

豆豉中 5 株产纤溶酶菌的筛选与鉴定

吕美云,刘紫英

(宜春学院 化学与生物工程学院,江西 宜春 336000)

摘 要:采用酪蛋白平板初筛的方法,从全国 14 种纳豆和豆豉中分离到 39 株具有蛋白酶活力的菌株;又以猪血粉平板进行复筛,并采用纤维蛋白平板法测定纤溶酶活力,得到 5 株产纤溶酶能力较强菌株,分别命名为 CQDC-03、CWND-03、NCDC-02、YJND-01 和 FJDC-02。对其进行 16S rDNA 序列分析,结果表明: CWND-03、CQDC-03 和 *Bacillus subtilis* 相似性为 99%, NCDC-02 和 *Bacillus subtilis* 相似性为 98%。因而 CQDC-02、CWND-03 和 NCDC-02 认定为 *Bacillus subtilis*, YJND-01 和 FJDC-02 是否为 *Bacillus subtilis* 的新种还有待进一步鉴定,但确定其为 *Bacillus* 属。

关键词:纤溶酶;筛选;16S rDNA;鉴定;枯草芽孢杆菌

中图分类号:S565. 1 **文献标识码:**A **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2016. 01. 0165

Isolation and Identification of Five Fibrinolytic Enzyme Producing Strains from Douchi(Chinese Traditional Food)

LYU Mei-yun, LIU Zi-ying

(College of Chemistry and Bioengineering of Yichun University, Yichun 336000, China)

Abstract: Thirty-nine strains of protease-producing strains were isolated from 14 kinds of traditional food natto and Douchi by using casein-plate method and 5 strains of highest fibrinolytic enzyme producing strains were screened by both pig blood powder-plate and fibrin plate method. The 5 strains were named NCDC-2, CQDC-03, CWND-03, YJND-01 and FJDC-02, respectively. 16S rDNA sequence analysis showed NCDC-02 was similiary with *Bacillus subtilis* by 98%, while CQDC-03 and CWND-03 were by 99%. Thus NCDC-2, CQDC-03, CWND-03 were identified as *Bacillus subtilis*. Further research is needed to identify whether YJND-01 and FJDC-02 are the new species of *Bacillus subtilis*. But it is no doubt that it is kind of *Bacillus* spp.

Keywords: Fibrinolytic enzyme; Screened; 16S rDNA; Identification; *Bacillus subtilis*

1987 年日本的 Sumi 等^[1]首次在纳豆中提取出纳豆激酶,纳豆激酶含有能够溶解血栓纤维蛋白活性的纳豆激酶。血栓性疾病严重威胁人类的生命健康,其发病率高居各种疾病之首,且近年来有日益增加的趋势,是当代医药研究的重点和热点之一。据统计,全世界血栓栓塞性病人约 1 500 万人,心脑血管血栓病已跃居人类死因的第一位。而纳豆激酶的发现有助于解决这一医学问题。我国研究人员从中得到启发,纷纷从微生物中挖掘产纳豆激酶活菌株。董明盛等^[2]从豆豉、酱豆和纳豆样品中分离筛选到 1 株具强力纤溶活性的细菌 NK-5,酶活达 683. 3 IU·mL⁻¹;薄金岭^[3]从酱豆和日本纳豆中筛选出活力最高的菌株,酶活力达 242 IU·mL⁻¹;奚晓琦等^[4]从纳豆食品中分离纯化 3 株具有较高纳豆激酶活性菌株,用琼脂糖-纤维蛋白平板法测酶活,其中酶活最高的溶圈面积可达 624. 48 mm²,

酶活为 1 804. 64 IU·mL⁻¹。赵仲麟等^[5]从我国黑豆豆豉中筛选到 1 株纳豆激酶生产菌株 BSNK-5,其发酵液相对于尿激酶的活性为 509. 64 IU·mL⁻¹,溶解圈面积为 197. 86 mm²。中国的豆豉类似日本的纳豆,其中确实存在具有纤溶活性的酶^[6],豆豉纤溶酶在体内有很好的溶栓能力,在体外也具有很强的抗凝血能力^[7],该酶具有较高纤溶活性及良好抗凝、溶栓作用,不溶解血细胞^[8],相对于传统的溶栓药,纤溶酶具有不引起内出血,体内半衰期长,且可通过消化道直接吸收等优点。因此,豆豉纤溶酶具有开发成为新型溶血栓药物和保健食品的极大可能性。

本研究收集全国 14 种大豆发酵制品(豆豉、纳豆等),运用酪蛋白培养基进行初筛,以猪血粉平板复筛,纤维蛋白平板法测定纤溶酶活力,旨在筛选出具有高产纤溶酶活力的菌株。并对其进行分子

收稿日期:2015-07-19
基金项目:江西省宜春市社会发展类科技计划(JXYC2011KSA002)。
第一作者简介:吕美云(1963-),女,副教授,主要从事微生物学教学与研究。E-mail:lvmeiyun2005@163. com。

鉴定及 16S rDNA 基因序列分析,确定其分类地位,为制备新型溶栓药提供更多可用的资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试纳豆和豆豉 燕京纳豆、西尾纳豆和黑豆纳豆 3 种纳豆,北京、重庆、南昌、赣州、湖南、福建、阳江、河南、上饶、丰城和樟树共 11 个地区的豆豉。

1.1.2 主要试剂 纤维蛋白原(Fibrinogen, 100 mg·支⁻¹)和尿激酶(Urokinase, 7 200 U·支⁻¹)购自 Sigma 公司;凝血酶(Thrombin)购自上海蓝季科技发展有限公司;Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒和 2×EasyTaq PCR SuperMix 购自上海生工生物工程有限公司;AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 购自康宁生命科学(吴江)有限公司。

1.1.3 培养基 初筛培养基(酪蛋白培养基)^[9]: 1.3 g·L⁻¹ Na₂HPO₄, 0.02 g·L⁻¹ ZnSO₄, 0.36 g·L⁻¹ KH₂PO₄, 0.002 g·L⁻¹ CaCl₂, 0.1 g·L⁻¹ NaCl, 15 g·L⁻¹ 琼脂, 4.0 g·L⁻¹ 酪素, pH7.2;

复筛培养基^[10]: 4 g·L⁻¹ 猪血粉, 10 g·L⁻¹ NaCl, 5 g·L⁻¹ 蛋白胨, 20 g·L⁻¹ 琼脂粉, pH7.0~7.2;

牛肉膏蛋白胨培养基: 30 g·L⁻¹ 牛肉膏, 10 g·L⁻¹ 蛋白胨, 5 g·L⁻¹ 氯化钠, 20 g·L⁻¹ 琼脂, pH7.0~7.2;

斜面培养基: 10 g·L⁻¹ 蛋白胨, 20 g·L⁻¹ 琼脂, 5 g·L⁻¹ NaCl, pH7.0;

种子培养基: 10 g·L⁻¹ 蛋白胨, 5 g·L⁻¹ 氯化钠, pH7.0~7.2。

1.1.4 仪器设备 T100 型梯度 PCR 仪(美国 Bio-rad); DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂); 冷冻型台式离心机(上海安亭科学仪器厂); ZF-90 型暗箱式紫外透射仪(上海顾村电光仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 产纤溶酶菌株的筛选 初筛: 称取 0.5 g 样品, 加入到装有 50 mL 无菌生理盐水的三角锥瓶中, 过夜充分浸泡, 再放置在 80℃ 水浴中 15 min, 取出后快速冷却制备成菌悬液。然后将上述菌悬液进行梯度稀释(10⁻⁵、10⁻⁶和 10⁻⁷), 分别取 100 μL 各稀释度混悬液涂布在酪蛋白平板上, 37℃ 倒置培养 24 h 后, 挑取有透明圈的菌落, 在酪蛋白平板上进行划线分离, 记录透明圈和菌落直径, 选取比值大的菌株斜面保藏。

复筛: 按照姜琼等^[10]的方法做好复筛培养基平

板, 将初筛并保藏菌株接种到 30 mL 液体种子培养基于 120 mL 三角瓶中, 37℃, 180 r·min⁻¹ 恒温培养, 过夜作为种子液, 用 0.9% 的生理盐水稀释, 分别取 100 μL 各稀释度混悬液均匀涂布于复筛粉培养基中, 每个梯度平行涂布 3 个平板。

1.2.2 纤溶酶活力的测定

(1) 纤溶酶粗酶液的制备: 将复筛获得的菌株在牛肉膏蛋白胨培养基上 37℃ 活化 24 h, 再挑取单菌落接种到 30 mL 液体种子培养基于 120 mL 三角瓶中, 37℃, 180 r·min⁻¹ 恒温培养, 待到最终活菌数约为 108 CFU·mL⁻¹, 以 2% (v/v) 接种量接种至 50 mL 液体发酵培养基于 250 mL 三角瓶中, 37℃, 180 r·min⁻¹ 恒温培养。24 h 后取发酵液, 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 上清液即为粗酶液备用。

(2) 纤维蛋白平板的制备: 纤溶酶活力的测定采用纤维蛋白平板法, 为改进的 Astrup 法^[11], 具体为: 取 5.05 g 巴比妥钠, 加 3.7 g 氯化钠以及适量的水溶解, 另取 0.5 g 明胶加适量水溶解后并入上述溶液中, 然后用 0.2 mol·L⁻¹ HCl 溶液调至 pH7.8, 用水稀释定容至 500 mL, 灭菌后即成为巴比妥钠-氯化钠缓冲液; 取 32 mg 纤维蛋白原, 加入 7.5 mL 巴比妥钠缓冲液配制成 4 mg·L⁻¹ 纤维蛋白原缓冲液, 30~37℃ 水浴; 将 500 U 凝血酶溶于 10 mL pH7.8 的巴比妥钠缓冲液, 配制成 50 U·mL⁻¹ 的凝血酶缓冲液; 取 0.09 g 琼脂糖, 加入 8.1 mL 巴比妥钠缓冲液, 微波炉溶解, 灭菌, 60℃ 水浴; 取 7.5 mL 的纤维蛋白原缓冲液加入平板中, 加入 8.1 mL (55~66℃ 水浴 10 min) 琼脂糖, 然后立即加入 0.4 mL 50 U·mL⁻¹ 凝血酶缓冲液, 立即混匀并倒于 9×9 cm² 平皿中, 室温下静置 0.5 h。用 2 mm 孔径的胶头滴管在平板上打孔, 备用。

(3) 标准曲线的制作: 纤溶酶活力以尿激酶作参照, 尿激酶标准曲线的制作参考马明等^[12]的方法。将配制好的尿激酶样品(100, 200, 300, 400, 600, 700 U·mL⁻¹)各 10 μL 点样于新配制的纤维蛋白平板上, 放置 10 min, 待尿激酶样品完全溶于平板后, 移入 37℃ 培养箱, 保温 18 h 后取出, 测定每个浓度的溶解透明圈的垂直直径, 两直径乘积表示为溶解透明圈的面积, 计算各溶解透明圈的面积。以溶圈面积为横坐标, 以尿激酶酶活力为纵坐标作图, 根据标准曲线计算样品中的纤溶酶活力。

1.2.3 产纤溶酶菌株的分子鉴定

(1) 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增与测序: 采用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒制备 5 株产纤溶酶菌菌株总 DNA, 以总 DNA 为模板, PCR 扩

增 16S rRNA 基因序列,正向引物为 27F:5'-ATTCCG-GTTGATCCTGC-3',反向引物为 1541R:5'-AGGAG-GTGATCCAGCCGCA-3'。PCR 反应体系(50 μL):25 μL 2 × EasyTaq PCR SuperMix,1 μL 引物,6.75 μL 模板 DNA,16.25 μL ddH₂O;PCR 反应条件:94℃,4 min;94℃,30 s;55℃,30 s;72℃,60 s;30 个循环;72℃,10 min。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。PCR 产物用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 纯化后由上海生工生物工程有限公司测序。

(2)序列分析及数据处理:测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 比对,应用 MEGA 6.0 软件,采用邻接法(neighbour-joining methods, NJ)构建 5 株高产纤溶酶菌细菌的系统发育树,bootstrap 检验值 ≥ 50%,1 000 次重复。

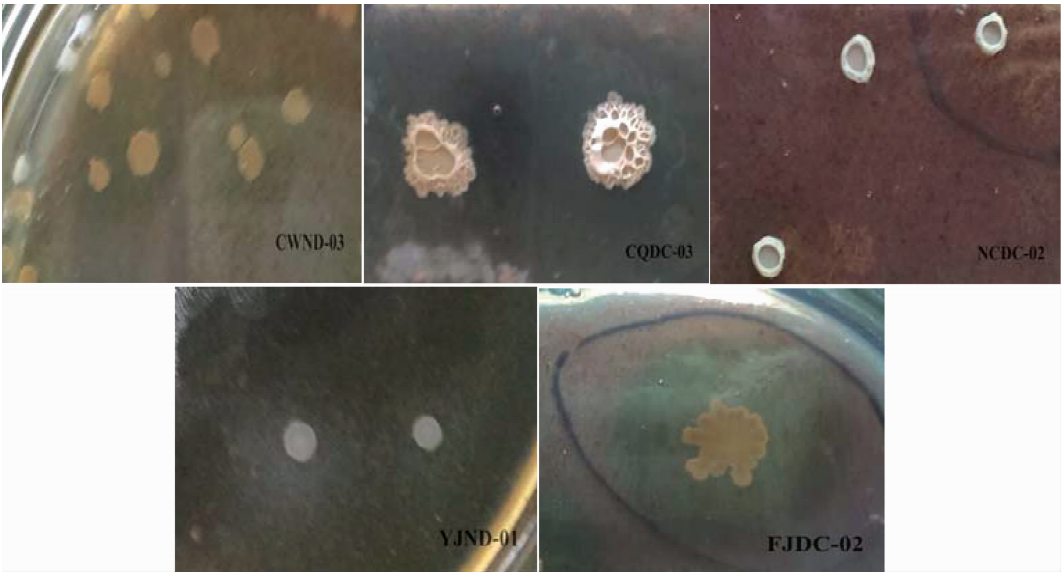


图 1 5 株产纤溶酶菌在猪血粉复筛平板上的菌落形态及水解圈

Fig. 1 The colony morphology of strains and transparent zones of five protease-producing strains

表 1 5 株产纤溶酶细菌菌落特点

Table 1 The colony morphology characteristics of five fibrinolytic enzyme producing strains

菌株 Strain	水解圈直径 Diameter of hydrolytic circle/mm	菌落直径 Diameter of bacterial colony/mm	菌落特点 Characteristics of the colony
CWND-03	7	2.5	干燥,边缘不规则,雪花状,乳白色
CQDC-03	24	11.0	干燥,边缘不规则,有火山口凸起,白色
NCDC-02	10	5.0	干燥,边缘规则,有火山口凸起,乳白色
YJND-01	5	1.5	湿润,边缘规则,较圆,乳白色
FJDC-02	35	12.0	干燥,边缘不规则,雪花状中间点状凸起,白色

2.1.3 纤溶酶活力测定 将复筛得到的菌种分别进行液体发酵试验。制备粗酶液并稀释 1 倍。取 10 μL 稀释的粗酶液点加到纤维蛋白平板上,恒温

2 结果与分析

2.1 产纤溶酶细菌的筛选

2.1.1 初筛 从 3 份纳豆和 11 份豆豉样品中共分离出 39 株产纤溶酶菌株。根据产纤溶酶菌株可水解酪蛋白,以在酪蛋白平板上产生透明圈大初步作为菌株具纤溶酶活性的指标,获得 39 株菌株。菌株命名以产品品牌或产地拼音首字母大写加编号,如燕京纳豆 1 号菌命名为 YJND-01。

2.1.2 复筛 以初筛获得的 39 株为出发菌株,通过猪血粉培养基平板复筛,有 11 株菌株在猪血粉复筛培养基平板具水解圈,5 株菌落水解圈直径与菌落直径之比大于 2(图 1),可视为产纤溶酶能力较强菌株,其形态特征描述见表 1。

37℃,温育 18 h 后,结果如图 2 所示,5 株溶解透明圈直径较大,其中 2 株菌的溶解透明圈面积均高于国内文献报道的溶圈面积^[2,4],属于高产菌株。根

据尿激酶标准曲线(图3)对5株纤溶酶的活性进行测定,结果如表3所示。FJDC-02菌株所产的纤溶酶活性最高,约为1 731.25 U·mL⁻¹,此菌株产纤溶酶活性高于马明等^[13]的筛选的N391菌株,CQDC-03菌株酶活性次之,为1 465.63 U·mL⁻¹,其余3株酶活为829.35,736.18和631.13 U·mL⁻¹。

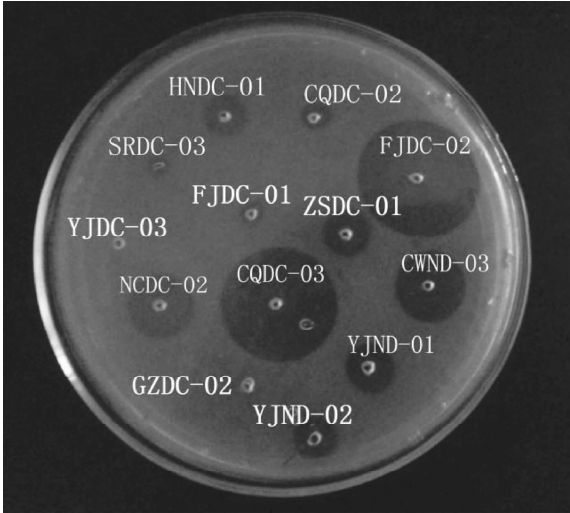


图2 11株产纤溶酶菌溶解透明圈(纤维蛋白平板)

Fig.2 Transparent zone of 11 fibrinolytic enzyme producing strains(fibrin plate)

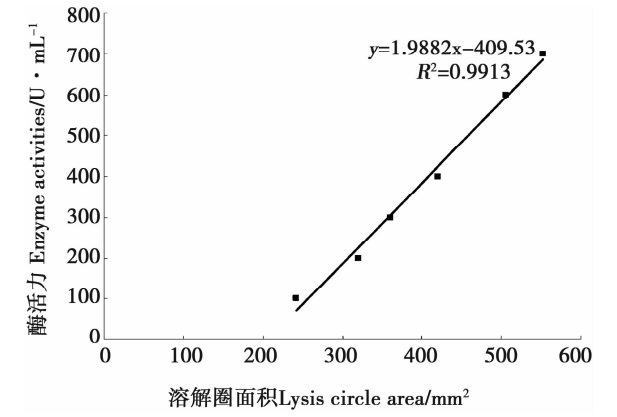


图3 尿激酶标准曲线

Fig.3 Standard curve of urokinase activity

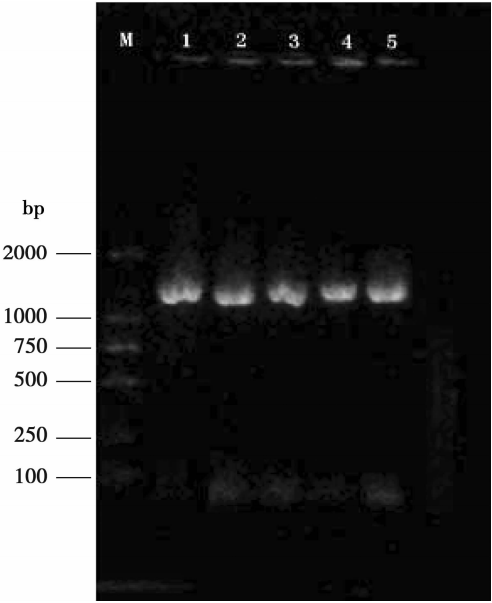
表3 5株菌株纤溶酶活力

Table 3 The fibrinolytic activities of 5 strains by fibrin plate method

菌株 Strain	溶解透明圈面积 Area of transparent zone/mm ²	相当于尿激酶活力 The equivalent of urokinase/U·mL ⁻¹
CWND-03	625	829.35
CQDC-03	946	1465.63
NCDC-02	578	736.18
YJND-01	525	631.13
FJDC-02	1080	1731.25

2.2 产纤溶酶细菌的分子鉴定

以5株高产纤溶酶菌的总DNA为模板,用16S rRNA的引物进行PCR扩增,在1 450 bp位置均出现清晰的电泳条带(图4),为16S rRNA电泳条带。



M表示DL 2 000的电泳条带;1~6分别表示菌株5株产纤溶酶菌的电泳条带。下同。

M indicates electrophoretic band of DL 2 000; 1 to 6 indicate electrophoretic band of 5 protease-producing strains. The same below.

图4 5株高产纤溶酶的16S rDNA扩增电泳图
Fig.4 Gel of amplification of 16S rDNA from the 5 strains

5株产纤溶酶菌的测序结果在NCBI网站进行BLAST比对,结果显示CQDC-03、CWND-03和*Bacillus subtilis*相似性为99%,NCDC-02和*Bacillus subtilis*相似性为98%,其它2株在NCBI网站上同源性最高的前10株多为枯草芽孢杆菌,故本文分离获得的5株菌株以枯草芽孢杆菌为主,其中根据Staekebrandt等^[14]的观点,16S rDNA序列相似性在97%以上即认为是同种。16S rDNA序列相似性在97%或以下即可以认为是新种。因而NCDC-2、CQDC-03和CWND-03认定为*Bacillus subtilis*。YJND-01和FJDC-02是否为*Bacillus subtilis*下的新种还有待进一步鉴定,但确定为*Bacillus*属。应用MEGA 6.0软件中邻接法(neighbour-joining methods,NJ)构建5株菌系统发育进化树(图5)。

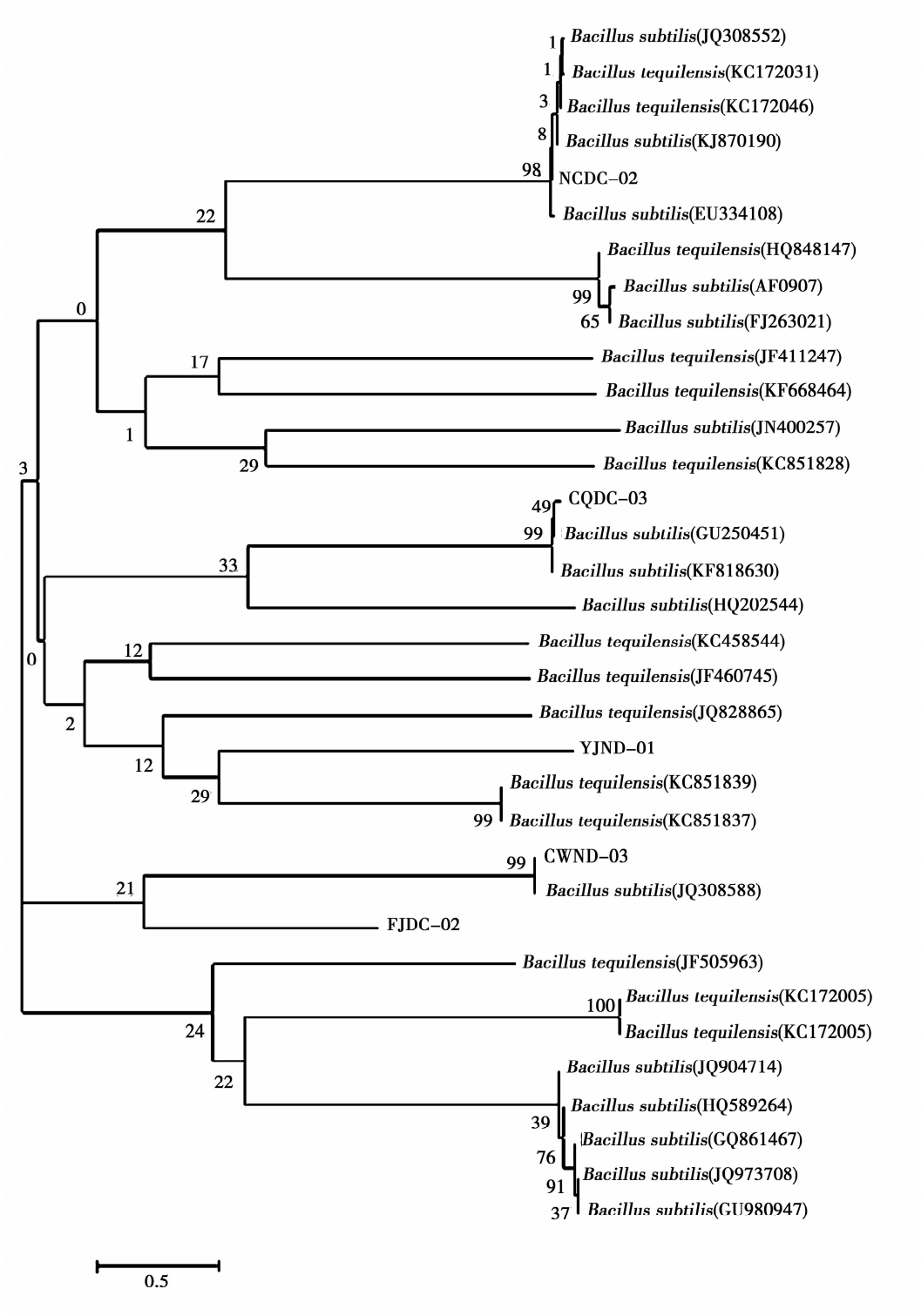


图 5 基于 16S rDNA 序列采用邻接法构建 5 株高产纤溶酶菌的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree inferred by neighbor-joining method based on 16S rRNA gene sequences of the five strains

3 结论与讨论

近年来,随着人民生活水平的提高,血栓性疾病有日益增加的趋势,严重威胁人类的生命健康,其发病率高居各种疾病之首,是当代医药研究的重点和热点之一。治疗血栓性疾病安全可靠并且有

效的方法是溶栓疗法,常用的溶栓药物如链激酶(streptokinase, SK)、尿激酶(utokinnase, UK)、组织溶酶原激活剂(tissue fype plasminogen activator, t-PA)、葡激酶(staphylokinase, Sak)均存在不同程度毒性,副作用较大;在人体内半衰期短,药效难以发挥;来源紧缺,价格昂贵,难以成为一种大众药

物^[1]。从我国传统的大豆发酵制品中筛选具溶栓作用的纤溶酶,在体内有很好的溶栓能力,在体外也具有很强的抗凝血能力^[7],该酶具有较高纤溶活性及良好抗凝、溶栓作用,不溶解血细胞^[8],可尝试用于制备新型溶栓药。袁慎亮等^[15]从海泥、土壤等环境中筛选到 1 株纤溶酶活性及稳定性较好的纤溶酶产生菌能有效溶解血块中纤维蛋白,并且对红细胞不产生降解作用,为一种新型、安全、实用的食品级功能性添加剂和药用溶栓剂,董明盛等^[2]从豆豉等食品中筛选得到高活性纤溶酶菌株 NK-5,确认 NK-5 菌株在分类上归属枯草杆菌,枯草杆菌是公认的安全性细菌。李小东等^[16]对豆豉在动物体内的溶栓作用进行了研究,以饲喂豆豉和纤溶豆豉提取液为试验组,饲喂全价营养鼠粮和蒸馏水为对照组进行试验,结果表明试验组在 15 d 后,凝血酶原时间、凝血酶时间均明显延长($P < 0.05$);在饲喂 10 d 后,纤维蛋白降解产物 D-二聚体呈阳性,表明豆豉具有激活动物体内机体纤溶系统和抑制凝血系统的作用。袁军等^[17]采用断尾法、玻片法和大鼠尾血栓模型法研究豆豉溶栓酶体内溶栓作用。试验结果表明:通过 7 d 灌胃给药,当剂量为 80 和 $40 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 时,均能明显延长体内出血和凝血时间,抑制血液凝聚;当剂量达 $80 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 对大鼠尾部血栓具有明显的溶栓效果。急性毒性试验结果显示无明显的毒副作用,并制备成胶囊制剂。胡少瑾等^[18]以贵州带豆豉酶提取物制备的纳乐胶囊,用于临床治疗急性脑梗死。因而本试验筛选得到的纤溶酶菌株具有开发成新一代溶栓药的潜力。

本文收集全国 14 个地区的纳豆和传统食品豆豉,采用水解酪蛋白初筛,筛选出 39 株具纤溶酶活性的菌株,以猪血粉平板进行复筛,得到 11 株在猪血粉平板具有较好溶栓效果的菌株,再以纤维蛋白平板测酶活,得到 5 株产酶能力较强纤溶酶菌株,通过 16S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增,PCR 产物序列在 NCBI 网站中进行同源性比对,应用 MEGA 6.0 软件中邻接法(neighbour-joining methods, NJ)构建系统发育树。结果表明分离获得的 5 株菌株以枯草芽孢杆菌为主,其中 FJDC-02、CQDC-03 菌株的溶解透明圈面积均高于国内文献报道的溶圈面积^[24],纤溶酶活性均高于马明筛选的 4411、B45、481、465 菌株^[12],属于高产菌株。均可进一步研究与开发,为人类制备新型溶栓药提供更多可用的资源。

参考文献

- [1] Sumi H, Hamada H, Tsushima 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(10):1110-1111.
- [2] 董明盛, 江晓, 刘诚, 等. 胞外纤溶酶产生菌的筛选及其产酶条件研究[J]. *食品与发酵工业*, 2001, 27(1):23-27. (Dong M S, Jiang X, Liu C, et al. Isolation of high-yielding lysozyme strain and optimization of its fermentation conditions *in vivo* [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2001, 27(1):23-27.)
- [3] 薄金岭. 纳豆激酶高产菌株的筛选及发酵条件的优化[J]. *大豆通报*, 2004(2):22-23. (Bo J L. Selection of high nattokinase-producing strains and optimization of the fermentation conditions [J]. *Soybean Bulletin*, 2004(2):22-23.)
- [4] 奚晓琦, 王加启, 卜登攀, 等. 纳豆芽孢杆菌的分离鉴定及纳豆激酶高产菌株的筛选 [J]. *东北农业大学学报*, 2009, 40(11):69-75. (Xi X Q, Wang J Q, Bu D P, et al. Identification and screening of high nattokinase activity producing strains of *Bacillus subtilis* Natto [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2009, 40(11):69-75.)
- [5] 赵仲麟, 李淑英, 聂莹, 等. 纳豆激酶生产菌株分离筛选与热稳定性分析[J]. *生物技术进展*, 2013, 3(4):277-280. (Zhao Z L, Li S Y, Nie Y, et al. Isolation of nattokinase producing strain and analysis of its thermal stability [J]. *Current Biotechnology*, 2013, 3(4):277-280.)
- [6] 李江伟, 冉国侠, 陈新梅. 豆豉溶栓酶的分离纯化及其体外溶栓作用[J]. *中国生化药物杂志*, 1999, 20(3):148-150. (Li J W, Ran G X, Chen X M. Isolation and thrombolytic effect of the fibrinolytic enzyme from semen sojae preparatum *in vitro* [J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 1999, 20(3):148-150.)
- [7] 刘宇峰, 王金英, 孙岸, 等. 豆豉纤溶酶保健功能食品的研制 [J]. *大豆通报*, 2000(2):22-23. (Liu Y F, Wang J Y, Sun A, et al. The progress in research of fibrinolytic enzyme in dietary supplement of soy sauce [J]. *Soybean Bulletin*, 2000(2):22-23.)
- [8] 彭勇, 张义正. 豆豉溶栓酶产生菌的筛选及其酶学性质的初步研究 [J]. *高技术通讯*, 2002, 12(2):30-34. (Peng Y, Zhang Z Y. Isolation and characterization of fibrinolytic enzyme producing strain DC-4 from chinese douchi and primary analysis of the enzyme property [J]. *Chinese High Technology Letters*, 2002, 12(2):30-34.)
- [9] 刘彩平, 崔堂兵. 产纤溶酶微生物的筛选鉴定及生长模型的建立 [J]. *食品与发酵工业*, 2010, 36(6):12-19. (Liu C P, Cui T B. Effect of pepsin controlled hydrolysis on emulsifying capacity of soybean protein isolates [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2010, 36(6):12-19)
- [10] 姜琼, 赵璇, 马明. 豆豉纤溶酶产生菌的筛选 [J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(1):14, 48. (Jiang Q, Zhao X, Ma M. Screening of fibrinolytic enzyme strains from Chinese lobster sauce [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 35(1):14, 48.)

脂过氧化及保护酶活性的影响[J]. 中国水稻科学,2003,17(1):57-60. (Pan X H, Liu S Y, Li F, et al. Effect of low-phosphorus stress on membrane lipid peroxidation and protective enzyme activities in rice leaves of different cultivars [J]. Chinese Journal of Rice Science,2003,17(1):57-60.)

[32] Terry N, Ulrieh A. Effects of potassium defieieney on the photos thesis and respiration of leaves of sugar beet under conditions of low sodium supply [J]. Plant Physiology, 1973, 51 (6): 1099-1101.

[33] 余松烈. 作物栽培学(北方本) [M]. 北京:农业出版社, 1980:102-108. (Yu S L. Crop cultivation (North) [M]. Beijing: Agriculture Press, 1980:102-108.)

[34] 王树起,韩晓增,严君,等. 缺磷胁迫对大豆根系形态和氮磷吸收积累的影响[J]. 土壤通报,2010,41(3):644-650. (Wang S Q, Han X Z, Yan J, et al. Impact of phosphorus deficiency stress on root morphology, nitrogen concentration and phosphorus accumulation of soybean (*Glycine max* L.) [J]. Chinese Journal of Soil Science,2010,41(3):644-650.)

[35] 丁玉川,陈明昌,程滨,等. 磷营养对不同大豆品种生长和磷吸收利用效率的影响[J]. 华北农学报,2006,21(1):121-124. (Ding Y C, Chen M C, Cheng B, et al. Effect of phosphorus on plant growth and phosphorus uptake and use efficiency in different soybean cultivars[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, ,2006,21(1):121-124.)

[36] 赵华,徐森,石磊. 植物根系形态对低磷胁迫应答的研究进展[J]. 植物学通报,2006, 23(4):409-417. (Zhao H, Xu S, Shi L. Advances in plant root morphology adaptability to phosphorus deficiency stress [J]. Chinese Bulletin of Botany,2006, 23(4): 409-417.)

[37] 丁洪,李生秀. 大豆品种耐低磷和对磷肥效应的遗传差异[J]. 植物营养与肥料学报,1998,4(3):257-263. (Ding H, Li S X. Genetic difference of response of soybean cultivars to low phos-

phorus stress and phosphorus fertilizer [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science,1998,4(3):257-263.)

[38] 胡根海,章建新,唐长青. 北疆春大豆生长动态及干物质积累与分配[J]. 新疆农业科学,2002,39(5):264-267. (Hu G H, Zhang J X, Tang C Q. Growth changing and dry matter accumulation and distribution in spring soybean Beijiang [J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2002,39(5):264-267.)

[39] 王建国,李兆林,李文斌,等. 磷肥与大豆产量及品质的关系[J]. 农业系统科学与综合研究,2006,22(1):55-57. (Wang J G, Li Z L, Li W B, et al. Application of phosphorus in relation to soybean yield and quality [J]. System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture,2006,22(1):55-57.)

[40] 程凤娟,涂攀峰,严小龙,等. 酸性红壤中磷高效大豆新种质的磷营养特性[J]. 植物营养与肥料学报,2010,16(1):71-81. (Cheng F X, Tu P F, Yan X L, et al. Phosphorus nutrition characters for new soybean germplasm with high phosphorus efficiency in acidic red soils [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science,2010, 16(1):71-81.)

[41] 王维军. 大豆的磷素营养与施肥[J]. 中国农业科学,1963(11):41-44. (Wang W J. Phosphorus nutrition and fertilization of soybean [J]. Scientia Agricultura Sinica,1963(11):41-44.)

[42] 乔振江,蔡昆争,骆世明. 低磷和干旱胁迫对大豆植株干物质积累及磷效率的影响[J]. 生态学报,2011,31(19):5578-5586. (Qiao Z J, Cai K Z, Luo S M. Interactive effects of low phosphorus and phosphorus efficiency of soybean plants[J]. Acta Ecologica Sinica,2011,31(19):5578-5586.)

[43] Kutama A S, Aliyu B S, Saratu A O. Influence of phosphorus fertilizer on the development of root nodules in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and soybean (*Glycine max* L. Merrill) [J]. International Journal of Pure and Applied Sciences, 2008, 2 (3): 27-31.

(上接第 170 页)

[11] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1952,40(2):346-351.

[12] 马明,杜金华,于玲,等. 高纳豆激酶酶活枯草芽孢杆菌的筛选及菌种鉴定[J]. 中国食物与营养, 2006(8): 29-32. (Ma M, Du J H, Yu L, et al. Screening and identification of *Bacillus subtilis* strains with high activity of Nattokinase-producing [J]. Food and Nutrition in China, 2006(8): 29-32.)

[13] 马明,杜金华,王囡,等. 一株产纳豆激酶菌株的分离筛选及鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(5): 37-41. (Ma M, Du J H, Wang N, et al. Indentification and screening of a strain of high nattokinase [J]. Food and Fermentation Industries, 2007, 33(5): 37-41.)

[14] Stackebrandt E, Goebel B M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. International Journal of Systematic Bacteriology,1994,44:846-849.

[15] 袁慎亮,邢德明,窦少华,等. 一株产纤溶酶菌株的分离鉴定及其纤溶组分分析[J]. 微生物学通报, 2014, 41(9):1843-1849. (Yuan S L, Xing D M, Dou S H, et al. Isolation and i-

dentification of a fibrinolytic enzyme producing bacterium and its analysis of the fibrinolytic components [J]. Microbiology, 2014, 41(9):1843-1849.)

[16] 李小东,王成涛,赵磊,等. 纤溶豆豉的制备及其对小鼠溶栓效果的评价[J]. 食品科学,2012,33(3):228-231. (Li X D, Wang C T, Zhao L, et al. Preparation of fibrinolytic douchi and evaluation of its thrombolytic effectiveness *in vivo* [J]. Food Science, 2012,33(3):228-231.)

[17] 袁军,谢声勇,沈榕强,等. 溶栓酶体内溶栓作用初探及其胶囊剂的制备[J]. 中国农学通报,2012,28(35):59-64. (Yuan J, Xie S Y, Shen R Q, et al. Primary studies on fibrinolytic function of fibrinolysis enzyme *in vivo* and preparation of its capsules [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28 (35): 59-64.)

[18] 胡少瑾,马世江,高秀丽. 纳乐胶囊治疗急性脑梗死的临床研究[J]. 中国民康医学,2013(6):52-55. (Hu S J, Ma S J, Gao X L. The clinical study on treatment of acute cerebral infarction with NaLe capsule [J]. Medical Journal of Chinese People's Health, 2013(6):52-55.)