

測定甜味劑阿斯巴甜之酵素感測器

周淑芬 陳椒華 周隆武
范晉嘉 *陳建源

嘉南藥專食品衛生科
*台灣大學農業化學研究所

摘 要

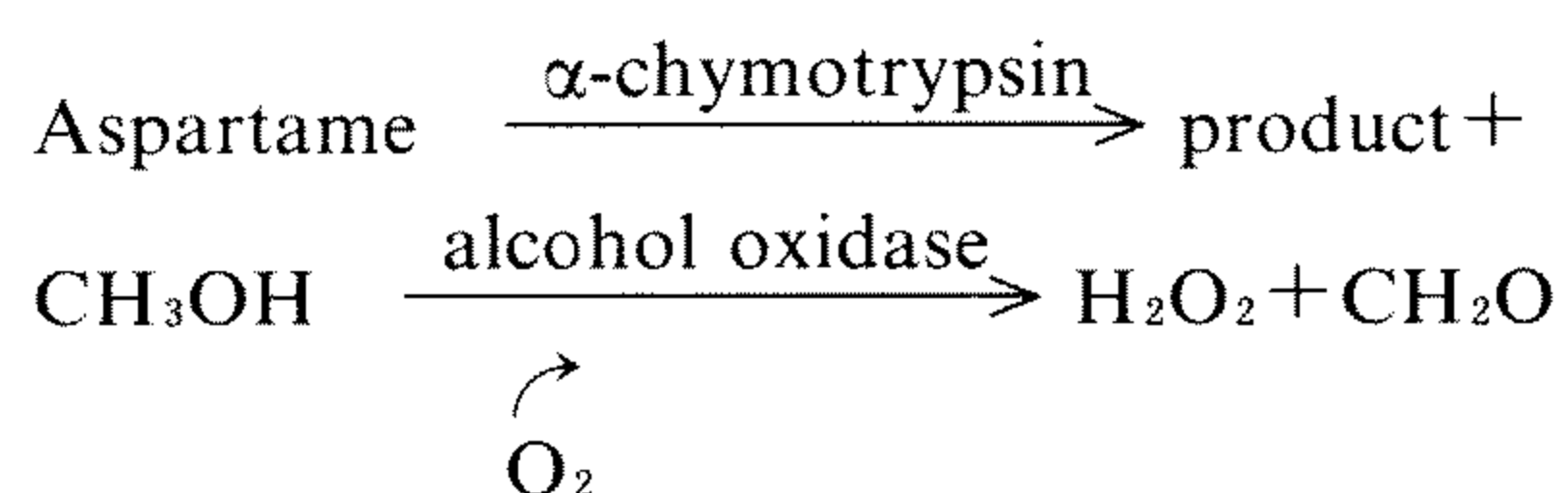
本研究開發出一個能有效、簡便地測定食品中阿斯巴甜(aspartame)含量之酵素感測器。所建立之檢測系統係選定由 α -chymotrypsin及alcohol oxidase所組成之雙酵素系,利用透析膜包覆法(entrapping)固定後與溶氧電極裝置組合,即可有效完成aspartame之定量工作。此酵素感測器最適操作pH值在6.5至8.5之範圍內,最適操作溫度為30°C,一次分析在10分鐘內完成,可有效測定0.1mM至2mM範圍內之受質濃度。若將此固定化酵素電極保存於dithiothreitol溶液中,操作穩定度可達7天以上,可連續操作70次而不會有活性之降低。以此法對三種不含酒精樣品進行檢測,所得結果與商品標示大致吻合(相對誤差在5%內)。

前 言

由人工合成之雙胺基酸阿斯巴甜(aspartame; L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester)是一種低熱量、甜度相當於蔗糖180倍之人工甘味劑,目前已廣泛地應用於各類食品中,其不僅可取代蔗糖,以提供糖尿病患者或其他體重控制者食用,亦能取代在食用後會有苦味且在實驗室中可引起實驗動物癌症的糖精(saccharine)^(1,2)。

由於,阿斯巴甜目前已廣泛應用於許多食品,如代糖、糕點、口香糖、清涼飲料及其他減肥食品和膳療食品中,因售價昂貴,故如何能準確測定其中含量與商品標示是否吻合,以控制並確保商品品質,即顯相當重要。又因食品中阿斯巴甜於長期保存下會有裂解現象產生而使甜度降低⁽³⁾,故對於用來追蹤食品於保存期間品質變化情形之檢測方法之確立即更顯重要。自1984年發展以色層分析法如HPLC、GC、GPC、TLC⁽³⁻⁶⁾為主之分析方法,雖已趨於完備,然因樣品須複雜之前處理,且整個過程冗長而耗時,因此於1985年另發展出以生物感測

器為主之測定方法^(7,8),其係將*Bacillus subtilis* 168 mutant strain固定於氧電極膜上,當它利用基質(aspartame)會引起氧氣濃度之變化而加以偵測,但由於易受溶液中葡萄糖及aspartame之胺基酸組成分干擾,故又於1988年發展出酵素電極法⁽⁹⁾,其係利用L-aspartase將aspartame轉換成氨離子選擇性電極(ammonium-selective electrode)可偵測之型式而加以定量,此法雖不須樣品前處理,但卻易受溶液中aspartate之干擾。故若須避免此缺點又欲利用酵素電極法進行測定,則本研究選擇 α -chymotrypsin及alcohol oxidase雙酵素系配合氧電極來定量即可滿足此項需求。此檢測系統之反應式如下:



主要研究工作在於將此雙酵素系利用透析膜包覆法(entrapping)固定後,與電氣化學裝置組合成酵

素感測系統(enzyme sensor system),並對此系統之最適操作條件(包括pH、溫度、受質濃度、操作穩定度及其他干擾因子等)作一探討,且擬進一步對數種實際商品進行檢測。

材料與方法

一、使用酵素及試劑

α -Chymotrypsin (E.C. 3.4.21.1 from Bovine Pancreas), alcohol oxidase (E.C. 1.1.3.13. from *Hansenula sp.*)兩種酵素及 dithiothreitol 購自 Sigma Chemical Co., U.S.A.。Aspartame 則購自東京化成株式會社。其他藥品均為試藥級製品,購入後均直接使用未經再精製處理。

二、溶氧檢測裝置

(一)Standard Bath Assembly YSI 5301

(二)Standard Oxygen Probe YSI 5357、5331

(三)Biological Oxygen Monitor YSI 5300

以上係購自Yellow Spring Instrument Co.,U.S.A.

三、固定化酵素電極之製備

使用透析膜包覆法(entrapping method)將兩種酵素分開固定:將各約0.5U(1U:依商品標示之酵素活性單位之定義)之兩種冷凍乾燥酵素粉末分別置於透析膜(cutoff 12,000~14,000)上,再將此含酵素之雙層透析膜套在溶氧電極之氣體滲透膜(gas-permeable membrane)上,最後以O-ring套住固定。此含酵素之雙層透析膜套在電極之氣體滲透膜上須依下列順序安裝:先將含alcohol oxidase之膜置於氣體滲透膜上,在將另一含 α -chymotrypsin之膜置於此酵素膜上,如此即可縮短應答時間(response time)。又若將兩種酵素以包覆法共同固定,則會有 α -chymotrypsin將alcohol oxidase分解之現象發生,而使酵素快速失活。安裝完成之電極可保存於4°C,10mM之dithiothreitol溶液中,如此可延長使用壽命。使用前須置於緩衝液中平衡5小時以上。氧電極概略圖與各層酵素膜安裝情形如圖一所示。

四、酵素感測系統之操作

吸取適量緩衝液(0.05M)注入具有循環水流保溫及電磁攪拌之玻璃反應器內,插入固定化酵素

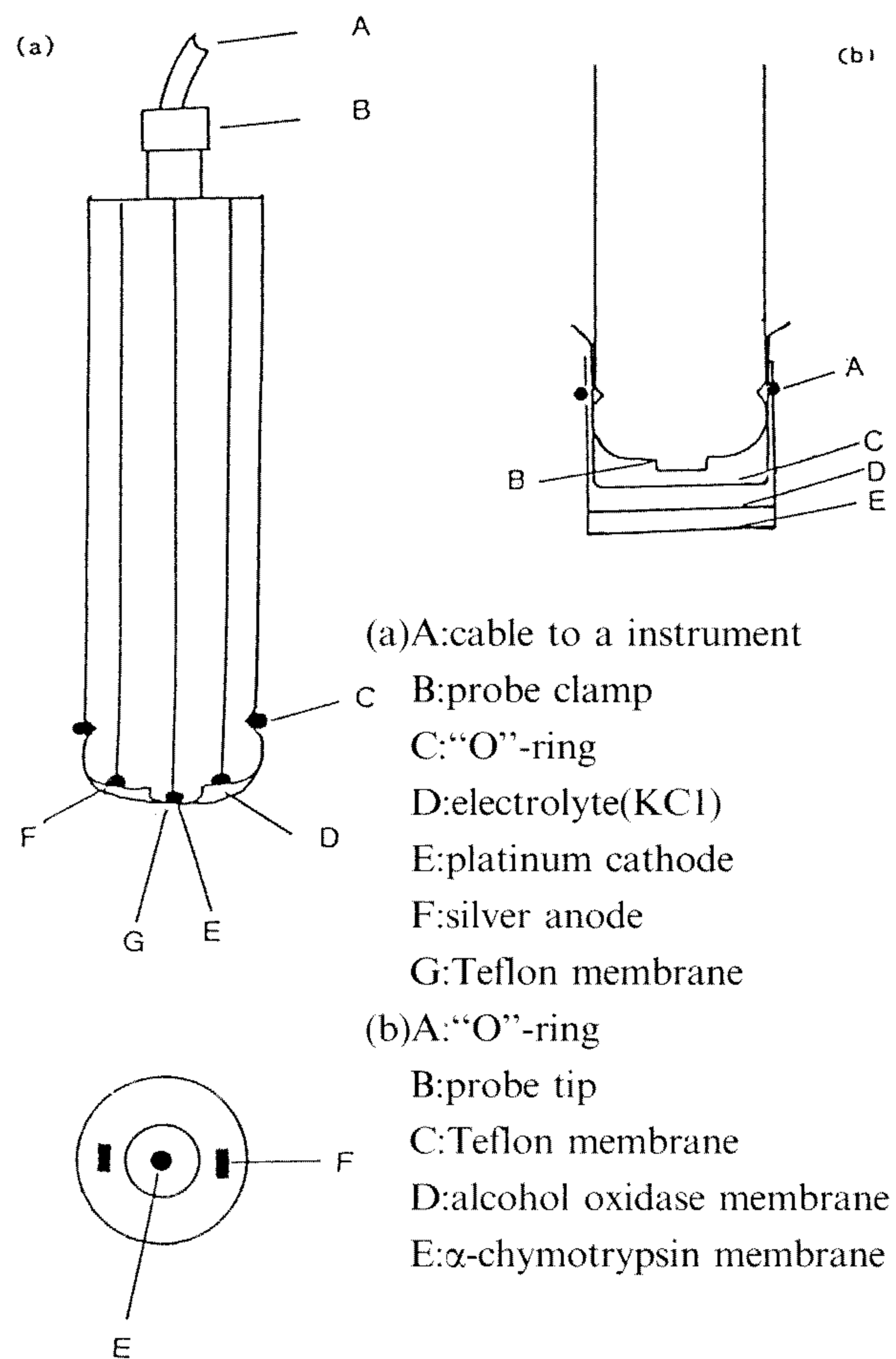


Figure 1. (a) Scheme of D. O. probe (b) Schematic diagram of enzyme membrane arrangement on the tip of D. O. probe

電極後,待氧氣飽和、溫度平衡(30°C, O_2 0.208 μ mol/mL)前加入適量基質溶液進行反應,經紀錄器紀錄得溶氧降低量。感測系統如先前研究⁽¹⁰⁾所示。

結果與討論

一、酵素系統之選定

能將aspartame分子轉換成電極可偵測之形式有幾種酵素分解路徑⁽⁹⁾: (I)以L-aspartase將aspartame轉換成氨離子選擇性電極可偵測之形式,但此系統易受aspartame之組成份胺基酸aspartate之干擾 (II)以L-amino acid oxidase將aspartame轉換成生物溶氧電極可偵測之形式(測定氧氣之消耗),但此酵素之活性(每毫克蛋白質之酵素活性單

位)及選擇性均較低(III)以 α -chymotrypsin及alcohol oxidase雙酵素系將aspartame轉換成生物溶氧電極可偵測之形式(測定氧氣之消耗),本研究即針對改進上述兩種酵素法之缺點,選定以(III)之雙酵素系來建立aspartame感測器,除可避免食品中aspartame所分解出之aspartate干擾,因存在於飲料中之aspartame易於長期保存下裂解出aspartate而使甜度降低,故可用來追蹤食品長期保存下之品質變化情形;亦因此酵素系之酵素活性及選擇性較佳,故可廣泛地應用於多項食品之檢測。

二、酵素感測系統最適操作條件之建立

(一)pH值

將已製備好之固定化酵素電極(含 α -chymotrypsin 250mU及alcohol oxidase 250mU)置於含0.33mM aspartame之不同pH值之緩衝溶液中,測定其溶氧降低值,實驗結果如圖二所示:此系統於pH 6.5~8.5均有最高溶氧降低值,顯示其最適pH值範圍甚廣。

(二)溫度

將同上述之固定化酵素電極分別控制於不同溫度(25°C、30°C、35°C、40°C、50°C、60°C)下,於加入0.33mM濃度之受質後,測定其溶氧降低值。結果顯示:當溫度愈高,電極之應答值愈高,但於60°C以上則顯著下降,而為顧及電極之操作穩定性

及進一步節省能源起見,後續試驗則選定接近室溫之30°C為最適操作溫度。

(三)受質濃度之校正曲線

將同上述之固定化酵素電極分別置於含不同濃度之aspartame緩衝溶液中進行測試,實驗結果由圖三顯示:受質濃度為0.1mM~2mM時,與其溶氧降低值呈線性關係。故試驗所用之樣品須稀釋至此線性關係範圍內之受質濃度為宜。

(四)干擾因子之探討

於緩衝溶液中分別添加數種物質(較可能存在於一般低熱量食品中之成份),視其對此固定化酵素系統之影響,實驗結果由表一顯示:大多數低熱量食品中之成份及aspartame本身胺基酸組成份對此系統並不造成干擾,但若使用Tris緩衝溶液即有干擾現象,故反應進行時以採用磷酸緩衝液為佳。又由於此固定化酵素系統之最適操作pH值範圍甚廣,實驗證明若以去離子水代替緩衝溶液,電極之應答值並不受影響,且可省去配製緩衝液之步驟,故後續試驗則可用去離子水來進行反應。

(五)操作穩定度試驗

一個固定化酵素系統之操作穩定性對其是否具有實際工業上之應用價值有相當重要之關係,故本實驗即對此系統進行操作穩定度試驗,其結果由圖四顯示:若將此酵素電極保存於10mM之dithiothreitol溶液(此為一種抗氧化劑,可保護酵素之硫氫基(-SH)不受氧化),穩定度可達七天而無活性降低,並可連續操作70次以上,但若未保存於該溶液中,則活性僅能維持兩天。

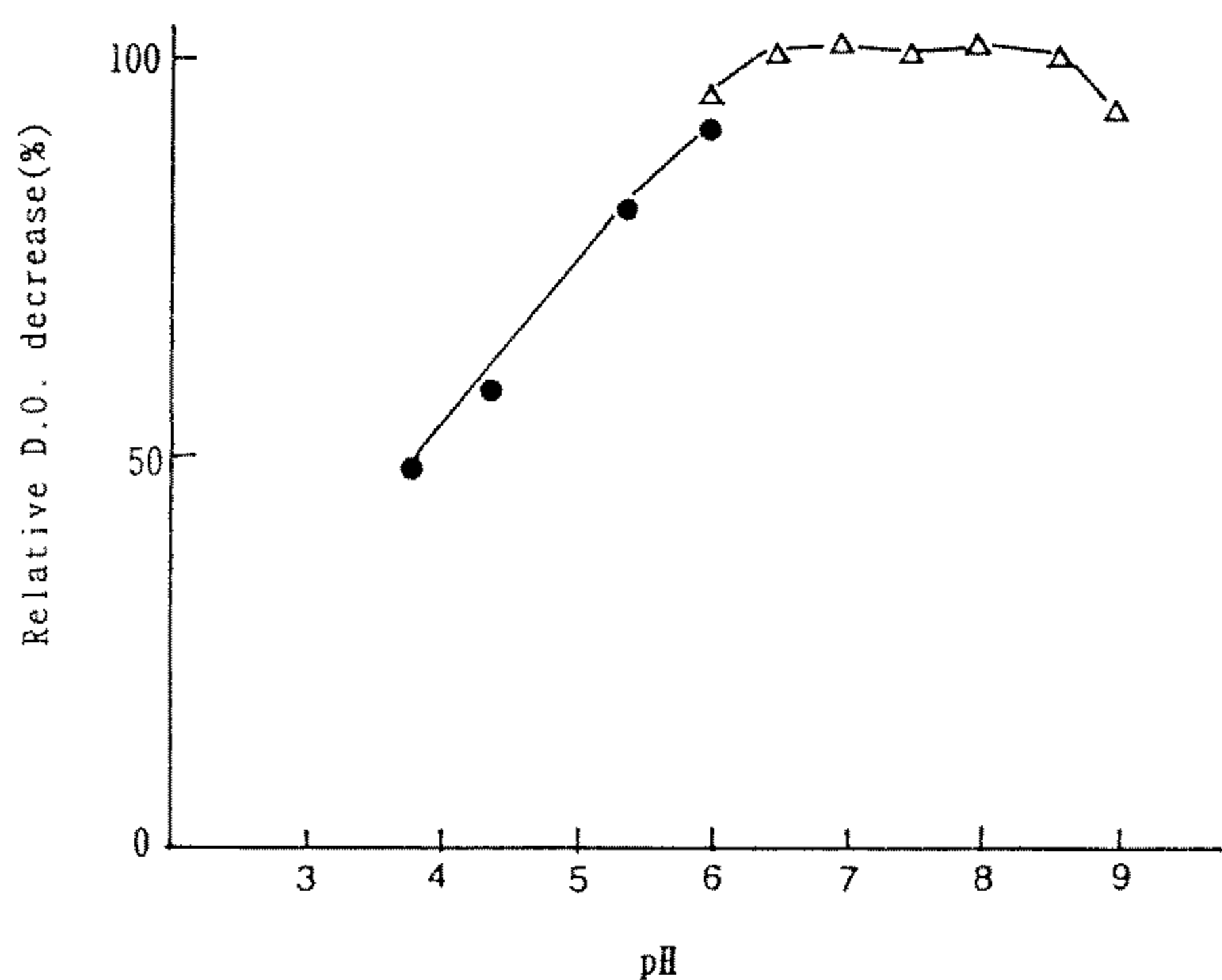


Figure 2. Effect of pH on enzyme sensor system

●:0.05M acetate buffer

△:0.05M phosphate buffer

Reaction temp.:30°C

Relative D. O. decrease:相對溶氧降低值(個別測得之溶氧降低值除以所測得最高之溶氧降低值)

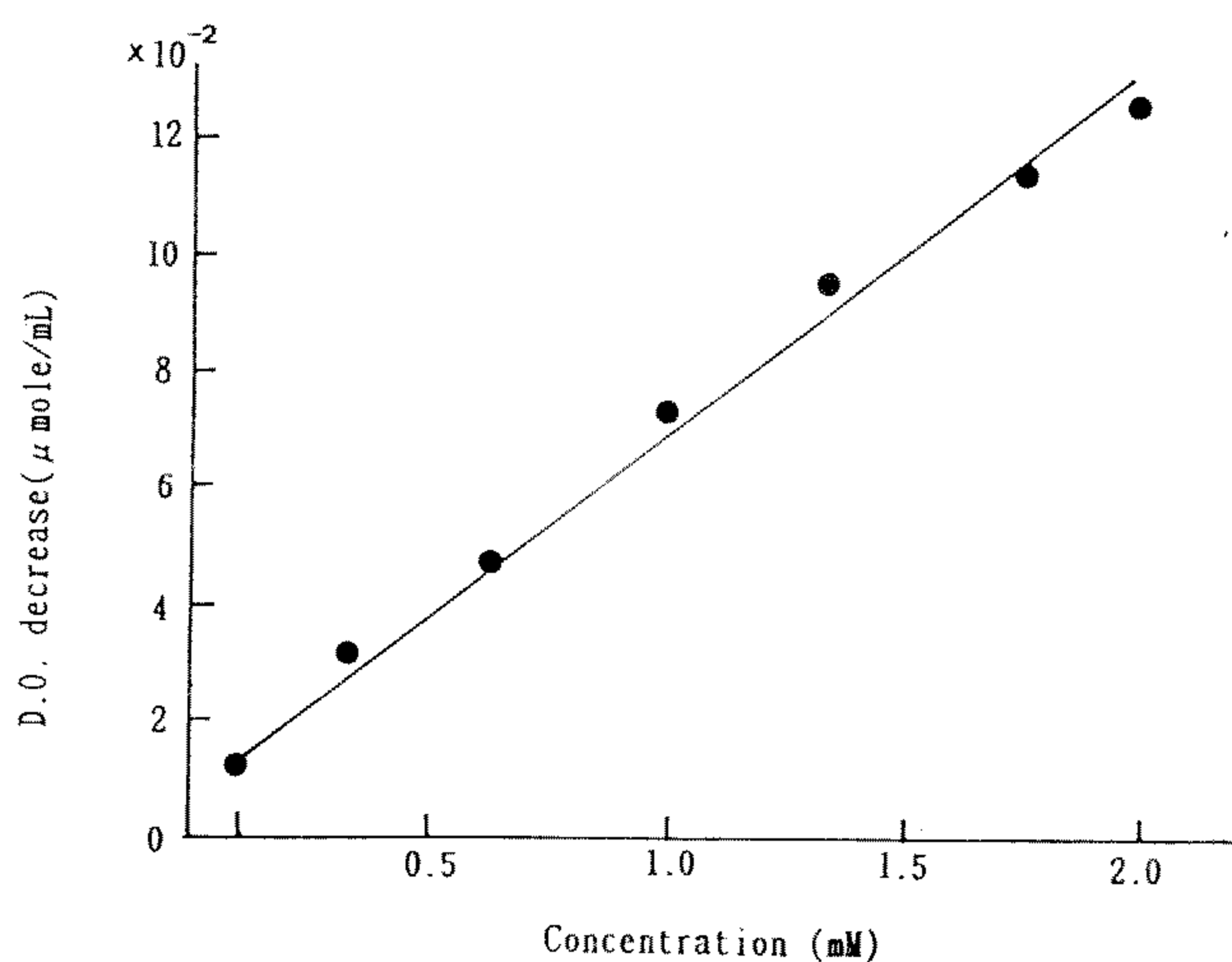


Figure 3. Calibration curve of aspartame concentration for enzyme sensor system

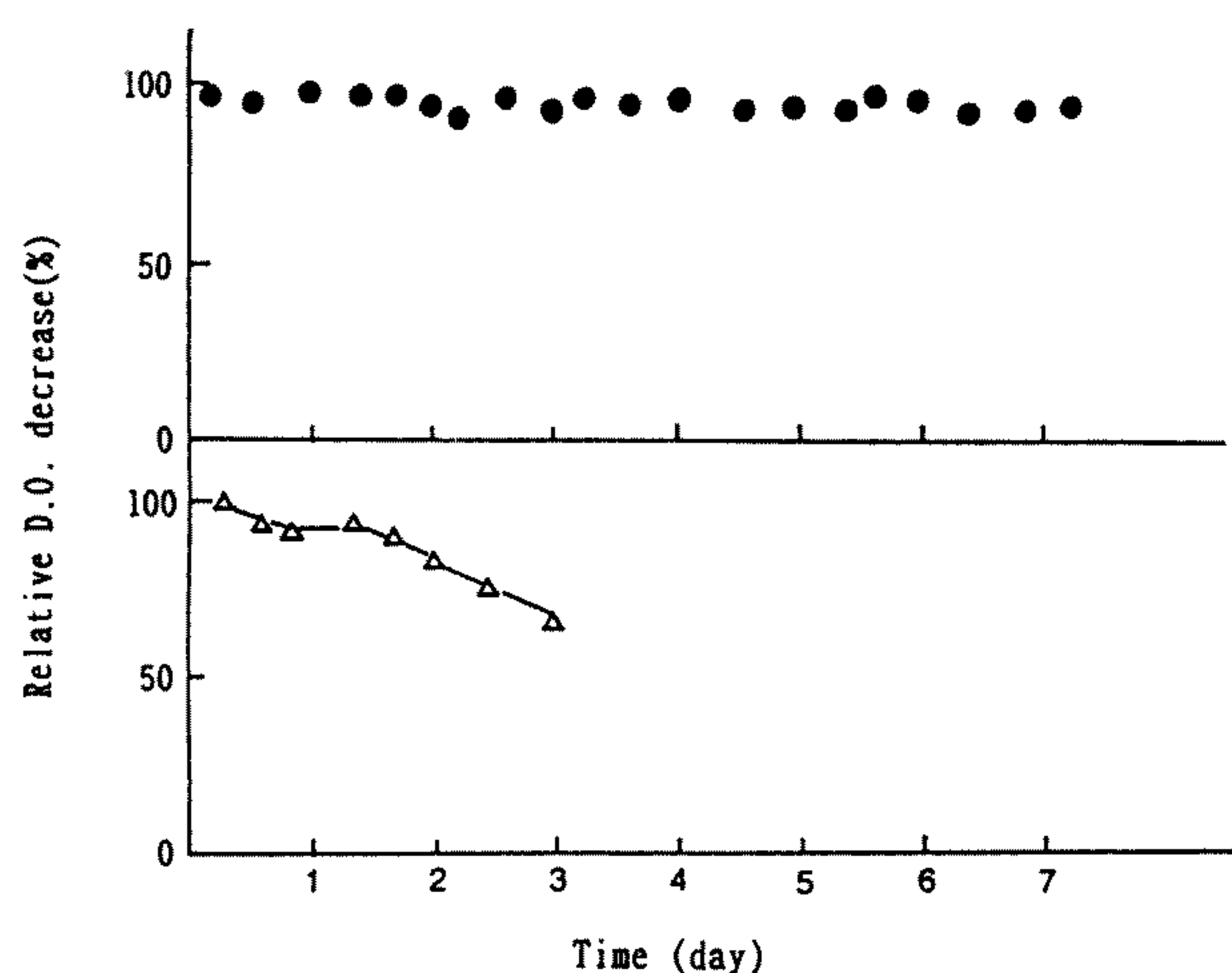


Figure 4. Operational stability of enzyme sensor system

●: stored in dithiothreitol solution

△: stored in buffer solution

Reaction temp.: 30°C

Relative D. O. decrease: 相對溶氧降低值

Table 1. Interfere factors of enzyme sensor system

Materials*	Relative response(%)
Aspartame	100
Sucrose	0
Lactose	0
Dextrin	0
Dextrose	0
L-Aspartate	0
L-phenylalanine	0
Citric acid	0
Succinic acid	0
Tris	82
Phosphate	0
Silicon dioxide	0
● Sodium benzoate	0

*Concentration: 0.33mM

(六) 實際樣品之測試

以所建立之固定化酵素感測系統對三種市售低熱量食品進行檢測。所用之商品中有兩種為粉末狀代糖：其一為aspartame與dextrin之混合物，另一為lactose、aspartame、silicon dioxide之混合物；另一種商品為低熱量可口可樂，成分為碳酸、焦糖、檸檬酸、苯甲酸鈉、咖啡因及aspartame等，測試時樣

Table 2. Determination of aspartame in commercial products with an enzyme sensor system

Sample ^a	Aspartame content(%)	
	Nominal ^b	Enzyme sensor method
A	3.8	3.70
B	3.5	3.56
C	2.7	2.58

^a A: aspartame+lactose+silicon dioxide; B: aspartame+dextrin; C: diet coke

^b Labelled values provided by manufacturer

品均不需前處理，經溶解後即可測定其溶氧降低值，再由所得應答值對照aspartame之標準曲線，即可得知其中aspartame之含量，實驗結果由表二顯示：以此酵素電極法進行分析，所得結果與商品標示大致吻合（所用商品保存時間未超過一個月），相對誤差在5%以內。由於所用 α -chymotrypsin及alcohol oxidase二種酵素會受蛋白質及一級醇⁽¹¹⁾干擾，因此將避免含蛋白質及酒精性食品之檢測。

結 論

本研究所建立以 α -chymotrypsin及alcohol oxidase雙酵素所組成之固定化酵素感測系統，可有效地應用於數種市售低熱量食品之檢測（含蛋白質及酒精性食品除外），並可用來追蹤食品長期保存下之品質變化情形。而為進一步提高此感測系統之操作穩定性，以利未來能有實際應用之價值，故後續研究仍朝如何改進酵素固定化方法，尋找更適當之固定化材料之方向而努力。相關實驗已在本研究室中進行，實驗結果將在近期內提出報告。

誌 謝

本研究承蒙行政院國家科學委員會補助研究經費(NSC-83-0117-C041-010-B)，謹此致謝。

參考文獻

1. Cloninger, M. R. and Baldwin, R. E. 1974. L-Aspartyl-L-Phenylalanine Methyl Ester (Aspartame) As a Sweetener. J. of Food Science. 39: 347-349.

2. Cloninger, M. R. and Baldwin, R. E. 1970. Aspartylphenylalanine Methyl Ester: A Low Caloric Sweetener. *Science*. 170: 81-84.
3. Tsang, W-S., Clarke, M. A. and Parrish, F. W. 1985. Determination of Aspartame and Its Breakdown Products in Soft Drinks by Reverse-Phase Chromatography with UV Detection. *J. Agri. Food Chem.* 33: 734-738.
4. Hussein, M. M., D'Amelia, R. P., Manz, A. L., Jacin, H. and Chen, W-T. C. 1984. Determination of Reactivity of Aspartame with Flavor Aldehyde by Gas Chromatography, HPLC and GPC. *J. of Food Science*. 49: 520-524.
5. Homler, B. E. 1984. Properties and Stability of Aspartame. *Food Technol.* 38(5-8): 50-55.
6. Issaq, H. J., Weiss, D., Ridlon, C., Fox, S. D. and Muschik, J. B. 1986. *J. Liq. Chromatogr.* 9:1791-1795.
7. Renneberg, R., Riedel, K. and Scheller, F. 1985. Microbial Sensor for Aspartame. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21:180-181.
8. Rechniz, GA. 1981. Bioselective Membrane Electrode Probes. *Science*. 214: 287-291.
9. Guilbault, G. G., Lubrane, G. J., Kauffma, J. -M. and Patriarche, G. J. 1988. Enzyme Electrodes for the Sugar Substitute Aspartame. *Anal. Chim. Acta*. 206:369-374.
10. 蘇遠志、周淑芬. 1993. 以複合酵素系統檢測澱粉之酵素感測器. *中華生質能源學會會誌*. 12(3-4):109-120.
11. Bergmeyer, H. U. 1984. *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd Ed. Vol. 2. pp. 143. 藝軒圖書出版社. 台北.

Determination of the Sweetener Aspartame with an Enzyme Sensor

SHU-FEN CHOU, JIAN-HUA CHEN, LONG-WU CHOU, JIN-JIA FAN, *CHIEN-YUAN CHEN

Department of Food Health, Chia-Nan College of Pharmacy, Tainan Hsien, Taiwan, R.O.C.

**Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.*

ABSTRACT

This study attempted to establish an efficient, convenient enzyme sensor for the determination of aspartame in foodstuff.

The sensor system we investigated was a bienzyme system composed of α -chymotrypsin and alcohol oxidase, immobilized by an entrapping method with dialysis membrane, subsequently combined with the dissolved oxygen electrode equipment. This method was able to determine aspartame efficiently. The optimum operational conditions for the enzyme sensor were pH 6.5~8.5 and 30°C. A linear relationship was

observed between D.O. decrease and the aspartame concentrations in the range of 0.1-2mM. One assay could be completed within 10 minutes. When the enzyme electrode was stored in dithiothreitol solution, the system was stable for more than 7 days and 70 assays. When this system was used for the determination of aspartame in commercial non-alcoholic products, the results were found to be in close agreement with the labelled values provided by manufacturer (within 5% of the relative error).

Key Words : Enzyme sensor, entrapping method, α -chymotrypsin, alcohol oxidase, aspartame