

NGHIÊN CỨU THU NHẬN, TINH SẠCH UREASE TỪ ĐẬU NÀNH**Lê Thị Phú, Nguyễn Thị Cẩm Vi, Nguyễn Tấn Đạt**

Trường Đại học Bán công Tôn Đức Thắng

(Bài nhận ngày 28 tháng 02 năm 2006, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 14 tháng 08 năm 2006)

TÓM TẮT: Trong nghiên cứu này chúng tôi đã so sánh các phương pháp tinh sạch sơ bộ enzym urease: tủa phân đoạn sunfat amon, tủa bằng aceton, sắc ký rây phân tử và siêu lọc. Dựa vào kết quả xác định độ tinh sạch, hiệu suất tinh sạch enzym và kết quả kiểm tra độ tinh sạch bằng điện di trên gel acrylamid chúng tôi nhận thấy phương pháp tủa phân đoạn sunfat amon nồng độ 65% và 55% bão hoà hiệu quả nhất. Tiếp tục thực hiện tinh sạch qua sắc ký trao đổi ion DEAE – cellulose, sắc ký đồ cho thấy có 3 peak protein và chỉ có một peak enzym urease ứng với nồng độ muối 0,3 M. Thu nhận peak enzym, kiểm tra trên điện di gel acrylamid đã xác định được urease đậu nành là một loại homogeneous. Kết quả điện di cũng đã chứng minh quy trình tinh sạch do chúng tôi xây dựng đã tinh sạch được enzym urease.

1.MỞ ĐẦU

Urease là một loại enzym thuỷ phân ure hình thành NH_3 và CO_2 , được ứng dụng rất nhiều trong Y học và Công nghiệp thực phẩm để định lượng ure trong các mẫu bệnh phẩm và nước chấm. Trước đây, đã có rất nhiều nghiên cứu về enzym urease và đã đưa ra nhiều phương pháp tinh sạch urease, tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào so sánh giữa các phương pháp tinh sạch khác nhau. Ở nước ta, cũng đã có một số nghiên cứu tinh sạch enzym urease từ đậu nành nhưng cũng chưa đưa được quy trình tinh sạch hiệu quả và chưa được ứng dụng trong sản xuất chế phẩm urease. Ngành Y học và Thực Phẩm ở nước ta hiện nay vẫn phải nhập chế phẩm urease và kit urease từ nước ngoài với giá thành rất cao.

Do đó chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm tìm ra một quy trình tinh sạch urease hiệu quả nhất từ đậu nành, một nguồn nguyên liệu rẻ tiền và dễ kiếm. Đồng thời sử dụng phương pháp điện di trên gel acrylamid để nghiên cứu thành phần enzym urease từ đậu nành.

2.NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**2.1.Nguyên liệu**

- Đậu nành loại bỏ các hạt xấu, bỏ sâu mọt, xay mịn, loại lipid, bảo quản lạnh.
- Hoá chất: Urease chuẩn (urease Jack bean), Albumin bovine, Ether petroleum, acetone, glycine, Tris(base), Coomassie Brilliant Blue – G250 (Merck), Nessler, EDTA, L-Cystein.HCl, Acrylamide và bisacrylamide, SDS, TEMED, Amonium persulfate, Sephadex G 50, DEAE – Cellulose (Merck), ...

2.2 Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp tủa sunfat amon: phương pháp 1 tủa phân đoạn ở 2 nồng độ 65% và 55% bão hoà, phương pháp 2 tủa phân đoạn ở 2 nồng độ 20% và 55% bão hoà.
- Phương pháp sắc ký: tách liên tục từng vi phân của hỗn hợp chất [6]
 - Sắc ký rây phân tử trên gel Cephadex G-50 (6×12cm)
 - Sắc ký trao đổi ion trên gel DEAE-Cellulose
- Phương pháp Bradford: xác định hàm lượng protein [4]
- Phương pháp Nessler: xác định hoạt tính urease [4]
- Phương pháp điện di: kiểm tra hiệu quả tinh sạch, điện di trên gel 10% polyacrylamid với tốc độ dòng 20mA, gel được nhuộm với Coomassie Blue R-250. [1]
- Phương pháp siêu lọc: sử dụng thiết bị lọc membrane Vivaflow.

3.KẾT QUẢ

3.1 Khảo sát các phương pháp tinh sạch urease từ đậu nành

3.1.1. Khảo sát nồng độ acetone để rửa enzyme

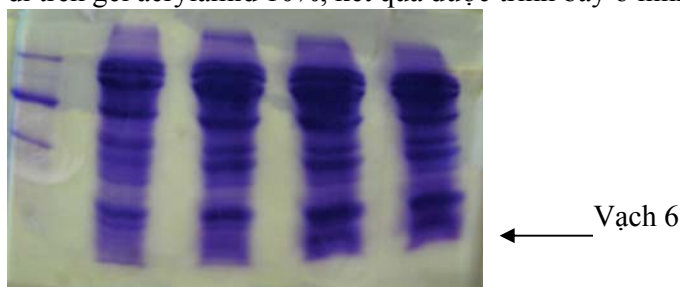
Kết quả so sánh độ tinh sạch và hiệu suất thu hồi enzyme urease khi rửa với các nồng độ acetone từ 30% - 60% được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả so sánh hiệu quả rửa enzyme ở các nồng độ acetone khác nhau

Giai đoạn	V _{dịch} , ml m _{bột} , mg	P, mg/ml (mg/mg)	P _t , mg	A, UI/ml (UI/mg)	A _t , UI	A _p , UI/mg pr	Độ tinh sạch	H, %
Trích ly	150.00	19.69	2953.50	104.40	15660.00	5.30	1.00	100
Aceton 30 %	882.75	0.21	185.38	1.36	1200.54	6.48	1.22	7.67
Aceton 40 %	2976.00	0.46	1368.96	1.79	5327.04	3.89	0.73	34.02
Aceton 50 %	3313.24	0.45	1490.96	1.87	6.95.76	4.16	0.78	39.55
Aceton 60 %	3788.25	0.44	1666.83	2.91	11023.81	6.61	1.25	70.39

Kết quả ở bảng 1 cho thấy độ tinh sạch của mẫu rửa 30% và 60% acetone gần bằng nhau và lớn hơn 1, nhưng hiệu suất thu hồi ở nồng độ acetone 60% nhiều gấp 10 lần so với nồng độ acetone 30%. Ở mẫu rửa 40% và 50% acetone có độ tinh sạch thấp hơn 1 và hiệu suất thu hồi enzyme cũng không cao.

Kiểm tra 5 mẫu qua điện di trên gel acrylamid 10%, kết quả được trình bày ở hình 1.



Urease Aceton Aceton Aceton Aceton
Jackbean 30% 40% 50% 60%

Hình 1. Kết quả điện di urease rửa ở các nồng độ acetone khác nhau

Điện di đồ trên hình 1 cho thấy: urease đậu nành dù đã ở dạng rất tinh khiết vẫn xuất hiện 3 vạch rõ ràng, điều đó chứng tỏ urease của đậu nành là một loại enzyme heterogeneous.

Điện di đồ đậu nành chứa đủ các vạch có trong điện di đồ đậu nành. Ngoài ra điện di đồ đậu nành còn chứa một số vạch khác cũng rất rõ ràng, đặc biệt vạch thứ 6 với độ đậm tăng dần từ nồng độ acetone 30% - 60%. Kết quả chạy điện di cho thấy phương pháp rửa bằng acetone có hiệu quả tinh sạch chưa cao, còn lẫn nhiều protein tạp nên các mẫu điện di chưa có sự phân tách rõ ràng.

Như vậy từ kết quả kiểm tra hiệu quả tinh sạch trên cho thấy nồng độ acetone 60% là nồng độ dung môi làm rửa enzyme urease có hiệu quả nhất về độ tinh sạch cũng như hiệu suất thu hồi enzyme.

3.1.2 Khảo sát tủa phân đoạn bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (theo phương pháp ở mục 2,2)

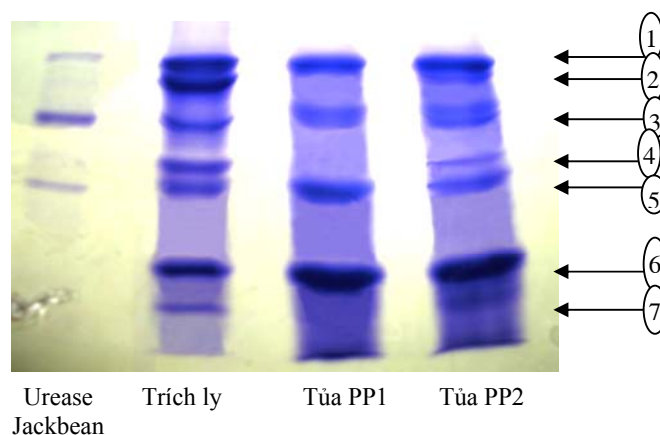
Kết quả xác định độ tinh sạch và hiệu suất thu hồi của hai phương pháp tủa phân đoạn sunfat amon được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. So sánh hiệu quả tinh sạch của 2 phương pháp tủa phân đoạn $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Giai đoạn	V _{dịch} , ml m _{bột} , mg	P, mg/ml (mg/mg)	P _t , mg	A, UI/ml (UI/mg)	A _t , UI	A _p UI/mg pr	Tinh sạch	H, %
Trích ly	150.00	19.69	2953.50	104.40	15660.00	5.30	1.00	100
P.Pháp 1	1896.72	0.19	360.38	1.60	3034.75	8.42	1.59	19.38
P.Pháp 2	1214.25	0.19	230.71	1.36	1651.38	7.16	1.35	10.55

Các số liệu thực nghiệm cho thấy ở phương pháp có độ tinh sạch enzym và hiệu suất thu hồi enzym đều cao hơn so với phương pháp 2. Tuy nhiên hiệu suất thu hồi enzym của cả 2 phương pháp này đều thấp, chỉ 10 – 20%.

Kiểm tra 4 mẫu qua điện di trên gel acrylamid 10%, kết quả được trình bày ở hình 5.



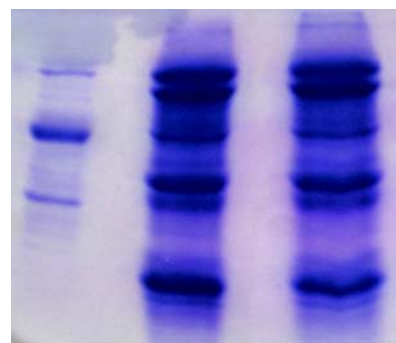
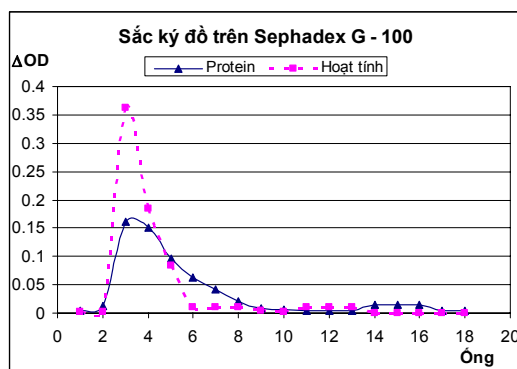
Hình 2. Kết quả chạy điện di các mẫu urease thu từ hai phương pháp tủa phân đoạn sunfat amon

Kết quả điện di cho thấy, cả hai mẫu tủa Sunfate amonium đều xuất hiện các vạch tương đồng với mẫu chuẩn và chứa ít vạch hơn so với mẫu trích ly. Ở mẫu tủa theo phương pháp 2 tuy đã loại bớt protein tạp ở vạch số 2 và số 4, tuy nhiên vẫn còn sót một ít và thể hiện thành các vạch mờ. Ở mẫu tủa sunfat amon theo phương pháp 1 đã loại được hoàn toàn các protein tạp ở các vạch 2, 4 và 7 so với mẫu trích ly. Điện di đồ của mẫu tủa theo phương pháp 1 chỉ còn lại 4 vạch.

Như vậy, phương pháp tủa phân đoạn Sunfate amonium theo phương pháp 1 đem lại hiệu quả tinh sạch tốt hơn phương pháp 2. Do đó chúng tôi chọn tủa bằng Sunfate amonium theo phương pháp 1 để tiếp tục các bước nghiên cứu sau.

3.1.3 Khảo sát quá trình tinh sạch urease bằng phương pháp sắc ký trên cột Sephadex G-50

Lấy 0,5ml dịch trích ly đã điều chỉnh về pH 7 cho lên cột Sephadex G-50). Rửa cột bằng đệm phosphate pH7; 1/15M. Kiểm tra hàm lượng protein và hoạt tính enzym ở mỗi phân đoạn.



Urease jackbean Trích ly Qua Cephadex

Hình 3. Sắc ký đồ của dịch trích ly từ đậu nành khi qua cột SephadexG-50

Hình 4. Kết quả điện di mẫu đã qua cột Sephadex, ở phân đoạn 4

Từ sắc ký đồ cho thấy vị trí cực đại của peak protein cũng chính là vị trí cực đại của peak enzym ở phân đoạn 4. Để kiểm tra hiệu quả tinh sạch, chúng tôi tiến hành chạy điện di trên gel acrylamide 10% với chất chuẩn là urease từ đậu rạ. Kết quả trình bày ở hình 4.

Sắc ký đồ trên gel acrylamide cho thấy hầu như tất cả các vạch trên mẫu trích ly đều xuất hiện ở mẫu đã qua tinh sạch trên cephadex. Điều đó có nghĩa trước và sau khi chạy sắc ký lọc gel trên cột Sephadex G-50 chưa có hiệu quả lắm về mặt tinh sạch, có thể do Sephadex G-50 không phù hợp nên chưa thể loại bỏ một số tạp chất.

3.1.4 Siêu lọc

Dịch trích ly được cho qua thiết bị lọc màng membrane có kích cỡ lỗ 10 000 Da, áp suất lọc 2.5 bar, lọc trong 2h. Sau khi qua siêu lọc, nồng độ enzym trong mẫu rất cao.

Bảng 3. Kết quả đánh giá hiệu quả tinh sạch của phương pháp siêu lọc

Giai đoạn	V _{dịch} , ml m _{bột} , mg	P, mg/ml (mg/mg)	P _t , mg	A, UI/ml (UI/mg)	A _t , UI	A _p , UI/mg pr	Độ tinh sạch	H, %
Trích ly	150.00	27.28	4092.00	68.40	10260.00	2.51	1.00	100
Dung dịch siêu lọc	90.00	29.34	2640.60	78.14	7032.60	2.66	1.06	68.54
Siêu lọc đk	6876.40	0.43	2956.85	0.76	5226.06	1.77	0.71	50.94

Khi sử dụng màng lọc 10 000 Da là quá nhỏ so với phân tử Urease nên hiệu quả tinh sạch không cao, chỉ làm dịch enzym đậm đặc hơn. Dịch siêu lọc sau đông khô bị giảm hoạt tính, có thể do một số chất ổn định hoạt tính urease như L-Cystein, EDTA-Na₂ đã bị loại khi siêu lọc.

3.2 So sánh các phương pháp tinh sạch

Kết quả so sánh các phương pháp tinh sạch sơ bộ enzym urease trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. So sánh hiệu quả tinh sạch của các phương pháp

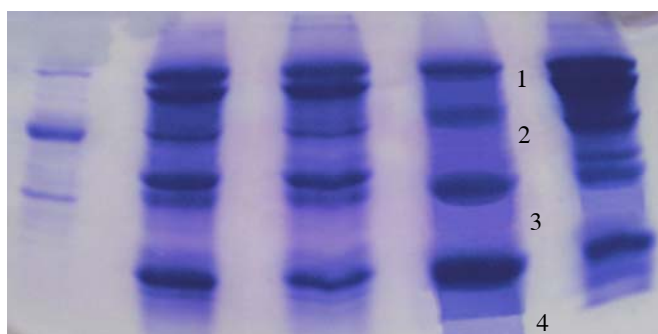
Giai đoạn	V _{Tr.ly} , ml m _{bột} , mg	P, mg/ml (mg/mg)	P _t , mg	A, UI/ml (UI/mg)	A _t , UI	A _p , UI/mg pr	Tinh sạch	H, %
Trích ly	150.00	27.28	4092.00	68.40	10260.00	2.51	1.00	100
Dung dịch siêu lọc	90.00	29.34	2640.60	78.14	7032.60	2.66	1.06	68.54
SK.Cephadex	300.00	7.88	2362.50	23.08	6924.00	2.93	1.17	57.88

(NH ₄) ₂ SO ₄ 65%	1906.00	0.39	743.34	1.48	2820.88	3.79	1.51	27.49
Aceton 60%	4837.13	0.46	2225.08	1.47	7110.58	3.19	1.27	69.30

Kết quả cho thấy rửa phân đoạn (NH₄)₂SO₄ theo phương pháp 1 cho độ tinh sạch cao nhất (1,51), nhưng hiệu suất thu hồi lại tương đối thấp (18,01%). Ở phương pháp siêu lọc và sắc ký trên Cephadex hiệu suất thu hồi rất cao, nhưng hiệu quả tinh sạch lại không cao.

Phương pháp rửa aceton 69% thực hiện rất đơn giản, thời gian rửa ngắn và rất dễ thu hồi, nhưng quá trình này không ổn định, enzym rất dễ biến tính. Hơn nữa, bột sau khi đông khô độ hoà tan rất kém. Bột đông khô thu được từ mẫu rửa sun fat amon có độ tan rất tốt.

Kiểm tra 4 mẫu qua điện di trên gel acrylamid 10%, kết quả được trình bày ở hình 5.



Urease jackbean Siêu lọc Qua Cehadex Rửa (NH₄)₂SO₄ PP1 Rửa Aceton 60%

Hình 5. Kết quả điện di urease qua 4 phương pháp tinh sạch

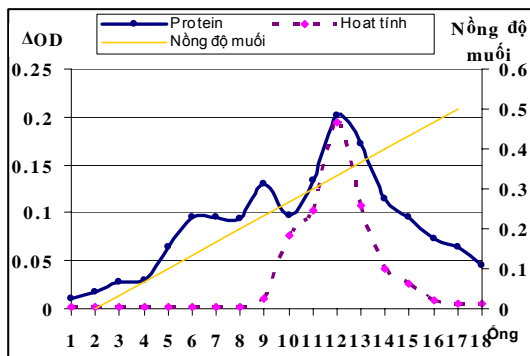
Kết quả điện di hoàn toàn phù hợp với số liệu thực nghiệm ở bảng 4. Các phương pháp sắc ký rửa phân tử, siêu lọc, rửa aceton không đem lại hiệu quả tinh sạch cao, điều đó thể hiện qua điện di đồ còn rất nhiều vạch tạp chất. Ở mẫu rửa sunfat amon theo phương pháp 1 có hiệu quả tinh sạch cao nhất, điện di đồ chỉ còn 4 vạch rất rõ ràng, ngoài 3 vạch tương ứng với các vạch trên điện di đồ của urease đậu rựa còn một vạch thứ 4 rất đậm. Từ những nhận xét trên, chúng tôi quyết định chọn phương pháp rửa phân đoạn sunfat amon theo phương pháp 1 để tiếp tục qua sắc ký trao đổi ion.

3.3 Kết quả tinh sạch trên cột sắc ký trao đổi ion DEAE - cellulose

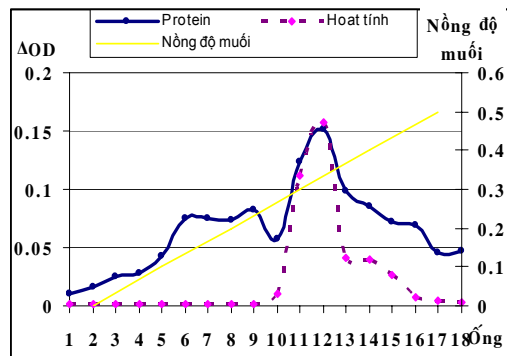
Trong phần này, chúng tôi thực hiện 2 thí nghiệm song song:

1) Mẫu enzym urease đậu nành sau khi tinh sạch bằng phương pháp rửa phân đoạn sunfat amon qua thẩm tích đối nước và qua cột trao đổi ion DEAE – cellulose, dùng hệ đệm phosphat pH7 1/15M, gradient bằng muối NaCl nồng độ từ 0 – 1M. Sắc ký đồ được trình bày ở hình 6.

2) Dung dịch sau thẩm tích được đông khô và chạy sắc ký trao đổi ion trên cột DEAE cellulose như trên. Sắc ký đồ được trình bày ở hình 7.



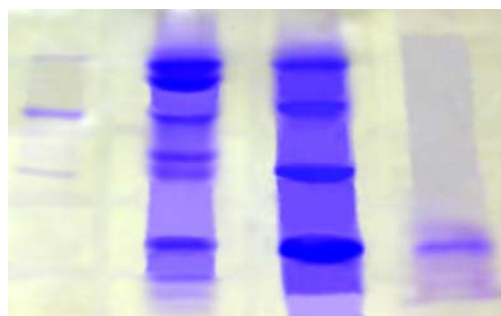
Hình 6. Sắc ký đồ trên DEAE-Cellulose của dịch tủa bằng $(NH_4)_2SO_4$ phương pháp 1



Hình7. Sắc ký đồ DEAE-cellulose bột tủa $(NH_4)_2SO_4$ phương pháp 1 đông khô

Sắc ký đồ cho thấy khi tách phân đoạn dung dịch enzyme sau tủa $(NH_4)_2SO_4$ nhờ sắc ký trao đổi ion thu được 3 peak protein và 1 peak enzyme. Vị trí cực đại của peak enzyme trùng với vị trí cực đại của peak protein thứ 3 ở nồng độ muối 0,3M. Enzyme tủa phân đoạn $(NH_4)_2SO_4$ sau đông khô qua sắc ký trao đổi ion có sắc ký đồ tương tự sắc ký đồ mẫu chưa đông khô, gồm 3 peak protein và 1 peak enzyme. Peak enzyme cũng trùng với peak protein thứ 3, nhưng hoạt tính enzyme chỉ tập trung ở 2 ống 11 và 12, trong đó ống 12 có hoạt tính cao nhất.

Như vậy, ở cả 2 mẫu dung dịch tủa $(NH_4)_2SO_4$ và tủa $(NH_4)_2SO_4$ đã qua đông khô, enzyme urease được đẩy ra ở nồng độ muối 0,3M. Peak chứa enzyme urease thu được sau sắc ký trao đổi ion được kiểm tra độ tinh sạch qua điện di, kết quả trình bày ở hình 8.



Urease jackbean Trích ly Tủa $(NH_4)_2SO_4$ Sau DEAE-cellulose

Hình 8. Kết quả điện di qua các giai đoạn tinh sạch

Kết quả điện di cho thấy, hiệu quả tinh sạch cũng như kết quả tách phân đoạn qua cột sắc ký rất cao, đã loại bỏ gần toàn bộ các protein tạp. Nhờ vậy, trên điện di đồ chỉ còn một vạch rất rõ. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả của một số nghiên cứu trước đây [18]. Từ đó, chúng tôi có thể kết luận: urease đậu nành (Glycine max) và đậu rựa (jackbean) mặc dù có hoạt lực thủy phân nguyên liệu đặc hiệu như nhau nhưng khác nhau về phân tử lượng cũng như thành phần cấu tạo, cụ thể: kết quả trên sắc ký đồ và điện di đồ trong thí nghiệm của chúng tôi cũng như trong các công trình nghiên cứu trước đây thì urease đậu rựa (jackbean) là loại enzyme heterogeneous, còn urease đậu nành (Glycine max) là homogeneous.

Bảng 5. Kết quả tổng kết qua các giai đoạn tinh sạch

Giai đoạn	V _{dịch} , ml m _{bột} , mg	P, mg/ml (mg/mg)	P _t , mg	A, UI/ml (UI/mg)	A _t , UI	A _p UI/mg pr	Độ tinh sạch	H, %
Trích ly	150.00	24.66	3669.00	62.47	9370.50	2.55	1.00	100
Dung dịch $(NH_4)_2SO_4$	75.00	14.25	1068.75	55.29	4146.75	3.88	1.52	44.25
DEAE-Cell Dịch	225.00	2.46	553.50	10.13	2279.25	4.12	1.62	24.32
$(NH_4)_2SO_4$ đk	1897.23	0.35	664.03	1.34	2542.29	3.83	1.50	27.13
DEAE-Cell đk	379.45	0.98	371.86	5.07	1923.81	5.17	2.03	20.53

Như vậy, qua mỗi cấp tinh sạch thì urease dần dần được tách ra khỏi các protein tạp khác. Ở mẫu tủa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ đã qua đông khô khi qua cột DEAE-cellulose thì hoạt tính chủ yếu tập trung trong 2 ống, do đó độ tinh sạch của nó cao hơn mẫu dịch tủa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và đạt 2,03 với hiệu suất thu hồi enzym là 20,53.

4.KẾT LUẬN

Qua quá trình nghiên cứu chúng tôi đã giải quyết được vấn đề sau:

- So sánh các phương pháp tinh sạch sơ bộ enzym urease và kiểm tra độ tinh sạch bằng điện di trên gel acrylamide và nhận thấy phương pháp tủa phân đoạn sunfat amon 65% và 55% là hiệu quả nhất so với các phương pháp siêu lọc, tủa acetone, sắc ký rây phân tử.

- Sắc ký trao đổi ion trên DEAE-cellulose thu được 3 peak protein và 1 peak enzym urease ứng với nồng độ muối 0,3M.

- Đã xây dựng được một quy trình thu nhận và tinh sạch enzym urease từ đậu nành hiệu quả, loại bỏ gần toàn bộ các protein tạp, độ tinh sạch đạt được là 2,03 và hiệu suất thu hồi enzym là 20,53.

- Sử dụng điện di để kiểm tra độ tinh sạch enzym và xác định được urease đậu nành là loại homogeneous.

EXTRACTION AND PURIFICATION OF UREASE FROM SOYBEAN

Le Thi Phu, Nguyen Thi Cam Vi, Nguyen Tan Dat
Ton Duc Thang University

ABSTRACT: *In this work, we compared some methods of urease preliminary purification: ammonium sulfate fractionations, acetone precipitation, gel filtration chromatography and ultrafilter. Determination of enzym fold purify and recovery yield, acrylamid-gel electrophoresis of urease from each method showed ammonium sulfate fractionations with 65% and 55% saturated concentrations was the most effective. Purification was carried out continuously by DEAE-cellulose column, the chromatograph showed three peak protein and only one peak urease at 0,3 M salt concentration. Acrylamid-gel electrophoresis of urease of the highest specific activity peak indicated that soybean urease was homogeneous enzyme. The result of electrophoresis indicated our purification process was effective and pure urease was obtained.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Phạm Thị Ánh Hồng, *Kỹ thuật sinh hóa*, NXB ĐHQG Tp.HCM, 2003.
- [2]. Nguyễn Thị Việt Hương, *Tách chiết urease từ đậu nành và ứng dụng để xác định urease trong bệnh phẩm*, Luận án thạc sỹ ĐHKHTN, 1999.
- [3]. Nguyễn Đức Lượng và các tác giả, *Công nghệ enzyme*, NXB ĐHQG Tp.HCM, 2004.
- [4]. Nguyễn Văn Mùi, *Thực hành sinh hóa*, NXB KH&KT Hà Nội, 2002.
- [5]. Lê Thị Phú, *Bài giảng các phương pháp nghiên cứu hóa sinh hiện đại*, ĐHBC Tôn Đức Thắng.
- [6]. Đào Hữu Vinh và các tác giả, *Các phương pháp sắc ký*, NXB KH&KT Hà Nội, 1985.
- [7]. Cristian Follmer và các tác giả, *Jackbean, soybean and bacillus pasteurii urease - biological effects unrelated to ureolytic activity*, Eur. J. Biochem. 271, 1357-1363, Cambridge, 2004.

- [8]. E. G. Schmidt, *The inactivation of urease*, The department of biological chemistry of the university of Maryland school of medicine, Baltimore, 1928.
- [9]. Frederick J. Dechow, *Separation and purification technique in biotechnology*, Noyes publications, New Jersey, 1989.
- [10]. Henry Tauber, Israel S. Kleiner, *The toxicity of crystalline urease, medical college and flower hospital*, J. Biol. Chem. 92, 177, New York, 1931.
- [11]. Irwin W. Sier, *The activation energy of urea hydrolysis catalyzed by soybean urease*, Eur. J. Biochem. 132, 209, Cambridge, 1939.
- [12]. J. G. Mateer, E. K. Marshall, *The urease content of certain beans, with special referenace to the jack bean*, John Hopkins University, Baltimore, 1916.
- [13]. Jack Peterson và các tác giả, *The dependence of the specific activity of urease upon the chemistry*, California Institute of Technology, Pasadena, 1970.
- [14]. James B. Sumner, *The isolation and crystallization of the enzym urease*, J. Biol. Chem. 69, 435 - 441, New York, 1926.
- [15]. K. Takisnima, T. Suga, *The structure of jack bean urease, the complete amino acid sequence, limited proteolysis and reactive cystein residues*, Eur. J. Biochem. 175, 151 – 165, Cambridge, 1988.
- [16]. Stacey F. Howell, James B. Sumner, *The specific effects of buffer upon urease activity*, J. Biol. Chem. 104, 619, New York, 1934.
- [17]. Isobel J. Rosenstein, Jeremy M. Hamilton - Miller and William Brufitt, *Role of urease in the formation of infection stones: comparision of urease from different sources*, 1981.
- [18]. Joseph C. Polacco và Evelyn A. Havir, *Comparisions of soybean urease isolated from seed and tissue culture*, www.biomedcetr.al.com, 1979.
- [19]. Prem P. Sehgal and Aubrey W.Naylor, *Purication and properties of urease derived from hydrated seeds of jack bean, Canavalia ensiformis (L)*, Plant Physiology. 4, 567 – 572, Horsham, 1966.