

纳豆激酶的亲和吸附工艺研究

马跃华^{1,2}, 董超², 杨明^{1,2}, 史延茂²

(1. 河北工业大学 化工学院生物工程系, 天津 300130; 2. 河北省生物研究所, 河北 石家庄 050081)

摘要:采用静态吸附方法验证了大豆颗粒对纳豆激酶的亲和吸附特性,测定了其静态吸附动力学特性和吸附等温线以及一些吸附条件。结果表明:该亲和吸附等温线符合 Langmuir 方程,吸附动力学符合扩散方程;吸附的最佳缓冲液选择 pH6.0、0.01 mol·L⁻¹ 的 PBS,在静态时选用大豆颗粒的最大吸附量为 6351.58 IU·g⁻¹,洗脱后收率达到 81.30%,纯化倍数约 30.23 倍。初步推断大豆蛋白中含有与纳豆激酶特异性吸附的配体结构。

关键词:大豆颗粒;纳豆激酶;吸附平衡;吸附动力学

中图分类号:Q814 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2010)02-0306-04

Adsorption of Nattokinase by Soybean Microspheres

MA Yue-hua^{1,2}, DONG Chao², YANG Ming^{1,2}, SHI Yan-mao²

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300100; 2. Hebei Institute of Biology, Shijiazhuang 050081, Hebei, China)

Abstract: The affinity adsorption of Nattokinase by soybean microspheres was characterized and the static adsorption dynamics, adsorption isotherms and some adsorption conditions were investigated in the present work. The results revealed that the adsorption isotherm was accorded with Langmuir adsorption isotherm and the adsorption dynamics was coincident with diffusion equation. The best buffer was 0.01 mol·L⁻¹ PBS with pH of 6.0. Under this condition, the maximum adsorption capacity was 6351.58 IU·g⁻¹. The purification fold and recovery of Nattokinase activity reached 30.23 and 81.3%, respectively. It may be presumed that the soybean protein contains the ligand which absorb the nattokinase specifically.

Key words: Soybean microspheres; Nattokinase; Adsorption equilibrium; Adsorption dynamics

纳豆激酶是由纳豆芽孢杆菌发酵产生的一种碱性丝氨酸蛋白酶^[1],具有强烈的溶栓活性,其溶栓效果最早由日本学者须见洋行博士发现^[2]。药理学研究表明^[3],纳豆激酶具有易于吸收、体内半衰期长,安全性好和可以规模化生产等优点^[3-4]。纳豆激酶是一种极具开发价值的溶栓药物,国内外许多科研工作者对纳豆激酶的发酵和提取工艺进行了研究^[5-6],分离提取工艺是限制纳豆激酶大规模生产的瓶颈问题。目前,实验室中对纳豆激酶的分离提取工艺主要采用盐析和各种层析相结合的方法,最终可以得到电泳纯的纳豆激酶,但由于层析介质价格昂贵,盐析工艺不易扩大化生产以及存在污染等问题,使纳豆激酶的生产成本大大提高。与其它层析方法相比,亲和层析具有专一性强、分离效果高的特点,有时只需一步处理即可使目标分子从复杂的混合物中分离出来,尤其是针对蛋白类的生物大分子,亲和层析可以使产物保持较高的生物活性^[7]。因此,该研究采用亲和层析进行纳豆激酶的分离提取,并采用静态吸附实验验证了大豆颗

粒对纳豆激酶的特异性吸附,研究了大豆颗粒与纳豆激酶的吸附性能。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

牛纤维蛋白原(Sigma公司);凝血酶(石家庄市华瑞创新生物科技开发中心);注射用尿激酶(辽宁卫星制药厂有限责任公司);台式保温培养箱(PW/10-002 重庆实验设备厂);纳豆芽孢杆菌,该实验室保存。

1.2 试验方法

1.2.1 纳豆激酶发酵液的处理 纳豆芽孢杆菌在 20 L 发酵罐中发酵 24 h,将发酵液过 0.22 μm 膜除菌体,得到纳豆激酶粗酶液;将粗酶液冷冻干燥得到粗酶冻干粉,它的酶活为 260.39 IU·mg⁻¹。

1.2.2 吸附介质—大豆颗粒的制备 将大豆冲洗干净,用水浸泡 15 h,充分膨胀。装入纱布袋,放入高压锅内 115℃ 保持 30 min。将熟大豆在研钵内捣

收稿日期:2009-08-24

基金项目:河北省科技支撑计划资助项目(08276413D)。

作者简介:马跃华(1982-),女,硕士,研究方向为微生物制药。

通讯作者:史延茂,研究员。E-mail:yanmaosh@163.com。

碎,加入少量无菌水,搅拌均匀,过 40 目筛后再用 60 目筛截取,得到大豆颗粒。将之用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸、水、 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH、水、 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl、水的顺序清洗后,在 $2 \sim 5^\circ\text{C}$ 低温保存备用。

1.2.3 吸附等温线 将处理好的大豆颗粒,用 pH6.0 的 PBS 缓冲液充分平衡,称取不同质量的粗酶冻干粉溶于一定量的缓冲液中得到不同浓度的纳豆激酶粗酶液,取 10 支试管,每个管中加 1.0 g 平衡好的大豆颗粒,加入不同浓度的纳豆激酶粗酶液,分别在 25°C 、 15°C 、 5°C 摇床震荡吸附 4 h,测粗酶液初始和吸附平衡后的酶活,按下式计算吸附量,绘制吸附等温线。

$Q = (C_0 - C_e)V/W$, 式中: Q —吸附量 ($\text{IU} \cdot \text{g}^{-1}$); C_0 —起始酶活 ($\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$); C_e —平衡酶活 ($\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$); V —溶液体积 (mL); W —亲和介质重量 (g)。

1.2.4 静态吸附动力学 称 15 g 湿大豆颗粒加到 60 mL 粗酶液中, 25°C 摇床震荡吸附,每隔一定时间取样测酶活,按 1.2.3 中的公式计算吸附量。并绘制大豆颗粒对纳豆激酶的静态吸附动力学曲线。

1.2.5 pH 值对纳豆激酶稳定性的影响 分别用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 和 NaOH 调粗酶液的 pH 值为 $2 \sim 12$, 4°C 过夜测酶活,酶活保留率 = 过夜后不同 pH 值酶活/原始酶活 $\times 100\%$ 。

1.2.6 pH 值对大豆颗粒吸附纳豆激酶的影响 用 pH 值为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 缓冲液分别平衡大豆颗粒,分别准确称取大豆颗粒放入三角瓶中。称取 0.05 g 冻干粗酶粉溶解到 10 mL 如上的 pH 值缓冲液中,将溶解好的粗酶液加到对应的三角瓶中,酶液和介质的比例为 $10:1 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ (v/m), 25°C 摇床震荡吸附 4 h,测初始和吸附后的酶活。由于纳豆激酶的酶活受到酸碱环境的影响,此时吸附量 $Q = (\text{初始酶活} \times \text{酶活保留率} - \text{吸附后的酶活}) \times V/\text{亲和介质的重量}$ 。

1.2.7 离子强度对大豆颗粒吸附纳豆激酶的影响 称取粗酶冻干粉 0.05 g 加到 10 mL pH6.0 的 PBS 缓冲液中,加入 2 g 的大豆颗粒介质, 25°C 摇床震荡吸附 4 h,加入 0.01、0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 浓度洗脱液,摇床震荡 30 min,测初始和洗脱后的上清的酶活。

1.2.8 大豆颗粒介质对纳豆激酶粗酶液的吸附收率和纯度测定 以 pH6.0 的 PBS 缓冲液充分平衡的大豆颗粒介质,称取 10 g 入三角瓶,加入粗酶液 100 mL, 25°C 摇床震荡吸附 2 h,将介质装入层析柱,滤出上清液,用 5 倍体积的 pH6.0 的 PBS 缓冲液(约 1 L)淋洗,沥干,取出吸附纳豆激酶的介质,

加入 100 mL $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液,摇床震荡解吸 2 h,过滤取滤液测酶活和电泳测定。纳豆激酶活力测定方法见文献[8]。

2 结果与分析

2.1 吸附等温线

在温度为 25°C 、 15°C 、 5°C , pH6.0 的情况下,大豆颗粒对纳豆激酶的吸附等温线如图 1 所示。

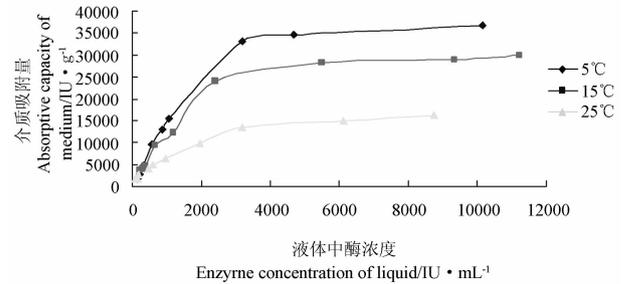


图 1 吸附等温线

Fig. 1 Adsorption isotherms

由图 1 可以看出,大豆颗粒对纳豆激酶的吸附量随平衡浓度的增加而增大,随温度的升高而降低,这是由于亲和吸附作用随温度升高而减小,吸附过程一般伴随熵的降低,但升高温度利于解吸,所以可以选择 5°C 低温上样吸附,而升至 25°C 解吸洗脱。同时用 Langmuir ($C_e/Q_e = C_e/q_m + 1/K_L q_m$) 和 Freundlich ($\ln Q_e = \ln K_f + 1/n \ln C_e$) 等温方程对图 1 数据拟合,其中 Q_e 为平衡吸附量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), C_e 为平衡浓度 ($\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$), K_L 和 K_f 分别为两方程的吸附系数。结果表明,Langmuir 等温方程能很好的描述大豆颗粒介质对纳豆激酶的吸附 ($R^2 > 0.95$), Langmuir 等温方程的 q_m (即最大吸附量) 随着温度的升高而减小,这也表明温度升高时树脂对纳豆激酶的吸附能力减小。在试验浓度范围内特征分离系数 $[R = 1/(1 + KC_0)]$, $0 < R < 1$,表明大豆颗粒对纳豆激酶的吸附为优先吸附。

一般情况下符合 Langmuir 方程的吸附可以用单分子层吸附理论来描述,即一个活性中心只能吸附一个分子,且被吸附的分子间无相互作用,而蛋白质的吸附等温线虽然可以用 Langmuir 方程来描述,但 Langmuir 平衡模型只是表象平衡模型,不是机理平衡模型^[9]。结果表明,大豆颗粒对纳豆激酶的吸附同样可用 Langmuir 方程来拟合,但吸附机理不能用单分子理论来解释,实际的吸附随介质表面结构、立体结构、蛋白质分子大小的不同而异,需要进一步研究。

2.2 静态吸附动力学

大豆颗粒对纳豆激酶的吸附动力学曲线如图 2

所示,随着时间的延长,大豆颗粒对纳豆激酶的吸附量逐渐增大,当时间在 20 min 以内时,吸附量的增加非常明显,30 min 以后随着时间的延长,吸附量不再增加,表明此时大豆颗粒对纳豆激酶的吸附已经达到饱和,大豆颗粒对纳豆激酶的最大吸附量为 $6\ 351.58\ \text{IU} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

根据 Langmuir 方程: $\ln(Q_e - Q_t) = \ln Q_e - kt$, 其 k 为准一级动力学方程表观速率常数^[10]。也可转换为: $-\ln(1 - Q_t/Q_e) = kt$ 或 $-\ln(1 - F) = kt$, 其中 $F = Q_t/Q_e$ 。如果以 $-\ln(1 - Q_t/Q_e)$ 或 $-\ln(1 - F)$ 对时间 t 做图得良好的线性关系,则吸附动力学可用准一级动力学描述。根据直线斜率可得表观吸附速率常数 k 。利用扩散方程 $-\ln(1 - F) = kt$ 对图 2 数据进行拟合,结果如图 3 所示,拟合方程为 $-\ln(1 - F) = 0.044x + 0.3695$, 其相关系数 R^2 为 0.9941, 其中, $F = q_t/q_e$, q_t 为吸附时间 t 时大豆颗粒对纳豆激酶的吸附量 ($\text{IU} \cdot \text{g}^{-1}$), q_e 为吸附达到平衡时大豆颗粒对纳豆激酶的吸附量 ($\text{IU} \cdot \text{g}^{-1}$), k 为吸附平衡速率常数, t 为吸附时间。吸附平衡速率常数 $k = 0.044\ \text{min}^{-1}$ 。

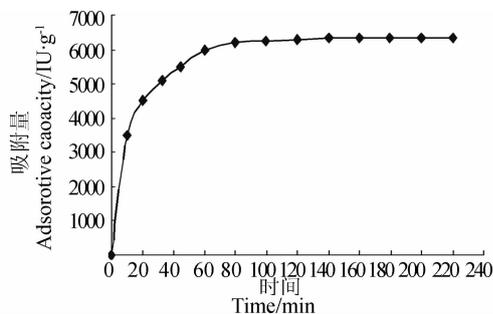


图 2 吸附动力学曲线

Fig. 2 Adsorption dynamics

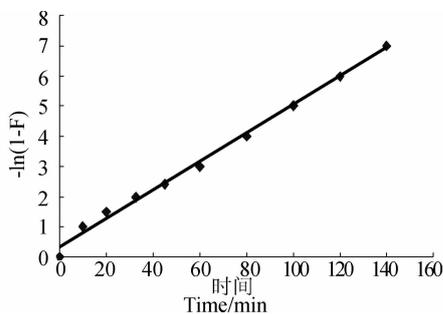


图 3 吸附动力学回归曲线

Fig. 3 Adsorption dynamics of regression equation

2.3 pH 值对纳豆激酶的稳定性影响

由图 4 可知,不同的酸碱环境会影响纳豆激酶的活性,在 pH 值小于 5 时,酶活急剧下降;在 pH 6.0~9.0 范围内可以达到 80% 的保留酶活;大于 9.0 时缓慢下降。

2.4 pH 值对吸附量的影响

选取 pH 值 5~8 范围内测定对介质吸附量的影响,大豆颗粒对纳豆激酶的吸附量变化趋势如图 5。

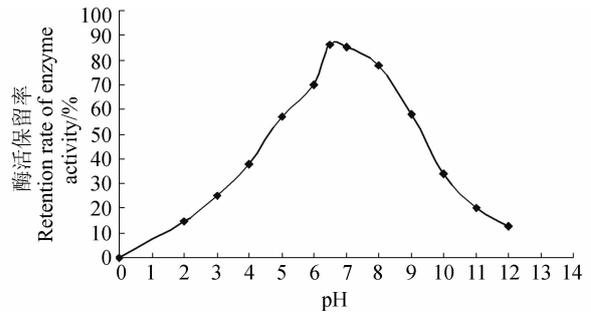


图 4 不同 pH 值下纳豆激酶的保留率曲线

Fig. 4 Curve of retention rate of Nattokinase in different pH

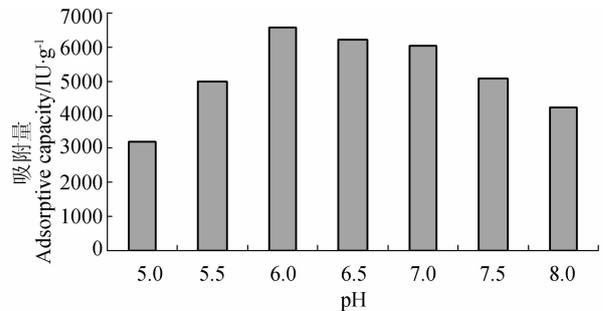


图 5 吸附量随 pH 的变化趋势

Fig. 5 Change of adsorption capacity in different pH

由图 5 可知, pH 6.0~8.0 的范围内,纳豆激酶的酶活保留率达到 80% 以上, pH 6.0 时吸附量最大。由于纳豆激酶的等电点为 8.6, 因此在 pH 6.0~8.0 的范围内,纳豆激酶均带正电荷,当 pH 值逐渐增大时,纳豆激酶所带的正电荷逐渐减少,纳豆激酶的空间构象也同时随着电荷数的减小而发生改变,这使得纳豆激酶与大豆颗粒中与之发生特异性吸附的配基之间的亲和力减弱,最终表现为纳豆激酶在大豆颗粒上的吸附量减小。pH 6.0 时酶活会随时间有一定的损失,那么此时实际的吸附量要高于图 5 所示。综合考虑选择 6.0 为大豆颗粒吸附纳豆激酶的最佳 pH 值。

2.5 NaCl 浓度对吸附量的影响

不同的 NaCl 浓度下,纳豆激酶在大豆颗粒上的吸附量的变化趋势见图 6。NaCl 浓度对纳豆激酶在大豆颗粒上的吸附量影响较大,当 NaCl 浓度在 0

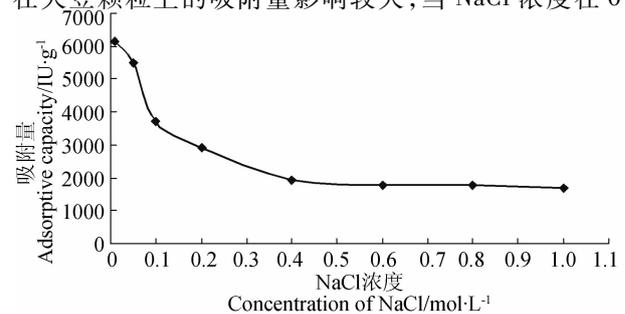


图 6 吸附量随 NaCl 浓度的变化趋势

Fig. 6 Change of adsorption capacity with the concentration of NaCl

~0.4 mol · L⁻¹内变化时,吸附量随 NaCl 浓度的增加而减小,这是因为随着缓冲液中离子强度的升高,在大豆颗粒与纳豆激酶之间形成的离子屏蔽削弱了静电作用力,降低了配基与纳豆激酶之间的亲和吸附能力。当 NaCl 浓度大于0.4 mol · L⁻¹时,吸附量随 NaCl 浓度的增加不再增加,NaCl 浓度不再对其吸附量产生影响。因此,可选择不含 NaCl 的 pH6.0 的 PBS 缓冲液中进行吸附,以高于 0.4 mol · L⁻¹的 NaCl 溶液进行洗脱。

2.6 大豆颗粒介质对纳豆激酶粗酶液的吸附收率和纯度测定结果

由表 1 可以看出,采用大豆颗粒对纳豆激酶发酵液一步的静态提取,收率可以达到 81.30%,纯化倍数可以达到 30.23 倍。并且电泳检测可以达到 1 条带(图 7)。

表 1 纳豆激酶的不同分离提取工艺与亲和提取的比较(500 mL 发酵液)

Table 1 Different separation and extraction of Nattokinase compared with affinity extraction of Nattokinase (500 mL fermented fluid)

	总酶活 General enzyme activity/IU	比活力 Specific activity /IU · mg ⁻¹	该步收率 The step yields /%	总收率 Total yield /%	纯化倍数 Purification factor
发酵粗酶液 Fermented crude enzyme solution	1.15 × 10 ⁶	136.76	100	100	1
20% 盐析 20% salting out	1.04 × 10 ⁶	138.80	90.83	90.83	1.01
60% 盐析 60% salting out	8.48 × 10 ⁵	441.57	81.21	73.76	3.23
亲和吸附 Affinity adsorption	9.35 × 10 ⁶	4134.25	81.30	59.13	30.23

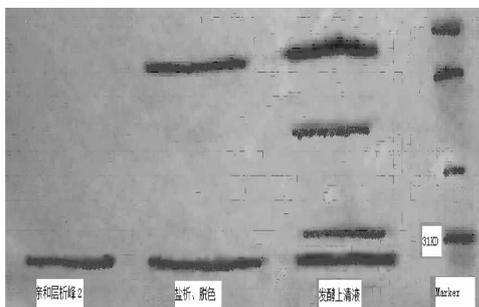


图 7 不同工艺产物的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 7 SDS-PAGE of different craftwork products

3 结论与讨论

结果表明,大豆颗粒中存在与纳豆激酶发生特异性吸附的物质,其对纳豆激酶的吸附为优吸型吸附,吸附等温线符合 Langmuir 方程。大豆颗粒对纳豆激酶的吸附受 pH 值和离子强度影响较大,确定

最佳 pH 值为 6.0,吸附量随离子强度的增加而减小,因此可在低离子强度的条件下上样吸附,在高离子强度的条件下进行解析。其最佳的静态吸附工艺为:介质平衡液为 pH6.0 的 PBS 缓冲液,吸附时间 4 h,1.0 mol · L⁻¹的 NaCl 溶液进行洗脱。

研究发现该吸附可以同时达到脱色的目的,选择亲和层析作为纳豆激酶生产工艺的初步提取步骤,可以代替盐析、离心和脱色等耗能高的工艺,一步浓缩倍数可达 30 左右。该亲和层析工艺用于纳豆激酶发酵提取的第一步处理,可以减少下游处理步骤,提高生物收率,减少工艺成本,为后续的精制提取工艺打好基础。

大豆蛋白的结构非常复杂,三级立体结构含有多个亚基对,二级结构的分子量和氨基酸残基也有相关报道,但是一级结构的氨基酸排列至今没有完成^[11-12]。经高温处理后的大豆颗粒对纳豆激酶的吸附量比用生大豆要高,因为高温可以引起蛋白的三级立体结构和部分二级结构的破坏,一级氨基酸的排列受到影响较小。纳豆激酶属于丝氨酸蛋白酶,共同特征是含有一个特异的催化三联体,由 Asp, His 和 Ser 残基组成^[13],推测大豆蛋白中的某段氨基酸链可以与纳豆激酶的催化三联体有亲和吸附,并且氨基酸链不会太长,所以其吸附不应该是复杂的立体结构作为亲和吸附的基础。但是配体结构还不清楚,相关验证和实验工作有待后续研究。

参考文献

- [1] Fujita M, Nomura K, Kong K. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean Fermented food in Japan [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, 197 (3): 1340-1347.
- [2] Sumi H, Hamada H, Tsumi H, et al. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet [J]. Experientia, 1987, 43 (20): 1110-1111.
- [3] Fujita M, Hong K, Ito &, et al. Transport of nattokinase across the rat intestinal tract [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 1995, 18: 1194-1196.
- [4] 张锋,金杰,解成俊. 纳豆激酶的最新研究进展[J]. 中国调味品, 2008(1):29-34. (Zhang F, Jin J, Xie C J. New research progress in nattokinase [J]. China Condiment, 2008(1):29-34.)
- [5] 董超,史延茂,张丽萍. 纳豆芽孢杆菌的发酵工艺研究[J]. 中国调味品, 2006(6):24-27. (Dong C, Shi Y M, Zhang L P. Studies on fermental conditions of Bacillus Natto [J]. China Condiment, 2006(6):24-27.)

- [3] Wang T, Xu R. Effect of Colostrum feeding on intestinal development in newborn pigs[J]. *Biology of the Neonate*, 1996, 70(6): 339-348.
- [4] Grant G, Dorward PM, Buchan W C, et al. Consumption of diets containing raw soya beans (*Glycine max*), kidney beans (*Phaseolus vulgaris*), cowpeas (*Vigna unguiculata*) or lupin seeds (*Lupinus angustifolius*) by rats for up to 700 days: effect on body composition and organ weights [J]. *British Journal of Nutrition*, 1995, 73(1):17-29.
- [5] Li Z, Li D, Qiao S, et al. Anti-nutritional effects of a moderate dose of soybean agglutinin in the rats [J]. *Archives for Tierernahr*, 2003, 57(4):267-277.
- [6] Tang S, Li D, Qiao S, et al. Effects of purified soybean agglutinin on growth and immune function in rats[J]. *Archives of Animal Nutrition*, 2006, 60(5):418-426.
- [7] Roy D M, Schneeman B O. Effect of soy protein, casein and trypsin inhibitor on cholesterol, bile acids and pancreatic enzymes in mice [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 1981, 111(5): 878-885.
- [8] Jordinson M, Deprez P H, Playford R J, et al. Soybean lectin stimulates pancreatic exocrine secretion via CCK-A receptors in rats[J]. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 1996, 270(4):653-659.
- [9] Li Z, Li D, Qiao S. Effects of soybean agglutinin on nitrogen metabolism and on characteristics of intestinal tissues and pancreas in rats[J]. *Archives for Tierernahr*, 2003, 57(5):369-380.
- [10] Donatucci D A. The role of the lectin on the nutritional toxicity of raw legumes[D]. Minneapolis: University of Minnesota, 1983.
- [11] Pusztai A, George G, Gelencser E, et al. Effects of an orally administered mistletoe (type-2 KIP) lectin on growth, body composition, small intestinal structure and insulin levels in young rats [J]. *Journal Nutritional Biochemistry*, 1998, 9(1):31-36.
- [12] Grant G. Antinutritional effects of soybean: A Review. *Prog [J]. Food Nutrition Science*, 1989, 13(2):317-348.
- [13] Ishiguro M, Nakashima H, Tanabe S, et al. Interaction of toxic lectin ricin with epithelial cells of rat small intestine *in vitro* [J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1992, 40(2):441-445.
- [14] Huisman J, Jansman A J M. Dietary effects and analytical aspects of antinutritional factors in peas (*Pisum sativum*) common bean (*Phaseolus vulgaris*) and soybeans (*Glycine max* L) in monogastric farm animals. A literature review [J]. *Nutrition Abstracts & Reviews*, 1991, 61(B):901-921.
- [15] Bardocz S, Duguid T J, Brown D S, et al. The importance of dietary polyenes in cell regeneration and growth [J]. *Nutrition*, 1995, 73(6):819-828.
- [16] Qin G, Elst E R, Bosch M W, van der Pole A F B. Thermal processing soybean, studies on the inactivation of antinutritional factors and effects on oral digestibility in piglets [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 1996, 57(4):313-324.
- [17] Pull S P, Pueppke S G, Hymowitz T, et al. Soybean lines lacking 120 000 Da seed lectin [J]. *Science*, 1978, 200:1277-1278.
- [18] Pusztai A, Bardocz S. Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications [J]. *Trends Glycosci Glycotechnol*, 1996, 8(41):149-165.
- (上接第 309 页)
- [6] 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. (Gao D H, Mei Y H, Sheng Q, et al. Separation and Purification of Nattokinase produced by bacillus subtilis with ammonium sulfate precipitation and chromatography [J]. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2006, 20(1):63-67.)
- [7] 陈勇, 徐焱, 应汉杰, 等. 亲和层析研究进展 [J]. *离子交换与吸附*, 2001, 17(3):276-280. (Chen Y, Xu Y, Ying H J, et al. Researches and developments of affinity chromatography [J]. *Ion Exchange and Adsorption*, 2001, 17(3): 276-280.)
- [8] 杨明, 董超, 史延茂, 等. 纤维蛋白平板法测定纳豆激酶方法的改进 [J]. *中国酿造*, 2008(7):77-80. (Yang M, Dong C, Shi Y M, et al. Improvement on the method of measuring the activity of Nattokinase with agarose-fibrin plate [J], *China Brewing*, 2008(7):77-80.)
- [9] 孙彦. 生物分离工程 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 189-191. (Sun Y. *Bioseparation Engineering* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005:189-191.)
- [10] 魏瑞霞, 陈金龙, 陈连龙, 等. 2-噻吩乙酸在 3 种树脂上的吸附行为研究 [J]. *高分子学报*, 2004, 8(4):471-477. (Wei R X, Chen J L, Chen L L, et al. Study of adsorption of 2-thiopheneacetic acid on three adsorbent resins [J]. *Acta Polymerica Sinica*, 2004, 8(4):471-477.)
- [11] 刘众悦, 王红玲, 刘春, 等. 中国大豆种质 11S 球蛋白 A5 A4 B3 和 A3 B4 亚基缺失的分子机制 [J]. *大豆科学*, 2009, 28(3):363-369. (Liu Z R, Wang H L, Liu C, et al. Molecular mechanism of A5A4B3-null and A3B4-null of Chinese soybean germplasm [J]. *Soybean Science*, 2009, 28(3):363-369.)
- [12] 麻浩, 王显生, 刘春, 等. 706 份中国大豆种质贮藏蛋白 7S 和 11S 组分及其亚基相对含量的研究 [J]. *大豆科学*, 2006, 25(1):11-17. (Ma H, Wang X S, Liu C, et al. The content variation of 7S, 11S globulins and their subunits of seed storage protein of 706 Chinese soybean germ plasm [J]. *Soybean Science*, 2006, 25(1):11-17.)
- [13] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002:405-408. (Wang J Y, Zhu S G, Xu C F. *Biochemistry* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2002:405-408.)