

# 大豆脲酶的提取及其影响因素研究

周东凯, 刘莹, 马学良, 刘冬梅, 王占勇, 马娟

(辽宁石油化工大学, 辽宁抚顺 113001)

**摘要:**为了寻求大豆脲酶的国产化途径,对市售大豆进行了脲酶提取研究。用乙醇水溶液从市售大豆中提取出了大豆脲酶,测得该脲酶的  $K_m$  值为  $3.576 \times 10^{-2}$ , 1.0 mL 提取液的酶活力为 26.58 U。大豆脲酶分解尿素的产物为铵氮,借助纳氏试剂比色法和凯氏定氮法对生成的铵氮进行了比色分析,进而从乙醇浓度、固液比、pH 值考察了脲酶的最佳提取条件。确定的最佳乙醇浓度为 30%、固液比为 1:10,最适 pH 值为 7.0。

**关键词:**大豆;脲酶; $K_m$ ;酶活

**中图分类号:**Q550.3

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-9841(2008)04-0704-04

## Extracting of Urease from Soybean and Its Influencing Factors

ZHOU Dong-kai, LIU Ying, MA Xue-liang, LIU Dong-mei, WANG Zhan-yong, MA Juan

(Liaoning Shihua University, Fushun 113001, Liaoning, China)

**Abstract:** The problem of lacking soybean urease in Chinese has been becoming more and more serious thanks to the increasing market demand although soybean (*Glycine max*) was planted in large area all across China, the experiment was designed to extract soybean urease by ethanol-water solution in laboratory and realized the predetermined target. The  $K_m$  value of the soybean urease was  $3.576 \times 10^{-2}$ , the enzyme activity of 1.0 mL extracting liquid was 26.58 U. The optimum conditions of extracting soybean urease were investigated by the concentration of ethanol in water, the ratio of soybean fine powder weight to extract liquid volume (W/V) and pH value of the extract solution. Urea could be decomposed to  $(NH_4)_2CO_3$  by soybean urease, and  $NH_4^+$  could be quantitatively determined by Nessler's reagent colorimetry. The absorption value at 480 nm ( $A_{480}$ ) was proportional to  $NH_4^+$  concentration in the reaction solution, so it had linear correlation with the soybean urease activity. When the concentration of ethanol in water was 30%,  $A_{480}$  showed the best value 0.885 than those were 18%、24%、42% and 36%. W/V equal to 1:10 was the best ratio for  $A_{480}$  than those were 1:6, 1:8, 1:12 and 1:14. Kjeldahl method was used to determine the  $NH_4^+$  concentration at different pH values, the HCl dosage in titration operation was proportional to  $NH_4^+$  concentration thus to manifest the soybean urease activity, the experiment result showed that 7.0 was the optimum pH value.

**Key words:** Soybean (*Glycine max*); Soybean urease;  $K_m$ ; Enzyme activity

脲酶作为重要的生物制剂在医学、畜牧业、环保等方面都有很广泛的应用。随着我国经济、科技的迅速发展,脲酶的需求量也越来越大。如脲酶是临床诊断血清中尿素氮的试剂盒中的一种重要的酶<sup>[1]</sup>。利用大豆中含有的脲酶,在适当的温度下,能将尿素分解为使 pH 试纸变蓝的碳酸铵,可检出牛乳粉中 0.1% 大豆粉含量<sup>[2]</sup>。利用脲酶还可以处理尿素废水<sup>[3]</sup>。目前,商品化脲酶产品主要是从由洋刀豆中提取,国内由于缺乏洋刀豆资源,故我国需要的脲酶依赖进口<sup>[4]</sup>。为实现脲酶的国产化,从价

格低廉、来源广泛的市售大豆中提取了脲酶,并提取条件进行了考察,为进一步研究提供一定的参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要仪器及试剂

1.1.1 仪器 威的 VL-3666B 干磨机;721 型可见光分光光度计;凯氏定氮仪;海尔 BCD-156TADZ 冰箱;100 目钢筛;800B 台式离心机。

1.1.2 试剂 所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

收稿日期:2007-06-25

作者简介:周东凯(1980-),男,硕士,研究方向为环境工程与微生物技术。E-mail:zdk1980@126.com。

通讯作者:马学良,高级实验师。E-mail:maxl6864566@126.com。

1.1.3 提取原料 干燥的市售大豆(*Glycine max*)。

## 1.2 方法

1.2.1 豆粉的制备 用天平称取 100 g 大豆,粉碎,以 100 目钢筛筛出豆粉放置于冰箱备用。

1.2.2 脲酶的提取 向锥形瓶中加入 2.0 g 豆粉,再加入 20 mL 的 30% 乙醇溶液,充分摇匀 30 min,放置冰箱里保存 24 h 后,以  $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min,上清液为脲酶提取液。

1.2.3 脲酶  $K_m$  值的测定 取 5 支试管(0-4<sup>#</sup>),分别向每只试管中加入 0、1.0、0.5、0.4、0.25 mL 的  $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的尿素溶液,试管中液体体积不足 1.0 mL 的,用蒸馏水补到 1.0 mL。向每个试管中加入 pH 为 7.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液 3.0 mL,并在 25 °C 恒温水浴中预热 5 min。向 0<sup>#</sup> 管加 0.1 mL 煮沸的脲酶提取液,向其它试管中加入 0.1 mL 未煮沸的脲酶提取液,在 25 °C 的恒温水浴中保持 10 min。之后向每个试管中加入 10% 的  $\text{ZnSO}_4$  溶液 1.0 mL 和  $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 NaOH 溶液 0.2 mL,混匀后离心分离。从每支试管中取上清液 0.5 mL 置于比色管中,加入蒸馏水 4.0 mL,10% 的酒石酸钾钠 0.5 mL,钠氏试剂 1.0 mL,混匀,以对照管调零,读取在 480 nm 处的吸光度值( $A_{480}$ )。

1.2.4 脲酶活力测定 取一支比色管,向其中加入浓度为  $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的尿素 0.4 mL、水 0.1 mL、pH 为 7.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液 3.0 mL,在 25 °C 水浴中预热 5 min。加入 3 倍稀释的脲酶提取液 0.1 mL,立即盖好比色管塞并剧烈摇动,置于 25 °C 恒温水浴内准确作用 10 min。然后加入  $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 NaOH 溶液 0.2 mL、蒸馏水 7.0 mL、10% 的酒石酸钾钠溶液 0.5 mL、钠氏试剂 1.0 mL,混匀。在 480 nm 处测吸光度值( $A_{480}$ ),参考以梯度稀释的硫酸铵溶液绘制的吸光度与铵氮浓度的标准曲线, $y=0.18\,266x+0.00886$ , $R=0.99912$ ,其中  $y$  代表  $A_{480}$ , $x$  代表含有硫酸铵的量,单位是  $\mu\text{mol}$ ,计算酶活。

1.2.5 乙醇浓度对脲酶活力的影响 分别于 5 个锥形瓶中加入 2.0 g 豆粉,按 1-5<sup>#</sup> 顺序加入 18%、24%、30%、36%、42% 的乙醇溶液 20.0 mL,提取脲酶,测定脲酶活力。

1.2.6 固液比(豆粉质量:乙醇溶液体积)对脲酶活力影响 分别于 5 个锥形瓶中加入豆粉 2.0 g,按 1-5<sup>#</sup> 顺序加入 30% 乙醇溶液 12.0、16.0、20.0、24.0、28.0 mL,提取脲酶并测定脲酶活力。

1.2.7 pH 值对脲酶活力的影响 分别向 5 支试管

中加入  $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  尿素溶液 0.5 mL,然后向 1-5<sup>#</sup> 管中依次加入 pH 分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的缓冲溶液 1.0 mL。在 25 °C 恒温水浴中预热 5 min 后向每个管中加入脲酶提取液 0.5 mL。反应后立即向每支试管中加入  $1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的盐酸 1.0 mL 混匀,把试管放在冰水浴中停止反应。从每支试管中取 0.2 mL 反应液用凯氏定氮法定氮<sup>[5]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 脲酶 $K_m$ 值的测定

以吸光度值( $A_{480}$ )的倒数和尿素(底物[S])浓度的倒数绘制图 1。

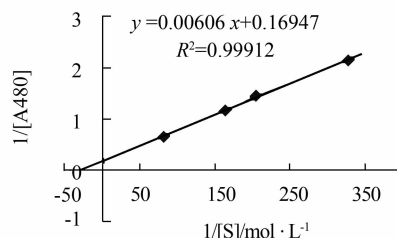


图 1 脲酶  $K_m$  值的测定曲线

Fig. 1 Determination curve of soybean urease  $K_m$  value

米氏常数  $K_m$  是酶的重要特征常数之一,通常利用米氏方程的双倒数形式即双倒数方程(double-reciprocal plot)来测定, $\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$ ,具体方法是将反应速度的倒数  $1/V$  对底物浓度的倒数  $1/[S]$  作图,得到一条直线,该直线在 Y 轴的截距为  $1/V_{\max}$ ,在 X 轴上的截距为  $1/K_m$  的绝对值。在脲酶水解尿素实验中,酶促反应速度  $V$  与时间的积分为生成铵氮的量,铵氮与钠氏试剂生成棕黄色的络合物,在 480 nm 处有最大吸收峰,因此,在相同时间内, $A_{480}$  与反应速度成正比,所以用  $1/A$  代替  $1/V$  作图求  $K_m$  值,方法简便,且结果不受影响。根据图 1 算出大豆脲酶的  $K_m$  值为  $3.576 \times 10^{-2}$ 。

### 2.2 脲酶活力的测定

大豆脲酶水解尿素的化学反应有很强的专一性,水解产物是碳酸铵,因为 1 mol 碳酸铵和 1 mol 硫酸铵中含有等量的铵氮,所以,用以梯度稀释的硫酸铵和钠氏试剂比色的  $A_{480}$  制作的标准曲线为溶液中的铵氮定量,完全适用于碳酸铵。脲酶分解尿素测得的  $A_{480}$  为 0.818,参考标准曲线可知碳酸铵含量为  $4.43\text{ }\mu\text{mol}$ ,因此,试样的铵氮为  $8.86\text{ }\mu\text{mol}$ ,乘以

30 倍稀释倍数后得到 1 mL 脲酶提取液水解尿素生成的铵氮为  $265.8 \mu\text{mol}$ , 将催化生成  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$  铵氮定义为一个酶活单位, 则 1 mL 大豆脲酶提取液的酶活力为 26.58 U。

### 2.3 乙醇浓度对脲酶活力的影响

以乙醇在水中的百分比浓度和  $A_{480}$  制作的曲线见图 2。

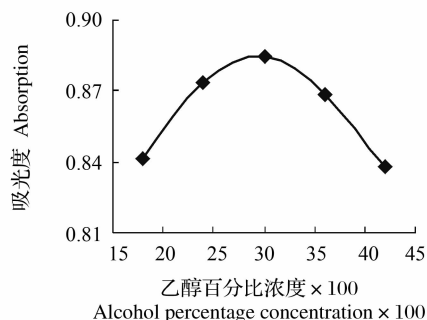


图 2 乙醇浓度对脲酶活力的影响

Fig. 2 The effect of ethanol concentration on urease activity

根据图 2 可以看出, 随着乙醇浓度的增大,  $A_{480}$  即脲酶分解尿素生成铵氮的量先增大后减小, 在乙醇浓度为 30% 时  $A_{480}$  达到最大值 0.885, 从而确定 30% 为提取脲酶的最适乙醇浓度。由于  $A_{480}$  与酶活成正比, 所以可知此时脲酶的酶活最大。

### 2.4 固液比 (豆粉质量: 乙醇溶液体积) 对脲酶活力的影响

以不同的固液比和  $A_{480}$  绘制的曲线见图 3。

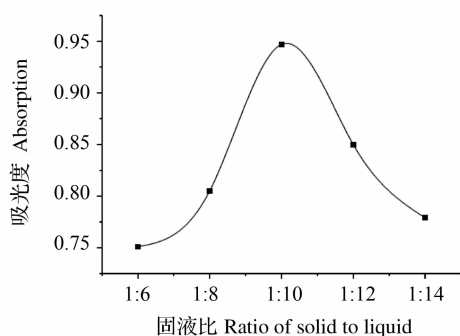


图 3 固液比对脲酶活力的影响

Fig. 3 The effect of the proportion of solid to liquid on soybean urease activity

根据图 3 可以看出, 随着固液比的增加,  $A_{480}$  即脲酶分解尿素生成铵氮的量先增大后减小, 在固液比为 1:10 时,  $A_{480}$  达到最大值 0.974, 从而确定 1:10 为提取脲酶的最佳固液比。

### 2.5 pH 值对脲酶活力的影响

根据凯氏定氮法原理, 滴定时盐酸消耗量与滴

定液中铵氮含量成正比。由图 4 可看出, 在 pH 值为 7.0 时消耗的盐酸体积最多, 说明此时消化液中的铵氮含量最高, 由此可知, 在 pH 值为 7.0 时, 脲酶的活力最高。

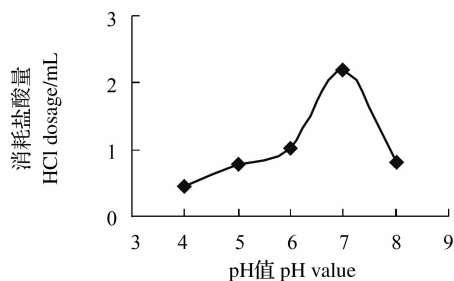


图 4 pH 值对脲酶活力的影响

Fig. 4 The effect of pH value on soybean urease activity

## 3 结论与讨论

我国是大豆生产大国, 大豆中含有丰富的脲酶, 实现脲酶的国产化可以大大缓解国内市场对进口的压力。研究利用乙醇水溶液成功的从大豆中提取出了大豆脲酶, 利用双倒数方程, 以反应 10 min 后反应液的吸光度值 ( $A_{480}$ ) 代替反应初速度  $V$  进行计算, 得出脲酶的米氏常数  $K_m$  为  $3.576 \times 10^{-2}$ 。进而对脲酶的酶活进行了测定, 利用硫酸铵中铵氮含量制定的标准曲线, 确定出脲酶分解尿素生成碳酸铵的铵氮含量, 将催化生成  $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$  铵氮定义为一个酶活单位, 则 1.0 mL 大豆脲酶提取液的酶活为 26.58 U, 由于没有估算出大豆脲酶的质量, 所以还不能求出大豆脲酶的比酶活。

对大豆脲酶的提取条件进行了探究。由于脲酶分解尿素的产物是铵氮, 所以通过定量生成的铵氮, 可以考察出一定时间内特定条件下脲酶分解尿素的活力大小, 从而确定出最佳脲酶提取条件。大豆脲酶是蛋白质, 属于两性物质, 用乙醇的水溶液作提取剂要优于乙醇或水单独使用, 乙醇浓度为 30% 时, 提取效果最佳。原因可能是乙醇浓度过低时, 不足以将脲酶全部提取出来, 乙醇浓度过高时, 提取液的非极性太强, 使得提取出来的脲酶较少, 乙醇浓度过高或过低都会导致脲酶浓度降低。进而考察了豆粉和提取液的比例即固液比, 当固液比为 1:10 时,  $A_{480}$  为 0.974, 脲酶的活力最佳。pH 对脲酶活力有很大影响, 当 pH 接近脲酶的等电点时, 脲酶的溶解性降低, 分解尿素的能力下降, 由结果得知, pH 较高或较低都不适合, 大豆脲酶的最适合 pH 值为 7.0。

## 参考文献

- [1] 陈菊娣,于云,杜小英,等.新法提取脲酶的研究[J].中国医药工业杂志,1997,28(12):531-533. (Chen J D, Yu Y, Du X Y, et al. A new method of extracting urease[J]. Chinese Medicine Industrial Magazine, 1997, 28(12): 531-533. )
- [2] 张继红.全脂牛乳粉掺大豆粉的脲酶测定法[J].广州食品工业科技,1996,12(1):24. (Zhang J H, Determination of urease in the whole milk powder with powder soybean[J]. Guangzhou Food Industry Technology, 1996, 12(1): 24. )
- [3] 张秋劲,王庆安.黑龙滩水库水体生态系统酶活力及其生态学意义研究[J].四川环境,1996,15(2):14-18. (Zhang Q J, Wang Q A, Black Longtan reservoir water ecosystems activity and its ecological significance [J]. Sichuan Environment, 15(2): 14-18. )
- [4] 崔有宏,罗侃,吴育凌,等.黄豆脲酶的提取与性质研究[J].甘肃科学学报,2000,1(1):62-66. (Cui Y H, Lu K, Wu Y L, et al. The extraction and nature study of soybean urease [J]. Gansu Science Journal, 2000, 1(1): 62-66. )
- [5] 周东凯,富雪菲,吴刚,等.一种蛋白质含量测定方法的改进研究[J].饲料工业,2005,18:44-45. (Zhou D K, Fu X F, Wu G, et al. Study on an improvement method of protein content determination [J]. Feed Industry, 2005, 18: 44-45. )
- (上接第 703 页)
- [4] 林红,来永才,齐宁,等.黑龙江省野生大豆、栽培大豆高异黄酮种质资源筛选[J].植物遗传资源学报,2005,6(1):53-55. (Lin H, Lai Y C, Qi N, et al. Screening of germplasm with high content of isflavone in wild and cultivated soybean in Heilongjiang[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2005, 6(1): 53-55. )
- [5] 孙君明,丁安林,常汝镇.大豆籽粒中异黄酮含量的遗传初步分析[J].中国农业科学,2002,35(1):16-21. (Sun J M, Ding A L, Chang R Z, Genetic analysis on isflavone content in soybean seeds [J]. Science Agricultura Sinica, 2002, 35(1): 16-21. )
- [6] 曾国良,王继安,韩英鹏,等.大豆异黄酮含量与主要农艺性状相关性及通径分析[J].大豆科学,2007,26(1):25-29. (Zeng G L, Wang J A, Han Y P, et al. Correlation of isflavones with the major agronomic characters in soybean [J]. Soybean Science, 2007, 26(1): 25-29. )
- [7] 孙君明,丁安林.地理环境对大豆种子异黄酮积累的影响趋势[J].大豆科学,1997,16(4):298-303. (Sun J M, Ding A L. Effects of geographical conditions on the accumulation of isoflavone in soybean seeds[J]. Soybean Science, 1997, 16(4): 298-303. )
- [8] 孙君明,丁安林,常汝镇.大豆籽粒中异黄酮含量与生态因子相关关系的研究[J].中国农业科学,2004,37(10):1458-1463. (Sun J M, Ding A L, Chang R Z. Effects of eco-physiological factors on isflavone contents in soybean seeds[J]. Science Agricultura Sinica, 2004, 37(10): 1458-1463. )

## 《分子植物育种》全面征订

《分子植物育种》于2003年创刊,创刊伊始即被美国化学文摘(CA),中国科学引文数据库、中国科技期刊全文数据库、中国引文数据库,中国科技期刊数据库、中文科技期刊数据库,中国核心期刊(遴选)数据库,中国生物学文摘和中国生物学数据库等多家中文文献数据库收录。据最新2007年度中国期刊引证研究报告统计,本刊2006年影响因子为0.918。

《分子植物育种》刊登的论文涉及水稻、小麦、玉米、油菜、大豆、棉麻、薯类、果树、蔬菜、花卉、茶叶、林、草等植物。研究领域主要涉及转基因育种、分子标记辅助育种、分子设计育种以及相关的植物功能基因、遗传多样性、分子标记遗传及遗传育种基础理论和实验技术等。

读者对象:国内外从事植物转基因育种、分子生物学、分子遗传学和分子育种等相关学科的专家、学者,科研工作者,大专院校师生等。也可作为我国科技部门生物领域的领导、管理干部的参考刊物。

订阅2008-2009年期刊,新老订户以及投稿作者将得到如下的优惠(本刊为双月刊,大16开本,208页,6期/年,国内定价¥40.00元,全年¥240.00元,国际定价\$20.00元,全年\$120.00元):

投稿作者:每征订1份,即5折优惠(只需¥120元/年)

您可以通过一下途径征订:

1. 通过邮局征订:邮发代码:84-23

2. 通过联合征订:征订代码:6521

3. 通过编辑部征订:mpbbj@vip.sina.com

地址:海南省海口市海秀大道128号双岛公寓13B室《分子植物育种》编辑部

邮编:570206 电话:0898-68966415 传真:0898-68958180 QQ:291006984

投稿邮箱:mpb@hitar.org; mpb@molplantbreed.org 编辑邮箱:mpbbj@vip.sina.com

网站:www.molplantbreed.org