

纳豆激酶的发酵和纯化方法

杨明俊¹, 杨晓彤¹, 杨庆尧²

(1. 上海师范大学微生物与免疫学研究所, 上海 200234; 2. 上海杨杨百草研究所, 上海 200234)

摘要 对纳豆激酶在菌种选育、发酵条件及分离纯化工艺方面的研究进展作了综述, 介绍了提高纳豆激酶产量的多种固、液体发酵条件和菌种选育结果, 并归纳了膨胀床吸附、金属螯合双水相亲和纳豆分配、反胶束萃取、磁性微球分离等分离技术在纳豆激酶分离纯化中的应用。

关键词 纳豆激酶; 发酵; 育种; 分离纯化

中图分类号 Q814 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)06-0961-05

FERMENTATION AND PURIFICATION TECHNIQUES IN NATTOKINASE PRODUCTION

YANG Ming-jun¹, YANG Xiao-tong¹, YANG Qing-yao²

(1. *Institute of Microbiology & Immunology, Shanghai Normal University, Shanghai 200234*; 2. *Shanghai Yang's Herb Institute, Shanghai 200234*)

Abstract This article introduced the progresses of strain breeding, solid and liquid fermentation and purification in nattokinase production. Various studies on fermentation conditions and breeding efforts to boost nattokinase production were reviewed, and the application of separation techniques for nattokinase extraction, such as expanded bed adsorption, immobilized metal affinity partition, reverse micelles extraction and magnetic bead separation were also summarized.

Key words Nattokinase; Fermentation; Breeding; Extraction

心脑血管疾病是现代社会中导致人类死亡的第一大疾病, 血管栓塞是引起多种心脑血管疾病的主要因素之一, 而药物溶栓是治疗这类疾病的重要手段。传统的溶栓药物有尿激酶(Urokinase; UK)和链激酶(Streptokinase; SK)等, 但它们的纤溶特异性低, 并伴有内出血倾向。新一代溶栓药物如组织型纤溶酶原激活剂(Tissue-type Plasminogen Activator; t-PA)、重组单链尿激酶型纤溶酶原激活剂(Recombinant Single Urokinase Plasminogen Activator; rSUC-PA)和葡激酶(Staphylokinase; SaK)等纤溶活性和纤

溶特异性虽然都有提高, 也存在体内半衰期短和生产成本高等缺点, 因此开发安全、长效、专一、高活性的溶栓新药物对预防和治疗心脑血管疾病无疑具有重要的意义。

纳豆激酶(Nattokinase, NK)是从日本传统大豆发酵食品——纳豆(Natto)中分离得到的一种具有较强纤溶活性的丝氨酸蛋白酶。体内外实验发现纳豆激酶有直接溶解纤维蛋白的功能, 还可以将尿激酶原激活转化成尿激酶, 起到间接溶解血栓的作用。此外, 纳豆激酶还能促进血管内皮细胞产生内源组

收稿日期: 2007-06-04

基金项目: 上海杨杨百草研究所资助

作者简介: 杨明俊(1979-), 男, 硕士研究生, 研究方向为微生物药物学。

通讯作者: 杨晓彤。Tel: 021-64322895, E-mail: xtyang@shnu.edu.cn

织型纤溶酶原激活剂(t-PA),使纤溶酶原活化为纤溶酶,并抑制水解纤溶酶原激活剂抑制剂(PAI-1)的活性,从而加速血栓溶解。

与传统的溶栓药物相比,纳豆激酶具有特异性强、安全无毒副作用、可经口服吸收、体内半衰期长且价格低廉等优点,是一种很具有开发潜力的新型溶栓药物。本文对纳豆激酶的理化性质,特别是发酵工艺条件和分离纯化方面的进展作了综述。

1 理化性质

纳豆激酶是由纳豆芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* var. *natto*)产生的类枯草杆菌蛋白胞外酶,由 275 个氨基酸残基组成单链结构,且分子结构中不含二硫键。根据氨基酸序列计算其准确分子量为 27 728Da。与其它枯草杆菌蛋白酶类似,纳豆激酶的活性中心位于一个由 2 个 α 螺旋和 7 个 β 片层构成的疏水袋状结构中,包括一个由 Asp₃₂、His₆₄ 和 Ser₂₂₁ 组成的催化三联体和由 Asn₁₅₅ 侧链和 Ser₂₂₁ 主链的氨基共同形成的负氧离子洞(oxyanion hole)^[1]。室温条件下,纳豆激酶在中性或碱性环境(pH7.0~12.0)中比较稳定,当 pH<5.0 时则极不稳定。但是与煮沸的大米提取物、肉汤、血清蛋白和胃液蛋白混合后纳豆激酶的稳定性大为提高,即使在酸性条件下酶活性也不会完全丧失。另有报道,纳豆激酶在胃环境中受胃蛋白酶影响而失活,但在小肠环境中较为稳定不会被胰蛋白酶降解^[2]。

纳豆激酶对枯草杆菌蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的底物 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA 最敏感,对纤溶酶底物 H-D-Val-Leu-Lys-pNA 的活性较低,对其它酶底物没有明显活性。Na⁺、K⁺ 对纳豆激酶活性无显著影响,Zn²⁺ 有较强抑制作用,而 Cu²⁺ 和 Al³⁺ 有一定的抑制作用,Mg²⁺ 和 Ca²⁺ 是较好的酶活稳定剂和促进剂^[3],但也有实验证实了 Ca²⁺ 对纳豆激酶有很强的抑制作用^[4]。

2 菌种选育

优良的菌种是进行高效发酵的前提,纳豆芽孢杆菌的筛选方法多采用酪蛋白平板法和紫外线诱变法。梅乐和等^[5]将纳豆中分离的菌悬液接种在 LB 平板上,再用含有酪蛋白的初筛培养基培养,选取透

明圈直径大的菌株再经液体培养复筛,最后得到的菌种液体发酵液中纳豆激酶活性达到 970 IU mL⁻¹。方祥等^[6]用含脱脂乳粉的蛋白培养基筛选经过暗室内紫外光照射处理过的纳豆杆菌,挑取透明圈大的菌落从而筛选出了酶活性增加了 87% 且能稳定遗传的纳豆激酶高产菌株。此外,人们还尝试用分子生物学技术获得了转纳豆激酶基因的工程菌株,为纳豆激酶高产菌株的筛选开辟了新的方向。许芳等^[7]利用 PCR 技术从纳豆杆菌基因组中扩增得到了纳豆激酶基因,并利用基因重组技术实现了纳豆激酶在原核生物 *E. coli* 中的表达;罗立新等^[8]将纳豆激酶基因整合到真核生物毕赤酵母染色体组 DNA 上,经甲醇诱导后表达产物可分泌至胞外,重组酵母发酵上清液中检测到溶纤活性,SDS-PAGE 电泳结果也证实了外源蛋白的表达。还有实验将纳豆激酶基因通过根癌农杆菌转化到番茄中,得到在转录水平表达的转基因植株,有望用植物作为生物反应器来获取纳豆激酶^[9]。

3 发酵工艺

纳豆激酶最初由固体发酵获得,传统的固体发酵工艺具有设备简单、易于推广、能耗少且产物含量高优点,还可以采用农副产品为原料使生产成本降低。但固体发酵存在的过程不易控制、产物分离困难和易于受杂菌污染等缺点,限制了其在工业化生产过程中的应用。液体发酵可以克服固体发酵的这些弊端实现大规模纯培养,因此人们对纳豆激酶生产方法的研究兴趣逐渐从固体培养转为液体发酵。

3.1 固体发酵

传统的纳豆生产工艺是以大豆为原料,浸泡过夜后经蒸煮,待其冷却后拌入菌种发酵而成的。孙启玲等^[10]在这基础上,将大豆脱皮、蒸煮后用 30~100 IU mL⁻¹ 的木瓜蛋白酶和 50~100 IU mL⁻¹ 的菠萝蛋白酶进行多肽化处理 40~120min,可使纳豆中纳豆激酶活性由传统方法的 2233.93 IU g⁻¹ 提高到 5300 IU g⁻¹。作者将其原因归结为大豆营养成分的利用率大大提高。豆渣也被用于纳豆激酶的生产,在豆渣中加入麸皮可以使培养基变得松散,有益于空气交换和热量散发从而有利纳豆芽孢杆菌的生长和纳豆激酶的生成。当豆渣和麸皮之比为 5:2 时比不加麸皮相对酶活性提高了 33.7%^[11]。

3.2 液体发酵

培养基组成不仅对菌体生长和产物合成等各种代谢活动的影响显著,还关系到产物的分离纯化等下游工艺,因此通常要对培养基组成进行优化。纳豆激酶液体发酵中常用的碳源有葡萄糖、木糖、蔗糖和可溶性淀粉等,以木糖最佳,其最适浓度为2%^[12]。碳源浓度太低影响菌体生长,太高则形成高渗环境影响糖的吸收,甚至使发酵液变得粘稠不利于氧气的供应从而降低激酶产量。

氮源种类是影响纳豆激酶发酵的另一重要因素,大豆成分的有机氮源明显比其他氮源更有利于菌体的生长,而菌体对大豆蛋白胨的利用效率最高,豆饼粉只有酶解后才能被利用,无机氮源则几乎不能被利用。氮源浓度过低菌体生长缓慢,过高不利于酶的生成,大豆蛋白胨的浓度以2%最为适宜^[13]。培养基的pH值不仅影响菌体的生长还影响酶的活性,当pH值为8.0时,对菌体生长有利,但在pH值为7.0时获得的酶活性最高^[14]。此外,培养基中加入0.02%的CaCl₂和0.05%的MgSO₄不仅有利于菌体生长,也有利于酶的生成^[15]。

在发酵前期较高的温度有利于菌体的增加,中后期较低的发酵温度可以延长稳定期有利于酶的分泌,一般控制发酵温度在37℃,超过40℃会影响酶的活性^[16]。接种量对酶的生成有较大影响,过低使发酵周期延长,过高使营养消耗过快不利于酶的合成,当接入2%的种子培养液时酶的活性最高^[14]。在进行摇瓶培养时,随着装样量的增加,生物量和酶的生成量都减少,提高发酵液的溶氧量有利于菌体生长和酶的生成。表面活性剂影响菌体细胞膜和细胞壁的合成,从而加快产物向细胞外的分泌,但它对细胞有一定的毒害作用,必须掌握添加的时间和添加的剂量。鲍时翔等^[17]研究了Tween-80、聚乙二醇和油酸钠的添加量和添加时间,发现在发酵12h后加入0.1%的油酸钠的效果最好。

最近,微胶囊固定化培养技术也被应用到纳豆激酶的液体发酵过程中。梅乐和等^[18]利用海藻酸钠/纤维素硫酸钠-氯化钠/聚亚基二胍氯化氢(SA/NaCS-CaCl₂/PMCG)微胶囊固定化培养枯草杆菌以发酵生产纳豆激酶,最高酶活力达到2465IU mL⁻¹,并且使发酵过程中菌体分泌出的纳豆激酶在微胶囊中累积,有利于下游的分离过程。

4 分离纯化

纳豆激酶的分离纯化传统方法多采用蛋白质分离纯化技术,高大海等^[19]纳豆杆菌发酵液经过离心,上清液硫酸铵沉淀、凝胶过滤和离子交换层析等步骤后,可获得高纯度纳豆激酶,纯化倍数为8.4,酶活回收率为49%,而朱健辉等^[3]用类似的方法使纳豆激酶的纯化倍数提高到35.5,回收率达到60.7%。传统方法往往纯化步骤较多、时间长、回收率不高,不利于大规模工业化生产。最近,膨胀床吸附、金属螯合亲和分离、反胶束萃取和磁性微球分离等新技术在纳豆激酶分离纯化的研究中也逐渐被采用,为纳豆激酶的工业化生产提供了高效新手段。

4.1 膨胀床吸附(Expanded Bed Adsorption)法

膨胀床吸附技术根据静电吸附的原理,以Streamline SP阳离子交换吸附剂将纳豆激酶从发酵液中分离出来。该法将固液分离、目标产物的浓缩和初步纯化在一个单元操作中完成,充分体现了分离过程的集成优势。发酵液的pH值和电导率是影响吸附效果的重要因素。在pH7.0~5.5范围内,随着pH的降低,纳豆激酶与吸附剂的作用增强,当pH值为6.0时,纳豆激酶的回收率最高。但pH值过低,由于杂蛋白产生的污染增加,纳豆激酶的纯度降低。发酵液的电导率过高,纳豆激酶不能被吸附,当发酵液经稀释后电导率降低,纳豆激酶的吸附量增加,当电导率低于6.2mS cm⁻¹时,平衡吸附量变化不大。在膨胀床吸附过程中,维持膨胀率恒定或维持料液流速恒定对纳豆激酶的回收率没有明显的影响^[20]。Hu等^[21]先通过1500g离心获得发酵液上清再由膨胀床吸附分离,使纳豆激酶的回收率达到95%,且分离过程也大为简化。

4.2 金属螯合双水相亲和分配(Immobilized Metal Affinity Partition)法

纳豆激酶的氨基酸序列中存在-His-Gly-Thr-His-结构,可利用二价或三价金属离子对该结构的螯合亲和作用,再引入双水相分配系统进行分离。该法操作在水相中进行,具有分离条件温和、选择性好和与生物物质兼容性好等优点。在金属螯合双水相亲和分配过程中,成相物质PEG(聚乙二醇)、PES(羟丙基淀粉)对纳豆激酶活性没有明显的抑制作用,亲和配基PEG-IDA-Cu(Ⅱ)对酶活性有较大的影响,但是由于其使用量很少产生的影响可以忽略。

而在 PEG/PES 双聚合物系统中,PEG 分子量减小或加入亲和配基 PEG-IDA-Cu(II) 都可使纳豆激酶在双水相中的分配系数增加。当 pH 值为 8 ~ 9 时纳豆激酶的分配系数出现最大值,且杂蛋白的分配系数随 pH 值变化不明显,因此选择合适的 pH 值可以获得纯化的纳豆激酶。在 2. 6% PEG、5% PEG-IDA-Cu(II) 和 20. 2% PES 系统中,当两相的相比为 1. 2, pH 值为 8. 2, 发酵液的加入量为 15% 时,纳豆激酶的回收率达 90%, 纯化因子也达 2. 0 并可较好地线性放大^[22]。

4.3 反胶束萃取(Reverse Micelles Extraction)法

反胶束是将表面活性剂溶于非极性有机溶剂中,并使其浓度超过临界胶束浓度,在有机溶剂内形成一个内核亲水的聚集体,从而使极性亲水物质可以进入聚集体内得到分离。它是针对生物活性成分的一种液液萃取体系,具有步骤少、选择性强、成本低和易于放大等特点。

纳豆激酶前萃取的动力是带正电荷的纳豆激酶和带负电荷的 AOT(丁二酸-2-乙基己基酯磺酸钠) 亲水磺酸基团之间的静电引力作用,因此,发酵液的 pH 值对萃取过程有较大影响, pH 值升高蛋白质回收率明显下降,纳豆激酶活力的回收率在 pH6. 0 ~ 6. 5 范围内达到最大,约为 80%。纳豆激酶反萃取过程中,不能通过提高反萃液的 pH 和离子强度以减弱静电相互作用而强化反萃取过程,但可以添加异丙醇强化反萃取过程,随着异丙醇浓度的增加,蛋白质和酶活力的回收率同步增加,当异丙醇浓度超过 15% 后,两者基本保持稳定^[23]。在前萃取过程中,有机相和发酵上清液体积比越大酶活回收率和蛋白回收率越高,以二者等体积混合为宜。该过程 8 min 后,虽然蛋白的回收率增加但酶活性的回收率却降低。反萃取时负载有机相与反萃水相等体积混合效果最好,酶活性的回收率超过 80%, 且萃取达到平衡的时间仅为 10 min。前萃取过程和反萃取过程的最适温度分别是 25℃ 和 35℃^[24]。以纳豆激酶的粗提液为水相与反胶团溶液按比例混合,在 10 ~ 35℃ 下进行萃取,使纳豆激酶进入反胶团溶液;再在 20 ~ 45℃ 下进行反萃取,可使纳豆激酶的回收率达到 80% 以上,纯化因子达到 3 以上,并且同时具有浓缩和脱色作用^[25]。

4.4 磁性微球分离(Magnetic Bead Separate)法

磁性微球是 20 世纪 70 年代末发展起来的一种新型生物分离技术,微球由磁性的内核和高分子外

壳两部分组成,高分子外壳上的多样性功能基团可与多种生物活性物质偶联,然后在外加磁场的作用下,微球可定向移动从而达到快速分离的目的。磁性微球适用于温和条件下复杂生物体系的快速分离,尤其是对蛋白质进行纯化。纳豆激酶可以与磁性微球表面对氨基苯甲脒为配体的功能基团偶联,在外加磁场作用下得到选择性高纯度分离。Yang^[26] 等利用该法直接从发酵液中分离纳豆激酶,酶活性回收率达 85%, 纯化因子也达 8. 7, 且整个回收过程仅需 40 min, 与传统的分离纯化工艺相比,具有高效、快速等优点。

除这些方法外,Shinsaku 等^[27] 在纳豆培养液中通过加壳多糖处理,再经过反渗透膜浓缩等步骤,得到 13 000 FU g⁻¹ 的纳豆激酶,并使纳豆发酵过程中产生的血液凝结因子——维生素 K₂ 的含量降低为 5 μg g⁻¹。

5 展望

纳豆激酶自首次被分离得到以来,就因其特有的纤溶活性引起人们的广泛关注。大量的纤维蛋白平板实验和动物血栓模型实验的研究都证明,纳豆激酶不仅具有很强的溶栓作用,还能抑制血栓形成。Suzuki 等^[28] 给股动脉内皮受损的大鼠摄食纳豆提取物,结果显示纳豆激酶可以抑制内膜增厚,并提高血栓溶解能力,且不会影响血小板的凝集或延长出血时间。Pais 等^[29] 将不同浓度的纳豆激酶和血样在 37℃ 下共同孵育,测量红细胞聚集程度和血液粘度,结果显示,纳豆激酶可显著降低红细胞聚集程度和血液低切粘度,并有量效关系,同样证实了纳豆激酶对血栓性疾病的治疗和预防起着重要作用。但相对于体外和动物试验,纳豆激酶在人体内的不良反应、药物相互作用和使用禁忌等方面的临床数据还相对缺乏,要真正成为一种治疗性药物还需要更深入的药理、药效和临床试验的研究。况且,血栓的形成是综合因素作用的结果,纳豆激酶有效防治血栓的机理及有关分子机制亟待进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Liu Z G, Zheng Z L, Zuo Z Y, et al. Construction of a 3D model of nattokinase, a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus natto* A novel nucleophilic catalytic mechanism for nattokinase[J]. Journal

of Molecular Graphics and Modelling,2005,23:373-380.

[2] 王萍,陈钧. 纳豆激酶纤溶活性研究[J]. 食品科技,2004,(9):91-94.

[3] 朱健辉,杜连祥,路福平,等. 纳豆纤溶酶——纳豆激酶的分
离提纯及稳定性研究[J]. 食品研究与开发,2005,26(5):45
-48.

[4] 曲涛,徐尔尼,周新萍,等. 金属离子对纳豆激酶的化学修饰
研究[J]. 食品科学,2006,27(1):82-85.

[5] 梅乐和,胡升,许静,等. 纳豆枯草杆菌的筛选和纳豆激酶发
酵条件优化[J]. 浙江大学学报(工学版),2004,38(10):
1355-1360.

[6] 方祥,周焕彩,王忠霞,等. 纳豆菌分离、鉴定及纳豆激酶高产
菌株的正向选育[J]. 食品与发酵工业,2005,31(12):26
-29.

[7] 许芳,冯建成,李洁,等. 纳豆激酶基因在大肠杆菌中活性表
达的比较研究[J]. 微生物学杂志,2004,24(2):10-13.

[8] 罗立新,黄志立,潘力,等. 纳豆激酶基因在巴斯德毕赤酵母
中的表达[J]. 华南理工大学学报(自然科学版),2003,31
(2):1-4.

[9] 袁琳,刘红海,王吟,等. 纳豆激酶基因导入番茄的研究[J].
湖北大学学报(自然科学版),2006,28(2):181-183.

[10] 孙启玲,罗建伟,魏珉,等. 提高发酵纳豆多肽含量和纳豆激
酶活性的方法[P]. CN 1545909A,2004-11-17.

[11] 鲍艳霞,钱之玉,陈钧,等. 豆渣固体发酵产纳豆激酶的工艺优化
及其部分酶学性质研究[J]. 大豆科学,2005,24(1):43-47.

[12] 谢秋玲,郭勇,林剑. 纳豆激酶产生菌——纳豆菌对木糖和葡
萄糖的利用[J]. 微生物学通报,2001,28(4):9-12.

[13] 王发祥,钟青萍,钟士清. 纳豆菌液体发酵条件的优化[J]. 微
生物学杂志,2004,24(3):64.

[14] 熊晓辉,梁剑光,熊强. 纳豆激酶液体发酵条件的优化[J]. 食
品与发酵工业,2004,30(1):62-66.

[15] 薛健,臧学丽,陈光,等. 纳豆激酶液体发酵条件的优化[J].
吉林农业大学学报,2005,27(5):569-573.

[16] 张锋,金杰,安莹,等. 纳豆激酶高活性菌株的筛选及其液体
发酵条件的优化[J]. 食品研究与开发,2006,27(4):27-30.

[17] 鲍时翔,田艳,黄惠琴,等. 纳豆菌液体发酵生产纳豆激酶的
研究[J]. 药物生物技术,2002,9(6):322-325.

[18] 梅乐和,章小忠,艾碧英,等. SA/NaCS-CaCl2/PMCG 微胶囊
固定化枯草杆菌 HL-1 发酵生产纳豆激酶[J]. 化工学报,
2004,55(8):1319-1323.

[19] 高大海,梅乐和,盛清,等. 硫酸铵沉淀和层析法分离纯化纳
豆激酶的研究[J]. 高校化学工程学报,2006,20(1):63-67.

[20] 胡洪波,张雪洪,梅乐和,等. 膨胀床离子交换吸附分离纳豆
激酶[J]. 化学工程,2005,33(4):1-4.

[21] Hu H B,Yao S J,Mei L H,et al. Partial purification of nattoki-
nase from Bacillus subtilis by expended bed adsorption [J]. Bio-
technology Letters,2000,22:1383-1387.

[22] 陆瑾,赵珺,林东强,等. 金属螯合双水相亲和和分配技术分离
纳豆激酶的研究[J]. 高校化学工程学报,2004,18(4):465
-470.

[23] Liu J G,Xing J M,Chang T S,et al. Reverse micelles extraction of
nattokinase:From model system to real system [J]. Chinese Sci-
ence Bulletin,2006,51:7796-7801.

[24] Liu J G,Xing J M,Chang T S,et al. Purification of nattokinase by
reverse micelles extraction from fermentation broth;effect of tem-
perature and phase volume ratio [J]. Bioprocess Biosyst Eng,
2005,28(4):267-273.

[25] 刘俊果,邢建民,沈睿,等. 反胶团法分离纯化纳豆激酶的方法
[P]. CN 1690196A,2005-11-2.

[26] Yang C L,Xing J M,Guan Y Pi,et al. Superparamagnetic poly
(methyl methacrylate) beads for nattokinase purification from fer-
mentation broth [J]. Appl Microbiol Biotechnol,2006,72(3):
616-622.

[27] Shinsaku T. Bacillus Natto culture extract [P]. US7018630B2,
2006-3-28.

[28] Suzuki Y,Kondo K,Matsumoto Y,et al. Dietary supplementation
of fermented soybean, natto, suppresses intimal thickening and
modulates the lysis of mural thrombi after endothelial injury in rat
femoral artery[J]. Life Sciences,2003,73:1289-1298.

[29] Pais E,Alexy T,Holsworth RE Jr,et al. Effects of nattokinase, a
pro-fibrinolytic enzyme, on red blood cell aggregation and whole
blood viscosity [P]. Clinical Hemorheology and Microcirculation,
2006,35(1-2):139-142.

(上接 968 页)

and fertility level on the chemical composition of soybean seed
[J]. U S Department of Agricultural Technology Bulletin,1942,
789:66.

[13] Wilson D O,Boswell F C,Ohki K,et al. Changes in soybean seed
oil and protein as influenced by manganese nutrition [J]. Crop
Science,1982,22,948-952.

[14] Heenan D P,Campbell L C. Growth, yield component and seed
composition of two soybean cultivars as affected by manganese
supply[J]. Australian Journal of Agricultural Research,1980,
31:471-476.

[15] Boswell F C,Worthington R E. Boron and manganese effects on

protein, oil, and fatty acid composition of oil in soybeans [J].
Journal of Agricultural Food Chemistry,1971,19:765-768.

[16] 王志新. 环境因素对大豆化学品质及产量影响研究 I. 播期
对大豆化学品质及产量的影响[J]. 大豆科学,2003,22(1):
45-494.

[17] 王国勋. 大豆品种生态研究 IV. 不同播期的大豆脂肪含量的
变异[J]. 中国油料,1979(2):41-43.

[18] 孟祥勋,王曙明,李爱萍,等. 不同年份及地点对大豆籽粒蛋
白质和脂肪的影响[J]. 吉林农业科学,1990,(4):17-20.

[19] 丁振麟. 气候条件对大豆化学品质的影响[J]. 作物学报,
1965,4(4):313-320.