

海因酶与氨甲酰水解酶产生菌的鉴定及分布*

梅艳珍 何冰芳** 欧阳平凯

(南京工业大学制药与生命科学学院 南京 210009)

摘要 利用 Biolog 微生物鉴定系统和 16S rDNA 序列分析相结合的方法对自行筛选的 24 株海因酶和氨甲酰水解酶产生菌进行了鉴定。海因酶与氨甲酰水解酶产生菌主要分布在 *Bacillus*, *Geobacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Kurthia* 和 *Empedobacter* 等菌属, 特别的是, *Kurthia* 和 *Empedobacter* 是新的海因酶和氨甲酰水解酶产生菌属, 说明海因酶和氨甲酰水解酶产生菌在细菌中分布较广泛。进一步分析比较发现, D-海因酶产生菌主要分布于 *Pseudomonas*, *Agrobacterium* 等菌属中, 而大部分 L-海因酶产生菌分布于 *Bacillus*, *Geobacillus*, *Microbacterium* 等菌属中, 说明 D-海因酶产生菌与 L-海因酶产生菌分布特点具有一定的种属倾向性。这些工作不仅提供了多种海因酶和 N-氨甲酰水解酶的生物材料, 而且对双酶的结构与功能及分子进化研究等具有重要意义。

关键词 菌种鉴定, Biolog 系统, 16S rDNA, 海因酶, 氨甲酰水解酶, 属倾向性

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)06-1104-05

Identification and Distribution of Hydantoinase- and Carbamoylase-producing Bacteria*

MEI Yan-Zhen HE Bing-Fang** OUYANG Ping-Kai

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009)

Abstract The isolated 24 strains-producing hydantoinase & carbamoylase were first identified by Biolog microbial identification system and 16S rDNA sequence analysis. The results suggested that the hydantoinase & carbamoylase-producing bacteria belonged to *Bacillus*, *Geobacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Kurthia* and *Empedobacter*, and so on. Especially, *Kurthia* and *Empedobacter* were new hydantoinase & carbamoylase-producing genera. Furthermore, it was found that D-hydantoinase & carbamoylase-producing bacteria belonged to *Pseudomonas* and *Agrobacterium*, while most of L-hydantoinase & carbamoylase-producing bacterial belonged to *Bacillus*, *Geobacillus* and *Microbacterium*. The distribution feature of D-hydantoinase & carbamoylase-producing bacteria and L-hydantoinase & carbamoylase-producing bacteria showed some genera tendency. This research work will provide the biomaterial of different hydantoinase and carbamoylase and contribute to study the structure and function, molecular evolution of the two enzymes.

Key words Microbial identification, Biolog system, 16S rDNA, Hydantoinase, Carbamoylase, Genera tendency

海因酶和氨甲酰水解酶是酶法转化 DL-5-取代海因制备天然、非天然氨基酸及其衍生物的关键生物催化剂^[1-3]。特别是用常规发酵法难以生产的人体必须氨基酸如 L-半胱氨酸^[4]和非蛋白氨基酸如 L-高苯丙氨酸^[5]。近年来, 因海因酶和 N-氨甲酰水解酶用于研究开发相关产品, 具有工艺简单、产物光学纯度高等特点, 国际上研究比较活跃。

微生物分类和鉴定除采用传统的形态学、生理学和生态特征之外, 许多新的特征作为分类鉴定的依据也在不断地开发中^[6,7]。Biolog 菌种鉴定系统

是美国 Biolog 公司从 1989 年开始推出, 发展到今天已能鉴定包括细菌、酵母、丝状真菌在内的近 2000 种微生物, 其应用日趋广泛^[8-10]。另一种素有“细菌化石”之称分子生物学鉴定方法——16S rDNA 序列分析法是目前国际上细菌分类鉴定的重要方法之一。为了快速、准确地确定所筛选到的 24 株海因酶和氨甲酰水解酶产生菌各菌株相关的生理生化性质, 利于后续发酵分析研究, 本文采用 Biolog 菌种鉴定系统和 16S rDNA 序列分析法相结合进行微生物鉴定, 取得了较满意的鉴定结果, 比较了两方法的优

* 973 项目(No. 2003CB716004), 国家自然科学基金项目(No. 20336010)

** 通讯作者 Tel: 025-83587336, E-mail: bingfanghe@njut.edu.cn

收稿日期: 2007-04-24, 修回日期: 2007-05-14

缺点,并进一步分析了海因酶产生菌的分布特点及其种属分布的倾向性。

1 材料与方 法

1.1 菌种来源

作者从土壤中筛选到 364 株海因酶产生菌,其中 24 株(17 株为 L-海因酶产生菌,7 株为 D-海因酶产生菌)具有较高的海因酶和氨甲酰水解酶双酶活性^[1],为提高海因酶与氨甲酰水解酶活性和热稳定性,增加底物的溶解度与消旋速率,筛选温度较高,此 24 株菌为中度嗜热菌,最适生长温度为 45℃。本文对此 24 株菌进行鉴定。

1.2 主要材料

8 通道电动移液器、浊度计、BUG 培养基、GP 鉴定板、GN 鉴定板、Biolog Microstation 软件系统(4.2v)(Biolog 公司产品)、Taq DNA 聚合酶、胶回收试剂盒、pMD 18-T vector 购自 TaKaRa 公司,引物由上海生工合成。

1.3 培养基

LB 培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母膏 5,氯化钠 10,pH7.2。

LB 琼脂培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母膏 5,氯化钠 10,琼脂 18,pH7.2。

1.4 实验方法

1.4.1 Biolog 鉴定: 1) 纯化待鉴定菌株:划线分离,45℃于 LB 琼脂培养基上培养 16 h。2) 革兰氏阳性菌和阴性菌鉴定:对细菌进行革兰氏染色,革兰氏阳性菌需做过氧化氢酶实验和芽胞染色实验,阴性菌需做氧化酶实验和三糖铁实验^[2],以确定实验应选择的数据库。3) 样品准备:挑取单菌落在 BUG 培养基上划线培养,45℃条件下培养 16 h 左右。革兰氏阳性芽胞杆菌需在 BUG 培养基中添加 0.25% 麦芽糖。4) 浊度调整:在关机状态下调整读数为 0,打开电源,用装有待接种液的试管调整至读数为 100%,再用浊度标准管调整读数。阳性芽胞菌浊度标准为 $28\% \pm 2\%$,阳性非芽胞菌浊度标准为 $20\% \pm 2\%$,阴性非肠道菌浊度标准为 $52\% \pm 2\%$,阴性肠道菌浊度标准为 $61\% \pm 2\%$,革兰氏阳性菌可在浊度液中添加几滴巯基乙酸钠,使菌体易于分散。5) 菌悬液制备:取无菌棉签用无菌水蘸湿,在平板表面轻轻滚动蘸取菌体,注意不要带出培养基,沿着接种液管内壁转动棉签,使菌体附着在内壁上,同时

把菌体打散,倾斜接种液管使菌体均匀分散于接种液中,通过加菌体或加无菌水调整浊度大小,使最终浊度值达到标准(对于阳性菌可添加几滴巯基乙酸钠使菌体易于分散)。6) 接种微平板:用 8 通道电动移液器将菌悬液分别加在鉴定板的各孔内,每孔 150 μL ,共 96 孔,A1 孔为对照孔。7) 培养:盖上鉴定板盖,标上菌株号放置在一个大小适宜的托盘中,并保持一定的湿度,45℃条件下培养 4 h 和 16 h 后用读数仪记录数据。

1.4.2 16S rDNA 鉴定: 1) 总 DNA 的抽提:酚-氯仿抽提法^[3]。

从冻存管中将待鉴定菌种接入 LB 培养基中,45℃培养,取培养 16 h 的细胞,离心重悬于 TE 缓冲液中,添加蛋白酶 K,溶菌酶和 SDS 适量,37℃水浴处理 40 min ~ 45 min,依次使用等体积饱和酚:酚氯仿:异戊醇(25:24:1,V/V/V)、氯仿:异戊醇(24:1,V/V)溶液抽提,取上清,用冰乙醇沉淀,将沉淀出的 DNA 用 70% 冰乙醇洗涤 2 次,自然风干,加入无菌水过夜溶胀,再加入微量核糖核酸酶(RNase)37℃反应 1h,备用。2) 细菌 16S rDNA 基因的 PCR 扩增:选用通用引物 BSF8/20 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 BSR1541/20 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')^[4]。反应条件为:95℃预变性 5 min。然后进行以下循环:94℃ 1 min,55℃ 30 s,72℃ 2 min。30 个循环后 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳。PCR 产物纯化试剂盒纯化。3) 16S rDNA 的序列测定:纯化的 16S rDNA 与 pMD 18-T 质粒(TaKaRa)于 16℃连接过夜,连接产物转化感受态细胞 *E. coli* DH5 α 培养 12h ~ 16h 后,做菌落 PCR 鉴定。阳性克隆由上海 Invitrogen 公司测序。4) 数据分析:测定的 16S rDNA 序列用 FASTA 程序与 GenBank 数据库中的 16S rDNA 序列进行相似性比较分析。5) 序列提交:24 株菌的 16S rDNA 序列通过 Seqin 提交到 GenBank 数据库,24 株的序列接收号为 DQ350815-DQ350838。

2 结果

2.1 Biolog 菌种鉴定生理生化实验

使用 Biolog 菌种鉴定系统鉴定细菌前,首先需对菌种进行下述简单的生理生化实验,便于准确选择对应数据库。实验结果及对应数据库选择如下表

1. 革兰氏阳性产芽胞杆菌 14 株,革兰氏阳性非产芽胞杆菌 4 株,革兰氏阳性球菌 1 株。革兰氏阴性菌 5 株,且均为非肠道细菌。

表 1 24 株菌形态学和生理实验及对应数据库

菌号	镜检形态	3% KOH	革兰氏染色	H ₂ O ₂ 实验	是否产芽胞	G ⁻ 氧化酶实验	G ⁻ 三糖铁实验	选择数据库
MH602	杆菌	+	+	+	有	---	---	GP-ROD SB
MH101	杆菌	+	+	+	有	---	---	GP-ROD SB
U404	杆菌	+	+	+	有	---	---	GP-ROD SB
U603	粗短杆	+	+	+	有	---	---	GP-ROD SB
S401	杆菌	+	+	+	有	---	---	GP-ROD SB
MH403	杆菌	+	+	+	有	---	---	GP-ROD SB
601	杆菌	+	+	+	有	---	---	GP-ROD SB
N8	杆菌	+	+	+	有	---	---	GP-ROD SB
IPH801	杆菌	+	+	+	有	---	---	GP-ROD SB
IPH103	杆菌	+	+	+	有	---	---	GP-ROD SB
IPH701	杆菌	+	+	+	有	---	---	GP-ROD SB
625	杆菌	+	+	+	有	---	---	GP-ROD SB
106	杆菌	+	+	+	有	---	---	GP-ROD SB
608	杆菌	+	+	+	有	---	---	GP-ROD SB
519	杆菌	+	+	+	无	---	---	GP-ROD
210	杆菌	+	+	+	无	---	---	GP-ROD
B5	细短杆	+	+	+	无	---	---	GP-ROD
22	杆菌	+	+	+	无	---	---	GP-ROD
S1004	球菌	+	+	+	无	---	---	GP-COCCUS
MH301	杆菌	-	-	---	---	+	K/K	GN-NENT
N1	杆菌	-	-	---	---	-	K/A	GN-NENT
B2	杆菌	-	-	---	---	+	K/K	GN-NENT
U202	杆菌	-	-	---	---	+	K/K	GN-NENT
B13	细短杆	-	-	---	---	+	K/K	GN-NENT

注: + 表示阳性, - 表示阴性; --- 表示不需做; K/K 表示无颜色变化; K/A 表示培养基颜色下半部分有颜色变化, 显黄色; GP-ROD SB 表示革兰氏阳性芽胞杆菌数据库, GP-COCCUS 表示革兰氏阳性球菌数据库, GN-NENT 表示革兰氏阴性非肠道菌数据库。

2.2 Biolog 系统鉴定结果

Biolog 菌种鉴定结果与菌种数据库中的对应数据库进行比较, 得出最佳匹配结果及相应的 Sim 值, 如表 2 所示。结果表明, 21 株菌能鉴定到属的水平, 达 87.5%; 14 株菌能达到种的水平, 达 60% 以上, 鉴定结果较为准确可靠。

2.3 16S rDNA 序列分析鉴定结果

将 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中的序列进行相似性比较, 表 2 列出了与它们相似性最高的

细菌及与这些菌株 16S rDNA 间的相似性百分比。结果指出, 90% 以上能鉴定到属的水平, 70% 以上能鉴定到种的水平。

少数几株菌如 106、210、519、601、625、IPH103, 2 种方法鉴定结果吻合度较低。经核查伯杰氏手册后发现, 106、210、519 菌株与 16S rDNA 序列分析鉴定结果的菌种性质相符, 菌株 601、625 与 Biolog 鉴定结果菌属相同, IPH103 则与 Biolog 鉴定结果完全相符, 说明这种方法具有较好的可靠性。两种方法相结合, 鉴定到属的准确率可达 100%, 鉴定到种的准确率达 80% 以上。

从以上的鉴定结果看出, 海因酶与氨甲酰水解酶产生菌主要分布在 *Bacillus*, *Geobacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Kurthia*, *Empedobacter* 等属菌中, 且绝大多数 L-海因酶产生菌为革兰氏阳性菌。

3 讨论

3.1 Biolog 菌种鉴定系统与 16S rDNA 序列分析

Biolog 微生物自动鉴定系统能利用计算机进行数据分析, 自动化和标准化程度高, 大大简化了鉴定程序, 具有鉴定范围大、快速等优点, 目前已成为国际上分类鉴定常用的技术手段之一。特别是对 16S rDNA 无法鉴定的菌属, 显示了一定的优越性。其缺点是在种的鉴定上, 其准确度比 16S rDNA 稍低。另外, Biolog 菌种鉴定系统对菌种是否为纯种及培养条件是否为最优培养条件等要求较为严格。例如菌种不是纯种、培养时间过长、污染、培养基错误、接种液浊度调整错误、培养温度不适合菌体生长等原因, 可能会导致鉴定结果不准确。除此之外, 此系统在国外广泛用于菌种的发酵代谢调控研究^[15, 16]。一般而言, 16S rDNA 序列分析鉴定结果较可靠, 但对于新属或新种的鉴定存在一定的局限, 一般认为, 16S rDNA 同源性大于 97% 可认为属于同一种菌。也有少数菌仅通过 16S rDNA 不能准确鉴定, 需结合其它方法得出最终结论。如本研究中的 601、625 菌株, 16S rDNA 序列分析并不能给出准确鉴定。本研究主要采用两方法相结合鉴定海因酶和氨甲酰水解酶产生菌, 大大提高鉴定结果的准确性, 取得了较好的效果, 存在的问题是对少数菌仍不能准确定位其种别, 需借助其它手段进一步鉴定。

表 2 24 株菌的 Biolog 系统鉴定和 16S rDNA 序列鉴定结果

Strains and accession No of 16S rDNA	The value of Sim by biolog system	FASTA interpretation (16S rDNA sequence)	Proposed consensus identification
106 ^a (DQ350815)	<i>Kuthia zopfii</i> 0.43	99.09% <i>Bacillus</i> sp. (DQ084534) 99.00% <i>Bacillus sphaericus</i> (AB116123)	<i>Bacillus sphaericus</i>
210 ^b (DQ350816)	<i>Brevibacterium linens</i> 0.57	98.11% uncultured soil bacterium (AY423297) 97.56% <i>Bacillus massiliensis</i> (AY677116)	<i>Bacillus massiliensis</i>
22 (DQ350817)	<i>Microbacterium saperdae</i> 0.61	99.58% <i>Microbacterium saperdae</i> (AJ717357)	<i>Microbacterium saperdae</i>
506 (DQ350818)	<i>Bacillus gelatini</i> 0.65	99.72% <i>Bacillus gelatini</i> (AJ586347) 99.40% <i>Bacillus gelatini</i> (AJ809500)	<i>Bacillus gelatini</i>
519 ^c (DQ350819)	<i>Microbacterium terregens</i> 0.22	98.54% Uncultured <i>Proteobacterium</i> (AJ604542) 98.54% <i>Bacillus</i> sp. (AM180734)	<i>Bacillus</i> sp.
601 ^d (DQ350820)	<i>Bacillus sphaericus</i> 0.65	96.01% <i>Bacillus fusiformis</i> (AY548950) 95.81% <i>Bacillus fusiformis</i> (AY548956)	<i>Bacillus</i> sp.
608 (DQ350821)	<i>Bacillus macroides</i> 0.77	99.67% <i>Bacillus macroides</i> (AJ628749) 99.54% <i>Bacillus</i> sp. TUT008 (AB098577)	<i>Bacillus macroides</i>
625 ^e (DQ350822)	<i>Bacillus badius</i> 0.42	97.57% uncultured bacterium (AF423297) 97.43% <i>Bacillus</i> sp. (DQ227779)	<i>Bacillus</i> sp.
B13 (DQ350823)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 0.79	99.52% <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AY486350) 99.46% <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AB037558)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^D
B2 (DQ350824)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 0.86	99.80% <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (DQ115539) 99.80% <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AF125317)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^D
B5 (DQ350825)	<i>Microbacterium saperdae</i> 0.44	99.80% <i>Microbacterium</i> sp. (AB234056) 99.14% <i>Microbacterium oxydans</i> (AJ717357)	<i>Microbacterium oxydans</i> ^D
IPH103 ^f (DQ350826)	<i>Kurthia zopfii</i> 0.7	97.16% <i>Bacillus faraginis</i> (AY443035) 96.64% <i>Bacillus fortis</i> (AY443038)	<i>Kurthia zopfii</i>
IPH701 (DQ350827)	<i>Brevibacillus borstelensis</i> 0.69	99.80% <i>Brevibacillus borstelensis</i> (AB112721) 99.80% <i>Brevibacillus borstelensis</i> (AF378230)	<i>Brevibacillus borstelensis</i> ^D
IPH801 (DQ350828)	<i>Brevibacillus borstelensis</i> 0.59	99.46% <i>Brevibacillus borstelensis</i> (AF378230) 99.46% <i>Brevibacillus borstelensis</i> (AB116134)	<i>Brevibacillus borstelensis</i>
MH101 (DQ350829)	<i>Bacillus badius</i> 0.32	98.67% <i>Bacillus</i> sp. (AJ071857) 97.36% <i>Bacillus fortis</i> (AY443038)	<i>Bacillus</i> sp.
MH301 (DQ350830)	<i>Brevibacillus borstelensis</i> 0.75	99.87% <i>Brevibacillus borstelensis</i> (AF378230) 99.67% <i>Brevibacillus borstelensis</i> (AB215102)	<i>Brevibacillus borstelensis</i>
MH403 (DQ350831)	<i>Geobacillus them- oglucoasiase</i> 0.68	99.40% <i>Bacillus</i> sp. (AJ071857) 98.98% <i>Bacillus fordii</i> (AY443039)	<i>Geobacillus themoglucoasiase</i>
MH602 (DQ350832)	<i>Microbacterium terregens</i> 0.52	99.07% <i>Bacillus</i> sp. 112442 (AJ071857) 98.64% <i>Bacillus fordii</i> (AY443039)	<i>Bacillus fordii</i>
N1 (DQ350833)	<i>Empedobacter brevis</i> 0.73	97.19% Uncultured bacterium (DQ129443) 99.46% Low G + C GP bacterium (AB210962)	<i>Empedobacter brevis</i> ^D
N8 (DQ350834)	<i>Bacillus licheniformis</i> 0.67	99.61% <i>Bacillus licheniformis</i> (AB055006) 99.28% <i>Bacillus licheniformis</i> (AY052767)	<i>Bacillus licheniformis</i>
S1004 (DQ350835)	<i>Stapylococcus gallinarum</i> 0.63	99.86% <i>Stapylococcus gallinarum</i> (AF467426) 99.86% <i>Stapylococcus gallinarum</i> (AF467417)	<i>Stapylococcus gallinarum</i> ^D
S401 (DQ350836)	<i>Bacillus badius</i> 0.66	99.55% <i>Bacillus fusiformis</i> (AY548950) 99.55% <i>Bacillus fusiformis</i> (AY548954)	<i>Bacillus fusiformis</i>
U404 (DQ350837)	<i>Brevibacillus borstelensis</i> 0.57	99.60% <i>Brevibacillus borstelensis</i> (AF378230) 99.47% <i>Brevibacillus borstelensis</i> (AB215102)	<i>Brevibacillus borstelensis</i> ^D
U603 (DQ350838)	<i>Aneurinibacillus migulanus</i> 0.81	100.0% <i>Aneurinibacillus migulanus</i> (AJ715390) 99.40% <i>Aneurinibacillus migulanus</i> (AB112723)	<i>Aneurinibacillus migulanus</i>

注: a, b, c, d, e, f, 参考伯杰氏手册得出最终鉴定结果; D, 指该菌 D-海因酶产生菌, 未注明者均为 L-海因酶产生菌。

3.2 海因酶和氨甲酰水解酶产生菌分布特点

从以上鉴定结果发现,海因酶与 N-氨甲酰水解酶产生菌具有生物多样性。主要分布在 *Bacillus*, *Geobacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas* 等属菌中,并发现海因酶和氨甲酰水解酶产生菌存在于新的菌属 *Kurthia*, *Empedobacter* 等中,文献中没有报道此类菌属,另有 2 株菌属于新的菌种,未见文献报道。在目前的检索范围内, D-海因酶产生菌报道占 70% 以上, L-海因酶产生菌的报道相对较少。菌种鉴定结果与文献报道的海因酶菌种比较表明:较高活性 D-海因酶产生菌主要分布于 *Pseudomonas*, *Agrobacterium* 等菌属中^[14, 18], 菌株的最适生长温度一般在 30℃ 左右;而 L-海因酶产生菌主要分布于 *Bacillus*, *Arthrobacter* 等菌属中^[19, 20], 菌株的生长温度一般在 45℃ 以上。而本文所鉴定的海因酶产生菌 L-型占绝大多数,且菌种主要分布于 *Bacillus*, *Geobacillus*, *Microbacterium* 等属中,这可能与本文所述菌种的最适生长温度为 45℃ ~ 55℃ 有关^[14]。同时也说明 D-海因酶系产生菌与 L-海因酶系产生菌在种属的分布上可能存在一定的倾向性。这些研究不仅说明了海因酶与氨甲酰水解酶产生菌在细菌中广泛分布的特点,而且对于开发新型海因酶和 N-氨甲酰水解酶资源很有利,为我国难以发酵生产的 L-氨基酸和非蛋白氨基酸等新型工业的发展注入新的活力,进一步对双酶的结构与功能及分子进化研究等具有重要意义。

参考文献

- [1] Ogawa J, Soong C-L, Kishino S, et al. Biosci Biotechnol Biochem, 2006, **70**(3): 574 ~ 582.
- [2] Altenbuchner J, Siemann M H, Syltatk C. Curr Opin Biotechnol, 2001, **12**: 559 ~ 563.
- [3] Arto L, Liisa T K. Tetrahedron, 2006, **62**: 5831 ~ 5854.
- [4] Ohmachi T, Narita M, Kawata M, et al. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, **65**(6): 686 ~ 693.
- [5] Lo H-H, Kao C-H, Lee D-S, et al. Chirality, 2003, **15**: 699 ~ 702.
- [6] 黄秀梨. 微生物学. 北京: 高等教育出版社, 1999, pp. 3 ~ 26.
- [7] Vandamme P, Pot B, Gillis M, et al. Microbiological reviews, 1996, **60**(2): 407 ~ 438.
- [8] Lu J, Nogi Y, Takami H. FEMS microbiol lett, 2001, **205**: 291 ~ 297.
- [9] Bochner B R. Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods, 2006, **3**: 55 ~ 73.
- [10] Khan S T, Nakagawa Y, Harayama S. Int J Syst Evol Micr, 2006, **56**: 323 ~ 328.
- [11] 梅艳珍, 何冰芳, 顾海红, 等. 热稳定性海因酶和氨甲酰水解酶产生菌的筛选. 第一届全国化学工程与生物化工年会. 南京, 2004.
- [12] 方心芳著. 应用微生物学实验法. 北京: 中国轻工业出版社, 1993, pp. 158 ~ 163.
- [13] Johnson J L. 1991. Isolation and purification of nucleic acids. p. 1-19. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (Ed.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley and Sons, Chichester.
- [14] Both B G Krupp, E Stackebrandt. Anal Biochem, 1991, **199**: 216 ~ 218.
- [15] Sala M M, Balague V, Pedras-Alio C, et al. FEMS Microbiol Ecol, 2005, **54**: 257 ~ 267.
- [16] Leflaive J, Cereghino R, Danger M, et al. J Microbiol Meth, 2005, **62**: 89 ~ 102.
- [17] Gokhale D V, Bastawde K B, Patil S G, et al. Enzyme Microb Technol, 1996, **18**: 353 ~ 357.
- [18] Nanba H, Ikenaka Y, Yamada Y, et al. Biosci Biotechnol Biochem, 1998, **62**: 875 ~ 881.
- [19] Mukohara Y, Ishikawa T, Watabe K, et al. Biosci Biotechnol Biochem, 1994, **58**: 1621 ~ 1626.
- [20] Wagner T, Hantke B, Wagner F. J Biotechnol, 1996, **46**: 63 ~ 68.