

# 用葡萄糖酶电极法测定葡萄糖淀粉酶活性的研究

史建国 周凤臻 杨明慧 朱思荣 冯德荣

(山东省科学院生物研究所 济南 250014)

**摘要** 利用固定化葡萄糖氧化酶酶膜和过氧化氢电极组成酶电极测定葡萄糖淀粉酶的活性单位。用已知单位的葡萄糖淀粉酶作为测定标准定标后,在仪器上直接测出被测样品的葡萄糖淀粉酶活性单位,测定时间140s,操作周期3min,连续10次测定CV值为0.67%,50~500u/ml的范围内线性良好, $r=0.9999$ 。

**关键词** 葡萄糖氧化酶,酶电极,葡萄糖淀粉酶测定

葡萄糖淀粉酶(EC 3.2.1.3, 1,4-葡聚糖水解酶)简称糖化酶,可连续地从淀粉和糖原的非还原末端除去葡萄糖单元<sup>[1]</sup>,它水解淀粉得到的产物是 $\beta$ -葡萄糖, $\beta$ -葡萄糖是葡萄糖氧化酶的专一性底物。

糖化酶的使用和生产过程的监控中都需要进行酶活力的测定。传统的糖化酶活力测定方法是把底物可溶性淀粉和酶在特定的条件下保温后,用氧化还原滴定法或比色法测定产生的还原糖量确定葡萄糖淀粉酶的活性单位,不仅繁琐、费时,而且是把还原糖的生成量按葡萄糖量计算,样品中的非葡萄糖还原性物质对测定结果有干扰,专一性差。酶电极法快速、准确、专一性好,是一种比较理想的分析工具<sup>[2]</sup>。用葡萄糖酶电极可以测定糖化酶的活力,有关这方面的研究已有一些报道<sup>[3,4]</sup>,但这些研究仅仅是利用了葡萄糖分析仪的功能,即以已知浓度的葡萄糖为标准,通过测定酶反应在单位时间内产生的葡萄糖量,计算出糖化酶的活力单位。因此,严格地讲还不是一种专用糖化酶分析仪。本研究利用已应用于生产的葡萄糖酶电极<sup>[5]</sup>,设计了生物传感分析仪,用已知酶活力的糖化酶作标准,在仪器上直接显示酶活性单位,实现了糖化酶的快速测定,140s以内就能得到结果,操作周期不超过3min,对糖化酶样品连续测定,CV值0.67%( $n=10$ );100~500u/ml内线性良好, $r=0.9999$ 。现将研究结果报道如下:

## 1 材料、原理及方法

### 1.1 试剂材料

葡萄糖氧化酶[EC 1.1.3.4],由美国Sigma公司出品;戊二醛由上海化学试剂采购供应站进口分装;XHM膜由上海瑞丽分析仪器厂生产;糊精是浙江菱湖淀粉厂出品的化学纯;葡萄糖淀粉酶[EC 3.2.1.3]是江阴星达酶制剂公司出品的液体酶;其它药品均为分析纯。

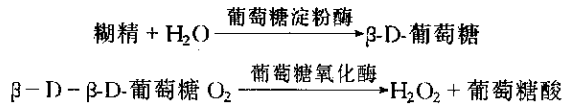
本文于1995年2月25日收到。

## 1.2 酶电极的制备

用戊二醛作交联剂,将葡萄糖氧化酶固定在 XHM 膜上,制成酶膜后覆盖在过氧化氢电极头端,然后在酶膜和电极之间加入电解质溶液,即构成葡萄糖电极。

## 1.3 原理

该方法的测定原理是根据下列酶反应:



在一定时间内,糖化酶作用于糊精产生的葡萄糖量与  $\text{H}_2\text{O}_2$  量成正比,用过氧化氢电极检测  $\text{H}_2\text{O}_2$  的生成量可以得到糖化酶的活力单位。

## 1.4 仪器

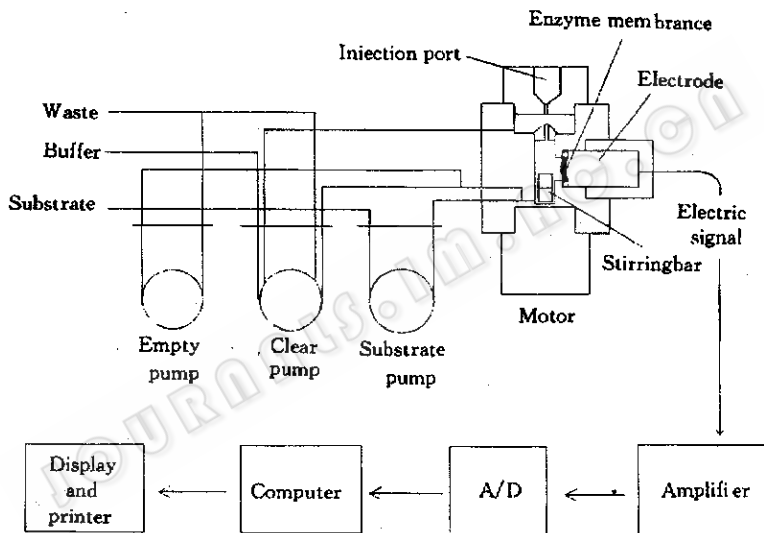


图 1 SBA-50 型分析仪结构原理图

Fig. 1 Schematic diagram of the SBA-50 analyzer

SBA-50 型生物传感分析仪:由山东省科学院生物研究所研制。该仪器由一次仪表和二次仪表两部分组成。一次仪表是由酶电极及其附属结构组成,完成生化信号转化为电信号。一次仪表产生的电信号由电极进入二次仪表,仪器的二次仪表是用 51 系列的单片机中央控制器控制采样、信号放大、A/D 转换、清洗、搅拌、数据储存及处理、线性校正和结果打印等功能,仪器结构原理见图 1。

## 1.5 操作程序

仪器开机后,调整仪器进入正常工作状态,将定量的葡萄糖淀粉酶样品和底物糊精注入反应池,仪器将按设定的程序自动记录反应起点到反应终点的酶反应产生的葡萄糖的变化量并自动显示和打印测定结果(反应的起点和终点可根据需要设定)。测定时首先用已知活性单位的糖化酶溶液标定仪器并进行线性校正,然后将待测样品稀释后测定,仪器显示数值乘以稀释倍数即为被测定样品中的葡萄糖淀粉酶活性单位。

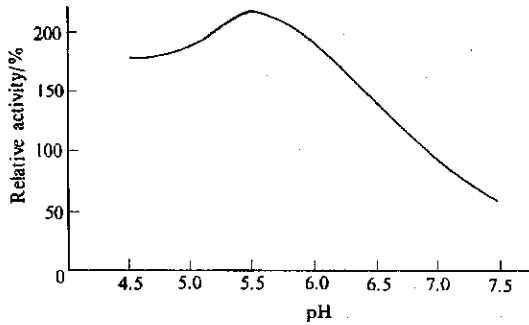


图 2 pH对测定的影响

Fig.2 The effect of pH on the determination

## 2 结果与分析

### 2.1 最适 pH 实验

pH 的测定环境对葡萄糖淀粉酶的活性测定的影响见图 2。本实验选用 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液。结果表明:pH5.5 时的测定值最高。但是考虑到葡萄糖氧化酶膜的稳定性和使用寿命<sup>[6]</sup>,本测定系统选用 pH6.0 的缓冲液。

### 2.2 测定时间的选择

将不同活性单位的糖化酶样品分别注入反应池,记录酶反应过程中的数字增加量,反应时间 180s,每 20s 读数、记录,计算出每 20s 的增加数值结果如下:

表 1 180s 酶反应过程记录

Table 1 The reaction results in 180s

No. of test	Time of test/s									
	5	20	40	60	80	100	120	140	160	180
1	63	80	81	80	83	83	79	80	76	75
2	48	62	60	62	61	59	59	57	54	52
3	33	48	47	47	48	46	47	46	44	45
4	20	33	33	34	32	31	32	32	32	31
5	10	16	17	18	16	16	16	17	16	16
6	7	9	7	8	8	10	9	10	9	9

表中测定 1~6 的所用的糖化酶活性依次分别为 500、400、300、200、100、50u/ml。

从上表可以看出:不同活性单位的糖化酶样品,在一定时间内的变化量不同。酶活性越高,变化速度越快,20s 内显示值增加越大,但是在 20s 到 140s 之间不同活性单位的糖化酶的反应速度基本是稳定的。因此,从进样 20s 开始到 140s 之间采样比较合适。

### 2.3 葡萄糖对葡萄糖淀粉酶活性单位测定的影响

预加 20 $\mu$ l 500u/ml 的葡萄糖淀粉酶,再加 5 $\mu$ l 5% 的糊精,以此结果定标为 500,进行下述测定:

测定 1:预加 20 $\mu$ l 500u/ml 的葡萄糖淀粉酶和 10 $\mu$ l 浓度为 100mg/ml 的葡萄糖后,再加 5 $\mu$ l 5% 的糊精;

测定 2:预加 20 $\mu$ l 500u/ml 的葡萄糖淀粉酶和 20 $\mu$ l 浓度为 100mg/ml 的葡萄糖后,再加 5 $\mu$ l 5% 的糊精;

测定 3:预加 5 $\mu$ l 5% 的糊精后,再加 20 $\mu$ l 500u/ml 的葡萄糖淀粉酶和 10 $\mu$ l 浓度为 100mg $\cdot$ ml<sup>-1</sup> 的葡萄糖;

测定 4:预加 5 $\mu$ l 5% 的糊精后,再加 20 $\mu$ l 500u/ml 的葡萄糖淀粉酶和 20 $\mu$ l 浓度为

100mg/ml 的葡萄糖;  
结果见表 2。

表 2 葡萄糖对测定结果的影响

Table 2 Elimination of glucose effect to results

t/s	5	20	30	40	50	60	70	80	100	120
CK	28	55	86	112	163	218	268	318	415	500
Test 1	30	56	85	112	163	218	268	314	423	501
Test 2	30	52	80	112	170	214	262	316	411	499
Test 3	25	53	78	106	162	215	265	311	412	501
TEst 4	25	55	85	108	165	213	268	318	410	500

从上述结果可看出:采用本测定系统设计的测定程序测定糖化酶的活性单位时,样品和底物中所含的葡萄糖对糖化酶活性的测定的影响均被消除。

#### 2.4 重现性实验

连续 10 次将 100u/ml 的葡萄糖淀粉酶样品注入反应池,结果见表 3。

表 3 连续 10 次进样结果

Table 3 Test fore producibility

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Results	100	101	101	99	100	100	101	101	100	100

对数据进行统计处理:

$$N = 10, X = 100.3, S = 0.675, CV = 0.67\%$$

结果表明,本测定系统对同一样品表现出良好的重现性,其结果偏差小于 0.675( $n = 10$ )。

表 4 线性实验

Table 4 Test of lineary

CK/u·ml <sup>-1</sup>	100	120	150	200	300	375	500
Test 1/u·ml <sup>-1</sup>	103	120	151	201	301	373	500
Test 2/u·ml <sup>-1</sup>	116	141	168	221	320	387	502

#### 2.5 线性实验

首先用 500u/ml 的糖化酶标定仪器,然后分别选用 400u/ml、300u/ml、200u/ml、100u/ml、糖化酶样品连续测定,将测定值输入仪器后按下线性校正键,则仪器自动完成线性校正。线性校正前后样品的测定值见表 4。

测定 1 的结果是先将仪器定标为 500 后,将测定系统进行了线性校正后得到的;

测定 2 的结果是定标为 500 后,测定系统没进行线性校正得到的。

结果表明:用本系统测定糖化酶时,进行线性校正后,进样量在 100~500u/ml 之间的不同酶量表现出良好的线性关系,计算得到线性方程为:

$$Y = 1.742 + 0.985X \quad r = 0.9999$$

## 2.6 回收实验

在 100u/ml 的糖化酶溶液中分别加入不同活力单位的糖化酶样品,作回收率实验,结果如表 5:

表 5 回收率实验  
Table 5 Test for recovery

Samples No.	Added enzyme/u·ml <sup>-1</sup>	Activity measured/u·ml <sup>-1</sup>	Recovery /%
1	50.3	151.0	101.4
2	99.7	201.0	101.3
3	149.8	248.5	99.1
4	199.4	299.0	99.8
5	251.8	345.0	97.3
6	149.8	246.2	97.6
7	199.4	295.0	97.8
8	251.8	351.5	99.9

上述结果表明,回收率在 97.6%~101.4%之间,标准偏差为 1.68%。

## 2.7 对比实验

在酶制剂厂测定有关葡萄糖淀粉酶的样品,并同碘量法进行比较,结果如下:

表 6 对比实验  
Table 6 Comparative Test

Sample No.	Chemical analysis (/u·ml <sup>-1</sup> )	Enzyme electrode (/u·ml <sup>-1</sup> )
1	12334	12500
2	1151564	116825
3	26453	26071
4	109878	110625
5	126491	127500
6	117240	118750
7	111388	109950
8	97000	97833
9	82694	82583
10	100000	101167
11	102439	104000
12	59306	58400

对上述结果进行 t 检验,结果如下:

$$t = 1.652 \quad t_{0.05(11)} = 2.201$$

$$t < t_{0.05(11)} \quad p > 0.01$$

所以上两种方法无显著差异。

## 3 结 论

传统的糖化酶测定方法中,选用可溶性淀粉作底物,根据酶反应产生的葡萄糖量来计算糖化酶的活力单位。因此,可溶性淀粉的来源、质量、特性等直接影响糖化酶活力测定的准确性。本研究是选用已知活力单位的

糖化酶作标准,每次测定值都是同标准糖化酶相比较的相对结果,因此在同一测定系统内,选用可溶性淀粉或糊精作底物对测定结果没有影响。由于糊精试剂配制简单,故本研究选用糊精作底物。另外传统的糖化酶测定方法中是根据还原糖测定的原理来计算糖化

酶反应产生的葡萄糖,在实际分析中可能会有一定的误差,不能真实反映糖化酶的活性单位和糖化酶的质量。而且该方法测定时间过长,操作比较繁琐,人为误差大。本研究建立的方法快速、准确,操作简单,用测定葡萄糖的产生量直接表示糖化酶活性单位,专一性好,结果可靠。样品和底物中葡萄糖对葡萄糖淀粉酶活性的测定有一定的影响,采用本测定系统所选择的测定程序和方法,这种干扰被消除。结果表明用葡萄糖酶电极测定葡萄糖淀粉酶的活性是一种理想的测定方法。

### 参 考 文 献

- [1] Ueda S. Hand Book of Amylases and Enzymes, The Amylase Research Society of Japan, 1988. p.116
- [2] Lubrano G J, Guilbalt G G. Analytica Chimica Acta, 1978, 97:229~236.
- [3] Tcacenco L, Matcescu M A, Chiochel R *et al.* Rev Roum biochim, Apr Jun 1984, 21(2):137~143.
- [4] Lodz M P. Starch/Staerke, 1991, 43(5):190~193.
- [5] 冯德荣, 尚雪芹, 周万里等. 食品与发酵工业 1993, 4:33~37.
- [6] 冯德荣. 全国第二届工业生化论文集, 1987, pp. 3091~3094.

## Study on the Determination of Glucoamylase with Glucose Enzyme Electrode

Shi Jianguo    Zhou Fengzhen    Yang Minghui

Zhu Sirong    Feng Derong

(Shandong Institute of Biology, Jinan 250014)

**Abstract** The glucoamylase's activity is determined with enzyme electrode constructed by immobilized glucose oxidase and hydrogen peroxide electrode. Using this analysis system, the glucoamylase's activity could be determined within 140 seconds, with the determination period no longer than 3 minutes, the linear range 50~500u/ml, and the coefficient of variation 0.67%.

**Key words** Glucose oxidase, enzyme electrode, glucoamylase determination