

农药生物传感器所用酶的比较研究

王仲海, 徐 斐

(上海理工大学低温生物技术研究, 上海 200093)

摘 要:在利用农药对酶的抑制反应来检测农药的方法中,选用的酶既可以是动物酯酶,也可以是植物酯酶。本文采用分光光度计法,对植物酯酶和动物酯酶在不同 pH 值下的酶活、抑制程度等性质进行了实验研究。结果表明:动物酯酶中的苍蝇酯酶、蝇蛆酯酶与植物酯酶中的小麦酯酶相比,它们的活力和被农药抑制程度处于相近的水平;植物酯酶中小麦与玉米相比,玉米酯酶的活力远低于小麦酯酶的活力,不适于用来进行抑制反应来检测农药。动物酯酶在 pH 值为 7.5 时活力最高,小麦酯酶在 pH 值 6.5 时最高。

关键词:农药残留;比色法;植物酯酶;动物酯酶

Abstract: Both animal - esterase and plant - esterase can be inhibited by pesticide. So, plant - esterase, as well as animal - esterase, can be used to detect pesticide residue. In this paper, plant - esterases, compared with animal - esterase were studied on activity, inhibition degree and related properties. The results of experiment showed that the activity of plant - esterases and inhibition degree on plant - esterases was almost the same as animal - esterases. Both as plant - esterase, corn esterase's activity was much lower than wheat's. So it was not suitable to detect pesticide by using corn esterase. The pH effect was also studied. The optimal pH value for plant - esterase was 6.5, and that for animal - esterase was 7.5.

Key words: pesticide residue; colorimetry; plant - esterase; animal - esterase

中图分类号: X592; TB6

文献标识码: A

文章编号: 1002 - 6300 - (2003)01 - 0021 - 03

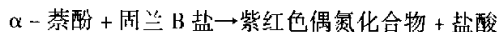
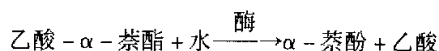
有机磷农药作为一类高效、广谱的杀虫剂被广泛应用于农业生产中。但大量使用造成在空气、土壤和水中的持久残留,对环境产生了严重危害。因此对有机磷农药残留的检测非常重要^[1,2]。

目前检测农药普遍采用的有色谱法、波谱法和酶抑制法等。色谱法检测准确,但成本高,检测时间长,需要具备一定技术水平的专业人员才能进行操作,只适合在实验室进行;波谱法干扰因素多,灵敏度不高,易出现假阴性结果,一般只能作为鉴别方法粗选;酶抑制法具有操作简便,速度快,适合现场检测和大批样品筛选检测的特点,且不需昂贵的仪器,因此作为一种检测农药的常用方法得到广泛应用^[3-5]。

抑制反应中所用的酶,绝大多数为动物酶。对植物酶的研究还很少。但植物酶具有来源方便,成本低的优点。如能使用植物酶进行抑制反应,将在很大程度上降低检测成本^[6]。通过实验我们发现,在酶活性和抑制程度上有些植物酶与动物酶相比并不逊色。用植物酶进行抑制反应的检测完全可行。

1 抑制反应测农药的原理

农药能抑制酶的活性。若试样中有农药残留,则酶被农药抑制。其被抑制程度可用比色法测定。本实验中试样采用乙酸- α -萘酯,显色剂为固兰 B 盐。其原理为^[6,7]:



当酶被抑制程度不同时,紫红色偶氮化合物产量不同,溶液颜色深浅不同,通过分光光度计的吸光度可测出其变化,进而测出农药的残留量。

2 材料与方法

2.1 实验材料

动物材料:苍蝇、蝇蛆,购买于无锡轻工大学食品科学系。

植物材料:小麦 8 种(小偃 54、周麦 9 号、豫麦 39、豫展 2 号、豫农 9345、豫麦 18、豫麦 4 号和漯麦 4 号),

收稿日期:2002-07-15

基金项目:国家自然科学基金项目(50176032);上海市农科委项目(2001 II-4)

作者简介:王仲海(1975-),男,硕士研究生,主要从事低温生物技术的研究。

玉米 2 种 (郑单 14、豫玉 25), 由河南农业大学国家小麦工程中心提供。

固兰 B 盐、乙酸- α -萘酯为美国 Sigma 公司试剂, 其它试剂均购买于上海化学试剂公司。

2.2 实验方法

2.2.1 提酶

动物酯酶: 将苍蝇和蝇蛆磨成粉, 与水按 1:20 比例混合, 置于锥形瓶中振荡 12h。取出过滤, 滤出液即为原酶。

植物酯酶: 将小麦和玉米磨成粉, 与水按 1:5 比例混合, 置于锥形瓶中振荡 12h, 取出过滤, 滤出液即为原酶。

2.2.2 酶活测定

缓冲液的 pH 值从 3.6、4.0、4.5... 至 8.0。其中 pH3.6~5.5 为醋酸盐, pH6.0~8.0 为磷酸盐^[8]。固兰 B 盐的浓度是 0.8%, 溶剂为 3.4% 的 SDS 溶液。

在 1.95ml 缓冲液 (pH3.6~8.0) 中加入 0.05ml 底物 (乙酸- α -萘酯), 振荡混合; 再加入稀释好的酶液 0.50ml, 振荡混合, 在 27℃ 反应 15min。然后加入固兰 B 盐 0.50ml, 经振荡混合, 在 27℃ 进行显色反应 10min, 然后在 595nm 波长处用分光光度法测其活力。一个酶活单位定义为: 在特定反应条件下, 每 min 催化底物水解产生 2×10^{-10} mol α -萘酚所需的酶量。

2.2.3 抑制实验

农药取敌敌畏, 配制在缓冲液中, 浓度为 10^{-5} mol/L。在上述测酶活的体系中将缓冲液换为此缓冲液, 其它条件不变, 可以测得被农药抑制后的酶活。利用未抑制时的酶活数据, 就可以计算出抑制程度。抑制程度定义如下:

$$\text{抑制程度} \alpha = \frac{\text{未抑制时的酶活} - \text{抑制后酶活}}{\text{未抑制时的酶活}}$$

3 结果与讨论

3.1 酶活比较

3.1.1 植物酯酶酶活比较

植物酯酶我们共试验了 8 种小麦, 2 种玉米。按原计划玉米也取样 8 种, 但进行了 2 组实验后, 发现其酶活很小, 与小麦比较相差甚远, 没有多做的必要。

图表 1 为小麦与玉米的酶活比较。为表示得更清楚, 小麦仅列出了酶活最大的 2 种: 小偃 54、豫麦 39。玉米为豫玉 25 和郑单 14。

小麦酯酶中酶活最大值为小偃 54 在 pH6.0 时, 其值为 1851。其余 7 种酶活高峰也基本都出现在

pH6.0 左右, 其值从 737~1851 不等。2 种玉米酯酶的最大酶活分别为 199 和 1102, 其中豫玉 25 虽在 pH4.5 时的酶活达到 1102, 但其平均酶活仍很小。

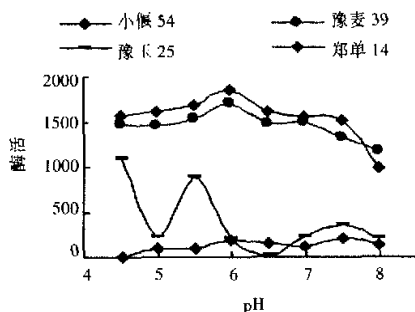


图 1 小麦和玉米不同 pH 值的酶活对比

3.1.2 动物酯酶酶活比较

动物酯酶一共采用了 2 种: 苍蝇和蝇蛆。它们都在 pH 值为 7.5 时酶活最大: 苍蝇为 1665, 蝇蛆为 904。如图表 2。

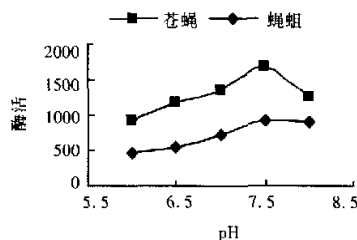


图 2 动物酯酶不同 pH 值的酶活

实验结果表明: 绝大多数植物酯酶在 pH6 时酶活最大; 而动物酯酶则在 pH7.5 时酶活最大。需要注意的是, 提动物原酶时与水混合的比例是 1:20, 而植物酶是 1:5。因此不能说植物酶的酶活一定比动物酶大。但可以得出结论: 利用此种方法提取的动物酯酶和植物酯酶的活性属于同一层次。

3.2 植物酯酶与动物酯酶抑制程度比较

图表 3 为植物酯酶与动物酯酶的抑制程度比较。植物酯酶仍选取酶活最高的 2 种 (均为小麦酯酶); 动物酯酶一共 2 种: 苍蝇和蝇蛆。

从中可以看出, 此两种动物酯酶与小麦酯酶的抑制程度水平也在一个层次上。两者的抑制程度都在 pH 值为 6~6.5 时最高。动物酯酶抑制程度最大值是苍蝇酯酶在 pH6.5 时, 为 71%。植物酯酶中的豫麦 39 在 pH6.0 的抑制程度达到了 73%。

4 结语

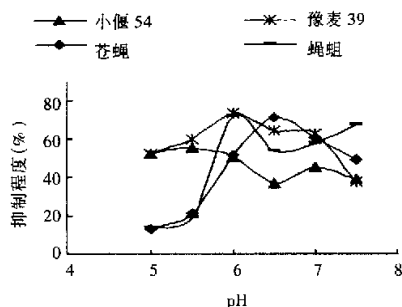


图3 几种植物酯酶与动物酯酶对 10^{-6} mol/L 敌敌畏抑制程度的对比

从以上的讨论可以看出,在利用抑制原理测农药残留的方法中,植物酯酶与动物酯酶相比,酶活与抑制程度等各项指标均不逊色。同时又具有来源方便,成本低的优势。通过我们的实验,植物酯酶能够稳定、准确地检测到浓度为 10^{-6} mol/L 的敌敌畏。这已经是一个安全限度。因此采用抑制植物酯酶检测农药残留是完全可行的。

参考文献:

- [1] Lea Pogacnik, Mladen Franko. Determination of organophosphate and carbamate pesticides in spiked samples of tap water and fruit juices by a biosensor with photothermal detection[J]. Biosensors & Bioelectronics, 1999, 32: 569 - 578.
- [2] Gogol E V et al. Amperometric biosensors based on nafion coated screen - printed electrodes for the determination of cholinesterase inhibitors. Talanta [J], 2000, 53: 379 - 389.
- [3] 邹伟民, 赵晓联. 有机磷农药检测方法综述[J]. 江苏食品与发酵, 2001(1): 28 - 30.
- [4] 纪淑娟, 赵丽丽, 冯辉. 蔬菜有机磷农药残留快速检测方法的评价[J]. 中国蔬菜, 2001, (2): 6 - 8.
- [5] Nicole Jeffrezic - Renault. New Trends in Biosensors for Organophosphorus Pesticides[J]. Sensors, 2001(1): 60 - 74.
- [6] 李治祥, 翟延路. 应用植物酯酶抑制技术测定蔬菜水果中农药残留量[J]. 环境科学学报, 1987, (12): 472 - 478.
- [7] Nanda Kumar N V, Visweswarish K, Majumder S K et al. Quantification of cholinesterase inhibition on TLC for estimation of parathion [J]. Agr Biol chem, 1976, 40 (2): 431 - 432.
- [8] 李建武, 于瑞元, 袁明秀. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994.

紫胶可食性内包装膜成膜特性及应用研究

唐莉英, 赵虹, 陈军, 甘瑾, 蔡静

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 昆明 650216)

摘要: 本文研究了淀粉加紫胶醇溶液改性后, 制作可食性内包装膜的成膜特性及应用研究。经过云南省科学技术情报研究所查新表明, 该研究国内无文献报道。该膜的成膜特性受其浓度、干燥温度、丙三醇、环氧氯丙烷含量的影响。该膜具有较好的防水、阻潮性; 较高的机械强度; 无毒无害、可被人体吸收、可自然降解。对面包进行涂膜处理可以有效地防止霉变, 延长保质期, 使其在贮藏过程中酸度、重量损失度明显低于其它对照组。该膜的应用前景十分广阔。

关键词: 淀粉; 紫胶; 可食膜

Abstract: The paper has studied the edible film made of Lac alcohol solution and starch. There was no such report in China after the survey of Yunnan Information Institute of Science and Technology. This film forming such characteristics yet, would be affected by concentration, drying temperature, glycerin and epoxy chloropropane content. This film showed better waterproof, moist proof and higher strength. It was also found that this film was harmless and decomposable. The treatment of bread coated by this film could lower the browning rate obviously and restrain the respiration of bread. During the storage, the loss rate of total acid and weight loss rate of coated bread were lower than the controls, so the film would have wide application prospects.

Key words: starch; lac; edibility

中图分类号: S789; TS206

文献标识码: A

文章编号: 1002 - 6630(2003)01 - 0023 - 05

收稿日期: 2002 - 08 - 15

基金项目: 云南省自然科学基金项目部分内容(1999C0026Q)

作者简介: 唐莉英(1967 -), 女, 副研究员, 工学硕士, 主要从事林产化学加工研究工作。