

植物酯酶源的筛选及最佳提取条件的确定

张天灵,魏金会,李 洋,于海生,王亚飞
(黑龙江八一农垦大学,黑龙江 大庆 163319)

摘要:为建立蔬菜、水果中农药残留的快速检测方法,以 2,6-二氯乙酰苯酚为显色剂,对不同来源的植物酯酶进行筛选,以总酯酶活力和比活力为考核指标,确定最佳植物酯酶源。结果表明:苜蓿酯酶的活力和比活力最大,苜蓿为最佳植物酯酶源,酯酶最佳提取条件是在 4℃,以 pH7.0 的 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲溶液为提取剂,料液比 1:10,提取时间 10 min。

关键词:植物酯酶;筛选;提取条件

中图分类号:S481.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)04-0133-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.04.0133

我国是农业大国,近年来粮食产量也逐年上升,然而,由于农作物病虫害,每年要损失粮食近 250 亿 kg,各类经济作物 1 800 万 t^[1]。为了防治病虫害,提高农作物产量,长期以来大量使用并依赖化学农药。目前我国的农药生产和使用居世界第一,单位面积化学农药的平均用量比世界平均水平高 2.5~5.0 倍^[2]。由于农药的大量、低水平的使用,用药者缺乏安全意识,导致农产品中的农药残留超标现象严重,由此引发的急性中毒乃至死亡事件时有发生,因此,对农产品上市前进行农药残留的检测监控显得尤为重要。近年来,关于蔬菜、水果中农药残留的快速检测方法的研究报道很多,植物酯酶抑制法以其原料来源广、检测成本低廉、酯酶保存时间长、检测所需时间短、适合现场检测等优点备受关注^[3]。目前,用于农药残留快速检测的植物酯酶都是从小麦^[4]、大豆^[5]、玉米^[6]、荞麦、豌豆^[7]等粮食作物中提取的,本试验拟从来源广、价格低廉的牧草中寻找合适的植物酯酶源,并对其提取条件进行优化研究。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为大米、小米、玉米、面粉、大豆,均购自农贸市场;紫花苜蓿、黄花锦鸡儿、白花三叶草、小叶章,采自试验田。

试验所用仪器和试剂有 AR124CN 分析天平、H2050R-1 高速冷冻离心机、Tu1901 型紫外可见分

收稿日期:2014-11-10
基金项目:黑龙江八一农垦大学校级大学生创新实验资助项目
第一作者简介:张天灵(1992-),女,黑龙江省大庆市人,在读硕士,从事植物保护研究。
通讯作者:王亚飞(1969-),女,硕士,副教授,从事化学教学与应用化学研究。E-mail:wangyafei6969@163.com。

Analysis on Error in Determining Amylose Content of Rice by Spectrophotometry

DUAN Chuan-ling¹, LAN Jing², ZHANG Hong-kun¹

(1. Department of Food and Environmental Engineering, East University, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: In order to accurately measure amylose content, the effect of degreasing, acidity, addition of iodine and chromogenic time on the absorbance value was investigated on the basis of the existing national standards. The results showed that addition of iodine and chromogenic time had a great impact on the experimental error. Iodine's adding amount should be accurately controlled between 1.0±0.1 mL, greater than 1.1 mL resulted in higher absorbance value, less than 0.9 mL induced lower absorbance value. In order to reduce experimental error, chromogenic time for the same batch of samples should be controlled within 2 hours. Degreasing times and acidity had little effect on measuring error.

Keywords: spectrophotometry; rice; amylase; error

光光度计、EMS-10TS 恒温水浴锅、PHS-3C 精密 pH 计、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液、 HAc-NaAc 缓冲溶液、 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液、 $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (分析纯)、酒石酸钾钠(分析纯)、硫酸铵(分析纯)、牛血清蛋白(北京拜尔迪生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 配制缓冲溶液 用酸度计分别配制 pH7.0,浓度为 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸盐、醋酸盐和氯化铵缓冲溶液;pH 为 7.0,浓度为 0.01、0.05、0.10、0.20 和 $0.30\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液;pH 分别为 4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0 的浓度为 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液。

1.2.2 确定最佳植物酯酶源^[7] 根据对大米(I)、

小米(Ⅱ)、玉米(Ⅲ)、面粉(Ⅳ)、大豆(Ⅴ)、苜蓿(Ⅵ)、锦鸡儿(Ⅶ)、三叶草(Ⅷ)和小叶章(Ⅸ)中提取的植物酯酶的酶活力和比活力比较,确定最佳植物酯酶源。

1.2.3 确定最佳提取条件 为了提高苜蓿酯酶的提取率,按照表 1 试验因素及水平进行单因素最佳提取条件确定,采用 $\text{L}_{16}(4^5)$ 正交试验设计表进行酯酶提取、总酶活(Y)及比活力的测定(见表 1),以确定出酯酶的最佳提取工艺。

2 结果与分析

2.1 最佳植物酯酶源的确定

从图 1 和图 2 可以看出,苜蓿酯酶的总酯酶活力和比活力都明显高于其它酶源,所以,本试验确定苜蓿为最佳植物酯酶源。

表 1 试验因素及水平
Table 1 Experimental factors for levels

水平 Levels	A 提取剂 Extraction	B 提取剂 pH pH of extraction agent	C 提取温度/℃ Extraction temperature	D 提取时间/min Extracting time	E 料液比 Ratio of material and liquid
1	$\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$	6.5	<4	立即	5
2	HAc-NaAc	7.0	10	10	10
3	$\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O-NH}_4\text{Cl}$	7.5	20	20	20
4	H_2O	8.0	30	30	30

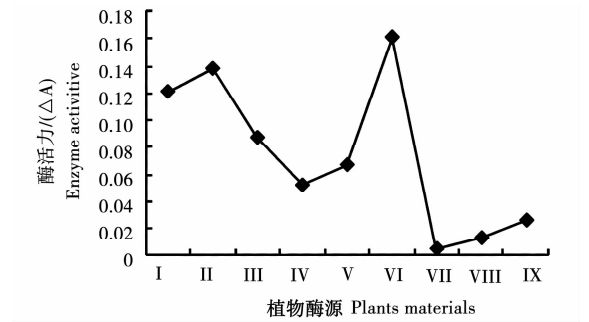


图 1 不同植物酶源总酯酶活力

Fig. 1 General esterase activity of different phytoesterases

2.2 单因素结果分析

2.2.1 提取剂对苜蓿酯酶酶活和比活力的影响

分别用 pH 为 7.0 的 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液、水、 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨-氯化铵缓冲溶液和 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸-醋酸钠缓冲溶液提取苜蓿中的酯酶,并测定其总酯酶活力和比活力。由图 3 和图 4 看出, $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液提取的苜蓿酯酶酶活和比活力最大,所以,确定磷酸盐缓冲溶液为最佳提取剂。

2.2.2 提取剂浓度对苜蓿酯酶活力和比活力的

影响 从图 5 和图 6 可以看出:用 pH 为 7.0 的 $0.10\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液为溶剂提取的苜蓿酯酶的酶活力和比活力明显高于其它浓度的缓冲溶液提取剂。所以,本试验确定磷酸盐缓冲溶液的最佳提取浓度为 $0.10\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

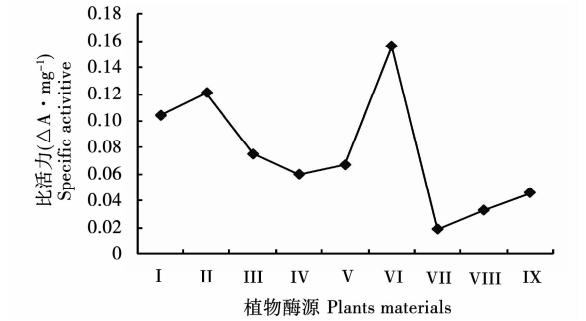
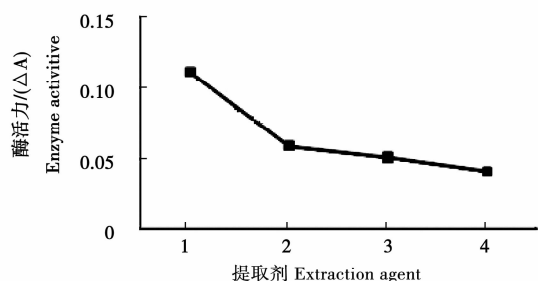


图 2 不同来源植物酯酶比活力

Fig. 2 Specific activity of different phytoesterases

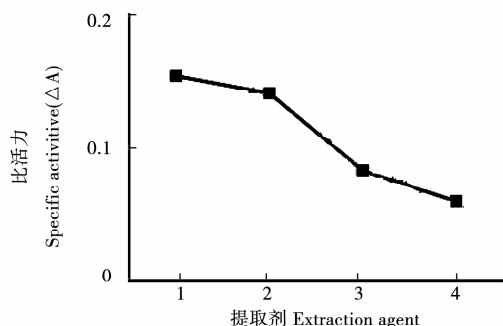
2.2.3 pH 对苜蓿酯酶活力的影响 从图 7 看出,用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液提取苜蓿酯酶^[8],pH 为 7.0 时酯酶活力(ΔA)明显高于其它 pH 的磷酸盐缓冲溶液。因此,本试验选择提取剂的 pH 为 7.0。



1:0.1 mol·L⁻¹ phosphate; 2: water; 3: 0.1 mol·L⁻¹ Ammonia-ammonium chloride; 4: 0.1 mol·L⁻¹ Acetate-sodium acetate

图3 不同提取剂对酯酶活力的影响

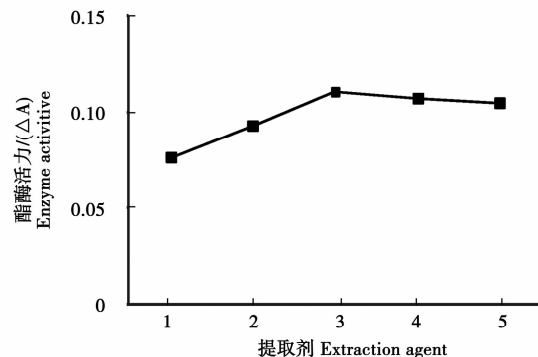
Fig. 3 Effect of different extraction on the activity of esterase enzyme



1:0.1 mol·L⁻¹ phosphate; 2: water; 3: 0.1 mol·L⁻¹ Ammonia-ammonium chloride; 4: 0.1 mol·L⁻¹ Acetate-sodium acetate

图4 不同提取剂对酯酶比活力的影响

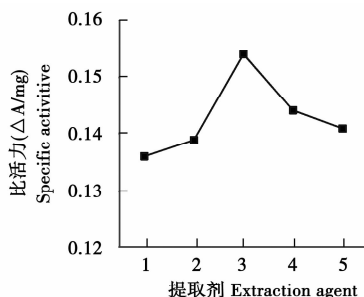
Fig. 4 Effect of different extraction on the specific activity of esterase enzyme



1:0.01 mol·L⁻¹ phosphate; 2: 0.05 mol·L⁻¹ phosphate; 3: 0.10 mol·L⁻¹ phosphate; 4: 0.20 mol·L⁻¹ phosphate; 5: 0.30 mol·L⁻¹ phosphate

图5 不同浓度提取剂对酯酶活力的影响

Fig. 5 Effect of different extraction agent on the activity of esterase enzyme



1:0.01 mol·L⁻¹ phosphate; 2: 0.05 mol·L⁻¹ phosphate; 3: 0.10 mol·L⁻¹ phosphate; 4: 0.20 mol·L⁻¹ phosphate; 5: 0.30 mol·L⁻¹ phosphate

图6 不同浓度提取剂对酯酶比活力的影响

Fig. 6 Effect of different extraction agent on the specific activity of esterase enzyme

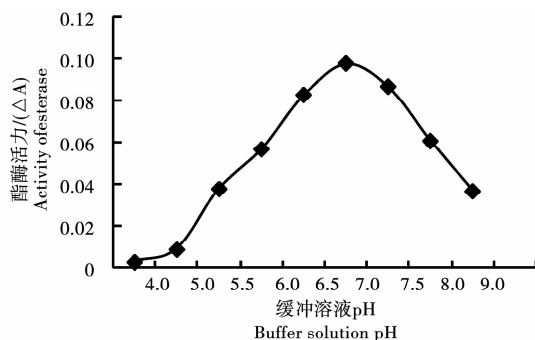


图7 提取剂 pH 对酯酶活力的影响

Fig. 7 Effect of different extraction pH on the activity of esterase enzyme

2.2.4 温度对苜蓿酯酶活力的影响 从图8可以看出,用 0.1 mol·L⁻¹ pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液提取苜蓿酯酶,4℃时酯酶活性最高,且随温度的升高,酯酶活性逐渐降低,因此,本试验提取温度选择 4℃。

2.2.5 料液比对苜蓿酯酶活力的影响 从图9可看出,用 0.1 mol·L⁻¹ pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液提取苜蓿酯酶,在料液比为 1:10 时其酯酶活力(ΔA)均高于其它料液比溶液。因此本试验选择 1:10 为最佳料液比。

2.2.6 提取时间对苜蓿酯酶活力的影响 从图10可以看出,4℃下用 0.1 mol·L⁻¹ pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液以 1:10 的料液比提取苜蓿酯酶随着提取时间增多,酯酶活力先升高,达到一定值后又降低。提取时间为 10 min 时,酶活力(ΔA)最高。所以,本试验最佳提取时间确定为 10 min。

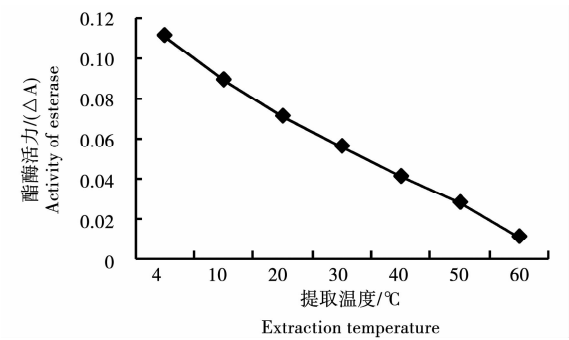


图 8 不同提取温度对酯酶活力的影响

Fig. 8 Effect of different extraction temperature on the activity of esterase enzyme

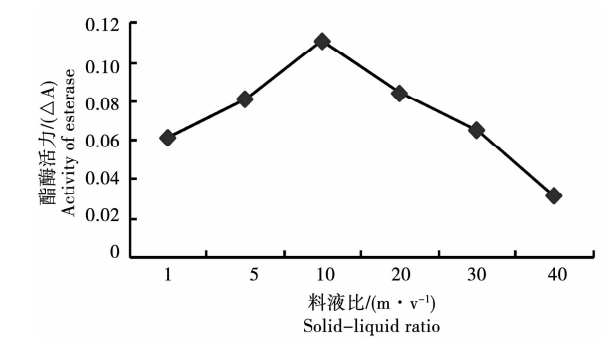


图 9 不同料液比对酯酶活力的影响

Fig. 9 Effect of different solid-liquid ratio on the activity of esterase enzyme

表 2 正交试验设计及试验结果

Table 2 Orthogonal experiments and experimental results

试验编号	A 提取剂	B 提取剂 pH	C 提取温度	D 提取时间	E 料液比	吸光度值	Y 总酶活	蛋白含量/	比活力	备注
Test	Extraction	pH of extraction	Extraction	Extraction	Solid-liquid	Absorbance	Total enzyme	(mg·mL ⁻¹)	Specific	
No.	agent	agent	temperature	time	ratio	value	activity	Protein content	activity	
1	1	1	1	1	1	0.767	0.095	0.698	0.136	过滤慢
2	1	2	2	2	2	0.991	0.101	0.720	0.140	
3	1	3	3	3	3	0.580	0.071	0.565	0.126	
4	1	4	4	4	4	0.428	0.044	0.420	0.105	
5	2	1	2	3	4	0.011	0.003	0.115	0.026	不变色
6	2	2	1	4	3	0.328	0.026	0.376	0.069	
7	2	3	4	1	2	0.000	0.000	0.067	0.000	
8	2	4	3	2	1	0.127	0.007	0.183	0.038	
9	3	1	3	4	2	0.159	0.013	0.255	0.051	过滤慢
10	3	2	4	3	1	0.534	0.061	0.519	0.118	
11	3	3	1	2	4	0.406	0.038	0.392	0.097	
12	3	4	2	1	3	0.562	0.068	0.554	0.123	
13	4	1	4	2	3	0.000	0.000	0.129	0.000	不变色
14	4	2	3	1	4	0.142	0.009	0.223	0.040	
15	4	3	2	4	1	0.611	0.088	0.685	0.128	
16	4	4	1	3	2	0.252	0.019	0.337	0.056	
k ₁	2.766	0.937	1.753	1.471	2.039					
k ₂	0.466	1.995	2.175	1.524	1.402					
k ₃	1.661	1.597	1.008	1.377	1.470					
k ₄	1.005	1.369	0.962	1.526	0.987					
K ₁	0.692	0.234	0.438	0.368	0.510					
K ₂	0.116	0.499	0.544	0.381	0.350					
K ₃	0.415	0.399	0.252	0.344	0.368					
K ₄	0.251	0.342	0.242	0.382	0.247					
R	0.575	0.265	0.303	0.037	0.263					
主次顺序	A>C>B>E>D									
最优组合	A ₁ B ₂ C ₂ D ₁ E ₁									

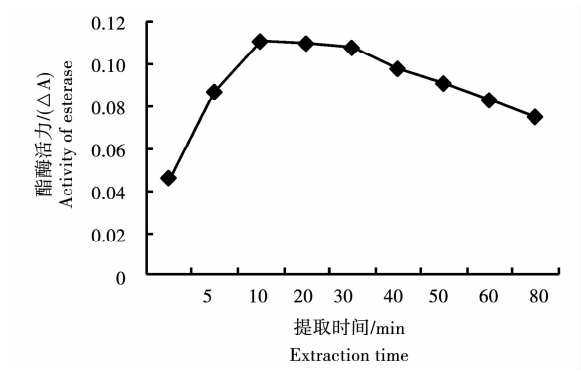


图 10 不同提取时间对酯酶活力的影响

Fig. 10 Effect of different extraction time on the activity of esterase enzyme

2.3 正交试验结果分析

从表 2 可见,吸光度值与酶活成正比,以酶活为考察指标时,A、B、C、E 四因素对酶活性均有极显著影响,各因素影响的主次顺序为 A>C>B>E>D,即对酶活影响程度最大的是提取剂种类,然后是提取温度,影响程度最小的是提取时间。据此,可确定苜蓿中植物酯酶提取的最优工艺为 A₁B₂C₂D₂E₂。通过正交试验得出最佳提取工艺为 A₁B₂C₂D₄E₁,而在单因素试验中,4℃时提取酯酶活性最大,因此为了进一步确定出酯酶最优

表 3 不同工艺提取结果

Table 3 Different extraction processes results				
实验组合 The combined experiment	吸光度值 Absorbance value	Y 总酶活 Total enzyme activity	蛋白含量/ (mg·mL ⁻¹) Protein content	比活力 Specific activity
A ₁ B ₂ C ₂ D ₄ E ₁	0.917	0.077	0.663	0.116
A ₁ B ₂ C ₂ D ₂ E ₂	0.991	0.101	0.720	0.140
A ₁ B ₂ C ₁ D ₂ E ₂	1.017	0.111	0.721	0.156
A ₁ B ₂ C ₁ D ₄ E ₁	0.943	0.086	0.660	0.130

提取工艺,分别按照 A₁B₂C₂D₄E₁、A₁B₂C₂D₂E₂、A₁B₂C₁D₂E₂及 A₁B₂C₁D₄E₁工艺进行酯酶提取和酶活力测定(见表 3)。

从表 3 可以看出,当提取剂和提取 pH 确定后,提取温度对酯酶活性的影响很大,所以最终确定植物酯酶最佳提取条件为:A₁B₂C₁D₂E₂,即以 pH7.0 的 0.1 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲溶液为提取剂,提取温度 4℃,料液比 1:10,提取时间 10 min。

3 结论

根据对大米、小米、玉米、面粉、大豆、苜蓿、锦鸡儿、三叶草和小叶章中提取的植物酯酶的酶活力(ΔA)和比活力(ΔA·mg⁻¹)比较,得出苜蓿为最佳植物酯酶源。通过单因素试验和 L₁₆(4⁵)正交试验最终确定植物酯酶最佳提取条件为:pH 7.0 的 0.1 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲溶液为提取剂,提取温度 4℃,料液比 1:10,提取时间 10 min。

参考文献:

[1] 李丽颖. 多名代表委员呼吁为植物保护立法[J]. 农药市场信息,2011(3):7.

[2] 章建森. 我国农药平均用量比世界高 2.5 至 5 倍[J]. 农药市场信息,2011(7):7.

[3] 刘云国,汪东风,李八方,等. 食品中农药及药物残留检测技术研究进展[J]. 海洋水产研究,2004,25(2):83-87.

[4] 肖建军,华泽钊,徐斐,等. 用于测量农药残留的小麦酯酶的选择[J]. 分析测试学报,2002,21(2):11-14.

[5] 温艳霞,李建科. 有机磷农药检测用植物酯酶的研究[J]. 食品科学,2006,27(4):123-126.

[6] 于基成,边辞,赵娜,等. 酶抑制法快速检测蔬菜中有机磷农药残留[J]. 江苏农业科学,2006(5):170-172.

[7] 王亚飞,张金艳. 农药残留检测用植物酯酶源的筛选[J]. 江苏农业科学,2011,39(4):375-376.

[8] 王亚飞,张金艳. 苜蓿酯酶的提取分离及性质测定[J]. 食品科技,2012,37(8):173-175.

Screen of Plant Esterase and Optimum Extraction Condition

ZHANG Tian-ling, WEI Jin-hui, LI Yang, YU Hai-sheng, WANG Ya-fei
(Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319)

Abstract: In order to set up a rapid detection for the pesticide residue in vegetables and fruits, taking 2,6-dichloro-ro-acetyl indophenol as chromogenic agent, different sources of plant esterases were contrasted in the presence of pesticide. The results showed that the total activity and the specific activity of the alfalfa esterase were the highest compared with other sources, so the optimum source was from alfalfa. The optimum conditions as follows: the temperature below 4℃; pH 7.0; 0.1 mol·L⁻¹ phosphate buffered solution as the extracting agent; soild-liquid ratio 1:10; and the extraction time for 10 min.

Keywords: plant esterase; selection; extraction condition