

鸡肝酯酶快速检测氰戊菊酯农药的试验研究

李思超, 徐斐*, 赵洁, 曹慧

(上海理工大学食品质量与安全研究所, 上海 200093)

摘要: 采用鸡肝酯酶对不同浓度的氰戊菊酯农药进行了催化水解, 并通过pH-stat法优化了水解条件。结果表明, 在pH 8.0, 温度55℃的条件下, 酶催化反应速度较大。在该反应条件下, 分析了农药浓度(1/x)与酶解反应初速度(1/y)之间的关系, 发现在0.05~2.00 mg·L⁻¹农药浓度范围内, 两者的关系曲线为 $y=0.0723x+0.1393$ ($R^2=0.998$), 可作为该速测法计算氰戊菊酯农药含量的标准曲线。最后采用该法对购置的农药标品稀释液进行了确认检测, 测量结果经t-检验显示, 与气相色谱标定的浓度之间无显著性差异。该法简单快速, 一次检测完成大约需要10 min, 和国标的气相色谱法相比, 大大缩短了检测时间。

关键词: 鸡肝酯酶; 氰戊菊酯农药; pH-stat法; 快速检测

中图分类号: TS201.6; TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1005-9369(2011)02-0010-06

Rapid determination of fenvalerate pesticide using chicken liver esterase/LI Sichao, XU Fei, ZHAO Jie, CAO Hui (Institute of Food Quality and Safety, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: Chicken liver esterase was used to catalyze the hydrolysis of fenvalerate and the optimal enzymatic reaction conditions were obtained as follows: pH 7.5 and temperature 55℃, using pH-state method. Based on the enzymatic hydrolysis of the fenvalerate reaction, the relationship between fenvalerate content (1/x) and initial velocity of enzymatic reaction (1/y) was discussed and the equation of $y=0.0723x+0.1393$ ($R^2=0.998$)

收稿日期: 2010-10-09

基金项目: 上海市科委生物医药专项(10391901500); 上海市农委重点攻关项目(2006第7-4号)

作者简介: 李思超(1985-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品安全。E-mail: sichaolee@163.com

*通讯作者: 徐斐, 教授, 博士生导师, 研究方向为食品安全。E-mail: xufei.first@263.net

etriphosphatase-deficient mutant of *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1973, 116: 1124-1129.

[6] Sakamoto K, Veen H W, Saito H, et al. Membrane-bound ATPase contributes to hop resistance of *Lactobacillus brevis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68: 5374-378.

[7] Blank L M, Koebmann B J, Michelsen O, et al. Hemin reconstitutes proton extrusion in an H⁺-ATPase-negative mutant of *Lactococcus lactis*[J]. American Society for Microbiology, 2001, 183(22): 670-677.

[8] 刘飞, 杜鹏, 王玉堂, 等. 保加利亚乳杆菌H⁺-ATPase缺陷型菌株的筛选[J]. 微生物学报, 2009, 49(1): 38-43.

[9] 杨洁彬, 凌代文, 郭兴华, 等. 乳酸菌-生物学基础及应用[M]. 北

京: 中国轻工业出版社, 1999: 139-176, 187-202.

[10] 国际乳品联合标准IDF 117: 1983. 酸奶特征微生物的菌落计数[S]. 北京: 中国乳品工业, 1990, 18(4): 179-182.

[11] Ongol M P, Sawatari Y, Ebina Y, et al. Yoghurt fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* H⁺-ATPase-defective mutants exhibits enhanced viability of *Bifidobacterium breve* during storage[J]. International Journal of Microbiology, 2007, 116: 358-366.

[12] 张勤, 张启能. 生物统计学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 220-223.

[13] 李艾黎. 酸奶菌种发酵工艺研究及优质乳品发酵剂的研制[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2006: 76-77.

was found as the standard curve for the calculation of fenvalerate content. And there was no significant difference between the results measured by the enzymatic method and GC method. The rapid method determination totally cost about 10 min, reducing a lot of test time than GC method.

Key words: chicken liver esterase; fenvalerate pesticide; pH-stat; rapid determination

氰戊菊酯属于拟除虫菊酯类农药, 是一类重要的合成杀虫剂, 具有广谱、高效和生物降解等功效, 近年来被广泛用于种植业生产和粮食储备过程中。这一类农药作为目前使用广泛的三大农药之一, 为解决人类粮食问题做出了巨大贡献; 但是另一方面它又不可避免的给我们带来困扰, 由于降解过程造成毒素蓄积^[1], 导致了拟除虫菊酯类农药在农作物上产生残留, 人类长期接触会引起慢性疾病^[2], 有致癌、致畸、致突变的危险^[3-4], 威胁人类健康。

目前检测此类农药的方法有很多, 论准确率当选色谱法, 但色谱法对仪器设备与人员技术要求很高, 且成本大, 不能满足大批量样品快速测定的要求。在拟除虫菊酯类农药的快速检测方面, 目前我国大部分研究仍是以色谱法为基础, 改进萃取等条件^[5-7], 并未实质性地改善色谱法检测的高成本和检测时间长的缺陷。因此迫切的需要寻求一种新型的高效、方便、成本低廉的快速检测方法, 用于拟除虫菊酯类农药在食品中的残留的现场检测。

酯酶是一种能够选择性催化水解含酯键物质的生物酶, 可以催化降解拟除虫菊酯类农药^[8-10]。基于此, 本文以拟除虫菊酯类农药中的用量较大的氰戊菊酯为研究对象, 选用从鸡肝中提取出的酯酶, 分别催化不同浓度的氰戊菊酯农药水解, 使用pH-stat法优化了水解条件, 并最终求得农药浓度(1/x)与酶解反应初速度(1/y)之间的关系曲线, 初步建立了酶解速测氰戊菊酯的方法, 同时进行了验证试验。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

氰戊菊酯农药标准品(规格: 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 上海市农药研究所); 新鲜鸡肝(上海沔青食品厂); 氢氧化钠、丙酮、柠檬酸三钠、柠檬酸、十二烷基硫酸钠(AR. 国药集团化学试剂有限公司); α -乙酸萘酯(CP. 国药集团化学试剂有限公司); Fast

Blue-Salt(SIGMA 试剂)、pH 9.18 校准液、pH 6.86 校准液等。

1.2 仪器与设备

PHSJ-3F 型 pH 计(上海天达仪器有限公司); 组织捣碎机(DS-1 型, 上海标本模型厂); Beckman 超高速冷冻离心机、10 mL 碱式滴定管、恒温加热器(THGD-05 型); 722S 型分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); S22-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器厂); 水浴摇床(江苏太仓市实验设备厂); 循环进液式保温杯、超声波清洗器(上海科导超声波仪器有限公司)等。

1.3 方 法

1.3.1 鸡肝酯酶液酶的制备

根据许学勤所述方法^[11]改进, 将 30.0 g 保存于 $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中的新鲜鸡肝以 1:3 的比例和 90.0 g 的柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液($0.025\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的缓冲溶液, pH 6.4)混合, 用组织捣碎机(DS-1 型, 上海标本模型厂)将上述混合物打成匀浆, 为避免捣碎过程中温度过高造成酶失活, 先加入 1/3 的缓冲液进行捣碎, 待鸡肝全部粉碎后, 再加入剩余 2/3 缓冲液, 每旋转 10 s, 停 20 s。重复 5 次。所得匀浆在冷冻离心机 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速下离心 10 min 后, 上清液即为鸡肝酯酶, 用脱脂棉过滤后, 立即贮于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻藏备用。

1.3.2 鸡肝酯酶活力的测定

根据 Asperen^[12]所述方法改进, 具体方法如下。

将酶液用 pH 6.4 的柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液适当稀释^[11]。在 3 mL 稀释酶液中加入 50 μL 底物($16\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ α -乙酸萘酯的丙酮溶液)混合均匀, 在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中保温反应 5 min, 然后与 0.5 mL 显色剂(0.4% 固兰 B 的 1.8% SDS 溶液)混合均匀, 再于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保温 5 min。以不加底物(α -乙酸萘酯)的反应液作空白, 在 595 nm 处读取以上反应液的吸光度。根据下式计算酶液的活力。

$$E_L(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}) = D \frac{K \times A}{5} \times 10^{-3}$$

式中, E_L 为酶液的酯酶活力($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$);

D 为酶液的稀释倍数;

K 为 α -萘酚标准曲线的斜率(10^{-6} M/OD);

A 为反应液的吸光度(OD);

U 为国际酶活单位(10^{-6} mol·min $^{-1}$)。

1.3.3 pH-stat法^[13-14]测定反应初速度

拟除虫菊酯类农药都含有酯键,在鸡肝酯酶的催化下,农药作为底物水解的过程实质上是酯键的断裂过程^[15]。在一定条件下,酶解过程中1 mol 酯键断裂释放出1 mol H^+ ,溶液的pH会降低,要保持pH不变需要消耗掉等量的OH $^-$ 酯酶水解拟除虫菊酯类农药的通式^[10]为:



由通式可知,氢氧化钠的消耗量与酯键的断裂是1:1的关系,故可以用消耗掉的氢氧化钠溶液的体积表示断裂的酯键的量。以NaOH溶液的消耗体积为 y 轴,反应时间为 x 轴作图,结果见图1。其初始斜率即单位时间内氢氧化钠的消耗量,为酶促反应初速度。测定过程中,为获得农药浓度与酶促反应初速度之间的关系,相对于所采用的农药浓度,应使鸡肝酯酶活力尽可能的高^[16]。

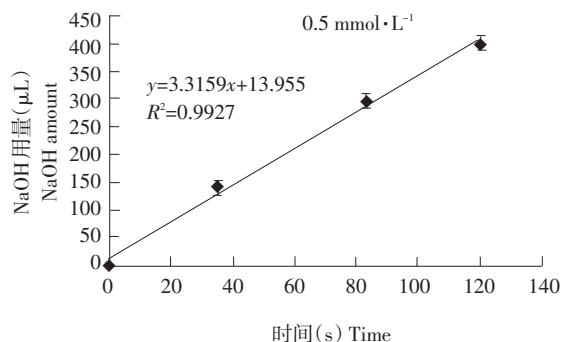


图1 氰戊菊酯酶解反应进程曲线

Fig. 1 Process curve of enzymatic hydrolysis of fenvalerate

用丙酮配制浓度为0.05、0.10、0.20、0.40、0.50、1.00、2.00 mg·L $^{-1}$ 的氰戊菊酯标准溶液,按以下步骤进行反应初速度测量。

量取20 mL蒸馏水,置于50 mL的酶反应器中,加入0.5 mL已稀释好的氰戊菊酯标准品溶液,温度恒定为某一设定温度,于磁力搅拌器上

匀速搅拌5 min,测定此时溶液的pH,用已标定好的0.001 mol·L $^{-1}$ 的NaOH溶液调整溶液的pH到某一设定值后,加入已稀释的0.5 U·mL $^{-1}$ 的鸡肝酯酶液0.1 mL,立即计时同时记录碱式滴定管中的初始刻度。当pH下降了0.1时,用NaOH标准溶液快速滴回原设定值,记录反应时间 t 和当时的NaOH溶液消耗量,直至反应总时间达到120 s为止。将反应时间为横坐标,NaOH溶液消耗体积为纵坐标作图(见图1),图中直线段(线性关系 R^2 高于0.99)斜率即为某浓度下的酶解初速度。以酶解初速度的大小为指标,可以优化酶解温度和pH。

通过以上步骤可得到不同氰戊菊酯浓度下的酶解初速度,然后以农药浓度的倒数为横坐标,酶解初速度的倒数为纵坐标,根据Lineweaver-Burk双倒数方程作图,便可得到用于计算农药含量的标准曲线。

1.3.4 确认试验

购置已标定的标准氰戊菊酯农药溶液,稀释成6种不同浓度的稀释液,用1.3.3中的方法对这6组试样进行酶解初速度的测定。根据测量值和标准曲线,便可测出试样中的农药含量。用 t -检验方法中配对试验的假设检验方法检验该法获得的农药含量与气相色谱标定值之间有无显著差异性。

1.3.5 数据统计分析

试验中的每个数据点均为3次平行试验的平均值,并在作图中给出上下误差限。结果中的相对误差是指绝对误差和已标定的氰戊菊酯浓度的比值。绝对误差是指平行试验的测量值与测量平均值的差值。相对标准偏差是指标准偏差与测量结果算术平均值的比值。

2 结果与分析

2.1 鸡肝酯酶催化氰戊菊酯农药水解条件的优化

用1.3.3中的方法,对鸡肝酯酶催化氰戊菊酯农药水解的温度和pH做单因素优化试验,根据酶反应动力学原理,综合考虑实验操作等因素,优化试验中采用的鸡肝酯酶浓度为0.5 U·mL $^{-1}$,NaOH溶液浓度为0.001 mol·L $^{-1}$ 。

2.1.1 pH对氰戊菊酯水解速度的影响

许学勤等曾对鸡肝酯酶催化 α -乙酸萘酯水解条件进行研究^[11],结果显示pH 7.5为最适pH。本

试验以氰戊菊酯农药为底物，围绕pH 7.5选取pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0共7个点，在温度为55℃、氰戊菊酯浓度为0.5 mg·L⁻¹、酶浓度为0.5 U·mL⁻¹的条件下测酶解反应初速度，结果见图2。

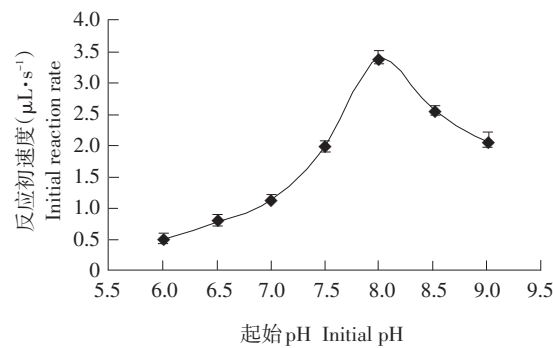


图2 pH对鸡肝酯酶催化氰戊菊酯水解反应的影响

Fig. 2 Effect of pH value on hydrolysis of fenvalerate catalyzed by chicken liver esterase

从图2中可以看出，鸡肝酯酶催化氰戊菊酯农药水解反应初速度受pH的影响较明显，pH 8.0时水解初速度有最大值，鸡肝酯酶酶活力最高。与鸡肝酯酶水解α-乙酸萘酯的最适pH相比，增加了0.5个单位。这可能是由于两种酶解反应所用的底物不同，由α-乙酸萘酯和氰戊菊酯结构上的差异造成的结果。

2.1.2 温度对氰戊菊酯水解速度的影响

根据许学勤等对鸡肝酯酶催化α-乙酸萘酯水解条件的研究结果^[11]，55℃为反应最适温度，本试验选取温度为40、45、50、55、60、65、70℃共7个点，测定不同温度下氰戊菊酯水解反应初速度，其他反应条件为pH 8.0、氰戊菊酯浓度为0.5 mg·L⁻¹、酶浓度为0.5 U·mL⁻¹，结果见图3。

从图3中可以看出，鸡肝酯酶催化氰戊菊酯农药水解反应初速度受温度的影响也较为明显，温度55℃时，酶解反应初速度最大，鸡肝酯酶酶活力最高。与鸡肝酯酶催化α-乙酸萘酯水解的体系相比，最适温度相同，可见在相似的条件下，更换了酶解反应底物后，温度对鸡肝酯酶酶活的影响趋势很相似。

2.2 酶解初速度和氰戊菊酯浓度之间的关系曲线分析

根据GB/T 5009.110-2003中对氰戊菊酯在果蔬

中最大残留限量的要求，氰戊菊酯在大部分果蔬中的含量不得超过0.10~1.00 mg·kg⁻¹。因此，本试验选择的氰戊菊酯浓度范围为0.05~2.00 mg·L⁻¹。通过1.3.3中的方法，测量不同农药浓度下酶解反应初速度。最终测得各农药浓度所对应的酶解反应初速度如表1所示。

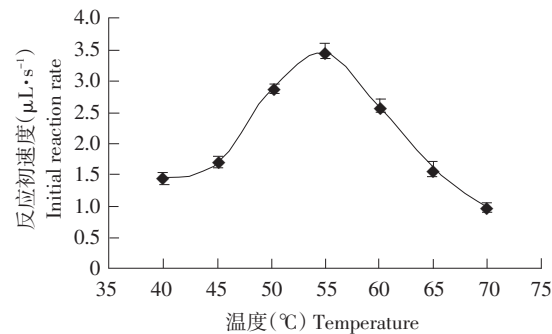


图3 温度对鸡肝酯酶催化氰戊菊酯水解反应的影响

Fig. 3 Effect of temperature on hydrolysis of fenvalerate catalyzed by chicken liver esterase

表1 不同氰戊菊酯浓度下的酶催化水解反应初速度

Table 1 Initial velocity of enzymatic hydrolysis of fenvalerate under different concentrations

农药浓度(mg·L ⁻¹) Pesticide concentrations	酶解反应初速度(μL·s ⁻¹) Initial velocity of enzymatic reaction concentrations	相对标准偏差(%) RSD
0.05	0.623	7.41
0.10	1.223	4.65
0.20	1.990	4.29
0.40	2.953	2.76
0.50	3.327	1.39
1.00	4.837	1.35
2.00	5.877	1.58

根据酶反应动力学原理，单底物酶催化反应中(一般将水解反应看作单底物反应)酶解反应速度(V)和底物浓度[S]有如下关系，称为米氏方程。

$$V=\frac{V_{\max}[S]}{K_m+[S]}$$

根据 Lineweaver-Burk 双倒数方程，作如下变形，可将米氏方程变化成相当于y=ax+b的直线方程，并作图如下：

$$\frac{1}{V}=\frac{K_m}{V_{\max}}\times\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V_{\max}}$$

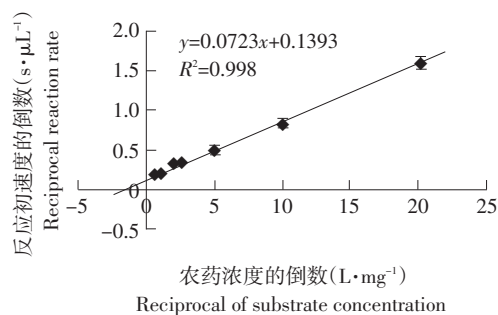


图 4 氰戊菊酯酶促反应的 Lineweaver–Burk

Fig. 4 Lineweaver–Burk diagram of fenvalerate enzymatic reaction

如图 4 所示，农药浓度 ($1/x$) 与酶解反应初速度 ($1/y$) 的关系曲线为 $y=0.0723x+0.1393$ ($R^2=0.998$)。数据显示该曲线具有良好的线性关系，可作为该快速检测法的标准曲线。虞云龙等^[8]利用降解菌 *A. lcaligenes* sp. YF 11 粗酶液催化降解拟除虫菊酯杀虫剂，所作 Lineweaver–Burk 双倒数曲线 $y=2.912x+0.0131$ ($R^2=0.9949$)，由于使用的浓度单位是 $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，与本试验采用的农药浓度 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同，造成曲线的斜率有较大差异，但从相关系数可以看出本方法所获得的标准曲线的线性关系更好。

2.3 验证试验

购置经气相色谱标定的标准氰戊菊酯农药溶液，稀释成 6 种不同浓度的稀释液，用 1.3.3 中的方法对这 6 组试样进行酶解初速度的测定。用所测初速度的平均值代入标准曲线计算底物浓度，再用该测量浓度和标定浓度做对照分析，结果见表 2。

表 2 测定结果和标定浓度的结果比较

Table 2 Comparison of measurement results and the results of calibration concentration			
编号 No.	测定结果($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Determination results	标定浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Calibration concentration	相对误差(%) Relative error
1	0.163±0.002	0.150	8.44
2	0.229±0.014	0.220	4.04
3	0.372±0.013	0.370	0.65
4	0.616±0.009	0.630	-2.28
5	0.924±0.036	0.960	-3.73
6	1.279±0.031	1.310	-2.33

注：标定浓度数据为中国上海测试中心农药行业测试点提供的氰戊菊酯农药标准品浓度。

Note: The calibration concentration is provided by the pesticide industry test center in Shanghai, China.

对该方法的验证试验显示，检测结果的相对误差最小值为 0.65%，最大值为 8.44%，小于 10.0%，但对低浓度农药检测时相对误差较高浓度时较大，这是由于农药浓度较低时，酶解反应速度较低，很小的操作和读数误差就会导致较大的相对误差，对较高农药浓度检测时，相对误差基本可以控制在 4% 以内。另外，选择 Lineweaver–Burk 双倒数曲线作图，在低农药浓度时 V 很小，本身容易产生误差，化成 $1/V$ 后，这种误差就明显放大。这也是造成低浓度时，测量相对误差较大的另一个原因。采用 t -检验中的配对试验的假设分析^[17]，来判断测定结果和标定浓度之间是否存在显著性差异，见表 3。结果显示，计算 $|t|$ 值 $<$ 临界 t 值，两组数据之间没有显著性差异，测量浓度和标定浓度一致性良好。

表 3 t -检验结果分析

Table 3 Result of t -test		
t -检验 t -test	标定浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Calibration concentration	测量浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Determination concentration
平均 Average	0.6067	0.5972
方差 Variance	0.2068	0.1895
观测值 Observations	6	6
泊松相关系数 Poisson coefficient	0.9989	
假设平均差 Hypothesized mean difference	0	
df	5	
t Stat	1.1230	
$P(T \leq t)$ 单尾 (Critical one-tail)	0.1562	
t 单尾临界 Critical one-tail	2.0150	
$P(T \leq t)$ 双尾 (Critical two-tail)	0.3124	
t 双尾临界 Critical two-tail	2.5706	

3 讨论与结论

该方法基于酶的专一性, 高效性, 针对拟除虫菊酯类农药所含有的酯键, 以拟除虫菊酯类农药的代表—氰戊菊酯作为底物, 利用鸡肝酯酶催化其水解。通过pH-stat法进行水解条件的优化, 结果显示pH 8.0, 温度55℃为酶解反应最适条件。在该反应条件下, 进一步分析了农药浓度(1/x)与酶解反应初速度(1/y)之间的关系, 选取0.05~2.00 mg·L⁻¹农药浓度范围, 获得两者的关系曲线为 $y=0.0723x+0.1393$ ($R^2=0.998$), 可作为该速测法计算氰戊菊酯农药含量的标准曲线。最后采用该法对购置的农药标准品稀释液进行了确认检测, 测量结果经 t -检验显示, 与标定的标准品浓度之间无显著性差异。

目前该方法的检测范围为0.05~2.00 mg·L⁻¹, 已能对GB/T 5009.110-2003中大部分果蔬中拟除虫菊酯类农药的最大残留限量水平进行检测。但对低浓度的农药检测时, 由于酶解反应速度较小, 很小的操作和读数误差就会导致较大的相对误差, 这是目前pH-stat试验的方法误差决定的。因此, 整个检测条件还需要进一步优化。另外, 粗酶的研究还不足以准确的反应酶学的特性, 为了进一步做深入的研究, 有必要进行酶的分离纯化。

值得一提的是该方法简单快速, 所用设备简单, 成本低廉, 一次检测完成大约需要10 min, 和国标气相色谱法相比, 大大缩短了检测时间。本研究利用的是拟除虫菊酯类农药都含有的酯键这一通性, 因此该法可推广到多种拟除虫菊酯类农药残留的检测。对该方法进行进一步的优化改进后, 在仪器化设计方面具有广阔的前景, 可适用于食品中多种拟除虫菊酯类农药残留的现场快速检测。

[参 考 文 献]

- [1] Al-Makkawy H K, Magdy D M. Persistence and accumulation of some organic insecticides in Nile water and fish[J]. Resources Conservation and Recycling, 1999, 27(1-2): 105-115.
- [2] Kolaczinski J H, Curtis C F. Chronic illness as a result of low-level exposure to synthetic pyrethroid insecticides: A review of the debate[J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42(5): 697-706.
- [3] Nina G, Friedhelm D. Influence of pyrethroids and piperonyl butoxide on the Ca²⁺-ATPase activity of rat brain synaptosomes and leukocyte membrane[J]. International Immunopharmacology, 2005, 5(2): 63-270.
- [4] Stratton G W, Corke C T. Toxicity of the insecticide permethrin and some degradation products towards algae and cyanobacteria [J]. Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological, 1982, 29(1): 71-80.
- [5] 曾凡刚. SBSE-TDU-GC快速测定茶叶中7种拟除虫菊酯类农药残留[J]. 农药, 2010, 49(4): 277-279.
- [6] 杨蕾, 王保兴, 侯英, 等. SBSE-TDS-GC-MS快速测定茶叶中拟除虫菊酯类农药残留[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 435-438.
- [7] 张晓荣, 饶景萍, 赵政阳, 等. 苹果中9种有机氯及拟除虫菊酯类农药的多残留快速分析技术[J]. 西北农业学报, 2007, 16(5): 203-207.
- [8] 虞云龙, 陈鹤鑫, 樊德方, 等. 拟除虫菊酯类杀虫剂的酶促降解[J]. 环境科学, 1998, 19(3): 66-69.
- [9] Sogorb M A, Vilanova E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis[J]. Toxicology Letters, 2002, 128(1-3): 215-228.
- [10] 王兆守, 刘丽花, 陈小兰, 等. 拟除虫菊酯类农药降解菌及降解酶的研究概况[J]. 微生物学通报, 2008, 35(5): 825-829.
- [11] 许学勤, 徐斐, 张慧君, 等. 鸡肝酯酶在有机磷和氨基甲酸酯类农药检测中的应用研究[J]. 食品科学, 2007, 28(5): 237-240.
- [12] Van Asperen K. A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method [J]. J Ins Physil, 1962(8): 401-416.
- [13] Adler-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by *Trinitro benzenesulfonic acid*[J]. Agric Food Chem, 1979, 27(1): 256-262.
- [14] 菲尼玛 O R. 食品化学[M]. 王璋等译. 北京: 中国轻工业出版社, 1991: 97.
- [15] 虞云龙, 史锋, 樊德方, 等. 一种固定化酶对氰戊菊酯的降解特性[J]. 农药学报, 1999, 1(1): 74-77.
- [16] 王璋. 食品酶学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997: 86-88.
- [17] 刘振学, 黄仁和, 田爱民, 等. 实验设计与数据处理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.