典型的响应信号峰见图4。峰值用 $\Delta mV$ 表示。电极灵敏度约为0.1mV/mmol/L。从加样到峰值的出现约需要20s，响应周期约1.5min，其线性范围： $5 \times 10^{-4}$ — $10^{-1}$  mol/L蔗糖(图5A)。实验的相关系数 $r = 0.995$ ，表现了较好的线性关系。实验的进样量为20  $\mu l$ 。实验表明，调整进样量可在一定程度上改变酶电极的线性范围。

2. 稳态法的线性范围：向系统中通

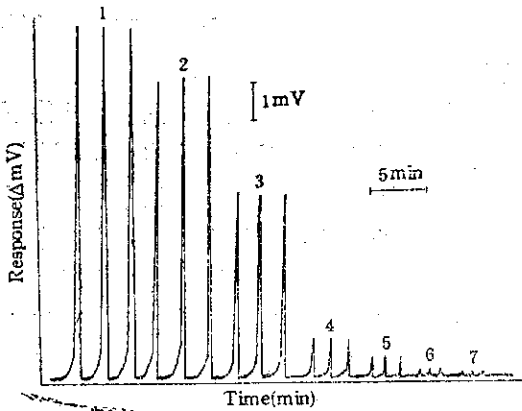


图 4 重复注射 7 种标准蔗糖溶液典型响应峰

Fig.4 Typical signals for duplicate injections of seven standard sucrose solutions

蔗糖浓度 Sucrose concentration (mol/L):  
1.  $2 \times 10^{-1}$ ; 2.  $10^{-1}$ ; 3.  $5 \times 10^{-2}$ ; 4.  $10^{-2}$ ;  
5.  $5 \times 10^{-3}$ ; 6.  $10^{-3}$ ; 7.  $5 \times 10^{-4}$ .

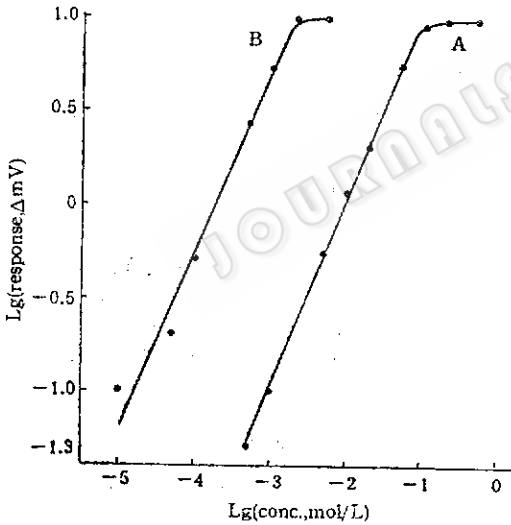


图 5 动态法与稳态法的标准曲线

Fig.5 Calibration graph for kinetic method (A) and steady state method (B)

入不同浓度标准的蔗糖溶液，直至输出稳定的响应信号 ( $< 2$  min)，记录响应值。电极灵敏度约为  $5.2\text{mV}/\text{mmol/L}$ ，其线性范围为  $10^{-5}$ — $2 \times 10^{-3}$  mol/L 蔗糖。实验的相关系数  $r = 0.999$  表现了很好的线

性关系 (图 5B)。在稳态法实验中，电极的响应是完全的，故能产生较强的响应信号，可以检测较低的蔗糖浓度 ( $10^{-5}$  mol/L)。与稳态法相反，动态法的响应是不完全的，因而可以测定较高的蔗糖浓度 ( $10^{-1}$  mol/L)。在实际应用中，两者可以相互补充，增强仪器的适应性。动态法还有响应迅速测定周期短的优点。

#### (五) 蔗糖酶电极的回收率<sup>[4]</sup>

实验的基础样品是以蔗糖为碳源的酵母发酵液。实验利用与蔗糖酶电极平行运行的 GOD 电极来消除发酵液中存在的葡萄糖 (蔗糖分解产生的) 对蔗糖酶电极的干扰。先用蔗糖酶电极与 GOD 电极共同测出溶液蔗糖含量，然后向样品中定量加入蔗糖溶液 ( $1 \times 10^{-1}$  mol/L 蔗糖溶液与样品等体积混合)，再测出其中的蔗糖含量。

计算公式如下：

$$C_s = A_s \times (R_t - A_g' \times R_g / A_g)$$

式中， $C_s$  代表蔗糖浓度； $A_s$ 、 $A_g$  分别代表蔗糖酶电极对标准蔗糖溶液与葡萄糖溶液的响应系数 (mol/L/mV)； $A_g'$  表示 GOD 电极对标准葡萄糖溶液的响应系数 (mol/L/mV)； $R_t$ 、 $R_g$  分别为蔗糖酶电极与 GOD 电极对发酵液的响应值。

表 2 为实验结果。蔗糖的平均回收率达到 98%，回收率较高。样品中蔗糖分解产生的果糖未对实验产生明显的干扰，发酵液中其他因素的影响也不显著。测定结果是可靠的。

#### (六) 误差分析

主要进行动态法的误差分析。以同样的进样量 ( $20\mu\text{l}$ ,  $5 \times 10^{-2}$  mol/L 蔗糖) 重复实验 10 次。10 次响应信号的平均值为  $5.38\text{mV}$ ，标准差为  $0.092\text{mV}$ ，变异系数为 1.7%，10 次测定的结果在一个标准差内的占 80%，在 2 个标准差内的占 100%。误差分析表明，实验的重复性很好，达到

表 2 回收率实验  
Table 2 Recovery test

样品 Samples			添加的蔗糖** Sucrose added		蔗糖预期值 Sucrose expected value	实测值 Detected value	回收率 Recovery
发酵液* Fermentation broth	蔗糖浓度 Sucrose concent. (mol/L)	体积 Volume (ml)	浓度 Concent. (mol/L)	体积 Volume (ml)	(mol/L)	(mol/L)	(%)
A	$1.32 \times 10^{-2}$	1	$1 \times 10^{-1}$	1	$5.66 \times 10^{-2}$	$5.44 \times 10^{-2}$	96.1
B	0	1	$1 \times 10^{-1}$	1	$5.0 \times 10^{-2}$	$5.0 \times 10^{-2}$	100

\* A. 早期发酵液 Earlier stage fermentation broth

B. 晚期发酵液 Later stage fermentation broth

\*\*蔗糖溶液与样品等体积混合 The sucrose solution mixed with samples in equal volume

了实用化要求。

### (七) 酶膜的回收活力

酶经固定化后, 其活力会部分丧失。本实验主要测定 INV + MUT 的综合回收活力。实验在 pH6.5(0.1mol/L PBS), 37°C 恒温搅拌条件下进行, 样品体积 1 ml, 蔗糖浓度  $1 \times 10^{-1}$  mol/L, 加入一定量的酶, 反应 2 min 时取 20 $\mu$ l 反应液用 GOD 电极测定产生的葡萄糖量(表 3), 计算出酶膜的回收活力为 42.9%。由于被固定的酶与溶液中底物的接触效率远不如游离酶, 所以实验得出的回收活力值 (42.9%) 是保守的估计。

表 3 酶膜的回收活力

Table 3 Recovery activity of enzyme membrane

酶量 (INV + MUT) Enzyme content (U)	GOD 电极响应 GOD electrode response (mV)	葡萄糖含量 Glucose content ( $\mu$ mol)	回收活力 Recovery activity (%)
游离酶 Free enzyme	72 + 48	0.7	10.93
固定化酶 Immobilised enzyme	72 + 48	0.3	42.9

### (八) 酶膜的使用寿命

实验采用稳态法连续通入 1mmol/L 蔗糖溶液, 考查响应值的变化情况。实验中每隔一段时间通入 0.75mol/L 葡萄糖溶

液一次, 测出酶膜的 GOD 酶活性。

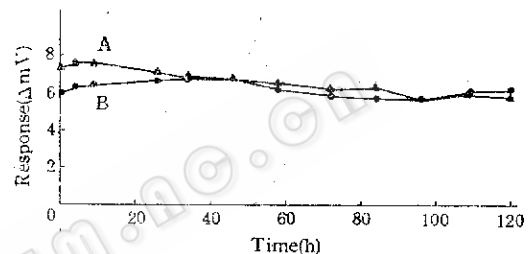


图 6 酶膜的稳定性

Fig.6 Stability of the enzyme membrane

A. 对葡萄糖的响应 Response to glucose  
对蔗糖的响应 Response to sucrose

表 4 酶膜的保存稳定性

Table 4 Storage stability of the enzyme membrane

保存方式* Storage methods	剩余活力 Remained activity (%)		
	1 day	7 days	27 days
A	100	80	50
B	100	100	100
C	100	50	0
D	100	80	50

\* A. 在蒸馏水中 4°C 保存 Stored in distilled water at 4°C

B. 密封于塑料袋中 4°C 保存 Stored in a sealed plastic bag at 4°C

C. 在蒸馏水中室温保存 Stored in distilled water at room temperature

D. 密封于塑料袋里室温保存 Stored in a sealed plastic bag at room temperature

图 6 为实验结果, 经过连续 5 天的实验, 酶电极的响应值为初始状态的 101.7

%, 可以认为酶电极对蔗糖的响应灵敏度基本没降低。曲线中间波动可能与实验系统及操作中的误差有关。从理论上说, 动态法测试周期以 2 min 计, 该酶电极至少可以进行 3600 次测试。经过 5 天的实验, 蔗糖酶电极对葡萄糖的响应值下降至原来的 80%, 仍然保留了较高的响应。实验表明, 我们的蔗糖酶膜的使用寿命至少为 5 天, 比 1988 年英国人报道的 14 h 有了显著

地提高; 蔗糖酶电极应用于发酵过程中蔗糖浓度的连续监控是完全可能的。

### (九) 酶膜的保存稳定性

实验于 4—5 月进行, 室温为 15—30°C。采取 4 种方式保存酶膜, 定期测定各酶膜的蔗糖酶活性。结果(表 4)表明, 方法 B(密封于塑料袋中, 4°C 保存)保存效果最佳, 此条件下酶膜活性可保持一个月以上。

### 参 考 文 献

- [1] Satoh, I. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 18:269, 1976.
- [2] Hamid, J. A. et al., *Analyst*, 113:81, 1988.
- [3] 张先恩等, 生物化学杂志, 6(4):294, 1990.
- [4] 张先恩等, 生物工程学报, 5(2):140, 1989.

## Study on Multiple-enzyme Electrode for Sucrose Determination

Hu Weipin Zhang Xianen Zhang Xing Hu Song  
(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan)

Invertase (INV), mutarotase (MUT), glucose oxidase (GOD) and BSA were coimmobilised via glutaraldehyde-bridged covalent bonding, and directly absorbed on the teflon membrane. This membrane was covered with a nylon mesh and placed over an oxygen electrode. An enzyme electrode flow injection analyze system (EFIA) was adopted. The optimum enzyme composition (IU) for immobilisation on the teflon membrane of INV-MUT-GOD was found to be in the ratio 72:48:2.4, with a recovery activity (INV + MUT) more than 42.9%. pH 5.8—6.5 was the most suitable for the sensor activity. The optimum temperature was 35—40°C. The system exhibited good linearity in the range  $5 \times 10^{-4}$ — $10^{-1}$  mol/L sucrose (kinetic method) and  $10^{-5}$ — $2 \times 10^{-3}$  mol/L sucrose (steady state method), short response time (<20s for kinetic method, <2 min for steady state method). CV = 1.7% (kinetic method). The sensor had been used for determination of sucrose concentration in fermentation broth, with an average recovery rate of 98%.

### Key words

Sucrose sensor; multiple-enzyme electrode; sucrose determination