

豆豉纤溶酶产生菌分离和鉴定

朱春节 汤祝华 谢秀祯*

(海南师范大学生命科学学院 海南 海口 571158)

摘要: 从全国各地收集豆豉样品, 采用不同的培养基进行富集培养, 并利用纤维蛋白平板法高效获得了 13 株形态差异较大的产纤溶酶菌株。通过传统方法、化学方法以及 16S rRNA 序列分析对这 13 株菌进行分类鉴定, 它们分属于芽孢杆菌属、链霉菌属、假单胞菌属以及节杆菌属, 包括 9 种细菌, 丰富了豆豉纤溶酶产生菌菌种资源。

关键词: 豆豉, 豆豉纤溶酶, 分离, 鉴定

Screening and Identification of Douchi Fibrinolytic Enzyme-producing Strains

ZHU Chun-Jie TANG Zhu-Hua XIE Xiu-Zhen*

(Biology Department of Hainan Normal University, Haikou, Hainan 571158, China)

Abstract: Various samples of Douchi, a kind of traditional Chinese fermented soybean food, were collected from provinces of China. Different strains with fibrinolytic activity were screened from these samples by enrichment culture medium and fibrin plate was used to confirm their fibrinolytic activity. Thirteen distinct strains were identified as *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Pseudomonas* sp. and *Arthrobacter* sp. by classical classification approaches, chemical approaches and 16S rDNA sequencing. Nine Dou chi fibrinolytic enzyme-producing strains were gained.

Keywords: Douchi, Douchi fibrinolytic enzyme (DFE), Screening, Identification

血栓栓塞性疾病致死率高, 对人类健康危害大。医学上治疗这类疾病的手段可分为 3 类^[1], 包括外科手术清除血栓或切除栓塞部位的血管、让患者长期服用抗凝剂, 减低凝血倾向, 以及注射溶栓剂溶解血栓。由于溶栓疗法致死率相对较低且费用也低得多, 因此成为最为有效并且易于推广的治疗手段。于是, 近年来科学工作者不断探索以期开发新型、高效的溶栓药物。受日本纳豆激酶相关研究的启发^[2], 我国的微生物学工作者开展了大量对传统发

酵食品豆豉的研究, 并且成效显著。目前已从发酵豆制品中成功筛选到产纤溶酶的枯草芽孢杆菌^[3-4]、解淀粉芽孢杆菌^[5]、蜡状芽孢杆菌^[6]、霉菌^[7]以及凝结芽孢杆菌^[8]等, 并将分离到的纤溶酶命名为豆豉纤溶酶(DFE, Douchi fibrinolytic enzyme)。在此基础上还进行了酶的分离纯化、酶学性质、酶的体外溶栓效果及酶的分子生物学等研究^[9-16]。实验证明豆豉纤溶酶具有较好的体外溶栓效果, 具备开发成为治疗和预防血栓栓塞性疾病药物的潜力。尽管近 10

基金项目: 海南省自然科学基金项目(No. 30707)

*通讯作者: Tel: 86-898-65883521; ✉ xiexiu zhen@sina.com

收稿日期: 2010-06-20; 接受日期: 2010-09-06

年来国内这一领域研究的成果很多,但对于产纤溶酶菌种库的构建至今尚未有报道。我国各地生产的豆豉由于工艺和曲种各异,可能存在多样化的产豆豉纤溶酶微生物,它们能在一定程度上代表豆豉纤溶酶产生菌多样性,因此从中筛选各种豆豉纤溶酶产生菌以构建菌种库,将为新型溶栓药物及保健食品的开发奠定基础。

本研究从全国各地广泛收集豆豉样品,然后从中筛选具有纤溶活性,且形态有较大差异的菌株,结合经典方法和现代分子生物学手段进行鉴定,以期构建一个豆豉纤溶酶菌株库。

1 材料与方 法

1.1 样品来源

黑龙江、辽宁、吉林、北京、河北、山东、河南、四川、江苏、安徽、湖南、广东、广西、云南、海南等地豆豉。

1.2 主要试剂

巴比妥钠-盐酸缓冲液,牛凝血酶溶液,尿激酶溶液(100 IU/mL)^[17]。

牛纤维蛋白原、凝血酶和尿激酶(标品)购于中国药品生物制品检定所,纤维蛋白为东京化成工业株式会社产品,其它试剂均为国产分析纯。

1.3 培养基

(1) 基本培养基。高氏一号合成培养基 pH 7.0-7.2, 营养肉汤培养基 pH 7.2-7.4, 察氏培养基 pH 6.4-6.7。

(2) 复筛培养基。基本培养基中添加 2%纤维蛋白, pH 7.2。

(3) 琼脂糖-纤维蛋白平板^[18-19]。

1.4 方法

(1) 样品的预处理。在超净工作台上称取 1 g 样品加入 10 mL 灭菌生理盐水充分研磨转入灭菌离心管中, 1000 r/min 离心 10 min, 取上清。

(2) 菌种的初筛。样品溶液梯度稀释后涂布于基本培养基平板上, 设置 3 个重复, 37°C 培养过夜, 然后挑取形态差异大的菌株进行复筛。

(3) 菌种的复筛。用无菌接种针将初筛得到的菌株接种在复筛培养基平板上, 37°C 培养 18 h 后测定菌落直径和透明圈直径, 计算溶圈与菌落的面积比, 选择比值大的菌落。

(4) 纤溶活性验证。将在复筛培养基上产生水

解圈的菌落接种至相应的基本培养基中, 200 r/min 培养 24 h, 取 10 μ L 培养液加入到琼脂糖-纤维蛋白平板小孔中验证其纤溶活性, 有水解圈的即为有纤溶活性的菌株。将菌种进行斜面保藏和超低温甘油保藏。

(5) 菌种常规鉴定。参考《伯杰细菌鉴定手册》第 8 版^[20]及《常见细菌系统鉴定手册》(2001 年)^[21]等文献的方法进行菌种鉴定。

(6) 基因组 DNA 提取以及 16S rDNA PCR 扩增。用天根公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Bacteria DNA Kit)提取 13 株菌总 DNA, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L): 模板 DNA 1 μ L, 27F (10 μ mol/L) 1 μ L, 1492R (10 μ mol/L) 1 μ L, 10 \times Taq Buffer (含 10 mol/L MgCl₂ 15 mmol/L) 5 μ L, dNTPs Mixture (2.5 mmol/L) 4 μ L, Taq plus (2.5 U/ μ L) 0.6 μ L, ddH₂O 37.4 μ L。

PCR 反应条件: 94°C 3 min; 94°C 30 s, 55°C 45 s, 72°C 2 min, 34 个循环; 72°C 10 min。采用 1% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物电泳检测。

(7) 16S rRNA 测序及系统发育分析^[22-23]。把 PCR 产物送交上海生工生物工程技术有限公司测序。

将测序获得的 16S rRNA 序列分别在 www.ncbi.nlm.nih.gov 中运用 BLAST 软件进行同源性分析, 并运用 DNAMAN 对同源性高的序列进行比对。最后用 MEGA 3.1 软件构建系统发育树, 并进行系统进化分析。

(8) 高效液相色谱测 G + C mol% 条件。选用 20 mmol/L KH₂PO₄ 缓冲液(pH 5.6)和甲醇 90:10 (V/V)作为流动相, 室温, 流速 1 mL/min, 色谱柱规格: 依利特 ODS-BP (200 mm \times 4.6 mm, F5 μ m), 检测波长: 254 nm, 进样量: 20 μ L。

(9) 标准碱基混合液的配制^[24-26]。

(10) DNA 水解^[27]。取 10 μ L 高氯酸于装有 DNA 的离心管中, 沸水煮 1 h, 管内液体变为棕黑色, 加水 40 μ L, 离心取上清, 即为 DNA 水解产物, 用 NaOH 溶液调节 pH 值约为 6.0 使其与流动相酸碱度相近。

2 结果与分析

2.1 纤溶酶产生菌的筛选

利用含纤维蛋白培养基从 56 个样品中筛选到

115 株能形成纤维蛋白水解圈的菌株。将这些菌株点样琼脂糖—纤维蛋白平板验证产酶活性, 并挑选 13 株有水解圈且菌落形态差异较大的菌株进行鉴定。分别命名为 HS1、HS3、HS4、HS5、HS6、HS7、HS8、HS9、HS10、HS11、HS12、HS13、HS14。

2.2 纤溶酶产生菌的鉴定

2.2.1 属的鉴定: 将筛选得到的菌株按文献手册中相关指标进行属分类鉴定, 结果见表 1。

(1) 菌落形态。(2) 染色。除 HS9 染色情况不稳定外, 其余菌幼龄菌体经革兰氏染色呈紫色, 即为革兰氏阳性菌, 且能形成明显芽孢。HS9、HS11 不呈明显杆状, 似圆形或卵圆形细胞; 48 h 培养物芽孢染色, 无芽孢。HS1 呈分支状, 圆孢子, 基内菌丝网分布, 无隔。

2.2.2 种的鉴定: (1) 生理生化特征。综合多种生理生化实验, 对菌株进行鉴定, 具体生理生化特征见表 2。

综合上述实验结果, 发现 13 株菌分属芽孢杆菌属、链霉菌属、节杆菌属和微球菌属。但特征并不完全与参考文献中种属特性一致, 可能是由于微生物易变异, 种属特征随时会产生变化, 也可能是操作过程中选取的方法和材料存在细微差异导致结果有出入。

(2) 16S rRNA 序列分析。以提取的基因组 DNA 为模板, 以 27F, 1492R 为引物, 进行 PCR 扩增, 获得了 13 株待鉴定菌的 16S rRNA。将扩增产物送交上海生工测序, 获得 13 株菌的 16S rRNA 近全长序列。在 GenBank 注册, 登录号分别为: HS1:

GU323364; HS3: GU323365; HS4: GU323376; HS5: GU323366; HS6: GU323367; HS7: GU323368; HS8: GU323369; HS9: GU323371; HS10: GU323370; HS11: GU323375; HS12: GU323372; HS13: GU323373; HS14: GU323374。

(3) 系统发育树的构建。利用 DNAMAN 软件将测序所得的序列与 GenBank 中的序列进行比对, 找出同源性高的序列, 再利用 MAGE 3.1 构建系统发育树。结果见图 1。

由比对结果和系统发育分析可知, 与 HS1 最相近的种都是链霉菌, HS9 与铜绿假单胞菌最相近, HS11 与节杆菌属最相近, 其余菌都与芽孢杆菌属最相近。以 16S rRNA 序列作生物进化和系统分类研究有很多优点, 如普遍存在于细菌中、序列保守、信息量大以及易于分析等, 但是在实际操作中往往由于测序过程的细微误差或者对测序结果进行拼接时的误差而导致最终进行分析的序列不能代表待鉴定菌株的 16S rRNA 序列特征, 那么, 在此基础上得到的分析结果也可能不可靠。因此, 应该将 16S rRNA 序列分析与常规生理生化鉴定以及 GC 百分比测定等指标相结合, 以尽可能全面的鉴定指标来判定菌种的进化地位。

(4) G + Cmol%分析。DNA G + Cmol%即 DNA 的碱基组成, 具有种特异性且不受菌龄和外界因素的影响, 成为微生物分类和鉴定的重要指标^[28], GC 比相差低于 2%时, 无分类学意义; 种内各株间的差别约为 2.5%—4.0%; 若相差在 5%以上, 则属于不同种; 假如差距超过 10%则是不同的属。实验菌株 GC 比见表 3。

表 1 菌落形态特征
Table 1 Colony configuration properties of the strains

菌株编号 Number	菌落形态特征 Colony configuration properties of the strains
HS1	近圆形, 干燥, 凸出培养基, 白色, 中部有轮状, 边缘圆整, 不透明, 较易挑取
HS3	圆形, 表面湿润, 中部有圈状, 贴培养基, 奶酪色边缘光滑, 易挑取
HS4	圆形, 表面干燥, 有干粉状, 贴培养基, 不透明, 边缘波状, 较易挑取
HS5	形态不规则, 中部色略显黄, 不透明, 边缘粘液状光滑
HS6	圆形, 表面湿润, 奶酪色, 不透明, 边缘波状
HS7	不规则, 表面干燥, 中部白色皱, 有清亮露珠状突起, 边缘丝状, 贴培养基, 难挑取
HS8	圆形, 表面湿润, 半透明, 边缘波状, 凸出培养基, 表面覆盖清亮黏液, 内部有米白色块状, 易挑取
HS9	略呈圆形, 表面湿润, 浅灰绿色, 半透明, 边缘波状, 贴培养基, 易挑取
HS10	圆形, 幼龄菌表面湿润, 半透明, 表面覆盖清亮黏液, 内部有米白色斑块, 凸出培养基, 老龄菌较干, 贴培养基, 易挑取
HS11	圆形, 表面较光滑, 湿润浅黄色, 易挑取
HS12	近圆形, 表面不光滑, 乳白色, 菌落较大, 易挑取
HS13	近圆形, 表面较湿润, 早期色浅, 48 h 以后的培养物呈浓黄色, 易挑取
HS14	圆形, 表面湿润光滑, 偏黄色, 贴培养基, 边缘呈波状, 易挑取

表2 菌株生理生化特征
Table 2 Physiological and biochemical properties of the strains

菌株编号 Number	HS1	HS3	HS4	HS5	HS6	HS7	HS8	HS9	HS10	HS11	HS12	HS13	HS14
生理生化特征													
所在的属 Genus	<i>Streptomyces</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
革兰氏染色 Gram stain	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+
接触酶 Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
运动性 Mobility	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
淀粉水解 Hydrolyse of starch	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
酪素水解 Hydrolyse of Casein	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
明胶液化 Gelatin liquidized		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
V-P 测定 V-P test	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
V-P 培养液 pH pH of V-P culture	7.35	5.21	6.00	5.80	5.30	5.28	5.38	4.60	5.94	ND	ND	ND	5.49
葡糖发酵产酸 Acid production of glucose fermentation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
葡糖发酵产气 Gas production of Glucose fermentation	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

注: V: 可变; +: 阳性; -: 阴性; ND: 未测。

Note: V: Variable; +: Positive; -: Negative; ND: Not detected.

表3 HPLC 测得的菌株 DNA G + Cmol%
Table 3 The DNA base G + Cmol% by HPLC

菌株编号 Number	16S rDNA 测序所在的科或属 Genus	碱基毫克分子数 Base content (mmol)				G + Cmol%	文献参考值 Reference
		C	G	T	A		
HS1	<i>Streptomyces</i>	342.54	612.53	132.99	294.13	69.10	69%–73%
HS3	<i>Bacillus</i>	462.92	829.33	692.03	972.84	42.85	39%–43%
HS4	<i>Bacillus</i>	808.49	1203.41	1221.25	1521.17	42.32	42%–43%
HS5	<i>Bacillus</i>	172.60	264.07	224.07	229.35	49.06	43%–47%
HS6	<i>Bacillus</i>	3830.48	3715.36	4975.16	5090.14	42.84	42%–43%
HS7	<i>Bacillus</i>	395.75	885.88	387.12	500.20	59.09	32%–62%
HS8	<i>Bacillus</i>	2106.42	30731.34	3472.30	18530.52	59.58	32%–62%
HS9	<i>Pseudomonas</i>	14861.10	25440.47	8375.45	11453.30	67.02	67%
HS10	<i>Bacillus</i>	985.03	2407.11	1855.06	2051.57	46.48	32%–62%
HS11	<i>Arthrobacter</i>	622.21	955.43	413.67	427.25	65.23	60%–72%
HS12	<i>Bacillus</i>	1703.27	7818.70	1960.55	5159.81	57.22	43%–47%
HS13	<i>Bacillus</i>	808.49	1203.41	1221.25	1521.17	56.73	32%–62%
HS14	<i>Bacillus</i>	2115.44	1191.96	1244.27	1278.07	42.32	32%–62%

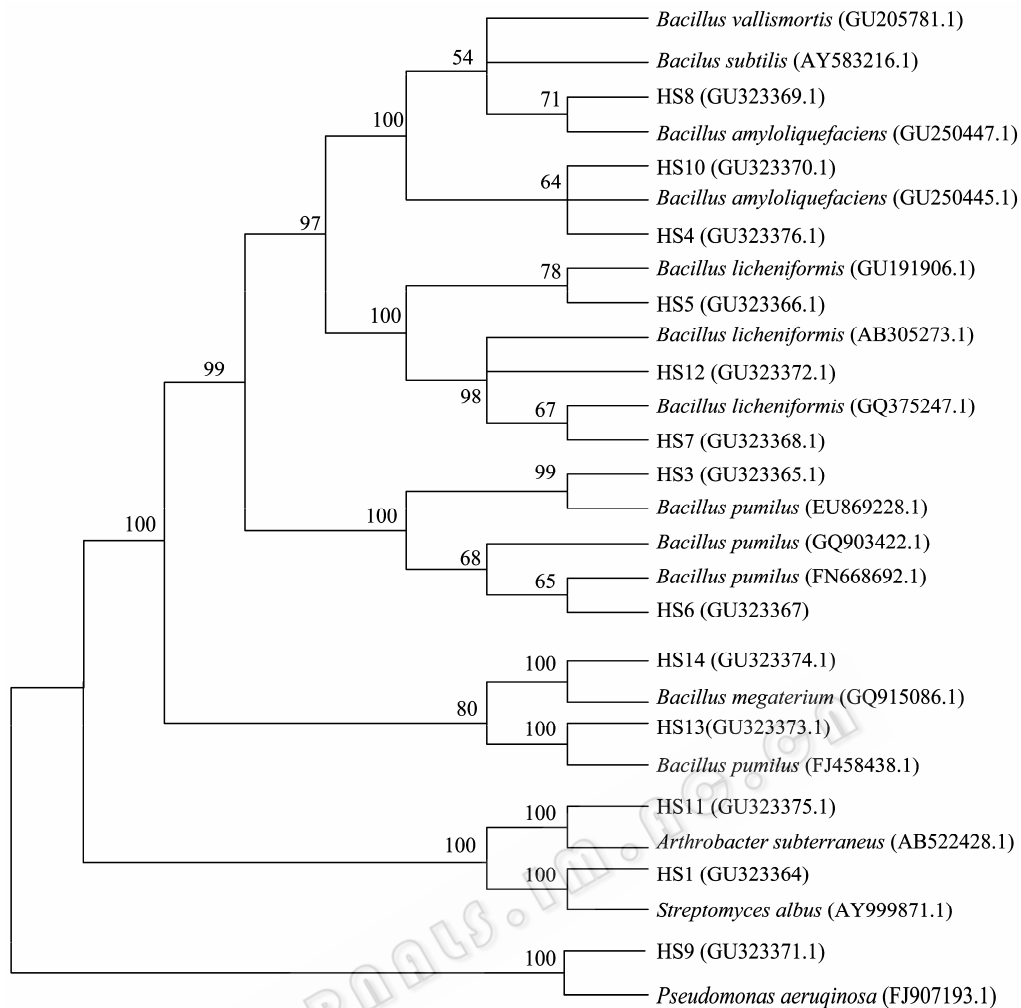


图 1 13 株菌系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of strains HS1-HS14 and related strains based on 16S rRNA

注: 在树节上的数字代表 1000 取样的百分比, 括号中为菌株的 GenBank 登录号, 比例尺代表 2% 的序列差异。

Note: The numbers at the nodes indicate the percentages of occurrence in 1000 bootstrapped trees. The GenBank accession number of each strain is indicated in parentheses and the scale bar represents 2% sequence difference.

实验菌株的 GC 百分比均在 16S rRNA 系统发育分析确定的属范围内, 即 HS1 属于链霉菌属, HS9 属于假单胞菌属, HS11 属于节杆菌属, 其余菌均为芽孢杆菌。这一结果与 16S rRNA 系统发育分析一致, 证明前期的分类结果可靠。

综合上述鉴定指标对所筛菌株进行定位, 初步得到由: *Streptomyces albus*, *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Arthrobacter subterraneus*, *B. cibi* 以及 *B. megaterium* 9 种豆豉纤溶酶产生菌, 所得菌株具体分类情况见表 4。

3 讨论

本实验以广泛收集的豆豉为材料, 利用不同富

菌株编号 Number	鉴定结果 Species	菌株编号 Number	鉴定结果 Species
HS1	<i>Streptomyces albus</i>	HS9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
HS3	<i>B. pumilus</i>	HS10	<i>B. amyloliquefaciens</i>
HS4	<i>B. subtilis</i>	HS11	<i>Arthrobacter subterraneus</i>
HS5	<i>B. licheniformis</i>	HS12	<i>B. licheniformis</i>
HS6	<i>B. pumilus</i>	HS13	<i>B. cibi</i>
HS7	<i>B. licheniformis</i>	HS14	<i>B. megaterium</i>
HS8	<i>B. amyloliquefaciens</i>		

集培养基中获得多样化的微生物, 再用含纤维蛋白的初筛培养基初步检测差异菌株是否有纤溶活性, 进而利用纤维蛋白平板法验证菌株的纤溶酶活性, 顺利筛选到 115 株具有纤溶活性的菌株。对筛

选到的菌株进行形态学及生理生化初步鉴定后归为 13 类存在较大形态差异的菌株。从中挑选 13 株作为代表, 分别编号 HS1、HS3、HS4、HS5、HS6、HS7、HS8、HS9、HS10、HS11、HS12、HS13 和 HS14, 经传统方法鉴定这 13 株菌分属枯草芽孢杆菌、链霉菌、微球菌属或节杆菌属。但是所做的各种鉴定指标的结果并不完全符合上述属的特征, 这可能是由于频繁的遗传物质交换, 使微生物群落表现出一定的遗传可塑性和灵活性, 整个群落遗传稳定性相对较差。另外微生物为适应各种生境条件, 采取灵活的代谢方式和适应策略, 使其代谢途径呈现高度多样性和复杂性, 这就导致按目前所建立的微生物分类系统可能不能准确给微生物定位。本研究结合分子生物学手段和系统发育分析, 鉴定结果基本符合经典鉴定结果。若进一步结合化学指标及数值分类等更加丰富更加全面的分类鉴定方法对上述菌株进行鉴定可能得到更加准确可靠的结果。

本实验筛选得到 *Streptomyces albus* 等 9 种细菌, 丰富了产豆豉纤溶酶菌株资源, 但是未筛选到已见报道的解淀粉芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌以及霉菌。这可能是由于各地制作豆豉均会添加一定的佐料, 尤其是盐和辣椒等刺激性调料, 并且制作工艺差异也较大, 会使微生物为适应环境而产生不确定的变化。同时, 筛选菌株的过程中培养基配方、培养条件以及个人操作差异也可能导致菌种丢失。

现有的工作成果进一步证明了, 豆豉中产纤溶酶微生物的多样性相当高, 筛选出各色菌株的可能性很大。继续筛选菌种, 并对现有菌种信息进行深入研究, 构建完善的菌种及信息库有望获得完善的产豆豉纤溶酶菌种资源库, 为开发溶栓药物提供微生物菌株和理论依据。

参 考 文 献

- [1] 隋玉杰. 纤溶酶产生菌的筛选、鉴定及其液体发酵条件的研究. 吉林大学硕士学位论文, 2006.
- [2] Sumi H, Hamada H, Tsushima H, *et al.* A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto, a popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia*, 1987, **43**(10): 1110-1111.
- [3] 李江伟, 冉国侠, 陈新梅. 豆豉溶栓酶的分离纯化及体外溶栓作用. 中国生化药物杂志, 1999, **20**(3): 148-150.
- [4] 吴思方, 向梅, 王伟平, 等. 豆豉纤溶酶产生菌的筛选及菌种鉴定. 微生物学杂志, 2005, **25**(1): 21-24.
- [5] 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. 高技术通讯, 2002(2): 30-34.
- [6] 张自强. 豆豉纤溶酶高产菌株的筛选及其酶学性质的研究. 广西大学硕士学位论文, 2005.
- [7] 闵伟红, 李佳, 王影, 等. 产纤溶酶霉菌的筛选及诱变. 食品科学, 2007, **28**(6): 226-229.
- [8] 魏静, 徐耀波, 陈怀辉. 产纤溶活性酶凝结芽孢杆菌的分离鉴定及其酶活性质初探. 西南大学学报: 自然科学版, 2009, **31**(3): 90-93.
- [9] 阎家麒, 童岩, 臧莹安. 豆豉纤溶酶的纯化及其性质研究. 药物生物技术, 2000, **7**(3): 149-152.
- [10] Wang Chengtao. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2006(33): 436-444.
- [11] Peng Y, Huang Q, Zhang Rh, *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. *Biochem Physiol Biochem Mol Biol*, 2003, **134**(1): 45-52.
- [12] 彭勇. 豆豉纤溶酶的纯化及其基因的克隆与表达研究. 四川大学博士学位论文, 2002.
- [13] 齐海萍. 豆豉纤溶酶的酶学特性及功能性质研究. 江南大学博士学位论文, 2004.
- [14] Lu Xiao, Ren-Huai Zhang, Yong Peng, *et al.* High efficient gene expression of a fibrinolytic enzyme (Subtilisin DFE) in *Bacillus subtilis* mediated by the promoter of α -amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4. *Biotechnology Letters*, 2004, **26**(17): 1365-1369.
- [15] 崔堂兵, 郭勇, 罗文华, 等. 定点突变提高豆豉纤溶酶的酶活性和底物特异性的研究. 自然科学进展, 2008, **18**(7): 826-832.
- [16] 梁惠仪, 郭勇. 全基因组重排育种技术提高豆豉纤溶酶菌产酶量. 中国生物工程杂志, 2007, **27**(10): 39-43.
- [17] 范晓丹. 新型纤溶酶的产生菌选育、发酵优化及酶学性质研究. 华南理工大学博士学位论文, 2006.
- [18] Tage Astrup, Sten mullertz. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys*, 1952(40): 346-351.
- [19] 范晓丹, 郭勇, 刘柳. 产纤溶酶菌种的鉴定及纤溶酶的分离纯化. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2007, **35**(4): 91-94.
- [20] RE 布坎南, NE 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册. 第 8 版. 北

