

胆碱酯酶保藏方法的筛选及固定化研究

樊秀花^{1,2}, 何庆峰^{1,2}, 张爱琳^{1,2}

(1.天津农学院食品科学系, 天津 300384;

2.天津市农产品加工科技创新与成果转化基地, 天津 300384)

摘要:目的:对胆碱酯酶进行保藏研究,以期得到最佳的酶活力。方法:以小麦酯酶为实验材料,采取冷藏、冷冻和酶的固定化的措施,添加不同种类和不同比例的防腐剂,采用不同的包装材料进行比较研究。结果:能够保持胆碱酯酶的酶活力方法是:设定保藏温度为-20℃,添加0.1%硫柳汞采用塑料瓶包装储藏,这样可以很好地保持酶液的酶活力。结论:采用低温冷冻保藏胆碱酯酶并且添加一定剂量的防腐剂可以很好的保持胆碱酯酶酶活力。

关键词:小麦,胆碱酯酶,保藏,固定化

Study on cholinesterase preservation method of screening and immobilized

FAN Xiu-hua^{1,2}, HE Qing-feng^{1,2}, ZHANG Ai-lin^{1,2}

(1.Department of Food Science, Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384, China;

2.Tianjin Agricultural Products Processing Scientific Innovation & Achievement Transform Base, Tianjin 300384, China)

Abstract:Objective: Study the preservation methods about the CHE, in order to get the best enzyme activity. Methods: Based wheat on the testing material, took cold storage, frozen and enzyme immobilization measures, adding different types and different proportions of preservatives, using the different packing material were investigated. Results: The result showed that the better effect of remain well enzyme solution of the enzyme activity was set for -20℃ temperature preservation, adding 0.1% thimerosal used plastic bottles packaging storage. Conclusion: The cold preservation CHE and adding regular doses of preservative could make cholinesterase enzyme very good maintenance.

Key words: wheat; cholinesterase; preservation; immobilized

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)22-0246-03

进入21世纪,全球农业发展的一个重要趋势是更加注意农产品及食品的质量安全性,倡导安全优质的绿色食品^[1]。近年来,由于农药的大量使用和不合理的使用,导致农产品尤其是果蔬产品农药残留过量,严重地危害着人类的健康,而且出口农产品因农药残留量超标,不仅造成巨大的经济损失,而且严重影响了中国的外贸声誉,尤其是在果蔬的农药残留中,又以有机磷农药的残留较为常见^[2]。为了确保人类的健康和安全,加强农产品中农药残留的监督和检测显得尤为重要。因此,建立快速高效的农药残留检测机制是一个十分重要的问题^[3]。传统的农药残留检测方法主要是气相色谱法和高效液相色谱法等,但仪器昂贵,操作过程复杂、费时及检测成本高,也不适用于现场监测^[4]。酶抑制法测定有机磷及氨基甲酸酯类农药残留,具有快速、简便、灵敏及成本低等优点,深受广大基层监督部门、生产基地及市场的欢迎

^[5],使其得到快速的发展。本实验着重研究酶抑制法的关键用酶——胆碱酯酶的保藏方法,从春麦和冬麦中提取胆碱酯酶,采取冷藏和冷冻的措施,添加不同种类和不同比例的防腐剂,采用不同的包装材料进行比较研究,适时检测各自方法的酶活力,并进行比较,寻找一种适合胆碱酯酶保藏的最有效的途径和方法,胆碱酯酶的实验结果得到的胆碱酯酶可用于检测蔬菜水果中的农药残留的快速检测用酶^[6]。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

春麦、冬麦 均由天津农学院实验基地提供,小麦浸泡一定时间后,用多功能组织捣碎机破碎,离心分离,置于离心管中进行离心,以4000r/min离心10min,取上清液(记录体积)即为胆碱酯酶粗酶液,冷藏备用,小麦酯酶前期研究的最优提取方法为:按1:4的比例加入蒸馏水,4℃浸泡18h,用多功能组织捣碎机破碎5min,5000r/min常温离心15min,酶液活力较高。

HH数显恒温水浴锅 江苏金坛市金城国胜实验仪器厂;7200可见分光光度计 尤尼科(上海)仪器有限公司;离心机 北京雷勃尔离心机有限公司;GZX-9070MBE数显鼓风干燥箱 上海博讯实业

收稿日期:2011-10-21

作者简介:樊秀花(1980-),女,硕士,实验师,研究方向:食品安全快速检测与研究。

基金项目:天津市高等学校科技发展基金项目(20100612)。

有限公司医疗设备厂;加样器(100~1000 μ L) 大龙医疗设备有限公司。

1.2 防腐剂实验

添加硫柳汞、硫酸铵、苯甲酸、甘油不同种类的防腐剂并设0.1%、1%两个浓度进行保藏。

1.3 胆碱酯酶的固定化

分别用蒸馏水和pH6.4磷酸盐缓冲液浸泡提取胆碱酯酶,然后用相同的提取液进行固定化处理,方法为:

a.固定化载体的预处理 树脂在室温下加去离子水浸泡,使其充分溶胀。对充分溶胀的湿树脂进行离心脱水。按1.5mL/g的比例在湿树脂中加入0.5mol/L的NaOH溶液,在室温条件下搅拌数小时,然后用去离子水洗涤到中性为止。如此制备得Cl⁻盐型阴离子交换树脂。加适量去离子水于4℃条件下贮存备用。以上离心脱水的Cl⁻型湿树脂中加入0.5mol/L的NaOH溶液,在室温条件下搅拌数小时,然后用去离子水洗涤到中性为止,如此制备得OH⁻型阴离子交换树脂。加适量去离子水于4℃条件下贮存备用^[7]。

b.酶的固定化 按4:1(mL:g)的比例,将粗酶液与制备好的树脂混合,在摇床上进行摇晃。经一定时间后,将固定化酶树脂与溶液分开。用与提取酶用的相同液体,按树脂:液体=1:10(mL:g)的比例,对以上的固定化酶洗涤8次。最后将固定化酶浸在同样的液体中,于4℃条件下贮存备用。

c.固定化酶的活性测定 用适当容器取适量离心脱水的固定化酶,按1:10比例加入缓冲液,使缓冲液充分浸润固定。以上体系中加入80mol/L的 α -乙酸萘酯丙酮溶液使其在体系中的浓度达到 4×10^{-4} mol/L,立即在摇床上摇晃5min,之后测定酶活力。

2 结果与分析

2.1 不同保藏温度对胆碱酯酶活力的影响

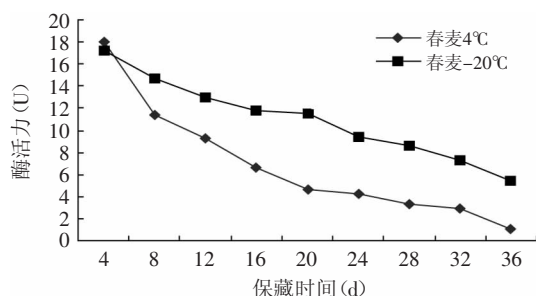


图1 保藏温度和保藏时间对胆碱酯酶活力的影响

Fig.1 Influence of CHE activity on the storage temperature and storage time

由图1可知,粗酶液在4和-20℃两个保藏温度下随着保藏天数的延长,酶活力均呈下降趋势,4℃保藏条件下的酶活力下降速度快于-20℃保藏条件,至保藏36d时酶活力几乎完全丧失,而-20℃下的酶活力在保藏36d后仍能保持原来的1/3左右,由此可见,温度对胆碱酯酶的保藏是一个关键的影响因素,冷冻低温保藏能较好地保持酶活力,但实验中发现,每次使用前必须提前将酶液融化并使其达到室温,否

则对检测结果有影响。

2.2 不同种类、不同浓度的防腐剂对酶液的保藏效果

2.2.1 在4℃保藏中添加不同种类不同浓度防腐剂的春麦粗酶液酶活力变化 由图2可知,在4℃下保藏过程中,添加不同种类防腐剂对保藏前期对胆碱酯酶活力都有一定作用,以添加0.1%甘油为防腐剂的酶液储藏效果最佳,储藏3d后酶活力为38.2U,未加防腐剂处理的原酶液同期测定酶活力为23.8U,但是在保藏27d后,酶活力下降迅速,添加防腐剂的酶液与原酶液酶活力差别不大,可见加防腐剂保藏对保藏后期的酶活力几乎无作用。

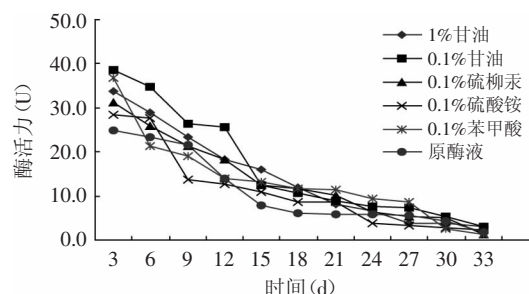


图2 不同种类不同浓度的防腐剂对胆碱酯酶活力的影响

Fig.2 Influence of CHE activity on the kinds and concentrations of preservative

2.2.2 在-20℃保藏中添加不同种类不同浓度防腐剂的春麦粗酶液酶活力变化 由图3可见,在-20℃保藏过程中,在保藏前期添加不同种类不同浓度的防腐剂对保持胆碱酯酶活力作用效果明显,储藏36d时酶活力还在10U左右,其中,加防腐剂为0.1%硫柳汞、0.1%甘油的保藏效果要比1.0%甘油和0.1%硫酸铵保藏效果好,苯甲酸的效果最差。但是随着保藏时间的延长,效果逐渐减弱,到了后期各处理的酶活力的差别很小。综合图2、图3,添加0.1%甘油保藏的酶活力效果好。

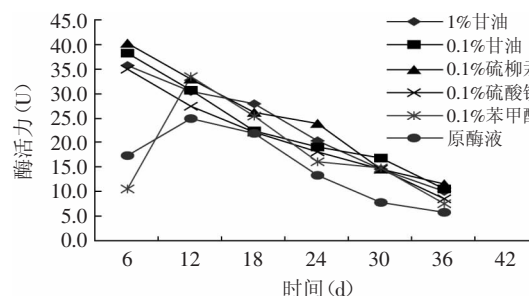


图3 不同种类不同浓度防腐剂对胆碱酯酶活力的影响

Fig.3 Influence of CHE activity on the kinds and concentrations of preservative

2.3 固定化处理对酶的耐藏性影响

分别称取适当离心脱水的固定化酶,按1:10比例加入固定提酶处理用的磷酸盐缓冲液和蒸馏水,使它们充分浸润20min后,分别测定缓冲液固定化酶和纯水固定化酶的酶活力,结果见图4。

从图4可知,以大孔径阴离子(OH⁻)交换树脂为载体,用离子结合法制备得到的两种固定化酶活

(下转第255页)

3.2 红松松球鳞片多酚具有很好的还原 Fe^{3+} 的能力和清除DPPH自由基的能力,通过对比纯化前后的红松松球鳞片多酚的作用效果,可知纯化多酚的作用效果明显优于粗提多酚,这说明红松松球鳞片中的多酚成分对还原 Fe^{3+} 和清除DPPH起了重要作用,但具体的作用机制和起作用的主要成分有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Mara EM Braga, Rosa MS Santos, Inês J Seabra. Fractioned SFE of antioxidants from maritime pine bark[J]. Journal of Supercritical Fluids, 2008, 47: 37-48.
- [2] M Pinelo, M Rubilar, J Sineiro, et al. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*)[J]. Food Chemistry, 2004, 85: 267-273.
- [3] Anna Sokoł-Łe towska, Jan Oszmianski, Aneta Wojdyło. Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap[J]. Food Chemistry, 2007, 103: 853-859.

- [4] Satu Turtola, Leena Sallas, Jarmo K. Holopainen. Long-term exposure to enhanced UV-B radiation has no significant effects on growth or secondary compounds of outdoor-grown Scots pine and Norway spruce seedlings[J]. Environmental Pollution, 2006, 144: 166-171.
- [5] AM Freitas, MTR Almeida, CR Andrighetti-Fröhner, et al. Antiviral activity-guided fractionation from Araucaria angustifolia leaves extract[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 126: 512-517.
- [6] 李文仙, 俞丹, 林玲, 等. Folin-Ciocalteu 比色法应用于蔬菜和水果总多酚含量测定的研究[J]. 营养学报, 2011, 33(3): 302-307.
- [7] 水明磊, 籍保平, 李博, 等. 大孔树脂对苹果渣中多酚与果胶分离的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 50-55.
- [8] 回晶, 李其久, 孟宪焘. 土槿皮多糖的体外抗氧化作用研究[J]. 辽宁大学学报: 自然科学版, 2008, 35(2): 155-157.
- [9] 熊建华. 巴拉圭茶多酚的分离纯化及功能研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007: 74.

(上接第247页)

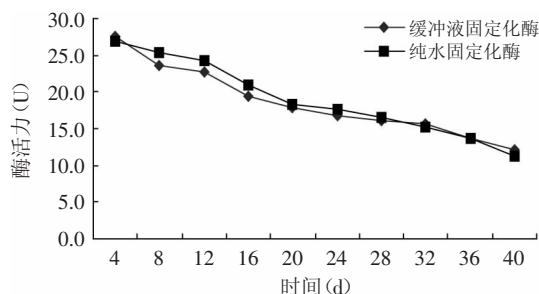


图4 不同固定化处理的胆碱酯酶活力比较

Fig.4 Influence of CHE activity on the immobilized processing

力比较高,在保藏4d时它们的酶活力都能达到27U以上,随着保藏期的延长酶活力都呈降低趋势,而且用缓冲液磷酸盐固定化和用纯水固定化后的酶活力差别很小,这说明提酶液种类对固定化酶保藏效果影响不大。这可能由于酶液中 OH^- 与树脂的结合力远远大于缓冲液离子及其他离子与树脂的结合力,从而使固定化酶呈现稳定性。

2.4 原酶液与透析纯化酶、固定化酶的耐藏性比较

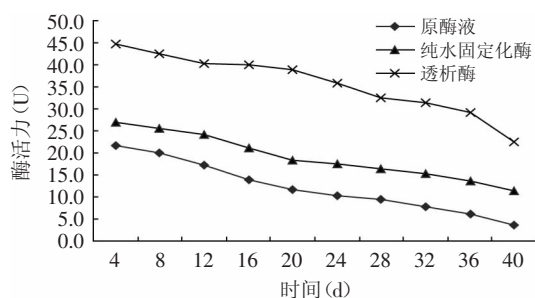


图5 不同纯化处理胆碱酯酶活力比较

Fig.5 Influence of CHE activity on the purification treatment

从图5可知,原酶液、透析纯化酶和固定化酶的酶活力存在着明显的差异,透析纯化的酶液在储藏

前期酶活力可以达到45U,在储藏40d时酶活力还可以达到25U。各酶在保藏过程中酶活力均呈下降趋势,透析处理的酶液下降趋势稍微缓慢,缓冲液固定化酶和纯水固定化酶它们的酶活力及耐藏性均无明显差别,所以,从耐藏性比较,各酶液无明显差异。以后的酶液可以采用透析纯化处理后的酶作为工作酶进行实验检测。

3 结论

3.1 通过研究小麦酯酶的保藏温度设定保藏温度为 -20°C ,添加0.1%甘油瓶包装储藏可以很好地保持酶液的酶活力。

3.2 以大孔径阴离子(OH^-)交换树脂为载体,用离子结合法制备得到的两种固定化酶活力比较高,在保藏4d时它们的酶活力都能达到27U以上。

参考文献

- [1] 侯迪名. 植物酯酶法快速测定有机磷和氨基甲酸酯类农药残留的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(7): 111-115.
- [2] Hwang S Y, Chang Y P, Byun S J, et al. An acetylcholinesterase inhibitor isolated from Corydalis Tuber and its mode of action[J]. Kor J Pharmacogn, 1996, 27: 91-95.
- [3] 邱朝坤, 孙广东, 刘晓宇, 等. 鸡血液中乙酰胆碱酯酶的提取研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(19): 5777-5778.
- [4] 温艳霞, 李建科. 酶抑制法在农残检测中的应用及乙酰胆碱酯酶的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(1): 130-132.
- [5] 王小瑜, 孙霞, 王相友, 等. 不同来源酶快速检测有机磷农药的灵敏度比较[J]. 农业机械学报, 2008, 39(9): 83-86.
- [6] 郑宝东. 食品酶学[M]. 南京: 东南大学出版社, 2006: 122-124.
- [7] 王元, 王学军, 赵亚丽, 等. 大孔吸附树脂新技术在中药分离分析中的应用[J]. 卫生职业教育, 2009, 27(20): 138-139.