

固定化谷氨酸氧化酶管流动注射测定谷氨酸的研究

李青山 叶邦策 张嗣良 俞俊棠

(华东理工大学生化工程所, 上海 200237)

摘要 用多孔玻璃珠固定谷氨酸氧化酶与过氧化氢酶分别制成相应的固定化酶管, 结合流动注射分析系统测定谷氨酸的含量。测定线性范围在 0.1—2.0 mmol/L, 精度 (C. V) 0.7%, 测定速率每小时 80 样以上, 使用寿命至少 4 个月。在谷氨酸浓度低于 2.5 mmol/L 时, pH 在 6.5—8.0, 温度 20—35℃, 磷酸盐浓度在 0.05—0.25mol/L 范围内对测定几乎无影响, 对不同发酵时间的谷氨酸发酵液测定, 测定的结果与酶试剂盒及瓦氏法比较, 结果一致, 说明该方法已具有实际应用价值。

关键词 谷氨酸, 谷氨酸氧化酶, 固定化酶

我国是味精生产大国, 有生产厂近 200 多家, 生产过程中谷氨酸的测定主要用瓦氏呼吸仪法, 食品中分析常用色谱法测定谷氨酸。此两种方法均费时, 费力, 费钱。近年来有不少文献报道开发谷氨酸生物传感器测定谷氨酸^[1-4]。为了降低样品中溶解氧与电活性物质的干扰, 我们曾试制了谷氨酸氧化酶修饰电极^[5], 尽管克服了溶解氧的影响, 但是由于加在工作电极上电压不能低于 200mV (以甘汞电极为参比电极), 发酵液中一些电活性物质仍然能在电极上反应, 影响测定。另外, 由于二茂铁的缓慢溶解导致电极寿命较短, 难以推广应用。本文报道利用固定化酶管测定谷氨酸的结果。该法具有使用寿命长, 测定速率快, 受测定环境影响小等优点。

1 材料与amp;方法

1.1 试剂

L-谷氨酸测定试剂盒系 Yamasa 酱油株式会社产品; 辣根过氧化物酶由上海东风生化技术公司生产; 硅硫偶联剂 KH-550 购自南京曙光化工厂; 戊二醛是进口分装; 其余试剂皆为 A、R. 试剂。

1.2 设备及仪器

501 型超级恒温水槽由重庆实验设备厂制造; 721 分光光度计系上海第三分析仪器厂产品; XWC-100 型自动平衡记录仪由大华仪表厂生产; 对数转换及放大器由沈阳电影反光镜厂生产; 蠕动泵是浙江定象山仪表厂产品。

1.3 酶管的制备

多孔玻璃珠 (120—200 目, 750—1000Å) 的活化有 4 种方法。方法 1: 用 10%NaOH 洗净后再用蒸馏水洗数次, 烘干。无水甲苯与硅烷偶联剂 KH-550 混合加入烘干的玻璃珠回流 1 小时, 洗净烘干即得。方法 2: 10%NaOH 洗净烘干后的玻璃珠 1g 加到 40ml 95%

乙醇与 KH-550 混合物中 (乙醇 : KH-550 = 9 : 1), 抽气摇动 20 分钟, 洗净、烘干即得。方法 3、4 分别以丙酮、pH7.0, 0.05mol/L 磷酸缓冲液取代方法 2 中的 95% 乙醇。

将活化的玻璃珠 1g 加到用 pH7.0, 0.05mol/L 的磷酸缓冲液配制的 2.5% 戊二醛溶液中, 抽气, 冰浴, 摇动 1 小时, 用缓冲液洗净, 抽干, 加入适量酶液, 4℃ 下过夜。将固定有酶的玻璃珠填充到聚四氟乙烯管中 (ID 2mm × 6cm), 用缓冲液冲洗干净, 放 4℃ 下保存待用。

1.4 试验装置

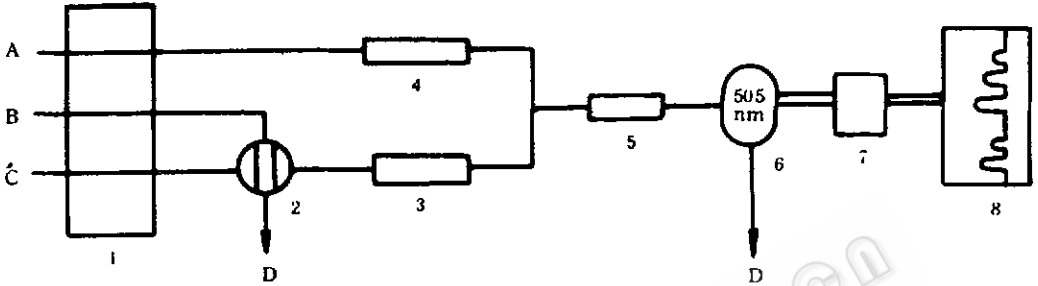


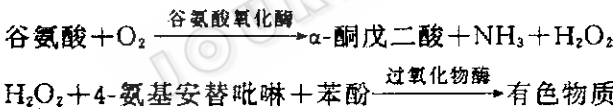
图 1 测定谷氨酸实验装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of a FIA system for glutamate analysis

1. Peristaltic pump; 2. Injector; 3. Immobilized *L*-glutamate oxidase reactor; 4. The same reactor as 3 without any enzyme; 5. Immobilized peroxidase reactor; 6. Colorimetric flow-through detector; 7. Logarithm transformer; 8. Recorder

A. Development solution; B. Sample; C. Carrying solution; D. Waste solution

试验装置如图 1 所示: 1.5 测定原理



谷氨酸流经谷氨酸氧化酶管生成 H₂O₂, H₂O₂ 流入过氧化物酶管前与显色液相遇, 在过氧化物酶管中反应生成有色物质, 在 505nm 下测定有色物质的吸光值。

2 结果与讨论

2.1 酶固定化方法的比较

用 4 种不同方法活化的玻璃珠 (其它方法相同) 制成 4 种固定化谷氨酸氧化酶。用此 4 种固定化酶制成相应的酶管, 分别以相同的速率流过 10 mmol/L 浓度的谷氨酸溶液, 测定产生的 H₂O₂ 浓度, 由此计算酶管的转化率。测得的结果表明, 方法 1—4 测得的转化率分别为 48.3%、46.7%、32.4% 和 23.2%。可见方法 1、2 的固定化效果最好, 但方法 2 较方法 1 简单得多, 此后皆用方法 2 进行酶的固定化。方法 1 被认为在多孔玻璃珠表面形成单层硅烷偶联剂膜, 而方法 4 要形成多层硅烷偶联剂的堆积。可能由于这方面的原因导致谷氨酸氧化酶固定效果方法 1 优于方法 4。方法 2 中有乙醇和少量水, 使硅烷偶联剂醇解和微水解同时进行, 这些已经水解和醇解的部份与玻璃珠表面反应并连接上去, 这整个过程进行的速率较方法 3 快而比方法 4 小得多, 这可能是方法 2 固定酶

的效果优于 3、4 的原因。方法 3 硅烷偶联剂活化不足, 而方法 4 硅烷偶联剂水解太快。固定化酶的活力回收率方法 3 略高于其它三个方法, 但它们之间相差都不大, 皆在 30% 左右。

2.2 测定条件的影响

2.2.1 缓冲液磷酸盐浓度与 pH 的影响: 在谷氨酸浓度低于 2.5 mmol/L, 取样 20 μ l (以下皆取样 20 μ l), 磷酸盐浓度在 0.05—0.25 mol/L, pH 在 6.5—8.0 对测定无影响。pH 的影响详见图 2。

2.2.2 温度的影响: 图 3 是温度对测定的影响曲线。可见谷氨酸浓度在 2.5 mmol/L 以下, 温度在 20—35 $^{\circ}$ C 对测定无影响。考虑到酶管的使用寿命, 温度不应高于 25 $^{\circ}$ C。测定缓冲液的磷酸盐浓度、pH、测定温度在谷氨酸浓度低于 2.5 mmol/L 时, 在相当大范围内对测定几乎没有影响, 这是由于酶管的活力高, 能以接近 100% 的转化率将谷氨酸转化为 H₂O, 而不受这些因素变化的影响, 为实际应用提供了方便。

2.2.3 专一性: 由表 1 可知, 除对丝氨酸、天冬氨酸略有响应外, 对其它十几种氨基酸与几种糖均无响应。

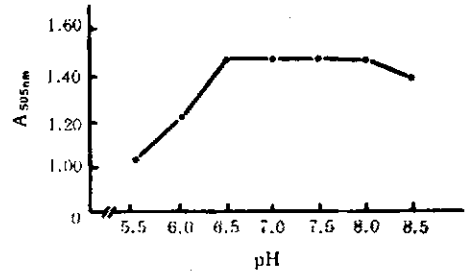


图 2 pH 对测定谷氨酸的影响

Fig. 2 The effect of pH value on the results of the glutamate determination using this system

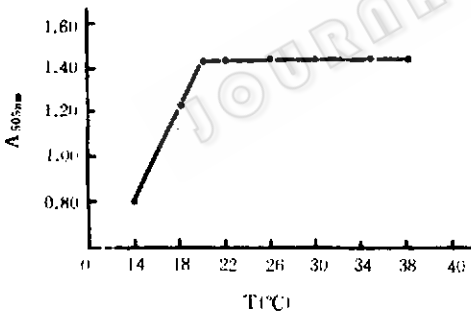


图 3 温度对测定谷氨酸的影响

Fig. 3 The effect of temperature on the results of the glutamate determination using this system

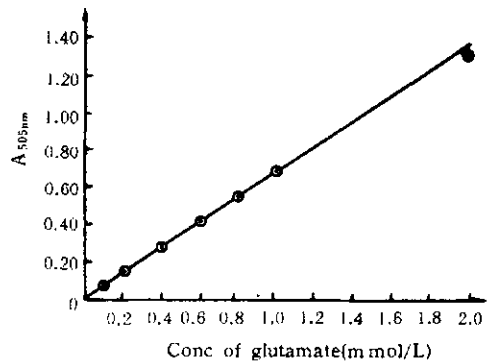


图 4 线性响应

Fig. 4 Calibration curves

2.3 测定的性能

2.3.1 重现性: 对 0.2 mmol/L 的谷氨酸溶液测定 8 次, 整理后的数据列于表 2, 可见重现性较好。表 2 中吸光值 (A) 为平均值, SD 为标准差, CV 为精密度。

2.3.2 线性范围: 测定的线性范围见图 4。测定在 0.1—2.0 mmol/L 浓度范围内, 谷氨酸浓度与吸光值成线性关系。其中线性相关系数 $r=0.998$ 。设 y 为吸光值, x 为谷氨酸浓度 (mmol/L), 线性回归方程为:

$$y = 0.599x + 0.043$$

表 1 酶管测定的特异性
Table 1 The specificity of the system

Amino acid	Response value	Amino acid	Response value
<i>L</i> -glutamate	100	<i>L</i> -alanine	0
<i>D</i> -glutamate	0	<i>L</i> -tryptophan	0
<i>L</i> -aspartate	7.0	<i>L</i> -cystine	0
<i>L</i> -histidine	0.5	<i>L</i> -glutamine	0.8
<i>L</i> -isoleucine	0	<i>L</i> -asparagine	0
<i>L</i> -leucine	0	<i>L</i> -threonine	0
<i>L</i> -ornithine	0	<i>D</i> -fructose	0
<i>L</i> -serine	10.3	Glucose	0
<i>L</i> -phenylalanine	0	Sucrose	0

2.3.3 测定速率：测定速率可达 60—80 样/小时。测定速率大小主要受酶管中酶活力高低的限制，酶活力高则将谷氨酸催化反应完全生成 H_2O_2 的速度就快，这样就可以提高载液流速与采样频率，使测定速率提高。另外，酶活力高，酶管可以做得更短，使测定速率进一步提高。不过，60—80 样/小时的测定速率已经能够满足工业生产的需要。

2.3.4 酶管的稳定性：酶管白天用于测定 300—400 样，夜间置于 4℃ 冰箱保存，在 pH7.0, 0.05mol/L 磷酸缓冲液中延续

保存 4 个多月，活力下降 50%，仍能继续使用。在用于谷氨酸测定的各种传感器中，稳定性超过 4 个月的，至今还未见到报道。有 4 个月的稳定性，已经具有实际应用与产业化的可能。

表 2 酶管测定的重现性

Table 2 The reproductivity of the determination of this system

Number	1	2	3	4	5	6	7	8	Absorption value (A)	SD (A)	CV (%)
Response value	0.155	0.158	0.155	0.156	0.156	0.156	0.158	1.53	1.56	0.008	0.6

2.4 相关实证

同一批号不同发酵时间的谷氨酸发酵液经一定稀释后进行测定。

2.4.1 回收率：将不同发酵时间的发酵液经稀释后，加入过量自产谷氨酸氧化酶充分氧化掉谷氨酸， H_2O_2 由过氧化氢酶消除，直到用试剂盒测不出谷氨酸为止，再加上已知量的谷氨酸，用电极测定，测定值与已知加入量之比为回收率。结果表明不同发酵时间发酵液对回收率的影响没有一定规律，回收率在 94.5%—103.8% 之间。

2.4.2 瓦氏呼吸仪法、试剂盒法与新方法的比较：三种方法测定不同发酵时间发酵液中谷氨酸含量。设 y 为新方法测定的值， x_1 , x_2 分别为瓦氏法与试剂盒法测定的值，线性回归分析拟合的方程分别为：

$$y = 0.985x_1 + 0.058$$

$$\text{与 } y = 0.992x_2 + 0.0033$$

相关系数皆为 0.988。可见三种方法都相当一致

参 考 文 献

- (1) 黄子良等. 华东化工学院, 14 (3) 365—373, 1988.
- (2) Hikuma M *et al.* Anal Chim Acta. 116: 61—67, 1980.
- (3) Chien-Yuan Chen *et al.* Anal Chim Acta, 243: 9—15, 1991.
- (4) Toshio Yao *et al.* Anal Chim Acta. 236: 437—440, 1990.
- (5) 李友荣等. 生物工程学报, 8 (4) : 394—400, 1992.

Determination of Glutamate in Broth by Flow Injection Analysis Using an Immobilized Glutamate Oxidase Reactor

Li Qingshan Ye Bange Zhang Siliang Yu Juntang

(Research Institute of Biochemical Engineering East China
University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract Two immobilized enzyme reactors, the glutamate oxidase and horseradish peroxidase on glass beads (120—200 mesh with 750—1000Å pore size) were used in a flow injection system to determine the *L*-glutamate concentration. The linear relationship was ranged from 0.1—2 mmol/L of glutamate. The reliability (C. V.) and determination speed was 0.7% and 60—80 samples/h, respectively. The reliable lifetime of this reactor was at least 120 days. If the *L*-glutamate concentration remain slower than 2.5 mmol/L, there is almost no effects imposed by pH value temperature and phosphate as they are limited within the range of 6.6—8.0, 20—35°C and 0.05—0.25 mmol/L respectively.

Different samples were taken at different stages during the whole fermentation process and the *L*-glutamate concentration were determined comparatively by enzymetic kit Warburg's respiration apparatus and the immobilized enzyme reactors described in this paper. The results showed that the three techniques are comparable.

Key words *L*-glutamate, *L*-glutamate oxidase, immobilised enzyme, flow injection analysis