

豆浆中脲酶活性快速检测试纸研究

成乐为, 戴璇, 汪霞丽, 陈雄, 张建辉*

(湖南省食品质量监督检验研究院, 长沙 410000)

摘要: **目的** 制备一种对豆浆中脲酶活性进行快速定性检测的试纸。**方法** 利用生豆浆中的脲酶能够对尿素专一性催化分解引起体系酸碱度的变化这一原理制备试纸, 能够便捷、高效、准确地对豆浆的生熟度进行判定, 从而筛查出脲酶活性为阳性的豆浆。**结果** 确定最优的试剂配比为 10 mL 0.4 g/L 苯酚红试剂和 0.005 g 尿素, 选择最佳的显色时间为 20 min 之内, 制备出的快检试纸浸入到豆浆样品后可以直接读取实验结果, 对脲酶活性进行快速判定。**结论** 该试纸制备方法简单, 易于操作, 检测重现性较好, 方法毒性更小, 而且在常温下能够长期储存, 可为实施豆浆的现场监督和快速检测提供有效的技术支撑。

关键词: 豆浆; 脲酶; 快速检测; 试纸

Rapid test paper for determination of urease activity in soya-bean milk

CHENG Le-Wei, DAI Xuan, WANG Xia-Li, CHEN Xiong, ZHANG Jian-Hui*

(Hunan Institute of Food Quality Supervision Inspection and Research, Changsha 410000, China)

ABSTRACT: Objective To prepare a rapid and qualitative test paper for determination of urease activity in soya-bean milk. **Methods** According to the system pH changes which was caused by selective catalytic decomposition of urease activity in soya-bean milk to urea, the prepared paper could easily, efficiently and accurately determine the maturity degree of soya-bean milk and screen the soya-bean milk with positive urease. **Results** The optimal ratio of reagents was 10 mL 0.4 g/L phenolred and 0.005 g urea, and the best chromogenic time was within 20 min. The prepared test paper could directly read the results after soaking into the soya-bean milk, which could quickly determine the urease activity. **Conclusion** The prepared paper is easy to made and operate, and has a good reproducibility, better security, and long-term storage at room temperature, which can provide a technical support for site supervision and rapid detection.

KEY WORDS: soya-bean milk; urease; rapid detection; test paper

1 引言

豆浆中含有丰富的营养成分且容易消化吸收, 是一种老少皆宜的营养饮品。豆浆中的部分有益成分对某些疾病也有很好的预防作用^[1,2]。然而, 生豆浆是对人体有害的, 生豆浆中存在多种抗营养因子如脲酶、蛋白酶抑制剂等^[3],

过量食入后会造一系列不良反应。例如, 蛋白酶抑制剂会降低胃液消化蛋白质的能力, 可能引起胰腺的肿大和增生^[4,5]; 脲酶在胃肠内一定条件下会催化含氮物质分解产生氨, 导致氮代谢的紊乱, 引发呕吐、腹痛等中毒现象^[6,7]。由于豆浆中皂素的作用, 加温至 80 °C 时会产生大量泡沫, 存在“假沸”现象, 人们会误以为已煮熟而喝下进而引起中

*通讯作者: 张建辉, 硕士, 高级工程师 主要研究方向为食品安全。E-mail: sps920@qq.com

*Corresponding author: ZHANG Jian-Hui, Master, Senior Engineer, Hunan Institute of Food Quality Supervision Inspection and Research, Changsha 410117, China. E-mail: sps920@qq.com

毒。因而需要一种快速的检测方法快速、准确地判定豆浆的生熟度^[8]。

豆浆中的抗营养因子都存在热不稳定性, 且它们的热失活率相当, 目前主要通过检测脲酶活性来判断这些抗营养因子的失活情况^[9]。陶顺兴等^[10]利用 pH 计根据豆浆中脲酶催化尿素分解的原理, 通过测定豆浆 pH 值的方法来判断生熟豆浆, 但是该法检出限较低, 且不适合推广; 徐茂军等^[11,12]以氨气敏电极法通过单位时间脲酶产生氨的数量来测定脲酶含量的高低, 但测量过程中氨的逃逸会产生较大的误差; 周其山^[13]用纳氏比色法定量测定脲酶活性, 但测量过程干扰物质较多, 而且试剂有较大的毒性。陈秀云等^[14]通过光电比色法来定量测定脲酶含量, 但方法操作较繁琐, 不适宜现场快速测试。

本研究利用脲酶催化尿素分解生成氨导致体系 pH 升高的原理对豆浆中脲酶活性快速检测进行研究, 通过选择合适的酸碱指示剂和一系列试剂条件优化, 制备了一种豆浆脲酶快速检测试纸, 建立了一种简便快速、结果准确的脲酶快速检测方法。

2 材料与方 法

2.1 材料与试剂

生黄豆(超市);

空白试纸(德国默克公司); 苯酚红、溴百里酚蓝、中性红、酚酞、百里酚酞、尿素(分析纯, 国药公司)。

2.2 仪器与设备

EMS-20 多功能电热恒温水浴锅(上海百典仪器设备有限公司); CP225D 电子分析天平(德国赛多利斯公司); 2WM-UT1-10 超纯水机(中沃水务环保科技有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 豆浆样品和快检试纸的制备

将生黄豆用搅碎机打碎过 120 目筛, 称取 100 g 黄豆粉, 于 1000 mL 蒸馏水中浸泡 4 h, 用双层纱布过滤, 取其滤液即生豆浆。再用蒸馏水稀释生豆浆, 配制成含生豆浆的体积分数分别为 0.1%、0.5%、1.0%、2.0% 的豆浆样品。另外将生豆浆在 100 °C 条件下加热 10 min, 制备熟豆浆样品。

将 10 mL 0.4 g/L 的苯酚红溶液分别与 0.001、0.005、0.01、0.05 和 0.1 g 尿素混合均匀后, 将裁剪后的定性滤纸条完全浸泡于试剂中, 待吸附 10 min 后用镊子夹取出, 于通风处自然干燥, 制成试纸, 密封存于棕色瓶中。

2.3.2 国标法测试不同稀释倍数生豆浆的脲酶活性

按照 GB/T 5009.183^[15] 国标方法分别测试不同稀释比例生豆浆的脲酶活性。观察显色结果, 豆浆样品的脲酶活性根据表 1 判定。

表 1 国标法中脲酶活性的判定

Table 1 Determination of urease activity by national standard method

脲酶定性	表示符号	显示情况
强阳性	++++	砖红色混浊或澄清液
次强阳性	+++	桔红色澄清液
阳性	++	深金黄色或黄色澄清液
弱阳性	+	淡黄色或微黄色澄清液
阴性	-	试样管与空白对照管同色或更淡

2.3.3 酸碱指示剂的选择

豆浆的 pH 范围一般为 6.5~7.5, 选择酸碱指示剂的 pK_{HIn} 值接近或高于这个范围的溴百里酚蓝、中性红、苯酚红、酚酞和百里酚酞 5 种指示剂来进行研究。分别取 5 份 2 mL 生豆浆样品于试管中, 编号 1~5, 分别依次加入 2 滴溴百里酚蓝、中性红、苯酚红、酚酞、百里酚酞指示剂, 再加入 1 mL 质量浓度 1% 的尿素, 摇匀后观察显色结果。同时用熟豆浆做空白对照试验。根据溶液变色前后的差异来选择最佳的酸碱指示剂。

2.3.4 试纸对豆浆试样的考察

将制备好的试纸浸入豆浆样品中, 考察试纸的使用情况, 对苯酚红溶液和尿素溶液的配比进行优化, 选择最优的配比浓度, 同时考察了试纸的显色时间以及在不同稀释倍数下生豆浆的显色情况。

2.3.5 快检试纸储存条件的考察

将制备好的试纸在常温、冷藏条件下储存 1、3 和 6 个月后作用于不同脲酶活性的豆浆样品, 观察反应。

3 结果与分析

3.1 国标法测试不同稀释倍数生豆浆的脲酶活性

将体积分数分别为 0%、0.1%、0.5%、1.0%、2.0% 的豆浆样品, 按照国标方法对其进行测试, 结果如表 2。

表 2 国标法对不同稀释倍数生豆浆的脲酶活性判定

Table 2 Urease activity determination with different dilution of raw soya-bean milk by national standard method

体积分数	显色情况	脲酶定性
0%	/	阴性
0.1%	淡黄色或微黄色	弱阳性
0.5%	深金黄色	阳性
1.0%	桔红色	次强阳性
2.0%	砖红色	强阳性

不同稀释倍数的豆浆样品用国标法显色后, 颜色依次为淡黄色、深金黄色、桔红色、砖红色, 对照表 1 可以判定, 体积分数分别为 0%、0.1%、0.5%、1.0%、2.0% 的豆浆样品脲酶活性依次为阴性、弱阳性、阳性、次强阳性和强阳性。

3.2 酸碱指示剂的选择

观察分别加入不同指示剂的生豆浆中加尿素反应后颜色的变化情况, 如表 3 所示。

表 3 加入不同指示剂的生豆浆颜色变化
Table 3 Color change of raw milk after adding different acid-base indicator

序号	指示剂	颜色变化
1	溴百里酚蓝	黄色变成绿色
2	中性红	红橙变成黄橙色
3	苯酚红	黄色变成鲜艳红色
4	酚酞	无色变成微红色
5	百里酚酞	无色且无颜色变化

3 号苯酚红指示剂由黄色变为亮红色, 而其他几种指示剂的颜色变化都没有那么明显, 因为苯酚红的 pK_{HIn} 值为 8.0, 刚加入指示剂呈黄色, 反应后随 pH 值升高而呈亮红色, 颜色变化很明显。同时根据熟豆浆的对照试验, 加入苯酚红指示剂的熟豆浆在加入尿素后颜色没有变化, 仍为黄色, 因而选择苯酚红作为快速检测豆浆中脲酶的指示剂。

3.3 不同试剂配比的考察

按照表 4 所示, 固定采用 10 mL 的 0.4 g/L 苯酚红试剂, 往其中分别加入不同剂量的尿素试剂, 振摇均匀后, 制备成试纸。

表 4 采用不同尿素浓度制备试纸
Table 4 Preparation of test paper using different urea concentrations

类别	1	2	3	4	5
0.4 g/L 苯酚红试剂 (mL)	10	10	10	10	10
尿素 (g)	0.001	0.005	0.01	0.05	0.1

将上述制备的试纸分别浸入到蒸馏水、稀释后脲酶活性为阴性、强阳性的豆浆试样中, 显色情况如图 1 所示。只有尿素加入量为 0.001 g 时制备出来的试纸显色没有那么明显; 而尿素加入量在大于 0.005 g 时, 试纸对脲酶强阳性豆浆试样即可产生明显的玫红色, 因此在考虑成本前提下可选择尿素的剂量为 0.005 g。

3.4 试纸显色时间

将优化配比后制备的试纸浸入到蒸馏水、稀释后脲酶活性为阴性、强阳性的豆浆试样中, 置于室温下, 观察颜

色随时间的变化。如图 2 所示。刚显色 1 min 的试纸颜色鲜亮, 与阴性试样试纸区别度高; 显色 30 min 后试纸的颜色有减退; 显色 60 min 后试纸的颜色几乎消退, 与阴性试样试纸同色。因此, 在实际测试应用中, 应控制在 20 min 内完成颜色的观察, 时间延长或者试纸干燥后颜色会褪去, 从而影响结果的判断。

3.5 试纸对不同脲酶活性豆浆试样的显色研究

将优化配比后制备的试纸分别浸入到稀释后脲酶活性为阴性、弱阳性、阳性、次强阳性和强阳性的豆浆样品中, 1 s 后取出, 观察颜色, 如图 3 所示。

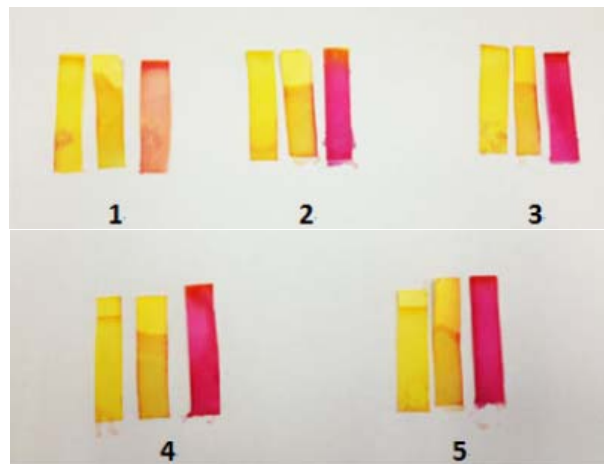


图 1 采用不同尿素浓度制备试纸

1~5 尿素浓度依次为: 0.001、0.005、0.01、0.05、0.1 g

Fig. 1 Preparation of test paper using different urea concentrations
concentration of urea of 1~5 were: 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 g

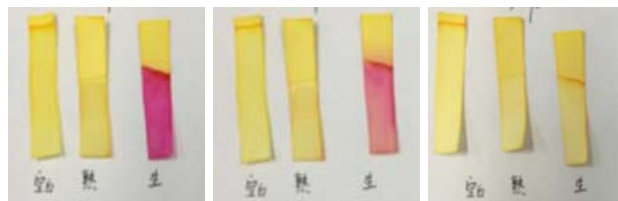


图 2 试纸颜色随显色时间的变化

(左)显色 1 min; (中)显色 30 min; (右)显色 60 min

Fig. 2 Changes of test paper color with chromogenic time
(left) 1 min, (middle) 30 min, (right) 60 min

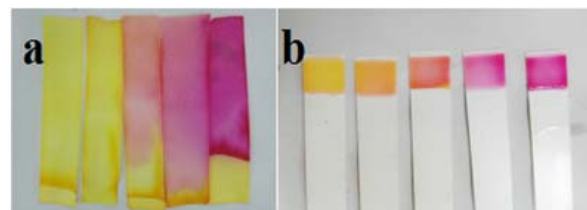


图 3 自制试纸的显色情况

(a 为定性滤纸载体制备, b 为默克空白试纸载体制备)

Fig. 3 The chromogenic reaction of test paper
(a. carrier preparation with qualitative filter paper,
b. carrier preparation with Merck blank strips)

从图 3 可知, 试纸对于阴性、弱阳性、阳性、次强阳性和强阳性的豆浆样品有较为明显的区别度, 显色依次呈黄色到橙色到红色, 脲酶活性越强, 颜色越红。根据这一现象, 可以制作成脲酶活性的比色卡, 在室温下浸入豆浆 1~2 s 后在规定时间内观察颜色, 与比色卡对比色, 读取活性强弱结果。

3.6 试纸的储存

将制备好的试纸在常温、冷藏条件下储存 1、3 和 6 个月作用于不同脲酶活性的豆浆样品, 观察反应。结果发现, 在常温、冷藏条件下储存的试纸均能有良好的重现性, 说明试纸可在常温下储存, 有效期可以达到 6 个月以上。

4 结 论

本研究通过对比各类酸碱指示剂的变色效果, 选择出指示效果最佳的苯酚红作为该快检试纸的指示剂。再通过一系列的优化实验, 确定了制备快检试纸的试剂最佳浓度和配比, 同时得出了最佳显色时间, 利用不同脲酶活性的豆浆样品显色情况制作了比色卡, 能够直接读出豆浆中的脲酶活性强弱, 该试纸在常温下能够长期保存, 为豆浆中脲酶活性的快速检测提供了借鉴。

参考文献

- [1] 高秀芝, 刘慧, 丁雪莲, 等. 大豆异黄酮的研究与应用进展[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 386-392.
Gao XZ, Liu H, Ding XL. Progress on the study and application of soybean isoflavones [J]. Food Sci, 2004, 25(11): 386-392.
- [2] 井乐刚, 张永忠, 杨健. 大豆异黄酮在保健食品和医药中应用的研究进展[J]. 植物学通报, 2002, 19(6): 692-697.
Jing LG, Zhang YZ, Yang J. Development of the application of soy isoflavones in health foods and pharmaceutical [J]. Chin Bull Botany, 2002, 19(6): 692-697.
- [3] 周红蕾, 李春玲, 王桂平, 等. 大豆中抗营养因子及其去除方法概述[J]. 饲料工业, 2006, 27(3): 23-26.
Zhou HL, Li CL, Wang GP, et al. Overview of antinutritional factors in soybean and their removal method [J]. Feed Ind, 2006, 27(3): 23-26.
- [4] 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, 111.
Cao H, Xu F. Establishment of determination method of urease in soybean juice and the enzymology characteristics [J]. Sci Technol Food Ind, 2012, 1: 106-108, 111.
- [5] 林菁菁, 伊娟娟, 王振宇. 脲酶测定法判定豆浆抗营养因子热失活情况研究[J]. 中国林副特产, 2014, 1: 8-10.
Lin JJ, Yi JJ, Wang ZY. Study on using urea enzyme assay to determine thermal inactivation of soya-bean milk antinutritional factors [J]. Forest By-Prod Special China, 2014, 1: 8-10.
- [6] 徐奇友, 许红, 马建章. 大豆中营养因子和抗营养因子研究进展[J]. 中国油脂, 2006, 31(11): 17-20.

- Xu QY, Xu H, Ma JJ. Study progress on nutritional and antinutritional factors in soy [J]. China Oils Fats, 2006, 31(11): 17-20.
- [7] 梁玉梅, 郭顺堂. 加热处理对大豆乳清中胰蛋白酶抑制剂活性以及大豆乳清蛋白体外消化率的影响[J]. 食品工业科技, 2006, 27(11): 79-84.
Liang YM, Guo ST. Effect of activity of trypsin inhibitor in soybean whey and soybean whey protein digestibility *in vitro* after heat treatment [J]. Sci Technol Food Ind, 2006, 27(11): 79-84.
- [8] 王金山. 谨防喝豆浆中毒[J]. 中国保健营养, 2002, (04): R161.
Wang JS. Beware of drink soya-bean milk poisoning [J]. China Health Care Nutr, 2002, (04): R161.
- [9] Kunitz M. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean [J]. Science, 1985, 101: 668-691.
- [10] 陶顺兴, 陶桂全, 王红勇, 等. 用 pH 计快速鉴别生熟豆浆[J]. 中国城乡企业卫生, 1997, 5: 39-40.
Tao SX, Tao GQ, Wang HY, et al. Rapid identification of cooked soybean milk with a pH meter [J]. Chin J Urban Rural Ind Hyg, 1997, 5: 39-40.
- [11] 徐茂军, 乐培恩, 郑凯. 氨气敏电极法定量测定大豆脲酶活性[J]. 食品科学, 1993, 14(9): 64-68.
Xu MJ, Yue PE, Zheng K. Quantitative determination of soybean urease activity by ammonia gas sensor electrode method [J]. Food Sci, 1993, 14(9): 64-68.
- [12] 徐茂军, 郑凯. 氨气敏电极法定量测定大豆及其制品中的脲酶活性[J]. 中国调味品, 1993, 12: 26-30.
Xu MJ, Zheng K. Quantitative determination of urease activity in soybean and its products by ammonia gas sensor electrode method [J]. China Condim, 1993, 12: 26-30.
- [13] 周其山. 豆浆中脲酶活性含量测定法[J]. 食品科学, 1989, 10(4): 42-44.
Zhou QS. The determination method of urease activity content in soybean milk [J]. Food Sci, 1989, 10(4): 42-44.
- [14] 陈秀云, 李湘鸣. 豆浆中脲酶活性的测定[J]. 江苏预防医学, 2002, 13(3): 63-65.
Chen XY, Li XM. The determination of urease activity in soya milk [J]. Jiangsu Prev Med, 2002, 13(3): 63-65.
- [15] GB/T 5009.183 植物蛋白饮料中脲酶的定性测定[S].
GB/T 5009.183 Qualitative analysis of urease in vegetable protein drinking [S].

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介



成乐为, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: 18550722@qq.com



张建辉, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全。
E-mail: sps920@qq.com