

产纤溶酶乳酸菌筛选及安全性评估

Screening and safety evaluation of lactic acid bacteria producing fibrinolytic enzyme

尹梦雯 周倩 雷婵 胡欣洁

YIN Meng-wen ZHOU Qian LEI Chan HU Xin-jie

(四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014)

(College of Food Sichuan Agriculture University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

摘要: 以从传统发酵食品中分离出的 2 株产纤溶酶的粪肠球菌 HYD09 与 HYN06 为对象, 测定其发酵上清液酶活, 对菌株进行安全性评估。选较安全的菌株进行胃肠道生存能力测试; 同时对发酵上清液进行蛋白酶处理试验; 从发酵液中获得粗酶液, 进行活性电泳。结果表明: HYD09 和 HYN06 发酵上清液酶活分别为 115.3 U/mL 和 107.2 U/mL; HYD09 和 HYN06 吲哚试验、硝酸盐还原酶试验、氨基脱羧酶试验、溶血试验均为阴性, 对 14 种抗生素无多重耐药性; HYD09 无毒性基因检出, HYN06 检出 *esp* 毒性基因。证明 HYD09 菌株是安全的。进一步研究发现, 菌株 HYD09 有一定的耐酸耐胆盐能力; HYD09 发酵上清液经胃蛋白酶和胰蛋白酶处理仍具有纤溶活性; 且菌株 HYD09 发酵上清液的粗酶中有 2 种主要的组分, 但具有纤溶活性的组分只有 1 种。

关键词: 纤溶酶; 乳酸菌; 鉴定; 安全性; 活性电泳

Abstract: In this study, 2 strains of *Enterococcus faecalis* HYD09 and HYN06 isolated from traditional fermented food were used to determine the enzyme activity of fermentation supernatant, and evaluate the basic safety of the strains. The safer strain were tested for gastrointestinal viability; meanwhile, the fermentation supernatant was subjected to protease; the crude enzyme was obtained from the fermentation broth and its activity was measured by Native-Page. The results showed: the enzyme activities of HYD09 and HYN06 fermentation supernatant were 115.3 U/mL and 107.2 U/mL, respectively; HYD09 and HYN06 indole test, nitrate reductase assay, amino acid decarboxylase test hemolysis test were negative, no multiple antibiotic resistance to 14 kinds of antibiotics. Moreover, no virulence gene was detected in strain HYD09, while the virulence gene *esp* was detected in strain HYN06. This confirmed that HYD09 strains were safe. Further studies showed that the

HYD09 had the ability of acid resistance and bile salt tolerance; besides, the fermentation supernatant of strain HYD09 still had fibrinolytic activity after pepsin and trypsin treatment. Two main components were found in the crude enzyme of the fermentation supernatant of HYD09 strain, and one of them had fibrinolytic activity.

Keywords: fibrinolytic enzyme; lactic acid bacteria; identification; safety; Native-Page

心脑血管疾病被视为 21 世纪人类健康最危险的杀手。据报道^[1], 中国每年有 260 万人死于脑卒中或心肌梗死, 每年需要进行溶血栓治疗的人数超过 300 万人。近年来, 随着生活节奏的加快, 饮食结构和生活习惯的改变, 血栓栓塞类疾病的发病率不断升高, 发病年龄也有年轻化的趋势, 给患者及其家人乃至社会都带来了沉重的负担^[2-3]。因此, 研发安全、高效的溶栓产品对日益严重的血栓性心脑血管疾病的预防具有重要意义。

目前, 临床已使用的溶血栓药物有链激酶(SK)、尿激酶(US)、组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)等, 尽管溶栓效果好, 但有副作用且成本高^[4]。发酵食品中许多微生物可以作为纤溶酶的产生来源。经研究^[5-6]发现大部分微生物产生的酶具有酶活性高、不易引起出血、半衰期长和可经消化道直接吸收等优点, 被认为是潜在、安全和廉价的溶栓剂。乳酸菌广泛存在于发酵食品中, 大多数乳酸菌是肠道内的有益微生物, 对维持肠道健康和活力有着重要作用, 目前仅少量的文章对产纤溶酶的乳酸菌进行报道, 已报道的产纤溶酶的乳酸菌有凝结芽孢杆菌^[7]、粪肠球菌^[8]、屎肠球菌^[9]、乳酸片球菌^[10], 且内容大多为筛选鉴定和酶学性质的研究, 并未对菌株的安全性进行评估。

本研究从传统发酵食品中初筛分离溶解脂乳的菌株, 用纤维蛋白平板复筛并进行鉴定; 对筛选出的菌株进行胃肠道生存能力测试和安全性评估, 对发酵上清液进行蛋白酶处理试验, 并对盐析后的粗酶进行活性电泳验证, 从而为进一步开发和利用该菌株提供理论依据。

作者简介: 尹梦雯, 女, 四川农业大学在读硕士研究生。

通信作者: 胡欣洁(1975—), 女, 四川农业大学讲师, 硕士。

E-mail: salangane_sky@163.com.

收稿日期: 2017-07-25

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 试验样品

从四川、重庆等地采集传统发酵食品 379 份:泡菜水样品 320 份,豆豉样品 54 份,发酵牛肉样品 5 份。

1.1.2 培养基

MRS 培养基、E-likier 培养基、蔗糖硫酸胺培养基、LB 培养基、蛋白胨水培养基、硝酸盐培养基、MH 培养基、血平板^{[11]9}、CM 培养基^[12]、脱脂琼脂平板:上海古朵生物科技有限公司;

纤维蛋白平板:参照文献^[13]修改如下:A:取纤维蛋白原 0.022 g 溶解于 10 mL 生理盐水中,37 °C 水浴 5~10 min;B:取凝血酶 0.000 5 g (浓度为 40 U/mg) 加入到 2 mL 生理盐水中,37 °C 水浴 5~10 min;C:称取 0.1 g 琼脂糖溶解于 8 mL 生理盐水,加热使琼脂糖充分溶解;B 加入 C 中,再将 A 加入,迅速混合均匀倒板,待凝固后打孔,放入 4 °C 冰箱备用。

1.1.3 菌株

大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923:四川农业大学食品微生物实验室。

1.1.4 主要试剂

牛纤维蛋白原、凝血酶(40 U/mg)、尿激酶标准品(50 U/mg):生化试剂,上海源叶生物科技有限公司;

胃蛋白酶(30 000 U/mg)、胰蛋白酶(250 U/mg):生化试剂,上海瑞永生物科技有限公司;

SDS-PAGE 试剂盒:武汉博士德生物工程有限公司;

蛋白 Marker:14.4~94.0 kDa,天根生化科技(北京)有限公司;

DNA Marker:生工生物工程(上海)股份有限公司;

PCR 引物:成都擎科梓熙生物技术有限公司;

药敏纸片:杭州微生物试剂有限公司。

1.1.5 主要仪器

冷冻离心机: Sorvall ST 16R 型,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;

超纯水仪: Milli-Q Reference 型,美国 Millipore 公司;

PCR 仪: C1000 型,美国 Bio-Rad 公司;

凝胶成像系统: Gel Doc XR+ 型,美国 Bio-Rad 公司;

水平电泳槽: Sub-Cell GT 型,美国 Bio-Rad 公司;

垂直电泳槽: Mini-PROTEAN Tetra System 型,美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 样品处理 将样品分别用 MRS 液体培养基、E-likier 液体培养基、蔗糖硫酸胺液体培养基 3 种进行富集培养,获得不同的富集培养液^{[14]85-103}。

1.2.2 产纤溶酶乳酸菌的分离

(1) 初筛:将筛选获得乳酸菌接种于含脱脂乳平板上,37 °C 培养 48 h。在脱脂琼脂平板上挑取溶解圈明显的单菌落,纯化。

(2) 复筛:将初筛获得的菌株接种于 CM 液体培养基中,37 °C 培养 24 h。收集菌液 1 mL 于 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 20 μL 于纤维蛋白平板小孔中点样。37 °C 孵育 18 h,挑选能产生溶解圈的菌株。

1.2.3 纤溶活性的测定

(1) 标准曲线绘制:分别取 31.25, 62.5, 125, 250, 500 U/mL 尿激酶标准品 20 μL 点在配制好的纤维蛋白平板的点样孔中。以标准尿激酶浓度的对数值为横坐标,溶解透明圈面积的对数值为纵坐标作图。

(2) 酶活测定:将复筛所得菌株活化后,按 2% 的接种量,接种于液体培养基 37 °C、180 r/min 培养 12 h。取菌液 1 mL 于 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 20 μL 于纤维蛋白平板小孔中点样。先将点样后的纤维蛋白平板于室温下平稳放置 10 min,再置于 37 °C 恒温培养 18 h,测定每个样品溶解透明溶圈的垂直直径,试验重复 3 次,取平均值,计算其乘积作为溶解透明圈面积,根据标准曲线计算出各测试样品的溶纤活性。

1.2.4 产纤溶酶乳酸菌的鉴定

(1) 形态学鉴定:将复筛所得菌株于 CM 固体培养基上划线培养 48 h,进行革兰氏染色。

(2) 生理生化鉴定:依据《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》^{[14]38-44} 和《伯杰氏细菌鉴定手册》^[15]。

(3) 分子鉴定:提取 DNA 后根据文献^[16]对菌株进行 16S rDNA 扩增。反应后的产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,选取在 1 500 bp 左右有清晰条带的 PCR 产物测序,测序由生工生物工程(上海)股份有限公司进行。测序结果利用 NCBI 的 BLAST 分析工具与 GenBank 数据库中已知菌株的对应序列进行比较鉴定,并用 MEGA 5.05 软件构建系统进化树。

1.2.5 产纤溶酶乳酸菌的安全性评估

(1) 溶血试验:参照文献^{[11]26-27},以金黄色葡萄球菌做阳性对照。

(2) 耐药性试验:采用(K-B)纸片扩散法^[17]进行药敏试验,药敏纸片:氨苄西林、亚胺培南、万古霉素、四环素、氯霉素、庆大霉素、利福平、头孢噻吩、丁胺卡那、链霉素、青霉素和红霉素。以大肠杆菌 ATCC 25922,金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 作为质控标准菌。

(3) 有毒代谢产物检测试验:主要包括产吡啶试验、硝酸盐还原试验和氨基脱羧酶活性检测等,参照文献^[18]方法进行。

(4) 毒力基因 PCR 检测:择取 3 种常见的和公认的肠球菌毒力基因,参考文献^[19]进行 PCR 扩增。根据退火温度的差异,设计 2 组 PCR 退火温度。As 退火温度为 50 °C, esp、gleE 为 53 °C。其余条件均为:预变性 94 °C 5 min,变性 94 °C 1 min,设定退火温度复性 1 min,延伸 72 °C 1 min,35 个循环,补充延伸 72 °C 10 min。PCR 反应采用 20 μL 体系:基因组 DNA 1 μL, Premix Taq 10 μL, Forward primer 1 μL, Reverse primer 1 μL, dd H₂O 7 μL。将 PCR 扩增产物进行凝胶电泳观察。毒力基因及相关引物见表 1。

表 1 毒力基因及相关引物

Table 1 Virulence genes and related primers

基因	引物	目的片段大小/bp
<i>as</i>	5-AAGAAAAAGAAGTAACCAAC-3'	1 553
	5-AAACGGCAAGACAAGTAAATA-3'	
<i>gelE</i>	5-ACCCCGTATCATTGGTTT-3'	419
	5-ACGCATTGCTTTTCCATC-3'	
<i>esp</i>	5-TTGCTAATGCTAGTCCACGAC-3'	933
	5-GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA-3'	

1.2.6 胃肠道生存能力测试

(1) 生长曲线的测定:将分离所得菌种活化后,按 1 mL/100 mL 接种于液体培养基中,37 °C 培养 24 h。每隔 2 h 测定其在 600 nm 处的吸光度,绘制生长曲线。

(2) 酸耐受试验:参考文献[20]的方法,将液体培养基 pH 调整至 3.0,37 °C 处理 2 h 后,稀释涂布,按式(1)计算存活率。

$$N = \frac{N_t}{N_0} \times 100\% , \quad (1)$$

式中:

N ——存活率,%;

N_t ——pH=3.0 的活菌数;

N_0 ——对照组的活菌数。

(3) 胆盐耐受试验:参考文献[20]的方法,加入含 0.3 g/100 mL 牛胆盐的生理盐水,37 °C 处理 2 h 后,稀释涂布,按式(2)计算存活率。

$$N = \frac{N_t}{N_0} \times 100\% , \quad (2)$$

式中:

N ——存活率,%;

N_t ——含 0.3% 牛胆盐培养基作用后的活菌数;

N_0 ——对照组的活菌数。

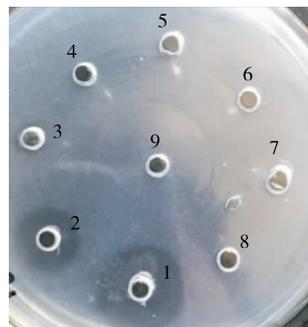
1.2.7 蛋白酶处理对酶活的影响 将发酵上清液调到胃蛋白酶的最适 pH 4.0,然后加入胃蛋白酶使发酵上清液的酶终浓度为 1 mg/mL,37 °C 水浴 2 h^[21]。再将 pH 调到胰蛋白酶最适 pH 8.0,然后加入胰蛋白酶使发酵上清液的酶终浓度为 1 mg/mL,37 °C 水浴 2 h。再将 pH 调回对照 pH 7.0,测定其纤溶活性。并以只用胃蛋白酶处理的发酵上清液、只用胰蛋白酶处理的发酵上清液、胃蛋白酶溶液、胰蛋白酶溶液、发酵上清液原液做对照。

1.2.8 活性电泳 参考文献[22]的方法,先将发酵上清液进行盐析透析,并选用 12% 的分离胶,5% 的浓缩胶进行活性电泳试验,分离胶分别以添加底物和未添加底物的作为对照(底物:纤维蛋白原和凝血酶)。

2 结果与分析

2.1 产纤溶酶乳酸菌的分离

由图 1 可知,初筛获得 9 株溶解解脂乳的菌株,经纤维蛋白试验筛选出溶解纤维蛋白菌株共 2 株,分别命名为 HYD09 和 HYN06。



1. HYD09 菌株发酵上清液
2. HYN06 菌株发酵上清液
3. HYP04 菌株发酵上清液
4. HYP36 菌株发酵上清液
5. HYD15 菌株发酵上清液
6. HYD43 菌株发酵上清液
7. HYP17 菌株发酵上清液
8. HYD66 菌株发酵上清液
9. HYN37 菌株发酵上清液

图 1 纤维蛋白平板复筛图

Figure 1 Fibrin plate screening

2.2 纤溶活性的测定

尿激酶活力标准曲线见图 2。

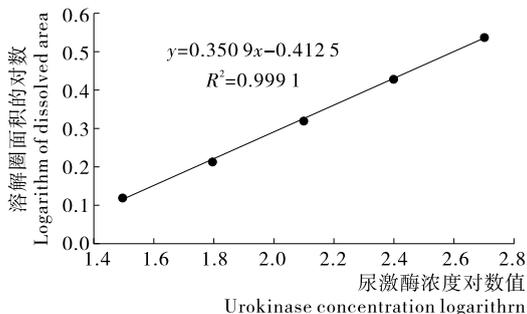


图 2 尿激酶标准曲线

Figure 2 Standard curve of urokinase activity

溶纤活性检测结果见图 3,根据测得溶解透明圈的垂直直径,计算出各菌株液体发酵产酶的活力大小,结果表明:HYD09 和 HYN06 菌株液体发酵的酶活分别为 115.3 U/mL 和 107.2 U/mL。

2.3 产纤溶酶乳酸菌的鉴定

2.3.1 形态学鉴定 菌落均呈圆形,直径为(3.0±1) mm,



- 1~3. HYD09 菌株发酵液粗酶原液(20 μL)
- 4~6. HYN06 菌株发酵液粗酶原液(20 μL)

图 3 纤维蛋白平板粗酶活性测定图

Figure 3 Proteolytic mapping of Crude enzyme by agarose-fibrinogen plate

乳白色、凸起、微白色、湿润、不透明、边缘光滑的单菌落，见图4。显微镜下呈紫色，圆形或椭圆形、呈单个或成对或短链状排列球菌，见图5。

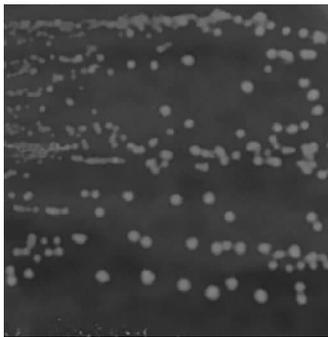


图4 菌株HYD09的菌落形态

Figure 4 The colony morphology of strain HYD09



图5 菌株HYD09的革兰氏镜检结果(10×100倍)

Figure 5 The strain of the strain HYD09 was 10×100 times

2.3.2 生理生化鉴定 生理生化鉴定结果见表2。

表2 细菌生理生化特征[†]

Table 2 Physiological and biochemical characters

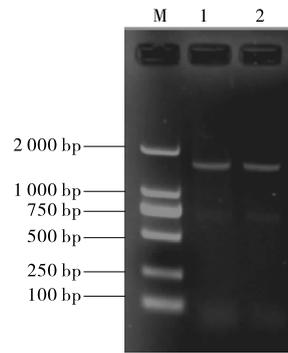
特征	HYD09	HYN06	特征	HYD09	HYN06
运动性	-	-	蜜二糖	-	-
精氨酸双水解酶	+	+	棉子糖	-	-
葡萄糖	-	-	山梨糖	-	-
葡萄糖酸盐	+	+	乳糖	+	+
L-阿拉伯糖	-	-	半乳糖	+	+
D-阿拉伯糖醇	-	-	10℃	生长	生长
环状糊精	+	+	45℃	生长	生长
甘油	+	+	6.5% NaCl	生长	生长
甘露醇	+	+	pH 9.6	生长	生长
淀粉	-	-			

[†] “-”表示反应呈阴性；“+”表示反应呈阳性。

2.3.3 分子鉴定 PCR扩增完成后，将扩增产物进行电泳，目标条带大约为1500bp，见图6。

PCR产物测序结果在NCBI数据库中进行比对，并利用MEGA 5.0建立系统发育树，见图7。

根据形态学鉴定、生理生化鉴定结果，结合16S rDNA测序比对结果，确定鉴定HYD09和HYN06均为粪肠球菌。



M. DNA Maker 1. HYD09 2. HYN06

图6 HYD09和HYN06菌株的16S rDNA PCR扩增 Figure 6 PCR for 16S rDNA of strain HYD09 and HYN06

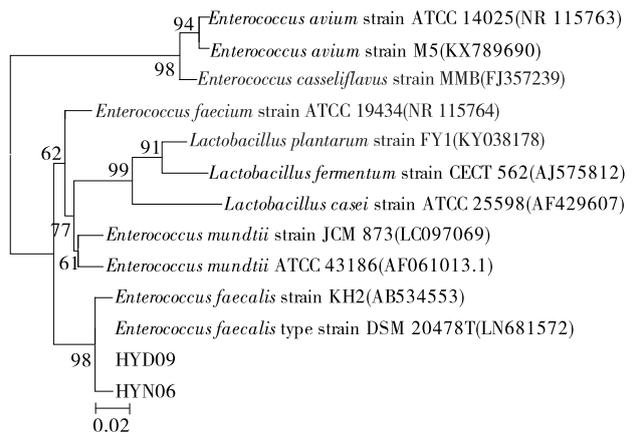


图7 HYD09和HYN06菌株分子系统发育树

Figure 7 Phylogenetic tree of strain HYD09 and HYN06

2.4 产纤溶酶乳酸菌的安全性评估

2.4.1 溶血试验 由图8可知，金黄色葡萄球菌菌落周围形成透明溶血环，呈β-溶血。HYD09，HYN06菌落周围没有变化，均为γ-溶血，即无溶血性。



1. 金黄色葡萄球菌 2. 菌株HYD09 3. 菌株HYN06

图8 溶血试验结果

Figure 8 The results of hemolysis test

2.4.2 耐药性试验 由表3可知，HYD09和HYN06对12种抗生素均无多重耐药。

2.4.3 有毒代谢产物检测试验 由表4可知，2株菌的吡啶试验、硝酸盐还原试验、氨基脱羧酶活性检测试验结果均成阴性。

2.4.4 毒力基因PCR检测 利用常见的毒力基因引物进行PCR检测，见图9。HYD09无毒力基因检出，HYN06检出esp毒力基因，大小与目的片段一致。

表 3 菌株对抗生素敏感性[†]

Table 3 Sensitivity of strains to antibiotics

菌株	氨苄西林	亚胺培南	万古霉素	四环素	氯霉素	庆大霉素	利福平	头孢噻吩	丁胺卡那	链霉素	青霉素	红霉素
HYD09	S	S	S	S	S	S	S	I	I	I	I	R
HYN06	S	S	S	S	S	S	I	I	I	I	R	I

[†] S 表示敏感;I 表示中间敏感;R 表示耐药。

表 4 菌株有毒代谢产物的测定[†]

Table 4 Determination of toxic metabolites in strains

菌株	吡啶试验	硝酸盐还原试验	氨基脱羧酶活性检测
HYD09	—	—	—
HYN06	—	—	—

[†] “+”表示阳性;“—”表示阴性。

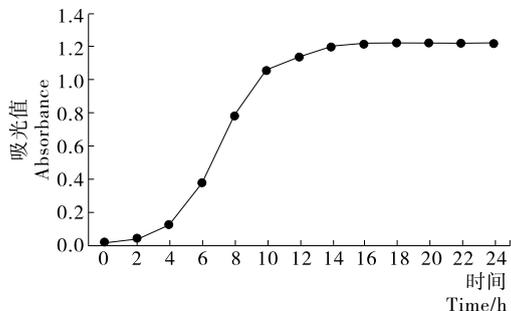
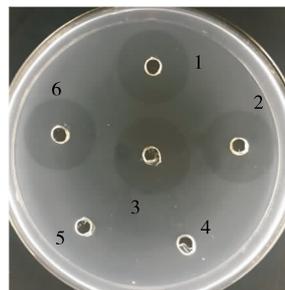


图 10 HYD09 生长曲线

Figure 10 Growth curve of HYD09

2.6 蛋白酶处理对酶活的影响

由图 11 可知,菌株 HYD09 的发酵上清液经胃蛋白酶和胰蛋白酶处理后仍具有纤溶活性,并且胃蛋白酶和胰蛋白酶对菌株 HYD09 的纤溶活性无明显的影响。



1. 经胰蛋白酶处理后的发酵上清液(20 μL) 2. 经胃蛋白酶处理后的发酵上清液(20 μL) 3. 发酵上清液(20 μL) 4. 胃蛋白酶溶液(20 μL) 5. 胰蛋白酶溶液(20 μL) 6. 经胃蛋白酶和胰蛋白酶处理后的发酵上清液(20 μL)

图 11 蛋白酶处理后酶活性测定

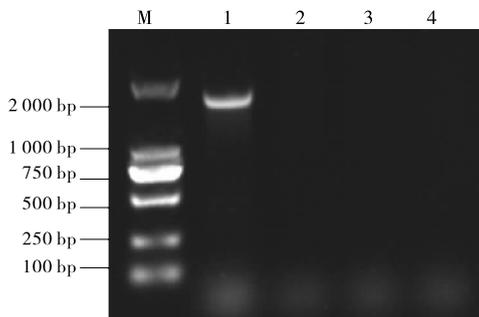
Figure 11 Determination of enzyme activity after protease treatment

2.7 活性电泳检测

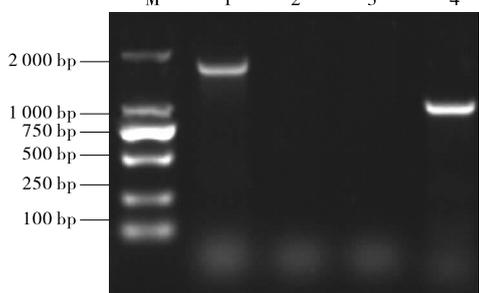
发酵上清液经盐析、透析和浓缩后获得粗酶液进行活性电泳分析,结果见图 12。由图 12 可知,盐析后的粗酶液中有 2 种主要的组分,但是具有纤溶酶活性的组分只有 1 种。而 Thokchom S 等^[22]所筛菌株的粗酶有 2 种或 3 种具有纤溶活性的组分,表明不同菌株产的纤溶酶存在一定差异。

3 结论

微生物来源的纤溶酶,特别是来自可食用微生物的纤溶酶,具有开发为保健食品原料预防血栓用药和治疗血栓用药的潜力^[23]。本试验从传统发酵食品中分离筛选得到 2 株具有纤溶活性的菌株 HYD09 和 HYN06,通过系统鉴定菌



(a) HYD09



(b) HYN06

M. DNA marker 1. 16S rDNA 2. *as* 3. *gelE* 4. *esp*

图 9 检测毒力基因电泳图

Figure 9 Electrophoresis of virulence genes detected growth curve

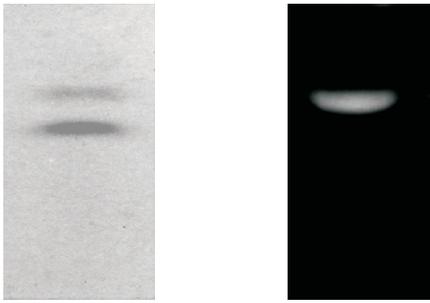
综合安全性评估试验结果,可以初步证明 HYD09 是安全的,因此选取菌株 HYD09 做相关基本性质的研究。

2.5 菌株 HYD09 胃肠道生存能力测试

2.5.1 菌株 HYD09 生长曲线的测定 测定菌株在 24 h 内的生长曲线,见图 10。取培养 14 h 左右的菌种进行酸耐受试验和胆盐耐受试验。

2.5.2 菌株 HYD09 酸耐受试验 pH 3.0 条件下,HYD09 活菌数为(8.38±0.09) lg CFU/mL,对照组活菌数为(8.59±0.02) lg CFU/mL,计算得出存活率为 61.80%。

2.5.3 菌株 HYD09 胆盐耐受试验 在 0.3%牛胆盐溶液条件下,HYD09 活菌数为(8.45±0.04) lg CFU/mL,对照组活菌数为(8.59±0.02) lg CFU/mL,计算得出存活率为 71.3%。



(a) 无底物 (b) 以纤维蛋白原和凝血酶作为底物

图 12 粗酶的活性电泳图

Figure 12 Native-Page gram of crude enzyme from strain HYD09

株均为粪肠球菌,发酵上清液酶活分别为 115.3 U/mL 和 107.2 U/mL。通过有毒代谢产物检测、耐药性试验、毒力基因检测试验综合评估,证明 HYD09 菌株乳酸菌是安全的。进一步研究 HYD09 相关基本性质表明:菌株 HYD09 有一定的耐酸耐胆盐能力,在 pH 3.0 条件下,存活率为 61.80%;在 0.3% 牛胆盐溶液条件下,存活率为 71.3%。蛋白酶敏感性试验表明,菌株 HYD09 发酵上清液经胃蛋白酶和胰蛋白酶处理仍具有纤溶活性;其粗酶中有 2 种主要的组分,但具有纤溶活性的组分只有 1 种。目前仅有少量的文章对产纤溶酶的乳酸菌进行报道,而且本试验所筛选的纤溶酶产生菌具有一定的安全性和肠道生存能力,有一定的应用价值。但有关该菌的安全性和酶的相关性质还需做进一步的研究。

参考文献

[1] SUMINO H, ICHIKAWA S, SAWADA Y, et al. Effects of hormone replacement therapy on blood coagulation and fibrinolysis in hypertensive and normotensive postmenopausal women [J]. *Thrombosis Research*, 2005, 115(5): 359-366.

[2] HAMMES M, DESAI A, PASUPNETI S, et al. Central venous catheters: incidence and predictive factors of venous thrombosis [J]. *Clinical Nephrology*, 2015, 84(1): 8-21.

[3] MARNEJON T, ANGELO D, ABU A A, et al. Risk factors for upper extremity venous thrombosis associated with peripherally inserted central venous catheters [J]. *Journal of Vascular Access*, 2012, 13(2): 231-238.

[4] 杨新春,温绍君,李志忠,等.溶栓药物在动脉血栓栓塞性疾病中的应用及其评价[J]. *中华内科杂志*, 2006, 45(6): 522-523.

[5] WANG Cheng-tao, JI Bao-ping, LI Bo, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2006, 33(9): 750-758.

[6] SIMKHADA J R, MANDER P, CHO S S, et al. A novel fibrinolytic protease from *Streptomyces*, sp. CS684[J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45(1): 88-93.

[7] PRIHANTO A A, DARIU S, FIRDAUS M. Proteolytic and fibrinolytic activities of halophilic lactic acid bacteria from two Indonesian fermented foods[J]. *Journal of Microbiology Biotech-*

nology & Food Sciences, 2013, 2(5): 2291-2293.

[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[J]. *西南大学学报:自然科学版*, 2009, 31(3): 90-93.

[9] SINGH T A, DEVI K R, AHMED G, et al. Microbial and endogenous origin of fibrinolytic activity in traditional fermented foods of Northeast India[J]. *Food Research International*, 2014, 55(2): 356-362.

[10] THOKCHOM S, JOSHI S R. Screening of fibrinolytic enzymes from lactic acid bacterial isolates associated with traditional fermented soybean foods [J]. *Food Science & Biotechnology*, 2014, 23(5): 1601-1604.

[11] 闫刘慧.泡菜中乳酸菌特性分析及模拟肠道存活定殖作用研究[D].广州:华南理工大学,2014.

[12] 文浩平.一种新型菌株—粪肠球菌 EF608 菌株(*Enterococcus faecalis* EF608)的筛选和鉴定及其溶纤酶的分离纯化和性质研究[D].重庆:重庆师范大学,2011:19.

[13] ASTRUP T, MULLERTZ S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 1952, 40(2): 346-351.

[14] 凌代文,东秀珠.乳酸细菌鉴定及实验方法[M].北京:中国轻工业出版社,1999.

[15] 布坎南 R E, 吉布斯 N E.伯杰细菌鉴定手册[M].8版.北京:科学出版社,1984:661-666.

[16] 张洁,徐桂花,尤丽琴.16S rDNA 序列分析法鉴定乳酸菌[J]. *农产品加工:创新版*, 2009(4): 47-49.

[17] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 25th Informational Supplement, M100-S25[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015: 3-56.

[18] 王梦姣,李少英,李淑芬,等.马奶及其制品中肠球菌属乳酸菌的安全性评价[J]. *食品科学*, 2014, 35(17): 204-208.

[19] 雷鸣.益生性肠球菌的生物学特性和安全性评价[D].浙江:中国计量学院,2014:20-21.

[20] 吕源玲.耐酸耐胆盐益生乳酸菌的筛选与鉴定[J]. *食品与机械*, 2017, 33(6): 42-45.

[21] 刘书亮,张艾青,田刚,等.植物乳杆菌 P158 的生长曲线及其细菌素的特性[J]. *核农学报*, 2009, 23(6): 1021-1025.

[22] THOKCHOM S, JOSHI S R. Screening of fibrinolytic enzymes from lactic acid bacterial isolates associated with traditional fermented soybean foods [J]. *Food Science & Biotechnology*, 2014, 23(5): 1601-1604.

[23] 艾瑞波,刘晓兰,邓永平,等.微生物发酵法生产纤溶酶的研究进展[J]. *食品与机械*, 2013, 29(2): 227-230.