

发酵剂对全脂酸奶中9种有机磷农药的降解作用

周欣伟¹, 赵新淮^{1,2*}

(1. 东北农业大学 乳品科学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: **目的** 研究2种直投式发酵剂对全脂酸奶发酵时9种有机磷农药降解的影响。**方法** 42℃下发酵不同时间的全脂酸奶样品,经萃取和净化处理后,气相色谱法定量分析9种有机磷农药残留,并计算有机磷农药降解动力学常数。**结果** 在发酵过程中9种有机磷农药残留量呈现逐步降低趋势。全脂酸奶发酵时9种有机磷农药的降解速率常数为0.0200~0.0364 h⁻¹,而其在全脂乳中的降解速率常数仅为0.0126~0.0191 h⁻¹。9种有机磷农药中,敌敌畏的降解速率常数较大而马拉硫磷的降解速率常数较小。**结论** 全脂酸奶发酵时2种发酵剂对9种有机磷农药的降解有不同程度的促进作用,敌敌畏较易降解而马拉硫磷较稳定。

关键词: 有机磷农药; 全脂乳; 酸奶; 直投式发酵剂; 降解动力学; 气相色谱法

Degradation of nine organophosphorus pesticides in full-fat yogurt by two starters

ZHOU Xin-Wei¹, ZHAO Xin-Huai^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;
2. Department of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

ABSTRACT: Objective The impacts of two directed vat-set (DVS) starters on the degradation of nine organophosphorus pesticides (OPPs) in full-fat yogurt during lactic fermentation were studied. **Methods** The nine residual OPPs in the full-fat yogurt fermented at 42℃ for different times were detected by a gas chromatography (GC) method after OPPs extraction and purification process. Degradation kinetic parameters of the nine OPPs were calculated thereof. **Results** Nine OPPs had decreased trends in their residual levels during a fermentation time of 5 h. The degradation rate constants of the nine OPPs in the yogurt were found to be 0.0200~0.0364 h⁻¹, while those in control whole milk were 0.0126~0.0191 h⁻¹. Among the OPPs investigated, dichlorvos had the higher rate constant while malathion behaved the lower one. **Conclusion** Two DVS starters had different acceleration on OPPs degradation in the whole milk during yogurt fermentation, and dichlorvos was easier to be degraded but malathion was more stable.

KEY WORDS: organophosphorus pesticides; whole milk; yogurt; DVS starters; degradation kinetics; gas chromatography

基金项目: 国家十一奶业重大专项(2006BAD04A08)

Fund: Supported by the National Key Dairy Program of China During the 11th Five-Year Plan Period (2006BAD04A08)

*通讯作者: 赵新淮, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为食品化学研究。E-mail: zhaoxh@mail.neau.edu.cn

*Corresponding author: ZHAO Xin-Huai, Professor, Ph.D, Department of Food Science of Northeast Agricultural University, No.59, Mucai Street, Harbin 150030, China. E-mail: zhaoxh@mail.neau.edu.cn

1 引言

有机磷农药具有广谱、高效、低毒等特点,被广泛应用于农业生产中病虫害的防治^[1]。但是,农药滥用也造成了环境污染、食物中农药残留,产生食品安全问题^[2-3]。乳制品也存在农药残留的安全性问题:(1)为预防奶牛皮外寄生物,将农药直接喷洒于奶牛、牛舍中,这是最突出和严重的污染^[4];(2)水体和牧草被农药污染后,通过食物链的富集作用,使奶牛间接吸收农药而导致乳制品的污染^[5-6]。Salas等^[7]发现所收集于墨西哥的牛奶样品中,敌敌畏、甲拌磷、毒死蜱和毒虫畏的平均残留水平为0.0051~0.0203 mg/kg。Zhao等^[6]曾检测56个收集于黑龙江的牛奶样品,分析7种有机磷农药残留量,发现16个牛奶样品中残留一种或多种有机磷农药。

加工处理过程对食品中的农药残留具有降解作用^[3]。Uygun等^[8]研究发现,谷物储存过程中马拉硫磷、杀螟硫磷、甲基毒死蜱和甲基对硫磷的减少量达到76%~88%。Kawar^[9]将含对硫磷25 mg/kg的葡萄汁进行发酵处理,最终在葡萄酒中检测到8.8 mg/kg的对硫磷,表明对硫磷发生降解。Banna等^[10]研究果汁发酵过程中马拉硫磷的降解,发现发酵57天后其减少量达到80%。Zhao等^[11]发现一些乳酸菌对7种有机磷农药有不同程度的降解效果。

国内对乳制品中有机磷农药降解的研究较少。因此,本研究采用液-液分配萃取法,利用气相色谱(GC)分析法,测定全脂酸奶发酵时9种有机磷农药的残留水平,并计算它们的降解动力学常数,从而研究2种直投式发酵剂对全脂酸奶发酵时有机磷农药降解的影响。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

敌百虫、敌敌畏、甲拌磷、二嗪磷、甲基毒死蜱、甲基嘧啶磷、毒死蜱、倍硫磷和马拉硫磷等9种有机磷农药标准品(纯度为99.0%~99.9%),均购自德国Sigma-Aladrich公司;丙酮、乙腈、二氯甲烷,为分析纯或色谱纯;实验用水为Milli-Q PLUS超纯水系统(Millipore,美国)纯化的纯净水;无抗生素残留的全脂奶粉由哈尔滨龙丹乳业科技股份有限公司提供;发酵剂1(YO-Mix 300)和发酵剂2(YO-Mix 511)由嗜

热链球菌和保加利亚乳杆菌组成,分别用于乳酸菌饮料和酸奶,由丹尼斯克(中国)有限公司提供。

Agilent 7890A 气相色谱仪,配有火焰光度检测器、7683B 自动进样器(Agilent 仪器有限公司,美国);LG10-2.4A 高速离心机(北京京立离心机厂);MTN 2800 D 型氮吹仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);DHP-9082 恒温电热培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

2.2 气相色谱条件

载气(N₂, 纯度>99.999%)流速1.0 mL/min;燃气(H₂, 纯度>99.999%)流速75 mL/min;助燃气(空气)流速100 mL/min。隔垫扫吹为3 mL/min,进样体积1 μL,进样方式为不分流进样。

进样口和检测器的温度为210℃、250℃,色谱柱DB-1701(30 m×0.250 mm×0.25 μm),柱箱升温程序为:初始温度50℃,保持1 min;以20℃/min升至130℃;以10℃/min升至200℃;再以0.5℃/min升至203℃;最后,203℃保持5 min。

2.3 有机磷农药的添加和酸奶制备

全脂奶粉与蒸馏水按1:9的比例混合均匀配制成全脂乳;添加农药混合标准工作液,使9种有机磷农药的质量分数为1 mg/kg;剧烈震荡后室温下放置30 min,95℃杀菌10 min,并立刻在冰水浴中冷却至42℃左右;无菌操作添加直投式发酵剂,添加量为0.021%;分别取20 mL全脂乳于50 mL小烧杯中,密封膜密封后于42℃培养箱中培养5 h;每1小时随机抽取1杯全脂酸奶为分析样品,迅速放在冰浴中冷却,立即进行萃取、净化和GC分析。同时,加有机磷农药、但不添加发酵剂的全脂乳作为对照样。所有试验和分析均重复3次。

2.4 有机磷农药的提取和净化

取10 mL样品,加入20 mL丙酮-乙腈(1:4, v:v),剧烈震荡提取15 min;6000 r/min离心6 min,收集上层液于250 mL分液漏斗中;沉淀再提取1次,合并上层液;分液漏斗中加50 mL二氯甲烷,剧烈震荡20 min,静置、分层,收集二氯甲烷于100 mL三角瓶中;水相层再用20 mL二氯甲烷萃取1次,合并二氯甲烷相,并加入5 g无水硫酸钠剧烈震荡,抽滤;移取10 mL二氯甲烷相于15 mL具塞试管中,氮吹吹至尽干;加色谱纯丙酮1.0 mL,0.45 μm有机滤膜过滤后进行GC分析。

3 结果与讨论

3.1 有机磷农药的GC分析

GC法常用于牛奶中有机磷农药残留的分析^[7,11],以保留时间定性,外标法定量。按照所选定的色谱条件,本研究所分析的9种有机磷农药的标准谱图和样品谱图见图1。9种有机磷农药能够被很好的分离,峰型对称,基线比较稳定,色谱峰的出峰时间在24 min内。以色谱峰面积对有机磷的质量浓度(0.1~10.0 mg/kg)作图,得到的标准曲线的线性关系良好(相关系数 $R^2 \geq 0.9995$)。

3.2 方法的添加回收率和检出限

如表1所示,在三个质量分数水平下,9种有机磷农药的回收率为83.9%~102.9%,测定的相对标准

偏差($n=3$)在0.9%~6.0%之间。以3倍的信噪比计算,9种有机磷农药的检出限为0.001~0.008 mg/kg。这表明,萃取和净化过程满足有机磷残留的常规分析要求^[12]。

3.3 全脂酸奶中有机磷农药的降解

全脂乳中人为添加9种有机磷农药后,接种直投式发酵剂并在42℃发酵时,有机磷农药的残留水平呈现逐步降低的趋势,具体情况如表2数据所示。

研究表明,有机磷农药降解为一级动力学反应^[7,11]。根据一级动力学反应方程,可计算出有机磷农药降解的速率常数、半衰期等参数。因此,由表2数据计算得到9种有机磷农药的降解动力学常数及半衰期(表3),回归分析的相关系数 $R^2 \geq 0.952$ 。表3数据显示,9种有机磷农药中,敌敌畏速率常数为

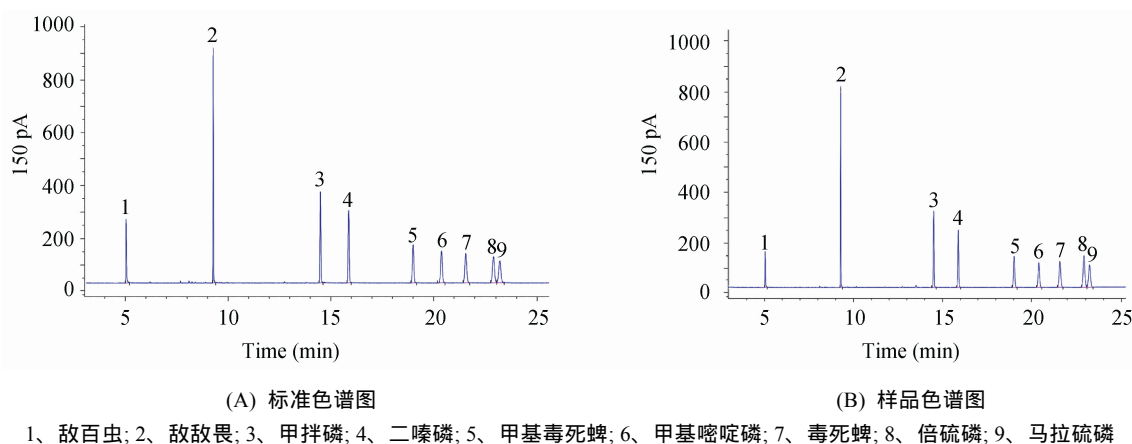


图1 9种有机磷农药分析时的色谱图

Fig. 1 Typical GC profiles of nine organophosphorus pesticides analyzed

表1 9种有机磷农药的添加回收率和检出限($n=3$)

Table 1 Recoveries and limits of detection of nine organophosphorus pesticides at three fortified levels ($n=3$)

农药	三个添加水平(mg/kg)的回收率 (%)			检出限 (mg/kg)
	0.1	0.5	1.0	
敌百虫	87.2±6.0	89.5±1.6	87.8±1.0	0.003
敌敌畏	85.7±4.3	83.9±5.7	84.1±2.0	0.001
甲拌磷	92.1±5.7	98.6±7.7	84.9±1.1	0.002
二嗪磷	86.3±2.8	87.8±2.2	85.4±2.7	0.002
甲基毒死蜱	94.0±3.3	97.5±1.5	90.7±1.6	0.005
甲基嘧啶磷	86.7±2.6	86.8±3.3	91.4±3.5	0.005
毒死蜱	97.4±2.4	96.5±3.6	91.9±0.9	0.006
倍硫磷	93.0±2.3	93.0±1.9	89.4±5.2	0.007
马拉硫磷	87.3±5.3	84.9±3.6	102.9±1.3	0.008

表2 全脂酸奶发酵中9种有机磷农药残留的质量分数(mean±SD, mg/kg)
Table 2 Nine organophosphorus pesticides (mean±SD, mg/kg) left in whole milk during yogurt fermentation

农药	发酵剂	不同发酵时间 (h)					
		0	1	2	3	4	5
敌百虫	发酵剂 1	0.969 ± 0.025	0.950±0.021	0.923±0.019	0.890±0.026	0.874±0.021	0.838±0.018
	发酵剂 2	0.969 ± 0.022	0.950±0.024	0.930±0.020	0.904±0.016	0.863±0.023	0.828±0.018
	无	0.976 ± 0.034	0.965±0.033	0.942±0.030	0.923±0.028	0.905±0.026	0.897±0.031
敌敌畏	发酵剂 1	0.971 ± 0.015	0.948±0.018	0.913±0.023	0.885±0.018	0.855±0.021	0.811±0.016
	发酵剂 2	0.976 ± 0.014	0.940±0.033	0.920±0.032	0.896±0.019	0.848±0.017	0.809±0.016
	无	0.961 ± 0.025	0.953±0.023	0.938±0.021	0.926±0.020	0.909±0.023	0.888±0.022
甲拌磷	发酵剂 1	0.970 ± 0.024	0.955±0.026	0.929±0.028	0.905±0.016	0.871±0.016	0.845±0.030
	发酵剂 2	0.958 ± 0.030	0.948±0.031	0.922±0.028	0.900±0.029	0.862±0.024	0.844±0.023
	无	0.943 ± 0.029	0.936±0.026	0.922±0.031	0.908±0.028	0.887±0.027	0.873±0.024
二嗪磷	发酵剂 1	0.965 ± 0.023	0.949±0.022	0.913±0.020	0.899±0.018	0.876±0.018	0.864±0.020
	发酵剂 2	0.970 ± 0.022	0.956±0.026	0.934±0.016	0.914±0.019	0.892±0.015	0.858±0.020
	无	0.954 ± 0.036	0.943±0.037	0.927±0.034	0.908±0.032	0.885±0.039	0.871±0.030
甲基毒死蜱	发酵剂 1	0.965 ± 0.032	0.955±0.030	0.938±0.026	0.905±0.023	0.883±0.021	0.859±0.015
	发酵剂 2	0.974 ± 0.021	0.964±0.019	0.943±0.016	0.919±0.018	0.899±0.019	0.874±0.018
	无	0.957 ± 0.036	0.948±0.037	0.928±0.034	0.908±0.032	0.885±0.039	0.871±0.030
甲基嘧啶磷	发酵剂 1	0.950 ± 0.026	0.940±0.029	0.928±0.029	0.902±0.026	0.884±0.027	0.856±0.024
	发酵剂 2	0.942 ± 0.019	0.932±0.017	0.919±0.018	0.893±0.020	0.867±0.022	0.850±0.019
	无	0.970 ± 0.024	0.962±0.025	0.944±0.023	0.938±0.022	0.922±0.025	0.912±0.020
毒死蜱	发酵剂 1	0.961 ± 0.022	0.943±0.021	0.929±0.020	0.892±0.017	0.864±0.016	0.845±0.019
	发酵剂 2	0.956 ± 0.026	0.943±0.024	0.923±0.020	0.894±0.025	0.878±0.030	0.847±0.020
	无	0.965 ± 0.025	0.955±0.027	0.942±0.021	0.930±0.019	0.917±0.018	0.902±0.026
倍硫磷	发酵剂 1	0.968 ± 0.023	0.958±0.024	0.935±0.024	0.910±0.018	0.888±0.025	0.869±0.022
	发酵剂 2	0.956 ± 0.029	0.944±0.027	0.927±0.026	0.901±0.019	0.881±0.024	0.858±0.033
	无	0.946 ± 0.029	0.937±0.028	0.922±0.025	0.912±0.027	0.897±0.030	0.879±0.024
马拉硫磷	发酵剂 1	0.962 ± 0.028	0.947±0.035	0.921±0.027	0.902±0.031	0.887±0.034	0.873±0.025
	发酵剂 2	0.948 ± 0.025	0.937±0.021	0.918±0.029	0.901±0.023	0.880±0.019	0.856±0.024
	无	0.956 ± 0.031	0.943±0.029	0.929±0.026	0.909±0.022	0.888±0.028	0.871±0.027

表 3 全脂酸奶发酵中 9 种有机磷农药的降解速率常数和半衰期

Table 3 Degrading kinetic rate constants and half-live periods of nine organophosphorus pesticides in whole milk during yogurt fermentation

农药	发酵剂	速率常数 k (h^{-1})	半衰期 $t_{1/2}$ (h)
敌百虫	发酵剂 1	0.0291	23.8
	发酵剂 2	0.0315	22.0
	无	0.0181	38.3
敌敌畏	发酵剂 1	0.0355	19.5
	发酵剂 2	0.0364	19.0
	无	0.0158	43.9
甲拌磷	发酵剂 1	0.0283	24.5
	发酵剂 2	0.0271	25.6
	无	0.0160	43.3
二嗪磷	发酵剂 1	0.0230	30.1
	发酵剂 2	0.0242	28.6
	无	0.0189	36.7
甲基毒死蜱	发酵剂 1	0.0244	28.4
	发酵剂 2	0.0222	31.2
	无	0.0198	35.0
甲基嘧啶磷	发酵剂 1	0.0207	33.5
	发酵剂 2	0.0217	31.9
	无	0.0126	55.0
毒死蜱	发酵剂 1	0.0270	25.7
	发酵剂 2	0.0245	28.3
	无	0.0133	52.1
倍硫磷	发酵剂 1	0.0226	30.7
	发酵剂 2	0.0221	31.4
	无	0.0145	47.8
马拉硫磷	发酵剂 1	0.0200	34.7
	发酵剂 2	0.0205	33.8
	无	0.0191	36.3

0.0158~0.0364 h^{-1} (降解速率较快), 马拉硫磷速率常数为 0.0191~0.0205 h^{-1} (降解速率较慢)。根据降解速率常数大小判断, 所研究的 9 种有机磷农药中敌敌畏较易降解(即速度常数较大), 马拉硫磷较稳定(即速

度常数较小)。

表 3 数据也显示, 全脂酸奶发酵时 9 种有机磷农药在全脂乳中的速率常数为 0.0200~0.0355 h^{-1} (接种发酵剂 1)或 0.0205~0.0364 h^{-1} (接种发酵剂 2), 而在对照样全脂乳中 9 种有机磷农药的速率常数仅为 0.0126~0.0191 h^{-1} , 表明发酵剂对有机磷农药的降解有促进作用。整体上看, 发酵剂 1 使甲拌磷、甲基毒死蜱、毒死蜱和倍硫磷的降解有较强的促进作用, 而发酵剂 2 对敌敌畏、敌百虫、二嗪磷、甲基嘧啶磷和马拉硫磷的降解具有较强的促进作用。

Abou-Arab^[13]发现, 发酵肠发酵 72 h 后其 DDT 和林丹的残留量减少 10%和 18%。这表明微生物对有机氯农药残留具有降解作用。Zhao 等^[14]研究发现, 嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌对脱脂乳培养基中 7 种有机磷农药降解促进效果; 而 Bo 等^[15]发现, 在酸奶发酵过程中 6 种有机磷农药的降解速率增大。本研究结果再次表明, 酸奶发酵剂对有机磷农药的降解有促进作用, 并且不同的发酵剂菌株组成会影响其促进作用大小。这一点有待进一步研究。

4 结 论

本研究采用 GC 法分析全脂酸奶发酵时 9 种有机磷农药残留的变化情况, 并计算出其降解动力学常数, 发现 2 种直投式发酵剂对 9 种有机磷农药的降解具有不同程度的促进作用, 其中敌敌畏易降解而马拉硫磷较稳定。直投式发酵剂对各个有机磷农药的降解促进作用具有差异性, 可能与其菌株组成有关系。本研究还进一步表明, 微生物发酵可能为发酵食品提供食品安全方面的有益作用。

参考文献

- [1] Ecobichon DJ. Pesticide use in developing countries [J]. *Toxicol*, 2001, 160(1): 27-33.
- [2] Fayed AE, Zidan ZH, Abou-Arab AAK, *et al*. Incidence of some environmental pollutants in milk and its products at great Cairo markets [J]. *Annals Agric Sci*, 1993, 1: 85-95.
- [3] Kaushik G, Satya S, Naik SN. Food processing a tool to pesticide residue dissipation-A review [J]. *Food Res Int*, 2009, 42(1): 26-40.
- [4] Cardeal ZDL, Paes CMD. Analysis of organophosphorus pesticides in whole milk by solid phase microextraction gas chromatography method [J]. *J Environ Sci Heal B*, 2006, 41(4): 369-375.

- [5] Battu RS, Singh B, Kang BK. Contamination of liquid milk and butter with pesticide residues in the Ludhiana district of Punjab state, India [J]. *Ecotox Environ Safe*, 2004, 59(3): 324–331.
- [6] Zhao XH, Bo LY, Wang J, *et al.* Survey of seven organophosphorus pesticides in drinking water, feedstuffs and raw milk from dairy farms in the Province Heilongjiang during 2008-2009 [J]. *Milchwissenschaft*, 2012, 67(3): 293–296.
- [7] Salas JH, González MM, Noa M, *et al.* Organophosphorus pesticide residues in Mexican commercial pasteurized milk [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(15): 4468–4471.
- [8] Uygun U, Senoz B, Koxsel H. Dissipation of organophosphorus pesticides in wheat during pasta processing [J]. *Food Chem*, 2008, 109(2): 355–360.
- [9] Kawar NS, Iwata Y, Dusch ME, *et al.* Behavior of diazinon, dimethoate, and methidathion in artificially fortified grape juice processed into wine [J]. *J Environ Sci Heal B*, 1979, 14(5): 505–513.
- [10] Banna AA, Kawar NS. Behavior of parathion in apple juice processed into cider and vinegar [J]. *J Environ Sci Heal B*, 1982, 17(5): 505–514.
- [11] Zhao XH, Wang J. A brief study on the degradation kinetics of seven organophosphorus pesticides in skimmed milk cultured with *Lactobacillus* spp. at 42 °C [J]. *Food Chem*, 2012, 131(1): 300–304.
- [12] Putnam RA, Nelson JO, Clark JM. The persistence and degradation of chlorothalonil and chlorpyrifos in a cranberry bog [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(1): 170–176.
- [13] Abou-Arab AAK. Degradation of organochlorine pesticides by meat starter in liquid media and fermented sausage [J]. *Food Chem Toxicol*, 2002, 40(1): 33–41.
- [14] Zhao XH, Wang J, Li TJ, *et al.* Degradation behaviors of seven organophosphorus pesticides in skimmed milk inoculated with *Streptococcus thermophilus* or *Lactobacillus helveticus* [J]. *Milchwissenschaft*, 2012, 67(4): 399–401.
- [15] Bo LY, Zhang YH, Zhao XH. Degradation kinetics of seven organophosphorus pesticides in milk during yoghurt processing [J]. *J Serb Chem Soc*, 2011, 76(3): 353–362.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



周欣伟, 硕士, 主要研究方向为食品化学。

E-mail: xinwei880806@163.com

赵新淮, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为食品化学。

E-mail: zhaoxh@mail.neau.edu.cn