

工业生物技术

耐盐氨基甲酸酯水解酶的分离纯化及酶学性质

卜攀攀, 陈坚, 堵国成

江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

卜攀攀, 陈坚, 堵国成. 耐盐氨基甲酸酯水解酶的分离纯化及酶学性质. 生物工程学报, 2014, 30(3): 404-411.

Bu PP, Chen J, Du GC. Purification and characterization of a halophilic urethanase from *Klebsiella pneumoniae*. Chin J Biotech, 2014, 30(3): 404-411.

摘要: 氨基甲酸酯是发酵食品中存在的一种致癌物质, 酶法去除发酵食品中的氨基甲酸酯是消除氨基甲酸酯危害的一种重要方法。从小鼠的胃部获得了一株产氨基甲酸酯水解酶的肺炎克雷伯氏菌, 为了解该氨基甲酸酯水解酶的酶学性质, 从肺炎克雷伯氏菌中提取获得氨基甲酸酯水解酶粗酶液, 经硫酸铵沉淀、离子交换层析和凝胶过滤层析分离得到氨基甲酸酯水解酶纯酶。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺电泳 (SDS-PAGE) 分析, 估计该酶的分子量约为 55 kDa。其水解氨基甲酸酯的 K_m 值为 74 mmol/L。酶反应的最适温度为 55 °C, 最适 pH 为 7.0。乙二胺四乙酸 (EDTA) 和二硫苏糖醇 (DTT) 对该酶有较强的激活作用, 而 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 则有较强的抑制作用。该酶可耐受高浓度 NaCl, 对低浓度乙醇也有一定的耐受性, 对于酱油中氨基甲酸酯的消除有一定的参考意义。

关键词: 氨基甲酸酯, 氨基甲酸酯水解酶, 耐盐, 分离纯化, 酶学性质

Purification and characterization of a halophilic urethanase from *Klebsiella pneumoniae*

Panpan Bu, Jian Chen, and Guocheng Du

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Ethyl carbamate (EC) is a carcinogenic substance in many fermented foods. Enzymatic removal of ethyl carbamate from fermented foods is an important way to eliminate its potential health damage to consumers. To study the

Received: June 1, 2013; **Accepted:** July 29, 2013

Supported by: National Basic Research and Development Program of China (973 Program) (Nos. 2012CB720802, 2012CB720806).

Corresponding author: Guocheng Du. Tel: +86-510-85918309; E-mail: gedu@jiangnan.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (Nos. 2012CB720802, 2012CB720806) 资助。

网络出版时间: 2013-10-11

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20131011.1834.001.html>

enzymatic properties of an ethyl carbamate hydrolase (urethanase) from *Klebsiella pneumoniae*, a strain isolated from murine stomach, we purified the enzyme using ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography and gel filtration chromatography. The molecular mass of this enzyme was estimated to be 55 kDa by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Its K_m was 74 mmol/L when EC was used as the substrate. Moreover, its optimal reaction temperature was 55 °C, and the optimum pH was 7.0. The activity was enhanced by ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) and dithiothreitol (DTT), but strongly inhibited by Cu^{2+} and Zn^{2+} . The enzyme was halophilic and tolerant to low concentration of ethanol. Therefore, it has the potential to remove EC from fermented foods.

Keywords: ethyl carbamate, urethanase from *Klebsiella pneumoniae*, halophile, purification, enzymatic properties

氨基甲酸酯 (Ethyl carbamate, EC) 早在 1943 年就被发现是一种致癌物质^[1-2]。自从 1971 年 Lofroth 等^[3]在发酵食品中发现了氨基甲酸酯的存在以后,许多学者又先后在酱油、面包、蒸馏酒、白兰地和威士忌等发酵食品与饮料中检测到了氨基甲酸酯^[4-8]。目前食品中氨基甲酸酯的危害已被认为是继黄曲霉毒素之后的又一重要食品安全问题^[8]。

氨基甲酸酯在食品发酵和长期的贮藏过程中均可产生^[9-10]。目前,人们主要是通过选育优良菌株、控制发酵条件和向完成的发酵食品中添加脲酶^[11-13]来控制氨基甲酸酯的形成。但是,由于氨基甲酸酯的化学性质比较稳定,一旦形成就很难被降解,以致于氨基甲酸酯会在发酵食品中不断地增加和积累。20 世纪八九十年代,国外报道了一些关于氨基甲酸酯水解酶的研究^[14-17],氨基甲酸酯水解酶能将一分子的氨基甲酸酯水解为一分子的氨、二氧化碳和乙醇。但是,不同氨基甲酸酯水解酶的适宜工作环境不同,而且发酵食品的成分复杂,以致合适的氨基甲酸酯水解酶还未得到开发。于是,研究氨基甲酸酯水解酶的性质对其在实际生产中的应用有着十分重要的参考意义。

我们已从小鼠的胃部分离获得了一株产氨基甲酸酯水解酶的肺炎克雷伯氏菌。超声破碎后的粗酶液有良好的 NaCl 耐受特性,对于高盐的酱油类发酵食品中氨基甲酸酯的消除有很高的参考价值。本研究利用硫酸铵沉淀、HiTrap Q FF 和 Mono Q 离子交换层析及 Superdex 200 prep grade 凝胶过滤层析实现了肺炎克雷伯氏菌氨基甲酸酯水解酶的分离纯化,并研究了该酶的理化性质。

1 材料与方法

1.1 材料

产氨基甲酸酯水解酶的肺炎克雷伯氏菌由本实验室从小鼠的胃部分离筛选得到。HiTrap Q FF 柱、Mono Q 柱和 Superdex 200 prep grade 柱为 GE 公司产品。氨基甲酸甲酯、氨基甲酸乙酯、氨基甲酸丁酯、乙酰胺、谷氨酰胺、苯甲酰胺购自 Sigma-Aldrich 公司。

终止剂: 10 g 三氯乙酸,超纯水定容至 100 mL。

显色剂 I: 15 g 苯酚, 0.625 g 亚硝基铁氰化钠,超纯水定容至 250 mL。

显色剂 II: 13.125 g 氢氧化钠, 7.5 mL 次氯酸钠,超纯水定容至 250 mL。

1.2 方法

1.2.1 肺炎克雷伯氏菌氨基甲酸酯水解酶的分离纯化

1) 粗酶液制备: 接种适量的肺炎克雷伯氏菌于营养肉汤培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 12 h。发酵培养物 4 °C、8 000 r/min 离心 20 min, 收集菌体。在 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.0) 中重悬, 置于冰水浴中超声 1 s, 间歇 1 s, 25 W 破碎 20 min, 4 °C、10 000 r/min 离心 30 min, 收集上清。

2) 硫酸铵沉淀: 将粗酶液在冰浴中边搅拌边缓慢加入硫酸铵粉末至一定饱和度, 4 °C 静置 4 h, 10 000 r/min 离心 20 min 收集 30%–60% 饱和度的沉淀, 重新溶于 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.0) 中, 并用相同的缓冲溶液彻底透析脱盐。

3) 离子交换层析: 将上述经透析脱盐后的粗酶液, 高速离心收集上清液。加到已用 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.0) 平衡的 HiTrap Q FF 阴离子交换柱上, 0–1 mol/L 的 NaCl 阶段洗脱, 收集有酶活性的部分。然后将收集的粗酶液透析脱盐后加入到预先用 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.0) 平衡的 Mono Q 阴离子交换柱上, 用 0–1 mol/L 的 NaCl 线性梯度洗脱, 收集有酶活性的部分。

4) 凝胶过滤层析: Superdex 200 prep grade 凝胶柱预先用 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.0) 平衡。将上述收集的粗酶液上柱, 并用相同的缓冲溶液洗脱, 收集有酶活性的部分。

1.2.2 蛋白质浓度的测定

以牛蛋白血清为标准蛋白, 用 Bradford 法测定蛋白质含量^[18]。

1.2.3 氨基甲酸酯水解酶酶力的测定

采用靛酚蓝反应法^[19]。在 0.2 mL 含 3% (W/V) 氨基甲酸酯的 20 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中加入 0.2 mL 经过适当稀释的酶液, 于 55 °C 温育 15 min, 加入 0.2 mL 终止剂终止反应, 8 000 r/min 离心 1 min 后取上清, 然后依次加入 0.2 mL 显色剂 I、0.2 mL 显色剂 II, 摇匀, 37 °C 水浴保持 1 h。在波长 625 nm 下测定吸光度, 计算酶活。实验条件下, 每分钟分解底物产生 1 mmol/L NH_4^+ 所需要的酶量为一个活力单位 (U)。

1.2.4 SDS-PAGE 分析

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳用于分析蛋白质的分子量, 分离胶浓度为 12%, 染色使用考马斯亮蓝 R-250^[20]。

1.2.5 酶学性质

1) 酶的最适反应温度及热稳定性: 在 20 mmol/L (pH 7.0) 磷酸缓冲液中, 酶分别在 20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C 和 70 °C 不同温度下测定酶活, 考察酶的最适反应温度。将酶在 37 °C、45 °C 和 55 °C 下保温 0 min、30 min、60 min、90 min 和 120 min 后检测残余酶活力, 考察酶的温度稳定性。

2) 酶的最适反应 pH: 分别在柠檬酸盐缓冲液 (pH 4.0–6.0)、磷酸盐缓冲液 (pH 7.0)、硼酸盐缓冲液 (pH 8.0) 和硼酸盐-氢氧化钠缓冲液 (pH 9.0–10.0) 中测定酶对氨基甲酸酯的水解活力^[15], 研究酶促反应的最适 pH。

3) 酶反应动力学性质: 将酶液与不同浓度 (50–90 mmol/L) 的氨基甲酸酯底物作用, 测定酶反应的初速度, 用 Lineweaver-Burk 双倒数作

图法求出酶对氨基甲酸乙酯的 K_m 值和 V_{max} 值。

4) 酶的底物特异性 将酶液与 3% (W/V) 的不同底物 (氨基甲酸甲酯、氨基甲酸乙酯、氨基甲酸丁酯、乙酰胺、谷氨酰胺、苯甲酰胺) 作用, 测定酶活力。

5) 金属离子和化学试剂对酶活力的影响: 将酶加入 1 mmol/L 的不同金属离子 (Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+}) 和试剂 (EDTA、DTT、SDS) 中, 37 °C 保温 5 min 后测定残余酶活, 观察金属离子和试剂对酶活力的影响。

6) 酶的乙醇耐受性: 将酶液加入含 1.5% (W/V) 氨基甲酸乙酯和不同浓度 (0–30%) 乙醇的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中, 于 55 °C 温度下反应 15 min 后加入终止剂测定酶的活力, 观察酶对乙醇的耐受性。

7) 酶的 NaCl 耐受性: 将酶液加入含 1.5% (W/V) 氨基甲酸乙酯和不同浓度 (0–18%) NaCl 的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中, 于 55 °C 温度下反应 15 min 后加入终止剂测定酶的活力, 观察酶对 NaCl 的耐受性。

2 结果与分析

2.1 肺炎克雷伯氏菌氨基甲酸乙酯水解酶的分选和纯化

肺炎克雷伯氏菌氨基甲酸乙酯水解酶粗酶液经过上述一系列纯化操作, 分离纯化结果见表 1, 肺炎克雷伯氏菌氨基甲酸乙酯水解酶从粗酶液到最后的纯化产物回收率为 19%, 纯化后的酶活力为 351.222 U/mg。SDS-PAGE 凝胶电泳 (图 1) 显示纯化后的肺炎克雷伯氏菌氨基甲酸乙酯水解酶为单一条带, 分子量大小约为 55 kDa。

表 1 肺炎克雷伯氏菌氨基甲酸乙酯水解酶的纯化
Table 1 Purification of urethanase from *Klebsiella pneumoniae*

Steps	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
Crude extract	930.00	1 171	1.259	100
30%–60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	387.60	731	1.885	62
HiTrap Q FF	18.60	674	36.255	58
Mono Q	4.20	563	134.048	48
Superdex 200 prep grade	0.64	225	351.222	19

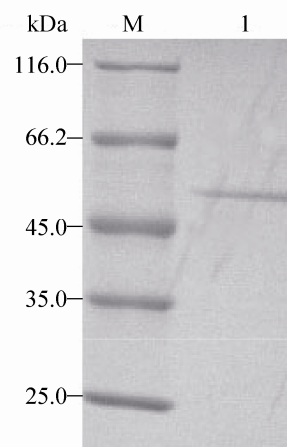


图 1 肺炎克雷伯氏菌氨基甲酸乙酯水解酶纯酶的 SDS-PAGE 凝胶电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified urethanase from *Klebsiella pneumoniae*. M: protein marker; 1: purified urethanase.

2.2 酶的最适温度和热稳定性

酶在不同温度下反应的酶活见图 2, 该酶的最适反应温度为 55 °C 左右, 温度超过 60 °C 后酶活急剧下降。将酶置于 37 °C、45 °C 和 55 °C 放置并取样测量酶的剩余活力, 结果见图 3。酶在 37 °C 保温 120 min 后酶活保持 70%, 45 °C 下保温 120 min 后酶活下降至 45%, 而当温度升

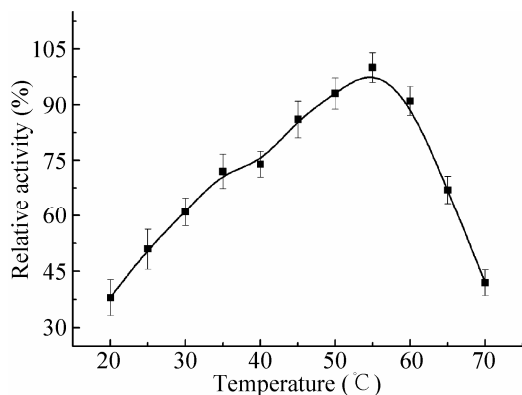


图 2 温度对肺炎克雷伯氏菌氨基甲酸酯水解酶活力的影响

Fig. 2 Effects of temperature on the activity of urethanase from *Klebsiella pneumoniae*.

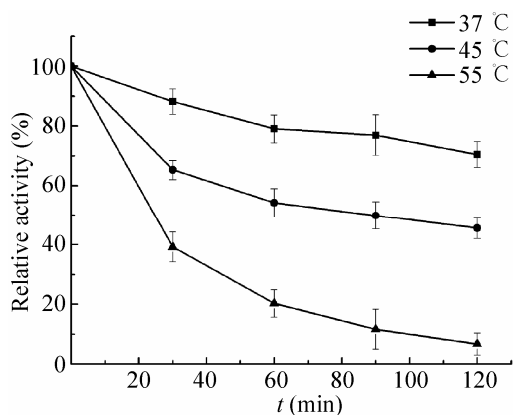


图 3 肺炎克雷伯氏菌氨基甲酸酯水解酶的热稳定性

Fig. 3 Thermostability of urethanase from *Klebsiella pneumoniae*.

至 55 °C 时保温 120 min 后酶活力降至 7%，几乎完全失活，表明该酶对热较敏感。

2.3 酶的最适反应 pH

实验结果表明 (图 4), 肺炎克雷伯氏菌氨基甲酸酯水解酶催化水解反应的最适 pH 为 7.0, 当反应 pH 从 6.0 升到 7.0, 酶活上升比较快, 而当 pH 超过 8.0 后, 酶活迅速下降, 表明该酶

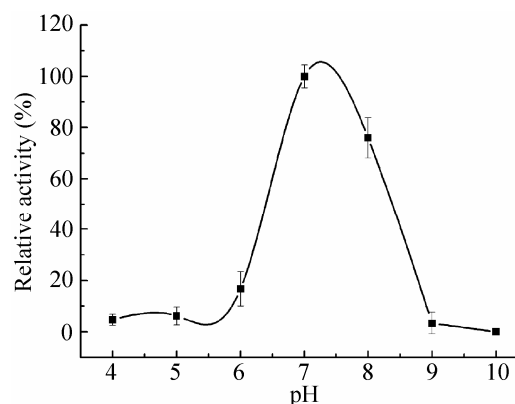


图 4 pH 对肺炎克雷伯氏菌氨基甲酸酯水解酶的影响

Fig. 4 Effects of pH on the activity of urethanase from *Klebsiella pneumoniae*.

对酸碱环境较敏感。

2.4 酶反应动力学性质

分别以浓度 50 mmol/L、60 mmol/L、70 mmol/L、80 mmol/L 和 90 mmol/L 的氨基甲酸酯为底物, 测定底物反应速率, 用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 求得 K_m 值为 74 mmol/L, V_{max} 为 0.307 mmol/(min·mg protein) (图 5)。

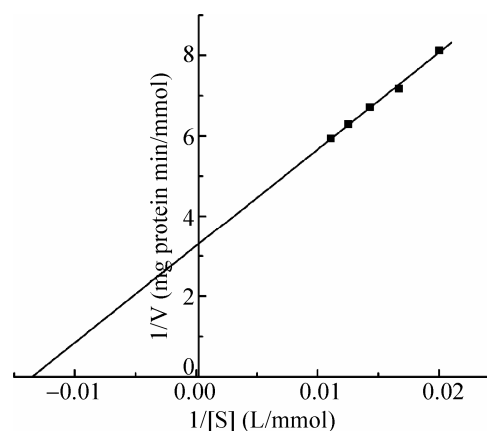


图 5 肺炎克雷伯氏菌氨基甲酸酯水解酶水解氨基甲酸酯的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 5 Lineweaver-Burk plot of purified urethanase from *Klebsiella pneumoniae*.

2.5 酶的底物特异性

分别以 1.5% (W/V) 的氨基甲酸甲酯、氨基甲酸乙酯、氨基甲酸丁酯、乙酰胺、谷氨酰胺、苯甲酰胺、尿素为底物,测定 NH_4^+ 的生成速度,结果如表 2 所示。该酶能水解氨基甲酸酯类化合物和乙酰胺,而其中对氨基甲酸乙酯的作用是其其他物质的数十倍。表明该酶对氨基甲酸乙酯作用特异性较强。

2.6 金属离子和化学试剂对酶活力的影响

从表 3 结果可知,实验中所选用金属离子

表 2 肺炎克雷伯氏菌氨基甲酸乙酯水解酶的底物特异性

Table 2 Substrate specificity of urethanase from *Klebsiella pneumoniae*

Substrate	Relative activity (%)
Methyl carbamate	3
Ethyl carbamate	100
Butyl carbamate	5
Acetamide	2
Benzamide	0
Glutamine	0

表 3 金属离子和化学试剂对肺炎克雷伯氏菌氨基甲酸乙酯水解酶的影响

Table 3 Effects of metal ions and chemicals on the activity of urethanase from *Klebsiella pneumoniae*

Metal ions and chemicals	Relative activity (%)
Cu^{2+}	2
Mg^{2+}	92
Mn^{2+}	115
Zn^{2+}	38
Ca^{2+}	113
Fe^{2+}	115
EDTA	215
DTT	191
SDS	114

对酶催化活力均有不同程度的影响,其中 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对酶活有较强的抑制作用, Mg^{2+} 有微弱的抑制作用,而 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 有微弱的激活作用;EDTA 和 DTT 对酶活力有很强的激活作用,SDS 也有微弱的激活作用。

2.7 酶的乙醇耐受性

分别测定酶在 0–30% (V/V) 的乙醇环境中的活力,结果见图 6。10% 的乙醇环境下酶活保持在 20%,20% 的乙醇环境下酶活已不足 10%,而当环境的乙醇含量升至 30% 后该酶活力几乎完全丧失,与已报道过的氨基甲酸乙酯水解酶^[15,17,21]相比,该酶只能耐受低浓度的乙醇。

2.8 酶的 NaCl 耐受性

酶在 0–18% (W/V) 的 NaCl 环境中的活力见图 7。酶在 0–3% 的 NaCl 低盐溶液中酶活有所上升;NaCl 浓度高于 3% 后,随着 NaCl 浓度的增加,酶活逐渐下降。当 NaCl 浓度高达 18% 时,仍能保留 40% 的酶活。该酶对 NaCl 耐受性较强。

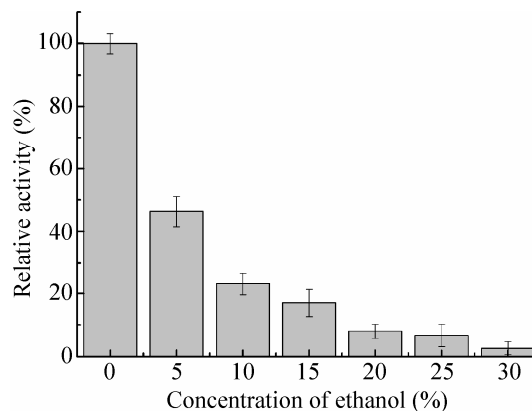


图 6 乙醇浓度对肺炎克雷伯氏菌氨基甲酸乙酯的影响

Fig. 6 Effects of ethanol concentration on the activity of urethanase from *Klebsiella pneumoniae*.

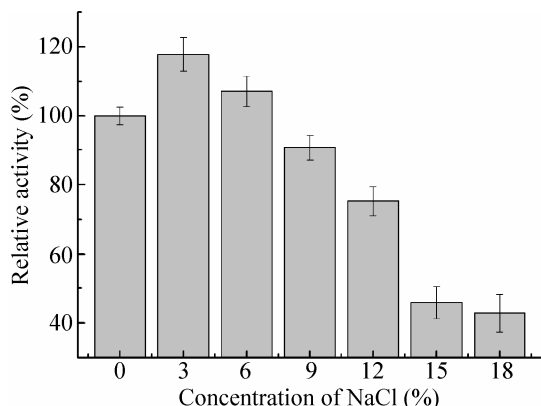


图 7 NaCl 浓度对肺炎克雷伯氏菌氨基甲酸酯水解酶的影响

Fig. 7 Effects of NaCl concentration on the activity of urethanase from *Klebsiella pneumoniae*.

3 讨论

氨基甲酸酯水解酶已在多种微生物中发现并研究,本文首次从肺炎克雷伯氏菌中分离获得一种氨基甲酸酯水解酶并对其酶学性质进行了研究。研究发现:这种酶在 55 °C 下短时间作用的活力较高,但稳定性不佳;在一定的低盐环境中酶的活力会有一些的上升趋势,超出一定范围后酶活力逐渐下降;另外,低浓度的表面活性剂 SDS 的添加会让酶的活力有略微的提高。这些现象都可以说明:酶的部分结构的变化对酶活性提高有促进作用。目前尚未报道过氨基甲酸酯水解酶的结构,对于这种现象还有赖于酶的具体结构解析的证实。

与之前发现的氨基甲酸酯水解酶^[15,17,21]相比,这种氨基甲酸酯水解酶对氨基甲酸酯类化合物的水解有特异性,对氨基甲酸酯有较高的底物专一性和作用活力。

另外,之前的文献报道均是致力于氨基甲酸酯水解酶的乙醇耐受性^[15,17,21]的考察,而对

其 NaCl 耐受性尚未见报道。本研究除对此氨基甲酸酯水解酶的乙醇耐受性作了研究,还首次考察了氨基甲酸酯水解酶的 NaCl 耐受性。研究发现该酶能耐受低浓度的乙醇和高浓度的 NaCl。由于该酶来源于非食品安全级微生物,所以此酶不适宜在酒精饮料和酱油中直接添加应用。酱油中的食盐浓度一般在 18%左右,而在 18%的高盐溶液中酶能保持 40%的活力,具有良好的耐盐特性。因此,经过对其蛋白序列解析后能为今后氨基甲酸酯水解酶的耐盐特性改造和酱油中氨基甲酸酯的消除提供十分重要的参考。

REFERENCES

- [1] Nettleship A, Henshaw PS, Meyer HL. Induction of pulmonary tumors in mice with ethyl carbamate (urethane). *J Natl Cancer I*, 1943, 4(3): 309–319.
- [2] Weber JV, Sharypov VI. Ethyl carbamate in foods and beverages: a review. *Environ Chem Lett*, 2009, 7(3): 233–247.
- [3] Lofroth G, Gejivall T. Diethyl pyrocarbonate: Formation of urethane in treated beverages. *Science*, 1971, 174(15): 139–144.
- [4] Shi WN, Liu XY, Zhao YQ, et al. Residue level of ethyl carbamate in fermented foods. *China Brewing*, 2009, 11(212): 124–126 (in Chinese). 石维妮, 刘晓毅, 赵玉琪, 等. 发酵性食品中的氨基甲酸酯含量调研. *中国酿造*, 2009, 11(212): 124–126.
- [5] Lee KG. Analysis and risk assessment of ethyl carbamate in various fermented foods. *Eur Food Res Technol*, 2013, 236(5): 891–898.
- [6] Jagerdeo E, Dugar S, Foster G, et al. Analysis of ethyl carbamate in wines using solid-phase extraction and multidimensional gas chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(21): 5797–5802.
- [7] Schmeltz I, Chiong KG, Hoffmann DJ. Fomation

- and determination of ethyl carbamate in tobacco and tobacco smoke. *J Anal Toxicol*, 1978, 2(6): 265–268.
- [8] Wu SJ, Wang HX. Research advancement of ethyl carbamate in fermented food. *Chem Bioeng*, 2009, 26(9): 15–19 (in Chinese).
吴世嘉, 王洪新. 发酵食品中氨基甲酸酯的研究进展. *化学与生物工程*, 2009, 26(9): 15–19.
- [9] Riffkin HL, Wilson R, Howie D, et al. Ethyl carbamate formation in the production of pot still whisky. *J I Brewing*, 1989, 95(2): 115–119.
- [10] Monteiro FF, Trousdale EK, Bisson LF. Ethyl carbamate formation in wine: use of radioactively labeled precursors to demonstrate the involvement of urea. *Am J Enol Viticult*, 1989, 40(1): 1–8.
- [11] Bao JH. The changes and research of ethyl carbamate in the wine [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2008 (in Chinese).
宝菊花. 氨基甲酸酯在葡萄酒中的含量的变化及研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2008.
- [12] Chen K. Quantification and accumulation conditions of ethyl carbamate in soy sauce [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012 (in Chinese).
陈可. 酱油中氨基甲酸酯的定量分析[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- [13] Zhao XR, Du GC, Zou HJ, et al. Progress in preventing the accumulation of ethyl carbamate in alcoholic beverages. *Trends Food Sci Tech*, 2013, 32(2): 97–107.
- [14] Zhao CJ, Kobashi K. Urethanase in rat tissues. *J Toxicol Environ Health*, 1992, 37(1): 37–45.
- [15] Mohapatra B, Bapuji M. Characterization of urethanase from *Micrococcus* species associated with the marine sponge (*Spirasfrella* species). *Lett Appl Microbiol*, 1997, 25(6): 393–396.
- [16] Zhao CJ, Imamura L, Kobashi K. Urethanase of *Bacillus licheniformis* sp. isolated from mouse gastrointestinal. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39(12): 3303–3306.
- [17] Kobashi K, Takebe S, Sakai T. Urethane-hydrolyzing enzyme from *Citrobacter* sp.. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38(5): 1326–1328.
- [18] Shu ZY, Yan JK, Yan YJ. Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus niger* F044. *Chin J Biotech*, 2007, 23(1): 96–100 (in Chinese).
舒正玉, 杨江科, 闫云君. 黑曲霉 F044 脂肪酶的分离纯化及酶学性质研究. *生物工程学报*, 2007, 23(1): 96–100.
- [19] Scheiner D. Determination of ammonia and Kjeldahl nitrogen by indophenol method. *Water Res*, 1976, 10(1): 31–36.
- [20] Wang JZ, Fan M. Protein Technical Manual. Beijing: Science Press, 2000: 77–124 (in Chinese).
汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000: 77–124.
- [21] Zhao CJ, Kobashi K. Purification and characterization of iron-containing urethanase from *Bacillus licheniformis*. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(6): 773–778.

(本文责编 陈宏宇)