

## 黄豆豆渣中脲酶的提取精制及其影响因素研究

张铁军<sup>1</sup>, 施圆圆<sup>1</sup>, 孔令漪<sup>2</sup>, 曹蓝霄<sup>2</sup>, 周嘉青<sup>3</sup>

1. 广州医科大学生命科学院, 广州 511436;

2. 广州医科大学第三临床学院, 广州 511436;

3. 广州医科大学南山学院, 广州 511436

**摘要:** 为拓展脲酶的国产化途径,对黄豆豆渣中脲酶的提取进行了研究。建立了从黄豆豆渣中提取脲酶的全套流程,利用盐析法和有机溶剂沉淀法,通过浸提及离心等试验操作手段,将黄豆豆渣中的脲酶进行提取精制,产率为0.1%。同时确定了脲酶的最佳提取条件:其最佳浸提温度为50℃,最佳丙酮浓度为50%,最适pH为7.0。利用纳氏试剂比色法的原理,测得该脲酶在最佳实验条件下的米氏常数 $K_m$ 值为 $4.11 \times 10^{-2}$  mol/L,1 mL脲酶溶液中的酶活力为18.63 U。从黄豆豆渣中提取脲酶,既可解决脲酶的国产化问题,又可提高黄豆豆渣的附加值,研究结果具有良好的工业价值和经济效益。

**关键词:** 黄豆豆渣;脲酶;酶活力; $K_m$ ;酶活影响因素

DOI:10.19586/j.2095-2341.2017.0005

## Study on the Extraction and Factors Affecting Enzyme Activity of Urease from Soybean Dregs

ZHANG Tiejun<sup>1</sup>, SHI Yuanyuan<sup>1</sup>, KONG Lingyi<sup>2</sup>, CAO Lanxiao<sup>2</sup>, ZHOU Jiaqing<sup>3</sup>

1. GMU-GIBH Joint School of Life Science, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China;

2. The Third Clinical School, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China;

3. Nanshan School, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China

**Abstract:** The research of extracting urease from soybean dregs was carried out in order to expand the way of urease localization. The research had established a full set of extracting urease from soybean dregs. By use of the method of salting out and organic solvent precipitation, the urease in the soybean dregs was extracted and refined through experiments of extraction and centrifuging, etc., and its yield rate was 0.1%. Meanwhile, the optimum condition of urease extracting was determined: the optimum extracting temperature was 50℃, the optimum acetone concentration was 50%, and the most suitable pH value was 7.0. By the principle of Nessler's reagent colorimetric method, it was tested that the value of Michaelis constant ( $K_m$ ) was  $4.11 \times 10^{-2}$  mol/L and the value of enzyme activity in the urease solution of 1 mL was 18.63 U under the optimum conditions. Extracting urease from soybean dregs not only solves the problem of urease localization, but also improves the added value of soybean dregs. The result of the research brings good industrial values and economic benefits.

**Key words:** soybean dregs; urease; enzyme activity;  $K_m$ ; factors affecting enzyme activity

脲酶(urease)亦称尿素酶,是一种寡聚酶,分子量约为293 500 Da,等电点为3.9,具有绝对专一性<sup>[1]</sup>,特异性地催化尿素水解释放出氨和二氧化碳<sup>[2]</sup>。脲酶是一种在各行业应用广泛的重要生物制剂。广泛分布于豆类植物中,尤其是在黄

豆、刀豆中含量丰富,约1%~1.5%。在医药方面,脲酶是幽门螺旋菌感染诊断试验RUT中的一种重要的酶<sup>[3]</sup>;在农业方面,适当条件下应用种子封装与脲酶可显著增强植物早期阶段氮营养的吸收利用<sup>[4]</sup>,另外,脲酶还可用于尿素废水的处

收稿日期:2017-01-24; 接受日期:2017-02-21

基金项目:国家自然科学基金项目(31501169);广东省自然科学基金项目(2016A030310274);广州市属高校科研项目(1201430264);广州医科大学校级科研项目(2013C10)资助。

作者简介:张铁军,讲师,博士,主要从事生物化学与分子生物学的研究。E-mail:zhang\_tiejun@gzhu.edu.cn

理<sup>[5]</sup>。国外对脲酶的制备研究早已成熟,生产方法主要是从洋刀豆中提取脲酶,并于近年来开始致力于研究脲酶的其他作用,如利用重组酸性脲酶消除致癌因素氨基甲酸乙酯(ethyl carbamate, EC)前体物质尿素等<sup>[6]</sup>。

随着我国经济、科技的迅速发展,脲酶的需求量越来越大,但因缺少洋刀豆资源,进而导致我国所需的脲酶主要依靠进口。因此,若能从黄豆(*Glycine max*)豆渣中提取脲酶,既可解决脲酶国产化问题,又可提高黄豆豆渣的附加值,具有巨大的经济效益。豆渣是生产豆奶或豆腐过程中的副产品,每年全球的豆渣产量约为600万t<sup>[7]</sup>。中国是豆腐生产的发源地,具有悠久的历史,豆腐的生产量、销售量都较大,每年会产生大量的副产品(如豆渣),废弃后造成的浪费也相当巨大。本实验旨在研究从黄豆豆渣中提取有活性且纯度较高的脲酶的可行性及其影响因素。因此,本实验选择从豆制品厂获取的豆渣作为原材料,成功分离出有活性的高纯度脲酶,并摸索建立从黄豆豆渣中提取脲酶的全套流程及活性测定方法,找到脲酶提取的新突破点,变废为宝,为价格低廉的豆渣带来更大、更普遍的实际意义和价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

黄豆豆渣来源于豆制品厂;硫酸锌、氢氧化钠、无水乙醇、尿素、丙酮、三羟甲基氨基甲烷、硫酸铵、纳氏试剂、酒石酸钾钠等试剂购自广州化学试剂厂,均为分析纯。

### 1.2 仪器

100 目标标准分样筛(新乡市绿声通用机械设备制造有限公司);721 型可见光分光光度计(上海光学仪器厂);800B 台式离心机(中国上海仪器厂);恒温水浴锅(上海乔跃电子有限公司);T-200 电子天平(常熟市双杰仪器测试厂);磁力搅拌器 GSP-77-02 型(江苏太县江埝电子仪器厂);IXJ-II 型离心沉淀机(上海双旭电子有限公司);CLF-30B 型超微粉碎机(江阴市高宏机械制造有限公司);101-2 型电热鼓风干燥箱(上海三腾仪器有限公司)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 黄豆豆渣脲酶的提取<sup>[8,9]</sup> ①黄豆豆渣的

获取及预处理。原料黄豆豆渣从豆制品厂获取。取豆渣 0.4 kg,干燥后粉碎,过 100 目筛<sup>[10]</sup>。②浸提。向预处理后的豆渣中加入 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液,料液比为 1:10,50℃ 下浸提 1 h,同时使用磁力搅拌器进行搅拌<sup>[11]</sup>。③粗酶液获取。将搅拌后的上述浸提液 3 000 r/min 离心 5 min,收集上清液,向此次滤渣中加入 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液,重复之前的浸提、离心操作。将两次离心后的上清液合并即为粗酶液。④利用硫酸铵分级沉淀及沉淀复水。向粗酶液中加入终浓度为 20% 的硫酸铵,充分搅拌后,3 000 r/min 离心 5 min,弃沉淀(杂蛋白)。将上清液收集,继续加入硫酸铵,使硫酸铵浓度达到 40%,充分搅拌后,3 000 r/min 离心 5 min,收集沉淀。向沉淀中加入粗酶液体积 50% 的水,充分搅拌使之完全溶解并脱盐。⑤精制脲酶。向上述溶液中缓慢加入丙酮,使其终浓度为 50% (V/V),在加入的过程中充分搅拌,3 000 r/min 离心 10 min,回收丙酮,收集沉淀。将沉淀置于 50℃ 低温烘干后制得的固体即为脲酶成品,向成品中加入 10 mL pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液即制得脲酶溶液<sup>[1]</sup>。

**1.3.2 不同因素对脲酶活力的影响** ①浸提温度对脲酶活力的影响<sup>[9]</sup>。取黄豆豆渣 0.4 kg,干燥后粉碎,过 100 目筛。分别加入 20℃、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃ 的 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液,料液比为 1:10,同时保温浸提 1 h,并使用磁力搅拌器进行搅拌,提取脲酶并测其活力。

②丙酮浓度对脲酶活力的影响<sup>[12]</sup>。分别于 6 个锥形瓶中加入硫酸铵分级沉淀并复水后的粗酶液 30 mL,缓慢加入丙酮,使其终浓度分别为 20%、30%、40%、50%、60%、70% (V/V),在加入的过程中充分搅拌,3 000 r/min 离心 10 min,提取脲酶并测其活力。

③pH 对脲酶活力的影响。取 6 支试管,加入 0.4 mL 0.05 mol/L 的尿素、0.1 mL 水,以及 3.0 mL pH 分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的 Tris-HCl 缓冲液,充分混匀后 30℃ 温浴 5 min。加入 0.1 mL 3 倍稀释的脲酶溶液,立刻盖好试管塞同时剧烈摇动,30℃ 温浴 10 min,分别测定脲酶活力。

**1.3.3 脲酶  $K_m$  值的测定<sup>[13-15]</sup>** 取 7 支试管(编号 0~6),0 号管为空白对照组,加入蒸馏水 1.0 mL,1~6 号试管分别加入不同量的 0.05 mol/L 的

尿素溶液和蒸馏水,配成终浓度分别为 0.05 mol/L、0.05 mol/L、0.04 mol/L、0.025 mol/L、0.02 mol/L、0.012 5 mol/L 的尿素溶液 1.0 mL。

每个试管均加入 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液 3.0 mL,30℃ 恒温水浴 5 min。0 号管不加脲酶溶液,向 1 号管加 0.2 mL 煮沸的脲酶溶液,向 2~6 号试管中加入 0.2 mL 未煮沸处理的脲酶溶液。30℃ 水浴 10 min。之后加入 1.0 mL 10% 的  $ZnSO_4$  溶液和 0.2 mL 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液,混匀后 3 000 r/min 离心 5 min。

取离心后上清液 0.5 mL 于新试管中,加入 0.5 mL 10% 的酒石酸钾钠、1.0 mL 纳氏试剂以及 5.0 mL 蒸馏水,充分混匀后,用 0 号管调零,利用分光光度计读出各管在 480 nm 处的分光光度值即  $A_{480}$  [16]。

**1.3.4 脲酶活力测定** [15,17,18] 在试管中加入 0.4 mL 0.05 mol/L 的尿素、0.1 mL 蒸馏水以及 3.0 mL pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液,充分混匀后 30℃ 温浴 5 min。向上述溶液中加入 0.1 mL 3 倍稀释的脲酶溶液,立刻盖好试管塞同时剧烈摇动,30℃ 温浴 10 min。向上述溶液加入 0.2 mL 0.5 mol/L NaOH 溶液、0.5 mL 10% 的酒石酸钾钠溶液、1.0 mL 纳氏试剂以及 7.0 mL 蒸馏水,充分混匀。利用分光光度计读出各管在 480 nm 处的分光光度值 ( $A_{480}$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 浸提温度对脲酶活力的影响

脲酶属于蛋白酶类,在一定温度范围内,其溶解度随着温度升高而增加。因此,适度的高温有利于脲酶在溶液中的浸提。然而,过高的温度可导致蛋白质变性,造成脲酶失活。由图 1 可知,浸提温度为 20~50℃ 时,脲酶活力增加,然而当温度为 60~80℃ 时,脲酶活力明显下降,这是由于过高的温度造成的。由此说明,脲酶的最适浸提温度为 50℃。

### 2.2 丙酮浓度对脲酶活力的影响

本实验利用丙酮对脲酶粗酶液进行提纯精制,由图 2 可知,随着丙酮浓度的升高,脲酶活力呈先上升后下降的趋势。当丙酮浓度为 50% (V/V) 时,测定的吸光度最高,反映出脲酶活力

最高。因此,采用浓度为 50% (V/V) 的丙酮进行脲酶的提纯。

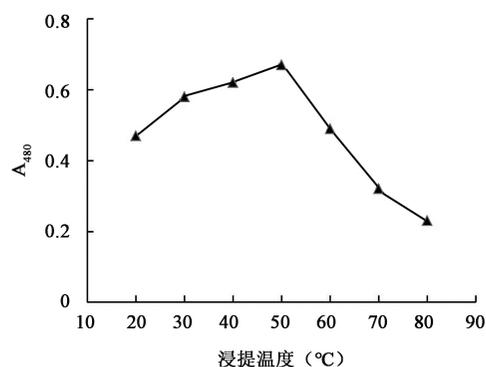


图 1 浸提温度对黄豆豆渣脲酶活力的影响

Fig.1 Effect of extraction temperature on soybean dregs urease activity.

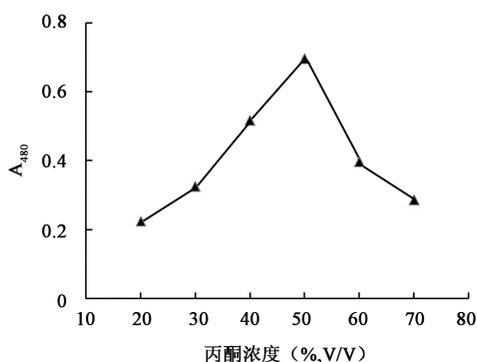


图 2 丙酮浓度对脲酶活力的影响

Fig.2 Effect of acetone concentration on urease activity.

### 2.3 pH 对脲酶活力的影响

由图 3 可知,在其他因素相同的情况下,在 pH 7.0 的时候,吸光值最大为 0.780,由此说明此时脲酶活力最强。因此,黄豆豆渣脲酶的最适 pH 为 7.0。

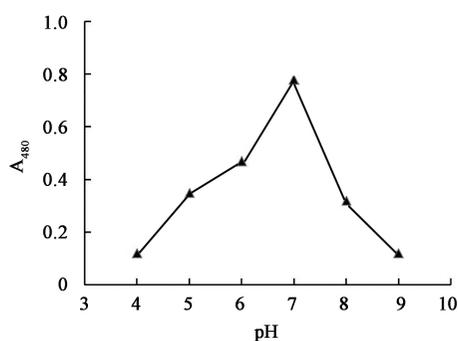


图 3 pH 对脲酶活力的影响

Fig.3 Effect of pH on urease activity.

## 2.4 脲酶 $K_m$ 值测定

利用 Hanes-Woolf 作图法制得一条直线,该直线在 X 轴上的截距即为  $K_m$  值的倒数。本实验中,脲酶  $K_m$  值的测定使用的是比色法。脲酶在一定条件下,可水解尿素生成铵,在碱性条件下,铵盐转化成为氨,与纳氏试剂反应生成黄棕色络合物,其吸光度与脲酶的酶促反应速率成正比。因此,可利用吸光度的数值来代替酶促反应速率  $V$ ,从而根据 Hanes-Woolf 作图法制得直线,进而求得  $K_m$  值。根据图 4 可得,黄豆豆渣脲酶的  $K_m$  值为  $4.11 \times 10^{-2}$  mol/L。

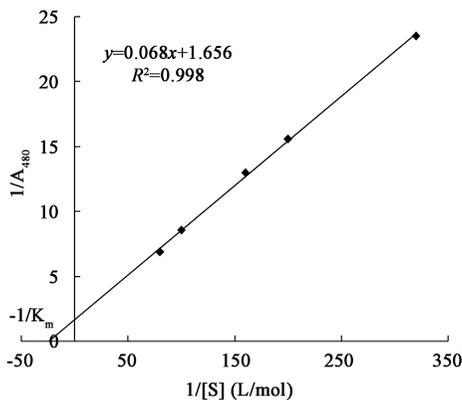


图 4 黄豆豆渣脲酶  $K_m$  值的测定曲线

Fig.4 Determination curve of soybean dregs urease  $K_m$  value.

## 2.5 最适条件下脲酶活力计算

以梯度稀释的硫酸铵溶液绘制出吸光度与硫酸铵浓度的标准曲线,如图 5 所示,  $y = 0.126x + 0.035$ ,  $R^2 = 0.997$ ,横坐标为不同浓度硫酸铵中铵根离子的物质的量 ( $\mu\text{mol}$ ),纵坐标为测得的

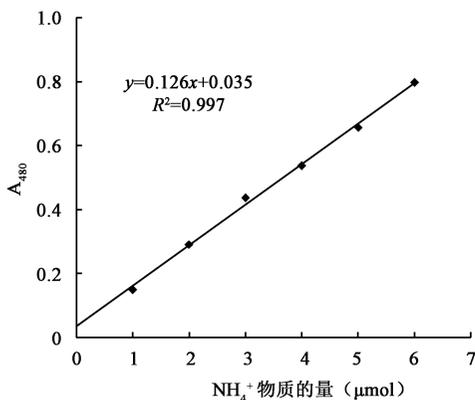


图 5 硫酸铵标准曲线

Fig.5 The standard curve of ammonium sulfate.

480 nm 处的吸光度 ( $A_{480}$ )。当铵根离子浓度为  $1 \sim 6 \mu\text{mol}$  时,呈现良好的线性关系。脲酶活力定义为:在  $30^\circ\text{C}$  时,每分钟催化产生  $1 \mu\text{mol}$  铵的酶量为 1 个酶活力单位<sup>[15]</sup>。利用最适条件下(浸提温度为  $50^\circ\text{C}$ ,丙酮浓度为 50%,Tris-HCl 缓冲液 pH 为 7.0)提取出的豆渣脲酶,其分解尿素测得的  $A_{480}$  为 0.817,参考标准曲线可知铵的含量为  $6.21 \mu\text{mol}$ ,根据稀释倍数,由此可得,1mL 脲酶溶液中的酶活力为 18.63 U。

## 3 讨论

通过利用从豆制品厂得到的豆类制品剩余的豆渣,成功提取出了脲酶,并对其进行了多次提纯精制。利用双倒数方程,以反应后反应液的吸光度值 ( $A_{480}$ ) 代替反应初速度  $V$  进行计算,得出脲酶米氏常数  $K_m$  值为  $4.11 \times 10^{-2}$  mol/L。利用脲酶分解尿素生成碳酸铵的氨氮含量制定的标准曲线。将  $30^\circ\text{C}$  时,每分钟催化生成  $1 \mu\text{mol}$  铵定义为一个酶活单位<sup>[15,19]</sup>,则 1 mL 豆渣脲酶溶液的酶活力为 18.63 U。因此,可得出结论,本实验具有合理性与可行性,拓宽了脲酶的获取途径,并可对实际生产生活中黄豆豆渣的回收利用产生启发。

黄豆豆渣脲酶提取的过程中,浸提液和浸提温度是影响实验结果的两个重要因素。本实验的浸提液为 Tris-HCl 缓冲液;另一方面,脲酶属于蛋白酶类,在一定温度范围内,其溶解度随着温度的升高而增加。因此,适度的高温有利于脲酶在溶液中的浸提。然而,过高的温度可导致蛋白质变性,造成脲酶失活,根据实验结果可知,黄豆豆渣脲酶的最适浸提温度为  $50^\circ\text{C}$ 。脲酶精制的过程中,采用了盐析法和有机溶剂沉淀法两步结合法,通过两步沉淀实验,较大幅度地提高了脲酶的纯度。在进行有机溶剂沉淀过程中采用的是丙酮,脲酶提取最适的丙酮浓度为 50%,与贾琦等<sup>[9]</sup>的研究结果一致。另外,pH 对脲酶活力也有很大影响,实验结果显示,黄豆豆渣脲酶的最适 pH 为 7.0。与此一致的是,崔有宏<sup>[10]</sup>、周东凯<sup>[15]</sup>、韦月平等<sup>[12]</sup>的研究结果表明:大豆脲酶的最适 pH 为 7.0。pH 通过影响底物和脲酶的解离程度,从而影响酶分子对底物分子的结合和催化。

本研究从黄豆豆渣中获取的脲酶,其活力为 18.63 U/mL。此活性的脲酶已可用于生产临床诊

断血清中尿素氮的试剂盒。亦可直接用于处理尿素废水。从豆渣中提取脲酶,既可解决我国脲酶依靠进口的问题,又可提高黄豆豆渣的附加值,变废为宝,具有较高经济效益。目前豆渣已被用来提取各种物质如核黄素、大豆多糖等。本研究所用的提取试剂主要是硫酸铵和丙酮,其价格低廉,而且丙酮可以回收利用。因此,从豆渣中提取脲酶是切实可行且经济廉价的脲酶获取方案,且所得成品脲酶活力较高。可根据各行各业的不同用途,进一步对所得成品进行不同程度的加工处理和精制。比如在医药行业,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;在食品行业,利用脲酶在适当的温度下能将尿素分解为使pH试纸变蓝的碳酸铵的特性,从而检出牛乳粉中大豆粉的含量<sup>[3]</sup>,此外,氧化纤维素固定化脲酶可以作为新型载体材料<sup>[20]</sup>。豆渣中存在较强活性的脲酶,若将本实验的工艺流程在实际中进行推广,便能将豆渣问题转变为国际优势,为现阶段我国脲酶来源紧缺的问题提供经济可行的解决方案。

#### 参 考 文 献

- [1] 林丽云,董晓洁,陈阿微. 黄豆脲酶的提取及其活性测定[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(9): 85-88.
- [2] Follmer C. Insights into the role and structure of plant ureases[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(1): 18-28.
- [3] Levin D A, Watermeyer G, Mohamed N, *et al.*. Evaluation of a locally produced rapid urease test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection[J]. *S. Afr. Med. J.*, 2007, 97(12): 1281-1284.
- [4] San Francisco S, Urrutia O, Martin V, *et al.*. Efficiency of urease and nitrification inhibitors in reducing ammonia volatilization from diverse nitrogen fertilizers applied to different soil types and wheat straw mulching[J]. *J. Sci. Food Agric.*, 2011, 91(9): 1569-1575.
- [5] 杨少斌,刘小冲. 等离子体引发 PTFE 膜固定化脲酶处理废水研究[J]. 河南化工, 2007, 24(10): 23-24.
- [6] 周建立,康振,刘庆涛,等. 重组酸性脲酶对黄酒中尿素和氨基甲酸乙酯的降解应用[J]. 生物工程学报, 2016, 32(1): 74-83.
- [7] 张振山,叶素萍,李泉,等. 豆渣的处理与加工利用[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 400-406.
- [8] Miyagawa K, Sumida M, Nakao M, *et al.*. Purification, characterization, and application of an acid urease from *Arthrobacter mobilis*[J]. *J. Biotechnol.*, 1999, 68(2-3): 227-236.
- [9] 贾琦,李兆祥,杜永霞,等. 大豆种皮中大豆脲酶的提取及精制[J]. 中外食品, 2014(2): 37-42.
- [10] 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, 12(1): 62-66.
- [11] Witte C P, Rosso M G, Romeis T. Identification of three urease accessory proteins that are required for urease activation in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol.*, 2005, 139(3): 1155-1162.
- [12] 韦月平,王鹏. 有机溶剂沉淀法提取脲酶的条件优化[J]. 辽东学院学报(自然科学版), 2014, 21(4): 241-243.
- [13] 罗侃,崔有宏,王绪明. 脲酶  $K_m$  值的比色测定法及其评价[J]. 西北国防医学杂志, 1995(1): 1-4.
- [14] 马锋,李阳,冯佰利. 双青豆脲酶提取工艺研究[J]. 陕西农业科学, 2010(5): 56-58.
- [15] 周东凯,刘莹,马学良,等. 大豆脲酶的提取及其影响因素研究[J]. 大豆科学, 2008, 27(4): 704-707.
- [16] 曹慧,徐斐. 豆浆中脲酶活性测定方法的建立及酶学性质的研究[J]. 食品工业科技, 2012(1): 106-108.
- [17] 蒋传葵,金承德,吴仁龙. 工具酶的活力测定[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982, 117-119.
- [18] 余云雷,齐德生,张妮娅. 大豆脲酶活性测定方法比较研究[J]. 养殖与饲料, 2005(6): 19-21.
- [19] 卢晓凌,王忠艳. 大豆脲酶活性的两种不同测定方法的研究[J]. 饲料工业, 2008, 29(2): 54-56.
- [20] 郭明,燕冰宇,杨萍. 新型方法制备固定化脲酶基质材料及固定化脲酶的性能研究[J]. 高校化学工程学报, 2014, 28(5): 1147-1153.