

不同植物酯酶对 α -乙酸萘酯催化活性研究

阮长青¹, 杨娟², 郭德军¹

(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 罗定职业技术学院, 广东 罗定 527200)

摘要: 为从不同作物中筛选出一种适于有机磷农药残留快速检测的酶源, 研究不同作物种子、不同生长期、不同部位植物酯酶对底物 α -乙酸萘酯催化作用的变化规律。结果表明: 种子发芽及幼苗期后几种植物的酯酶活性总体呈现递减趋势, 几种植物种子中的酯酶活性大小顺序依次为: 小麦 > 大豆 > 玉米 > 水稻; 龙麦 26、豫麦 39、麦 976189 种子酯酶活性较高; 经过粉碎筛分后的龙麦 26 不同部位中, 麸片酯酶活性最高。建议利用龙麦 26 麸片作为酶法快速检测有机磷农药的酶源。

关键词: 植物酯酶; α -乙酸萘酯; 催化活性; 有机磷农药

Catalytic Activity of Esterases from Different Crops to α -Naphthalene Acetic Acid

RUAN Chang-qing¹, YANG Juan², GUO De-jun¹

(1. College of Food Science, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319, China;

2. Luoding Polytechnic College, Luoding 527200, China)

Abstract: In order to screen an esterase source for rapid determination of organophosphorus pesticide residues, the changes in catalytic activity of esterases from wheat, corn, soybean and rice to α -naphthyl acetate were investigated during the development period from seed to seedling, and the catalytic activities of esterase from different parts of wheat seeds were compared. The results indicated that for all the four crops, the esterase activity presented general declining trend during the sprouting and seedling periods and the catalytic activities of esterase from seeds decreased in the following order: wheat, corn, rice and soybean. Seeds of wheat Longmai 26, Yumai 39 and Mai 976189 showed higher esterase activity than the others and the highest esterase activity was observed in the brans of wheat Longmai 26. The bran of wheat Longmai 26 is therefore, highly recommended as an esterase source for fast detection of phosphate pesticide residues.

Key words: plant esterase; α -naphthyl acetate; catalytic activity; organophosphorus pesticide

中图分类号: TS207.5.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)13-0183-04

有机磷农药是一种动物体组织器官中乙酰胆碱酯酶和神经性靶标酶的抑制剂^[1-2], 它通过对作物的直接污染、环境间接吸收、生物富集及食物链转移, 在植物、动物体内产生蓄积作用, 而通过食源等途径对人体产生急性毒性、遗传毒性、生殖毒性以及免疫毒性作用^[3]。利用动物和微生物来源的胆碱酯酶快速检测有机磷农药的研究已取得一些成就^[4-7]。1976 年 Kumar 等^[8]提出了 α -乙酸萘酯在乙酰胆碱酯酶的作用下能够水解生成乙酸和 α -萘酚, 当酶受到有机磷农药的抑制后, 水解速度下降, 可根据产物显色反应的变化指示农药含量。动物来源胆碱酯酶来源有限、保持期短、需冷冻低温保存, 而植物酶源易得, 提取和保存较为方便、检测时间短、成本低, 测量准确度和精密度均较好^[9-12]。国家标准对

于蔬菜、肉、茶中有机磷及氨基甲酸酯的快速检验方法均采用了酶抑制率法, 并以面粉为酶源^[13-15], 研究者也均利用小麦种子整粒或市售面粉作为酶源材料。由于小麦品种和面粉的来源不同, 其酶的活性可能不同^[16]; 不同生长期及不同部位酯酶活性也存在着差异, 因此, 目前有机磷农药检测所用植物酯酶存在着活性部位不明确的弊端。研究不同作物、不同品种在种子休眠期、芽期、幼苗期的酯酶活性, 筛选出一种用于检测农产品及环境中有机磷农药残留的优良酶源, 能够为深入研究其纯化及固定化技术、酶与底物反应的动力学特性、酶与有机磷农药作用的量效关系提供依据。

1 材料与方法

收稿日期: 2008-12-20

基金项目: 科技部“十五”食品安全重大专项项目(2001BA804A43); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(10541160)

作者简介: 阮长青(1968—), 男, 副教授, 博士研究生, 研究方向为食品营养与安全。E-mail: cqruan@163.com

1.1 材料、试剂与仪器

玉米(龙福丹、垦粘1号);大豆(绥农14、绥农4、垦农5、垦农18、垦农19);水稻(农大4034、空育131);小麦(豫麦39、龙麦26、麦97189、麦6239、垦农31)。大豆及水稻由黑龙江省850农场种子站提供,玉米及小麦由黑龙江八一农垦大学植物科技学院提供,均为当年种子。

PBS缓冲溶液(pH6.8);显色基质(125mg固蓝B盐加入80.0ml H₂O;125mg α -乙酸萘酯溶于80ml乙醇,上述两溶液按1:9混合,40℃恒温水浴下保温10min)^[9-10]。所用试剂均为分析纯。

LRMM8040-3-D实验磨粉机、LFS-30粉筛、HPG-280HX智能人工气候植物箱、HEQ-F160全温振荡培养箱、JJ-2B电动高速捣碎机、TGL16M高速冷冻离心机、FD-1D冷冻干燥机、754紫外-可见分光光度计。

1.2 方法

1.2.1 酶源的处理

种子处理:将各种子由实验磨粉机直接粉碎后,制备酶液。对于酯酶活性较高的作物种子,用粉筛将磨下的混合物分离为麸片、麦渣、麦心、粗粉4个部分^[17],分别制备酶液。

发芽实验:选取籽粒饱满、无破损及霉变的大豆、玉米、水稻、小麦种子按照《国际种子检验规程》进行发芽实验^[18],发芽末期即为幼苗初期。

幼苗培养:供试种子浸种后播于装有消毒沙的瓷盘内,于人工气候植物箱内控制相对湿度60%、光照强度7500lx,每天分别在20℃、16h和30℃、8h(小麦20℃恒温)条件下培养。

酶清液的制备:粉碎和筛分后的种子分别按1:5(m/V)加入蒸馏水,4℃下混匀浸泡4h后磨碎;切取芽中部和幼苗上展第一叶片中部(去除叶脉)剪碎,4℃下研磨成匀浆^[18-19]。按照整粒(或筛分后)种子、芽和幼苗中的水分含量^[18],在匀浆液中分别加入不同体积的水使各试样保持相同的干物质浓度,在全温振荡培养箱中4℃、110r/min条件下振摇2h,同温下抽滤后取滤液于4℃、3500r/min条件下离心10min,再经4℃条件下10000r/min离心15min后制得酶清液^[19],冻干后4℃保存备用。

1.2.2 酶活性测定

取一定量酶冻干粉加入PBS缓冲溶液1.0ml,加入显色基质1.0ml,定容至10.0ml,以蒸馏水为空白,于490nm波长处比色,用水解产物 α -萘酚与固蓝B盐反应后试液的吸光度表示酶的活性^[20-21]。每次实验设计3次重复,5个平行。

2 结果与分析

2.1 大豆酯酶活性的变化

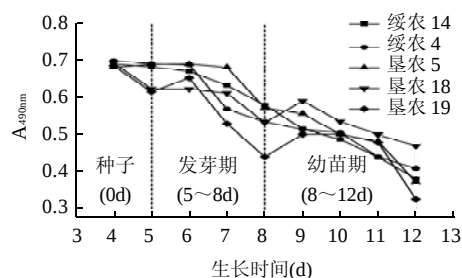


图1 大豆种子及不同生长期酯酶的活性

Fig.1 Catalytic activities of esterase from soybean at different growth stages

由图1可知,大豆种子及发芽初期时酯酶的活性较高,发芽期(5~8d)后及幼苗期(8~12d)酶活性总体呈递减趋势,其中幼苗期酯酶活性递减较明显。种子中绥农4种子中酯酶活性最高,垦农5种子中最低。发芽7d后各品种酯酶活性变化较大,垦农5种子至7d芽之酯酶活性较高。这是由于大豆种子中的有机态磷和镁,发芽时转变成无机态,并以迅速移向生长部位,伴随着相应酶系的变化,从而一定程度上抑制酯酶的活性,引起种子中酯酶活性高于发芽及幼苗期。而垦农18、垦农19种子在幼苗期(8d后)酶活性呈现上升后下降趋势,可能是由于这两个品种幼苗期酶液中的非特异性酯酶的产生及活性变化所致^[22-23]。

2.2 玉米酯酶活性的变化

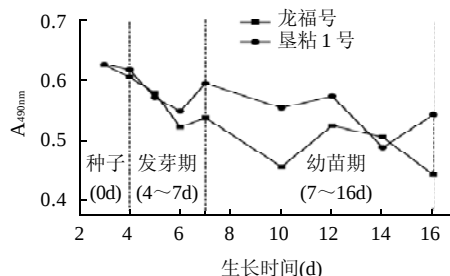


图2 玉米种子及不同生长期酯酶的活性

Fig.2 Catalytic activity of esterase from corn seeds at different growth stages

由图2可知,玉米种子及发芽(4~7d)初期时酯酶活性较高,龙福丹与垦粘1号种子中酯酶活性差异不大;芽期及幼苗期(7~16d)酯酶活性总体呈递减趋势,但幼苗期后两品种酯酶活性均呈现锯齿型下降趋势,幼苗8d后垦粘1号的酯酶活性大于龙福丹。表明该类酶在弱酸及种子发芽初期才得以活化。而幼苗初期植物由营养生长向并进生长过渡,叶片处于伸长期阶段,光和产物输出较多,酯酶随脂肪代谢变化后活性呈下降趋势。而幼苗期后两品种酯酶活性均呈锯齿型下降,可能是由于幼苗期酶液中的非特异性酯酶的产生及活性变化较大豆垦农18、垦农19种子明显所致。

2.3 水稻酯酶活性的变化

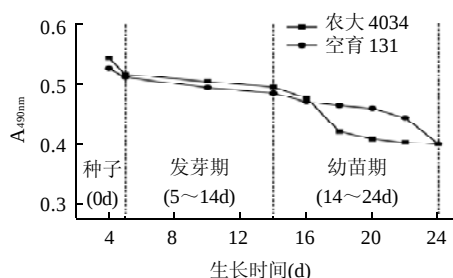


图3 水稻种子及不同生长期酯酶的活性

Fig.3 Catalytic activity of esterase from rice at different growth stages

由图3可知,水稻品种农大4034、空育131种子、芽(5~14d)及幼苗(14~24d)叶片酯酶活性均呈递减趋势,农大4034种子及芽期酶活性大于空育131,而在幼苗期(14d)后酶活性下降较明显,且低于空育131。可能由于水稻发芽时,种子内大量的菲丁消失,磷酸减少,而无机磷增加,导致酶系的相应变化^[24],作用于底物的酯酶下降所致。两种水稻种子中酶活性同大豆、玉米相比相对较低。

2.4 小麦酯酶活性的变化

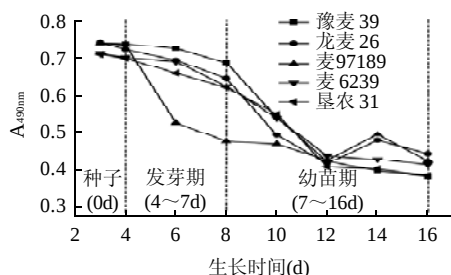


图4 小麦种子及不同生长期酯酶的活性

Fig.4 Catalytic activity of esterase from wheat at different growth stages

由图4可知,小麦种子、芽及幼苗中酯酶活性变化规律与大豆相似,总体呈下降趋势。几种小麦品种种子中,豫麦39、龙麦26和麦97189酶活性均较高且相近,芽期(4~8d)豫麦39和龙麦26酶活性降低较缓慢,幼苗期(8~16d)麦97189在发芽4d后酶活性迅速下降后缓慢降低。在幼苗期12d后,龙麦26和麦97189幼苗酯酶活性上升后又有所下降,这与大豆垦农18、垦农19种子和玉米种子、芽及幼苗期酯酶的活性变化规律相似。

2.5 龙麦26种子不同部位酯酶的活性

由图5可知,龙麦26经破碎处理后,各部位酯酶活性不同,麸片中酶活性最高,粗粉最低。这是由于小麦麸片主要由糊粉层和皮层组成,而糊粉层贮存有大量的淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶^[25],而其中的特异性酯

酶的含量也较高。

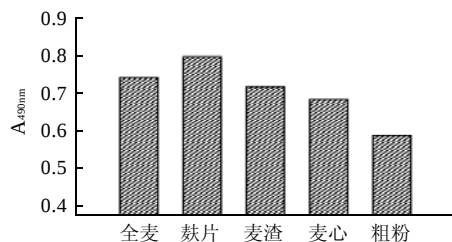


图5 龙麦26不同活性部位酯酶活性

Fig.5 Catalytic activity of esterase from various parts of Longmai 26 seeds

3 讨论

大豆、玉米、水稻、小麦种子中整体破碎后,以 α -乙酸萘酯为底物考察酯酶活性时,发芽初期酶活性下降缓慢,而发芽后期及幼苗期下降明显。种子在萌发过程中,淀粉酶、蛋白酶、磷酸酶等主要水解酶吸水后得以活化^[26],但作为酯酶B类^[9, 27],既能够作用于底物 α -乙酸萘酯,又能够被有机磷农药所抑制,与种子休眠期相比较,萌发后特异性酯酶可能参与了脂类的合成,导致酯酶活性有所下降。实验条件下几种种子酯酶活性的顺序为:小麦>大豆>玉米>水稻,其中龙麦26、豫麦39、麦97189种子中酯酶活性较高。

鉴于龙麦26已在黑龙江、内蒙、新疆等高寒地区大面积种植,考虑酯酶活性以及品种来源的广泛性,本实验选用了强筋小麦品种龙麦26作为酯酶提取的材料。由于种子中皮层、胚乳、胚等活性部位中酯酶活性分布可能不同,本研究将龙麦26种子筛分为麸片、麦渣、麦心、粗粉4个部分研究其酯酶活性,经测定,发现龙麦26种子麸片中酯酶活性最高,可作为有机磷农药残留检测的优良酶源,从而更利于提高植物酯酶与有机磷农药作用的敏感性和方法的检测限^[28]。

筛选出的龙麦26麸片中的酯酶有待于进一步深入研究其纯化技术、酶学特性及其与有机磷农药的作用机制。

参考文献:

- [1] FUKUTO R T. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides[J]. Environmental Health Perspectives, 1990, 87: 245-254.
- [2] COSTA L G. Current issues in organophosphate toxicology[J]. Clinica Chimica Acta, 2006, 366(1/2): 1-13.
- [3] 张波, 李鹏. 食品中有机磷杀虫剂残留对人体健康的损害作用[J]. 中国食品学报, 2004, 4(4): 98-102.
- [4] SINGH A K, FLOUNDERS A W, VOLPONI J V, et al. Development of sensors for direct detection of organophosphates. Part I: immobilization, characterization and stabilization of acetylcholinesterase and organophosphate hydrolase on silica supports[J]. Biosensors and Bioelectronics, 1999, 14(8/9): 703-713.

- [5] JAFFREZIC-RENAULT N. New trends in biosensors for organophosphorus pesticides[J]. *Sensors*, 2001, 1(2): 60-74.
- [6] 郭晶, 高菊芳, 唐振华. 乙酰胆碱酯酶的动力学机制及其应用[J]. *农药*, 2007, 46(1): 18-22.
- [7] 余孝颖. 有机磷农药对不同生物来源的胆碱酯酶选择性抑制的研究[J]. *环境科学*, 1996, 17(4): 41-43.
- [8] KUMAR N V N, VISWESWARIAH K, MAJUMDER S K. Quantification of cholinesterase inhibition on TLC for estimation of parathion[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1976, 40(2): 431-432.
- [9] 李治祥, 翟延路. 应用植物酯酶抑制技术测定蔬菜水果农药残留量[J]. *环境科学学报*, 1987, 7(4): 472-478.
- [10] 侯明迪. 植物酯酶法快速测定有机磷农药残留的研究[J]. *食品科学*, 2002, 23(7): 111-115.
- [11] 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.
- [12] 孟玲, 翁霞, 刘长江. 利用植物酯酶快速检测有机磷农药残留的研究进展[J]. *农药*, 2006, 45(5): 306-308.
- [13] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 18630—2002 蔬菜中有机磷及氨基甲酸酯农药残留量的简易检验方法 酶抑制法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [14] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 18625—2002 茶中有机磷及氨基甲酸酯农药残留量的简易检验方法 酶抑制法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [15] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 18626—2002 肉中有机磷及氨基甲酸酯农药残留量的简易检验方法 酶抑制法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [16] 杨东鹏, 张春荣, 董民, 等. 用于检测蔬菜有机磷和氨基甲酸酯类农药残留的酶抑制分光光度法研究进展[J]. *中国农学通报*, 2004, 20(2): 37-39; 51.
- [17] 郭祯祥. 小麦加工技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 173-181.
- [18] 国际种子检验协会. 1996国际种子检验规程[M]. 农业部全国农作物种子质量监督测试中心, 浙江大学种子科学中心, 译. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [19] 费美娟. 小麦叶片磷酸酯酶和类囊体膜磷酸酯酶生化性质及抑制动力学研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2004.
- [20] 黄保宏, 姚垠. 用于检测农药残留的植物酯酶的选择[J]. *安徽技术师范学院学报*, 2004, 18(2): 15-17.
- [21] 杨娟, 阮长青, 闫美珍, 等. 植物胆碱酯酶抑制法分析有机磷农药残留的研究[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2006, 18(5): 55-58.
- [22] GIBSON D M, ULLAH A H. Purification and characterization of acid phosphatase from cotyledons of germinating soybean seeds[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1988, 260(2): 514-520.
- [23] 郭晶, 高菊芳, 唐振华. 羧酸酯酶及其在含酯类化合物代谢中的作用[J]. 2007, 46(6): 365-368; 381.
- [24] 中山包. 发芽生理学[M]. 马云彬, 译. 北京: 中国农业出版社, 1988: 123.
- [25] 金善宝. 中国小麦学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 153.
- [26] 王宝山. 植物生理学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 201.
- [27] CUMMINS I, BUMET M, EDWARDS R. Biochemical characterisation of esterases active in hydrolysing xenobiotics in wheat and competing weeds[J]. *Physiologia Plantarum*, 2001, 113(4): 477-485.
- [28] 温艳霞, 李建科, 张晓敏, 等. 植物酯酶法检测有机磷农药的敏感性和检测限的研究[J]. *食品科学*, 2006, 27(9): 186-188.