

大豆种子萌发期脲酶催化特性的研究

何士敏, 向邓云, 尹实实
(长江师范学院 生命科学系, 重庆 408100)

摘要:根据脲酶水解尿素后释放 NH_3 而使得水溶液 pH 值升高的原理, 通过冷冻离心提取酶液和酸度计测定 ΔpH 的方法, 测知大豆种子萌发期脲酶的活性, 为大豆的合理栽培提供参考。结果表明: 合丰 25 大豆, 在底物浓度为 $0.25\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 脲酶活性最强; 辽豆 7 号, 在底物浓度为 $0.35\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 脲酶活性最强; 2 个大豆脲酶的最适温度是 70°C ; 大豆种子水培养 24 h, 脲酶活性最强。合丰 25 的尿酶活性大于辽豆 7 号。

关键词:大豆; 脲酶; 催化特性; 底物浓度; 温度

中图分类号: S565.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-9841(2009)05-0856-03

Investigation of the Urea Enzyme Catalysis Specific Property in the Sprouting Period of Soybean

HE Shi-min, XIANG Deng-yun, YIN Shi-shi
(Department of Life Science, Changjiang Teacher's College, Chongqing 408003, China)

Abstract: Urea enzyme influence environmental urea utilization ratio directly during sprouting of soybean seeds. According to the principle that urea will release NH_3 when hydrolyzed by urea enzyme and hence increase pH of aqueous solution. Soybean seeds of Hefeng 25 and Liaodou 7 were soaked in distilled water for 12 h, and then cultured in incubator at 25°C for 0, 24, 36, 48 and 72 h, respectively. Then the cultured soybean seeds were smashed and centrifuge to obtain the urea enzyme sample solution. The activity of urea enzyme under different concentration of urea phosphate buffer and temperature were calculated based on the ΔpH . Results showed that the urea enzymic activity of Hefeng 25 was maximum when concentration of substrate was $0.25\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; while for Liaodou 7 the concentration of substrate was $0.35\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The most suitable temperature for urea enzymic activity was 70°C , and soybean seeds had highest urea enzyme activity when cultured for 24 h. The Urea enzyme activity of Hefeng 25 was higher than that of Liaodou 7.

Key words: Soybean; Urea enzyme; Catalysis specific property; Substrate concentration; Temperature

脲酶特异性地促使脲水解释放出氨和二氧化碳, 分子量约为 483.0, 等电点为 4.8, 最适 pH7.0。脲酶广泛分布于植物界的种子中, 某些微生物中也有, 但以刀豆和大豆中含量较丰富^[1]。脲酶活性越大, 栽培中的大豆种子越能更好地利用环境中的尿素。而影响脲酶活性大小的因素很多, 因此, 研究脲酶的测定方法以及影响脲酶活性大小的因素越来越受到广大科研工作者的重视。目前, 对大豆制品中脲酶活性的研究较多, 而对萌发中的大豆种子的脲酶研究甚少。萌发种子中的脲酶活性直接影响大豆种子对环境中的尿素的利用率, 从而影响大豆的产量。研究大豆种子萌发过程中脲酶活性随外界环境条件的变化情况, 旨在为大豆的合理栽培提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

所用的大豆种子是合丰 25 和辽豆 7 号, 购于涪陵何亚种子公司。挑选籽粒饱满的大豆种子各 50 粒, 置于无氨蒸馏水中浸泡 12 h。将浸泡好的种子整齐摆放在垫有洁净脱脂纱布的培养皿中, 以蒸馏水为培养液, 置于 25°C 的恒温培养箱中培养。然后分别恒温培养 0、24、48、72 h 取样, 5 次重复。

1.2 方法

1.2.1 大豆脲酶提取液的制备 按照大豆种子材料的质量(g)与 30% 的乙醇体积(mL)的比例为 1:20 的方法, 将二者置于研钵中研磨成匀浆^[1], 取匀浆液置于 GR22G 高速冷冻离心机(日本日立公司)

收稿日期: 2008-10-30
基金项目: 长江师范学院重点扶持学科资助项目。
作者简介: 何士敏(1955-), 女, 教授, 现主要从事生物化学及分子生物学研究。E-mail: heshimin5589@sina.com。

中离心 4 min($10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 5°C),离心后取上清液作为酶液置冰箱中 5°C 保鲜备用。

1.2.2 不同底物浓度条件下脲酶活性的测定 脲酶水解尿素后释放 NH_3 , NH_3 溶解于水溶液中使水溶液 pH 值升高,而 pH 变化的大小与脲酶活性成正比,因此可以用其与对照的差值表示脲酶活性高低,单位为 $\Delta\text{pH}^{[2]}$ 。取 8 支 50 mL 的大试管,每管各加入脲酶液 1 mL,然后按管号依次加入 0.05、0.15、0.25、0.35、0.45、0.55、0.65 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的尿素磷酸盐缓冲液 20 mL,摇匀后置于 70°C 恒温水浴中保温 30 min(每隔 5 min 振摇一次),然后分别向各管中加入 4 滴饱和氯化汞溶液以终止反应。用 SG2 型酸度计分别测定各管的 pH 值。以 20 mL 磷酸盐缓冲液代替 20 mL 尿素磷酸盐缓冲液作为对照管,计算出各管的 ΔpH 。 ΔpH 的大小代表了脲酶活性的高低^[3-4]。

1.2.3 不同温度条件下大豆脲酶活性的测定 取 7 支 50 mL 的大试管,每管各加入脲酶液 1 mL,然后向各管分别加入 20 mL $0.25\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (辽豆 7 号加 $0.35\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的尿素磷酸盐缓冲液,充分混匀。按管号依次将各管置于不同温度 (30°C 、 40°C 、 50°C 、 60°C 、 70°C 和 80°C) 条件下,恒温水浴 30 min,每隔 5 min 振摇一次。然后将各管分别加入 4 滴饱和氯化汞溶液终止酶促反应,计算 ΔpH 值。

2 结果与分析

2.1 底物浓度对大豆脲酶活性的影响

2.1.1 底物浓度对合丰 25 脲酶活性的影响 由反应液的 ΔpH 与大豆脲酶活性大小呈正相关该原理,综合 4 个取样时期不同底物浓度的脲酶活性可以知道,底物浓度为 $0.25\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时脲酶活性最强,时期 2(25°C 恒温培养 24 h)脲酶活性最大, ΔpH 达到 1.13。

酶的底物浓度与酶促反应速度的关系一般情况下符合米氏理论^[5]。由图 1 可以看出,底物浓度对合丰 25 脲酶活性影响基本上符合这一理论。4 个时期中, $0.05\sim0.25\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 底物浓度梯度下, pH 的变化(即脲酶活性)呈上升趋势,底物浓度为 $0.25\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时脲酶活性达到最大。在 $0.25\sim0.65\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 底物浓度梯度中, pH 的变化(即脲酶活性)呈平稳趋势。

2.1.2 底物浓度对辽豆 7 号脲酶活性的影响 从图 2 可以看出,底物浓度为 $0.35\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时脲酶活性最强,时期 2 脲酶活性最大, ΔpH 达到 0.97。由图 2 可知,底物浓度对辽豆 7 号脲酶活性影响基本

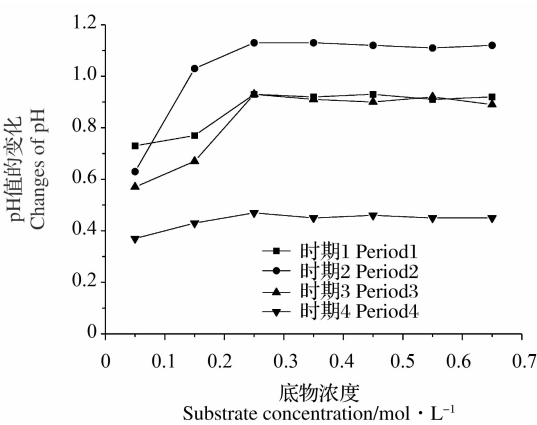


图1 底物浓度对合丰 25 脲酶活性的影响

Fig.1 Effect of substrate concentration on urea enzyme activity of Hefeng 25

上符合米氏理论。4 个时期中, $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 到 $0.35\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 这一底物浓度梯度下, pH 的变化(即脲酶活性)呈上升趋势,底物浓度为 $0.35\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时脲酶活性达到最大。 $0.35\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 到 $0.65\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 这一底物浓度梯度下, pH 的变化呈平稳趋势。

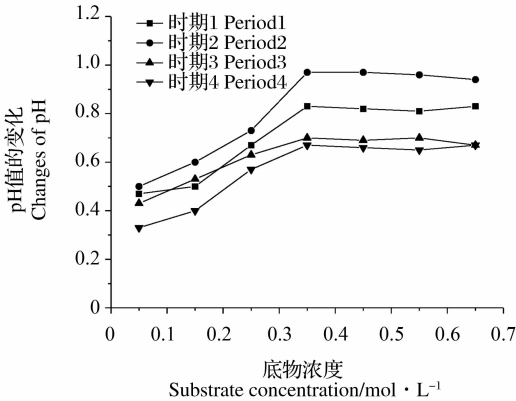


图2 底物浓度对辽豆 7 号脲酶活性的影响

Fig.2 Effect of substrate concentration on urea enzyme activity of Liaodou 7

2.2 温度对大豆脲酶活性的影响

2.2.1 温度对合丰 25 号脲酶活性的影响 从图 3 可以看出,温度为 70°C 时脲酶活性最强,时期 2 脲酶活性最大, ΔpH 达到 1.30。 30°C 至 70°C 时, pH 的变化呈上升趋势,温度为 70°C 达到最大; 70°C 至 80°C 时,呈急剧下降趋势,原因是此时的酶已经开始失活以至后来变性。

2.2.2 温度对辽豆 7 号脲酶活性的影响 从图 4 可以看出,温度为 70°C 时脲酶活性最强,时期 2 脲酶活性最大,达到 1.53 ΔpH 。 30°C 至 70°C 时, pH 的变化呈上升状态, 70°C 时,酶活性达到最大; 70°C 至 80°C 时,呈急剧下降状态。

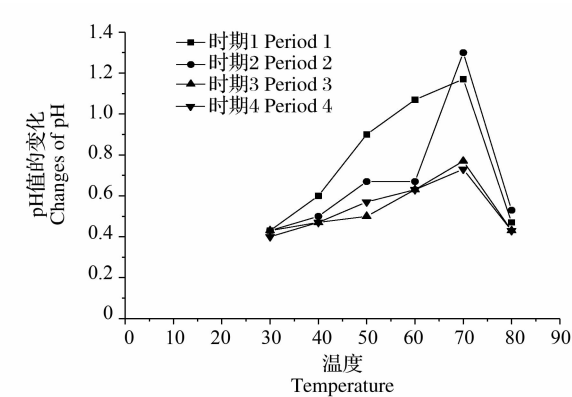


图3 温度对合丰25号脲酶活性的影响
Fig.3 Effect of temperature on urea enzyme activity of Hefeng 25

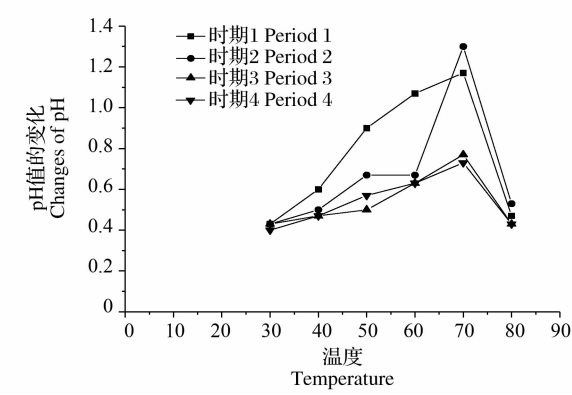


图4 温度对辽豆7号脲酶活性的影响
Fig.4 Effect of temperature on urea enzyme activity of Liaodou 7

2.3 不同品种大豆脲酶活性的比较

供试的2个大豆品种,其脲酶活性最强时期均为第2时期(培养24 h)。

表1 底物浓度对大豆第2时期脲酶活性的影响
Table 1 Effect of substrate concentration on soybean urea enzyme activity in the second period(ΔpH)

品种 Varieties	底物浓度 Substrate concentration/mol·L ⁻¹						
	0.05	0.15	0.25	0.35	0.45	0.55	0.65
合丰25							
Hefeng 25	0.63	1.03	1.13	1.12	1.12	1.11	1.12
辽豆7号							
Liaodou 7	0.50	0.60	0.73	0.97	0.97	0.96	0.94

由表1可知,底物浓度对2个大豆脲酶活性的影响不一致。合丰25无论在哪个底物浓度条件下ΔpH值都大于辽豆7号。合丰25在底物浓度为0.25 mol·L⁻¹时ΔpH(即脲酶活性)最大,达到1.13;辽豆7号在底物浓度为0.35 mol·L⁻¹时ΔpH最大,达到0.97。结果表明,合丰25脲酶的最适底

物浓度为0.25 mol·L⁻¹;辽豆7号脲酶的最适底物浓度为0.35 mol·L⁻¹;二者都是25℃恒温培养24 h(时期2)的脲酶活性最大,前者达到1.13 ΔpH;后者达到0.97 ΔpH。合丰25和辽豆7号大豆脲酶的最适温度都为70℃。合丰25号的脲酶活性比辽豆7号强。

3 讨论

脲酶在大豆栽培中直接影响大豆种子对环境中心尿素的利用率。尿素这种氮肥可溶于土壤中的水,大豆种子在萌发的过程中需从土壤中吸收一定量的水分。进入吸胀大豆种子中的尿素,可在大豆脲酶的作用下水解为NH₃和CO₂。NH₃是机体合成氨基酸的有效成分,而氨基酸一方面是蛋白质合成的原材料,另一方面还可用来合成一些重要的生物活性物质如叶绿素、细胞色素、乙烯、泛醌和质醌、生物碱、嘌呤、核酸、磷脂等^[5]。大豆种子萌发过程中脲酶活性的高低直接关系到大豆幼苗是否茁壮。茁壮的幼苗,是大豆生长茂盛的基础也关系到大豆产量的高低。结果说明,底物浓度和温度是影响大豆种子脲酶活性的主要外界因素,探知这2个因素(外界环境条件)与脲酶活性的关系,可在大豆栽培过程中,合理使用尿素(脲酶的底物)并考虑尽可能在气候温暖的条件下栽培大豆。

参考文献

[1] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术[M].北京:高等教育出版社,1981:145-149. (Zhang L X,Zhang T F,Li L Y. Method and technology of biochemical experiment[M]. Beijing: Higher Education Press,1981,145-149.)
[2] 余云雷,齐德生,张妮娅.大豆脲酶活性检测方法比较研究[J]. 养殖与饲料,2005,12(6):19-21. (Xu Y L,Qi D S,Zhang N Y. Compare study of urea enzymic activity test in soybeans[J]. Breeding and Feed,2005,12(6):19-21.)
[3] 陈建新,刘翠珍.简述大豆脲酶活性测定法的探讨[J]. 中国饲料,1994,10(6):32-33. (Chen J X,Liu C Z. Approach determine method simply and quickly of soybean urea enzymic activity[J]. China Feed ,1994,10(6):32-33.)
[4] 沈小海,王辉.脲酶相对活性的定量检测[J]. 甘肃科学学报,2002,(5):7. (Shen X H,Wang H. Quantitative test of urea enzymic relative activity[J]. Journal of Gansu Science,2002,(5):7.)
[5] 王林嵩,毛慧玲.普通生物化学[M].北京:科学出版社,2008:364-365. (Wang L S,Mao H L. Common biochemistry[M]. Beijing:Science Press,2008:364-365.)