

土壤脲酶抑制剂正丁基硫代磷酸三胺的作用基团研究^①

孙庆元, 张雪崧, 王艳红

(大连工业大学生物与食品工程学院, 辽宁大连 116034)

摘要: 土壤脲酶抑制剂正丁基硫代磷酸三胺 (nBPT) 是抑制土壤中尿素水解的最有效的化合物之一。分析大连工业大学合成的土壤脲酶抑制剂 nBPT 抑制脲酶活性的影响因素及作用机理, 结果表明: 在 50 °C, pH = 5.91 时, nBPT 的抑制活性达到最大值; 在 nBPT 各结构基团中, 正丁基 (-NH(CH₂)₃CH₃)、硫基 (-S) 对 nBPT 与脲酶的结合起辅助作用, 胺基 (-NH₂) 是 nBPT 与脲酶结合的关键基团, 与脲酶活性部位巯基 (-SH) 结合。土壤脲酶抑制剂 nBPT 与脲酶的具体结合机理还有待继续研究。

关键词: 正丁基硫代磷酸三胺; 脲酶; 温度; pH 值; 作用机理

中图分类号: S143.16

尿素由于具有含 N 量高, 使用方便, 用后不会导致土质变坏等优点, 20 世纪 80 年代以来已经成为我国农业应用的主要 N 肥之一^[1-2]。一般情况下, 尿素在土壤中很快被脲酶分解成氨, 高浓度的氨易于损伤作物和挥发损失, 致使尿素的利用率通常只有 30% ~ 40%, 且肥效期只有 50 天左右^[3]。脲酶抑制剂是能够抑制土壤脲酶活性的一类物质的总称, 在尿素中加入脲酶抑制剂是近 10 年来研究出来的新技术。使用土壤脲酶抑制剂可有效地减缓尿素分解成氨的酶解过程, 延长施肥点处尿素的扩散时间, 由此降低土壤中 NH₄⁺ 和 NH₃ 的浓度^[4-5], 使土壤供肥和作物需肥同步。因此, 应用土壤脲酶抑制剂对节省尿素肥料施用量、提高作物产量、减少环境污染等均有好处, 是一种可持续的农业生产技术^[6-8]。正丁基硫代磷酸三胺 (N-(n-butyl) tiophosphoric triamide, nBPT) 是目前最有效的土壤脲酶抑制剂之一^[9]。

然而要充分发挥脲酶抑制剂 nBPT 的作用, 必须对 nBPT 的使用效果与环境条件的关系、使用方法及作用机理进行研究和探讨。土壤脲酶抑制剂 nBPT 减缓尿素水解的作用条件及作用机理研究均未见报道。本实验以 nBPT 的合成途径为基础, 从 nBPT 其本身结构出发, 重点研究了 nBPT 抑制脲酶酶解的有效基团, 并对其使用效果与环境条件的关系进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

大豆 (拉丁学名为 *Glycine max(L) Merrill*), 采用品种辽豆 11。脲酶抑制剂“保倍氮” (主要成分是 nBPT), 由大连工业大学脲酶抑制剂项目组提供。其他化学试剂均采用分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 制备粗制脲酶 取 20 g 大豆浸泡于 200 ml 去离子水中 12 h, 使黄豆充分吸水膨胀, 用高速匀浆机将大豆匀浆 15 min, 大豆呈一定的浓度, 冰箱中 (4 °C) 静止放置过夜, 离心 (1500 r/min) 30 min, 弃去沉淀, 取上层液。此上层液即为所需的粗制脲酶。放置于冰箱中, 4 °C 密封保存。

1.2.2 制备脲酶抑制剂和尿素缓冲溶液 称取 4.45 g 磷酸氢二钠和 3.40 g 磷酸二氢钾溶解于水, 并稀释至 1000 ml 制得磷酸缓冲液。称取 15 g 尿素溶于磷酸缓冲液中, 并稀释至 500 ml 备得 0.5 mmol/L 含尿素缓冲液。以 HCl 和 NaOH 调整尿素缓冲溶液 pH。称取 85.12 mg 脲酶抑制剂溶解于水, 用适量 Np10 助溶, 并定容至 100 ml 备得 5 mmol/L 脲酶抑制剂溶液。

1.2.3 土壤环境对 nBPT 抑制活性的影响 吸取脲酶液 1 ml 于小烧杯中, 加入 10 ml 尿素缓冲液, 充分混合, 分别在 4、23、30、40、50、60 °C 水浴 30 min; 在 30 °C 水浴条件下, 分别取 10 ml pH 为 4.92、5.91、6.98、8.04 的尿素缓冲液, 加 1 ml 脲酶液水浴 30 min, 然后分别加入 1.0 ml 2% 酒石酸钾钠终止反应。采用纳氏试剂法测得反应液中铵生成量。各处理均 4 次重复。以加入 nBPT 后每分钟每毫升脲酶分解尿素释放

①基金项目: 辽宁省教育厅科研项目 (2004D203)、大连市重点科研项目大连计发[2003]99 号和辽宁省发酵工程重点实验开放课题 (辽发表 2006-009) 共同资助。

作者简介: 孙庆元 (1957—), 男, 辽宁北票人, 博士, 教授, 主要从事生物化工方面的研究。E-mail: qsun@dipu.edu.cn

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的微克数的减少量表示 nBPT 的制剂活性。

1.2.4 nBPT 有效基团验证 nBPT 作为土壤脲酶抑制剂最有效的化合物之一，其化学名称为 N-正丁基-硫代磷酰三胺 (N-(n-butyl) tiophosphoric triamide)，分子式为 $\text{C}_4\text{H}_{13}\text{N}_3\text{PS}$ ，化学结构如图 1 所示：

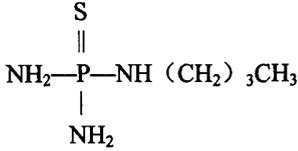


图 1 nBPT 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of nBPT

nBPT 中基团的验证本实验以 nBPT 的合成途径为基础采用基团替代法^[10]进行。即利用 nBPT 中的正丁基、胺基和硫基可分别被其他类似基团替代反应的特点，利用原料类似物进行反应，使 nBPT 中的正丁基、胺基和硫基被不同的基团取代，以此来确定各基

团在 nBPT 抑制脲酶酶解中的作用。具体实验设计如表 1、2、3 所示。实验过程中称取等当量的原料，放置于冷却条件下的反应器中缓慢混合并搅拌，待反应产物冷却后测定其对脲酶的抑制活性。

1.2.5 脲酶和脲酶抑制剂抑制活性的测定 在缓冲溶液 pH 为 6.0 条件下，在 30℃ 水浴条件下，将 1 ml 脲酶加入 10 ml 尿素缓冲溶液中作为对照，在对照中加入 10 ml 脲酶抑制剂溶液，测定脲酶活性和脲酶抑制剂的抑制活性。参考中华人民共和国国家标准大豆制品中脲酶活性测定和计算方法(GB 8622-1988)^[11]。以未加脲酶抑制剂的脲酶活性作为对照，加入脲酶抑制剂的剩余脲酶活性^[12]为脲酶抑制剂的抑制活性。

1.2.6 数据统计分析 在数据处理中，采用 ANOVA 进行 t 检测计算出 LSD (P = 0.05)，对土壤环境因素对脲酶抑制剂 nBPT 的抑制活性的影响和不同基团的脲酶抑制剂的抑制能力间的差异进行比较。

表 1 正丁胺基团测定实验设计

Table 1 Designing of the experiment to determine the normal-butyl group

原料	反应现象	生成的不同基团
正丁胺、三氯硫磷、氨气	反应剧烈	正丁胺基 -NH(CH ₂) ₃ CH ₃)
异丁胺、三氯硫磷、氨气	反应剧烈	异丁胺基 (-NH-CH ₂ CH(CH ₃)-CH ₃)
正丙胺、三氯硫磷、氨气	反应强烈	正丙胺基 (-NH(CH ₂) ₂ CH ₃)
三氯硫磷、氨气	反应强烈	胺基 (-NH ₂)
叔丁胺、三氯硫磷、氨气	-	-

表 2 硫基基团测定实验设计

Table 2 Designing of the experiment to determine the sulfur group

原料	反应现象	生成的不同基团
正丁胺、三氯硫磷、氨气	反应剧烈	硫基 (=S)
正丁胺、三氯氧磷、氨气	反应剧烈	氧基 (=O)
正丁胺、三氯化磷、氨气	反应强烈	-

表 3 胺基基团测定实验设计

Table 3 Designing of the experiment to determine the amido group

原料	反应现象	生成的不同基团
正丁胺、三氯硫磷、氨气	反应剧烈	胺基 (-NH ₂)
正丁胺、三氯硫磷	反应强烈	-

用下进行的，其转化过程与脲酶的活性有关。影响脲酶活性的因素包括土壤酸碱度、水分状况、通气条件、加入的有机物质以及尿素的浓度。脲酶抑制剂的使用效果在很大程度上与那些对脲酶活性有影响的土壤因素也有关联，尤其是环境条件，如土壤温度和土壤酸碱度对 nBPT 的影响很大^[13]。不同季节及不同类型的土壤中，其温度及酸碱度是不同的^[14-15]。本实验在实验室条件下模拟了不同季节及不同类型的土壤温度及酸碱度，测定温度及酸碱度对 nBPT 抑制效果的影响，结果见表 4、表 5。

温度对脲酶具有一定的影响，在达到其最适温度 (50℃)^[6]以前，脲酶活性与温度呈正相关关系。未加 nBPT 时，脲酶活性在 50℃ 时最强。加入 nBPT 后，脲酶活性随温度的变化差异不显著 (LSD = 0.07)，nBPT 抑制活性随温度升高而增大。50℃ 时，nBPT 抑制脲酶酶解速度的能力最强，可作为土壤中施用 nBPT 的最适温度。

2 结果与讨论

2.1 土壤环境对 nBPT 抑制脲酶酶解速度的影响

尿素 N 转化成 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 是在土壤中脲酶的催化作

表 4 温度对 nBPT 抑制脲酶解速度的影响

Table 4 Effect of temperature on inhibiting activity of nBPT

温度 (℃)	脲酶活性 (U/min)	加 nBPT 后脲 酶活性 (U/min)	抑制剂活性 (%)
4	0.54	0.21	60.29
23	0.76	0.20	73.40
30	1.05	0.14	86.67
40	1.56	0.24	84.43
50	1.87	0.26	86.09
60	1.61	0.21	86.95
LSD(P=0.05)	0.21	0.07	11.20

表 5 酸碱度对 nBPT 抑制脲酶解速度的影响

Table 5 Effect of pH on inhibiting activity of nBPT

pH 值	脲酶活性 (U/min)	加 nBPT 后脲酶 活性 (U/min)	抑制剂活性 (%)
4.92	1.48	0.38	74.21
5.91	1.16	0.21	82.28
6.98	1.46	0.41	71.98
8.04	0.85	0.26	69.27
LSD (P=0.05)	0.17	0.10	12.34

与温度类似, pH 也对 nBPT 的抑制效果具有一定的影响。当 pH 达到 5.91 时, 脲酶抑制剂 nBPT 的抑制活性达到最大值。因此, pH 为 5.91 是土壤中施用 nBPT 的最适酸碱度。

2.2 nBPT 的有效基团验证

2.2.1 正丁胺基基团的测定 在反应过程中, 叔丁胺与三氯硫磷不反应, 没有比较意义, 没有列入表 6 中。在表 6 中, 根据 LSD 分析, 含正丁胺基、异丁胺基、正丙胺基的生成物对脲酶解的抑制效果无明显差异; 而不加正丁胺, 只有三氯硫磷和氨气反应生成含胺基基团的产物仍具有抑制活性, 但其活性明显降低。由此可知, 正丁胺基不是 nBPT 对脲酶解起抑制作用的关键基团, 采用正丁胺类似物代替其参加反应, 生成物具有抑制活性; 但正丁胺基的存在对 nBPT 的抑制活性具有很大的辅助作用。因正丁胺相对于异丁胺、正丙胺来说, 其价格比较低, 且毒性相对较低, 因此在合成过程中宜采用正丁胺进行反应, 以降低合成成本。

2.2.2 巯基基团的测定 在表 7 中, 根据 LSD 分析, 含巯基、氧基的生成物抑制活性没有差别, 而不含任何基团的生成物的抑制活性稍低于含巯基、氧基的生成物的抑制活性。由此可知, 巯基、氧基对 nBPT

的抑制效果作用相同; 而无基团时, 其活性偏低, 则巯基对 nBPT 的抑制活性具有一定的辅助作用, 但是可用氧基取代。在生成过程中, 因三氯硫磷的价格、毒性低于三氯氧磷, 因此合成过程中采用三氯硫磷。

表 6 4 种不同基团的 nBPT 类似物的抑制活性

Table 6 Inhibiting activities of nBPT analogs different in N-butyl group

基团	存在的脲酶活性比例 (%)	抑制剂及类似物活性 (%)
正丁胺基	26.99	73.01
异丁胺基	25.27	74.73
正丙胺基	30.98	69.02
胺基	68.60	31.04
LSD (P=0.05)	-	11.39

表 7 3 种不同基团的 nBPT 类似物的抑制活性

Table 7 Inhibiting activities of nBPT analogs different in sulfur group

基团	存在的脲酶活性比例 (%)	抑制剂及类似物活性 (%)
巯基 (=S)	25.49	74.51
氧基 (=O)	23.58	76.42
无基团	39.49	60.51
LSD (P=0.05)	-	7.87

2.2.3 胺基基团的测定 在表 8 中, 根据 LSD 分析, 不含胺基时, nBPT 类似物抑制活性为 1.89%, 抑制活性接近于 0%; 而含胺基的 nBPT 抑制活性为 75.25%, 二者具有明显的差异。由此可知, 胺基是 nBPT 具有抑制活性的关键性基团。

表 8 两种不同基团的 nBPT 类似物的抑制活性

Table 8 Inhibiting activities of nBPT analogs different in amido group

基团	存在的脲酶活性比例 (%)	抑制剂及类似物 活性 (%)
胺基 (-NH ₂)	24.75	75.25
无基团	98.11	1.89
LSD (P=0.05)	-	12.45

2.2.4 nBPT 中基团分析 在 PDB 蛋白质库中, 共收录了 40 种不同类型的脲酶, 如 La5K、La5m、1fwa 等类型。脲酶是一种依赖于镍 (Ni) 的金属酶, 40 种脲酶的结构不同, 氨基酸的序列也有一定的差异, 但它们具有共同的作用, 催化非肽键的直链酰胺的 C-N 键水解, 促进尿素水解为氨水和胺基甲酸盐^[16-17]。40 种脲酶对尿素水解起作用的是其中的 4 ~ 8 个带巯基

(-SH)的化合物^[18], 巯基对脲酶的活性具有重要作用。宁国辉等^[6]、孙爱文等^[16]研究表明, 脲酶抑制剂通过对在脲酶催化过程中扮主要角色的巯基(-SH)发生作用, 从而延缓土壤中尿素的水解速度, 减少氨的挥发损失^[6, 13]。nBPT 作为土壤脲酶抑制剂, 其结构与脲酶底物尿素的结构十分相似, 并且与脲酶的作用也与尿素相似, 作用于脲酶的活性部位巯基(-SH)基团。脲酶抑制剂 nBPT 与尿素混合使用时, nBPT 与尿素一起与脲酶作用, 即 nBPT 与尿素竞争, 阻止部分尿素与脲酶的结合, 从而减少了尿素的水解, 降低了尿素水解产物氨的挥发, 提高了尿素的利用率。正丁胺基的存在改变了 nBPT 的极性, 有利于 nBPT 与脲酶的结合。而巯基的存在则使 nBPT 的结构更类似于底物尿素中氧基的存在, 增大了 nBPT 与脲酶的结合机率。胺基是 nBPT 与脲酶结合的关键基团。因此, 胺基是 nBPT 与脲酶的结合基团。

3 结语

土壤脲酶抑制剂 nBPT 是抑制土壤中尿素水解最有效的化合物之一, 其抑制效果受温度、酸碱度的影响。在施用时应选择最佳温度、最佳酸碱度以提高 nBPT 的活性, 以充分发挥其作为脲酶抑制剂的作用。在 nBPT 各结构基团中, 正丁胺基、巯基对 nBPT 与脲酶的结合起辅助作用, 胺基是 nBPT 与脲酶结合的关键基团, 与脲酶活性部位巯基(-SH)结合。

参考文献:

- [1] 宣风琴. 改进农用尿素产品质量的若干措施. 安徽化工, 2001 (5): 15-17
- [2] Sun H, Tang Y, Zhao QG. Nitrogen mineralization of prunings of six N₂-fixing hedgerow species in a dry valley of the Jinsha river. *Pedosphere*, 2002, 12 (1): 25-31
- [3] 张进权. 脲酶抑制剂在甘蔗中的应用研究. 作物研究, 1992, 6(1): 39-41

- [4] 王小彬, 蔡典雄. 脲酶抑制剂 nBPT 在农业中的应用. 中国化工, 1998 (5): 3-5
- [5] Rozas HS, Echeverría HE, Studdert GA. No-till maize nitrogen uptake and yield effect of urease inhibitor and application time. *Agronomy Journal*, 1999, 91: 950-955
- [6] 宁国辉, 刘树庆, 张笑归. 脲酶抑制剂的研究进展. 河北环境科学, 2003, 11 (4): 30-33
- [7] 李辉信, 胡锋, 蔡贵信, 范晓晖. 红壤的供氮能力及化肥氮的去向. 土壤学报, 2002, 39 (3): 390-396
- [8] 李辉信, 胡锋, 刘满强, 蔡贵信, 范晓晖. 红壤氮素的矿化和硝化作用特征. 土壤, 2000, 32 (4): 194-197
- [9] 王小彬, 辛景峰. 尿素与脲酶抑制剂联用对春小麦植株氮吸收的影响. 干旱地区农业研究, 1998, 16 (3): 6-10
- [10] 李晔, 宴日安, 李晓光. 三氯蔗糖的基团迁移法合成研究. 食品科学, 2004, 25 (1): 50-52
- [11] 中国兽药监察所. 中华人民共和国国家标准大豆制品中脲酶活性测定方法: 中国农业标准汇编(饲料卷). 北京: 中国标准出版社, 2000
- [12] 王艳红, 孙庆元. 土壤脲酶抑制剂正丁基硫代磷酰三胺生物特性的分析. 大连轻工业学院学报, 2004, 23 (4): 256-259
- [13] 王小彬. 关于几种土壤脲酶抑制剂的作用条件. 植物营养与肥料学报, 1998, 4 (3): 211-218
- [14] 唐高霞. 适宜蔬菜生长的土壤环境. 吉林农业, 2003 (8): 18-18
- [15] 蒋朝晖, 曾清如, 方至. 不同温度下施入尿素后土壤短期内 pH 的变化和氨气释放特性. 土壤通报, 2004, 35 (3): 299-302
- [16] 孙爱文, 石元亮, 张德生, 张德生. 硝化/脲酶抑制剂在农业中的应用. 土壤通报, 2004, 35 (3): 357-361
- [17] Lin H, Koelsch G, Lin XL, Wu SL, Terzyan S, Ghosh AK, Zhang XC, Tang J. Structure of the protease domain of Memapsin 2 (β -secretase) complexed with inhibitor. *Science*, 2000, 290: 150-153
- [18] Delares R. Introduction (Urease kral). Department of Chemistry, 1997

Functional Groups of Soil Urease Inhibitor nBPT

SUN Qing-yuan, ZHANG Xue-song, WANG Yan-hong

(College of Biology & Food Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

Abstract: N-(n-butyl) tiophosphoric triamide (nBPT) is one of the most efficient soil urease inhibitors that suppress urea hydrolysis in the fields, thus preventing ammonia loss, and increasing N use efficiency of urea. This paper was to explore functional groups of nBPT, their mechanisms and influencing factors, for example, temperature and pH, and a method to purify the urease from soybean. The result showed that 50 °C was the optimum temperature, 5.91 the optimum pH, and -NH₂ the key functional group.

Key words: nBPT, Urease inhibitor, pH, Temperature, Mechanism of action