

# 微生物发酵制备纤溶因子的研究进展

范荟<sup>1</sup>, 韦荣编<sup>2</sup>, 宋茹<sup>1\*</sup>

(1. 浙江海洋学院食品与医药学院, 浙江舟山 316022; 2. 浙江海洋学院海洋科学与技术学院, 浙江舟山 316022)

**摘要** 血栓性疾病是目前危害人类健康的第一大健康杀手, 微生物发酵制备纤溶因子安全性高, 是国内外筛选特异性强的溶栓剂常用方法之一。综述了纤溶菌(或纤溶酶)来源、纤溶酶制备和溶栓发酵液的其他生物活性, 并对微生物发酵制备纤溶因子的未来发展方向进行了展望。

**关键词** 血栓; 纤溶性; 微生物; 发酵

**中图分类号** S188+.4; TS202.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)31-12452-03

## Review of Preparing Fibrinolytic Agents Using Fermentation Methods

FAN Hui et al (Food and Pharmaceutical College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316022)

**Abstract** Thrombosis, one of the most harmful diseases, is harmful to human health. The method of fermentation used to prepare fibrinolytic agents is considered as one of the most common approaches to select effective fibrinolytic agents. The sources of fibrinolytic bacterial strains or fibrinolytic enzyme, preparation of fibrinolytic enzyme and other bioactivities of fibrinolytic fermentation were summarized. In addition, the potential research aims of fibrinolytic fermentation were proposed.

**Key words** Thrombosis; Fibrinolytic activity; Microbe; Fermentation

血栓疾病是一类严重危害人类健康和生命的疾病, 全世界有血栓性疾病患者约 1 500 万人, 其中每年死于心脑血管疾病的就高达 1 200 万人。在我国, 随着人们生活水平的提高和生活方式的改变, 导致膳食中高脂肪、高蛋白的过量摄取, 加上老龄化社会的到来, 血栓性疾病已超过癌症和糖尿病成为第一大健康杀手, 每年约有 100 多万人因此死亡。所以, 开发安全性高、特异性强的溶栓剂是目前溶栓剂的研究热点, 其中以微生物发酵制备溶栓因子的研究倍受关注。日本学者 Sumi 最早在 1987 年从一种传统发酵豆制品——纳豆中提取出具有溶血栓功能的物质, 定名为纳豆激酶(Nattokinase, 简称 NK)<sup>[1]</sup>。纳豆激酶不仅具有独特的溶栓功效, 而且无任何毒副作用。随后, 研究者从不同国家和地区的一些发酵食品, 如: 牛肉酱、豆豉、发酵红豆、发酵鱼及鱼露等, 也陆续分离出有溶栓作用的纤溶酶类<sup>[2-6]</sup>。近几年, 微生物发酵制备溶栓因子在纤溶菌(或纤溶酶)选择、如何制备纤溶酶以及溶栓发酵液的其他生物活性研究方面依然方兴未艾。

## 1 纤溶菌(或纤溶酶)来源

**1.1 发酵豆制品** 通过体外快速筛选模型从发酵豆制品中初筛目标菌, 然后再通过纤维蛋白板或纤维蛋白管法可以确定产纤溶酶的纤溶菌。薄金岭从 20 份豆制品中通过纤维蛋白平板筛选方法分离筛选出 6 株有较高溶纤活性的纳豆菌, 其中菌株 NK-1 的活力最高可达 242 IU/ml<sup>[7]</sup>。李宝库采用络蛋白平板初筛和纤维蛋白原平板复筛, 并结合体外溶栓试验, 从 220 份试样中筛选出 HF1、HF3 2 株高产纤溶酶产生

菌, 其产纤溶酶活力分别可达 864.9 尿激酶 IU/ml 和 862.2 尿激酶 IU/ml<sup>[8]</sup>。将筛选得到的纤溶菌进行适当诱变处理能有效提高诱变株的产纤溶酶能力, 如: 以纤溶菌枯草杆菌 FM-S2 为出发菌, 通过  $\gamma$ -射线和 2.5% 硫酸二乙酯复合诱变, 结果从 200 株诱变菌株中筛选到 7 株生产性能较出发菌株均显著提高的突变株, 它们的溶纤酶活性均超过 2 000 uk · u/ml, 其中突变株  $\gamma$ -DES36 的溶纤酶活性最高可达 (2 719.89 ± 242.51) uk · u/ml, 而且该菌株遗传性能稳定<sup>[9]</sup>。

**1.2 中草药类** 纤溶酶类不仅存在于发酵豆制品, 还有报道称从一些药用动植物蛋白提取液和发酵液同样也能获取具有溶栓活性的物质。何叶喧用硫酸铵沉淀法分别提取 45 种临床常用有活血化瘀作用的中草药蛋白质, 结果发现其中 22 种中草药粗蛋白提取物有体外溶纤活性, 以益母草、肉豆蔻、茜草、栝楼、竹节三七、牛膝、蒲黄和桔梗的蛋白提取物溶栓活性最高<sup>[10]</sup>。刘晓兰等研究发现, 蛹虫草深层培养可以至少产生 2 种纤溶酶, 经过分离纯化得到分子量为 28 000 的纤溶酶 I 和分子量为 32 000 的纤溶酶 II, 比活力分别为 1 467.44 U/mg 和 1 681.58 U/mg<sup>[11]</sup>。沈明花等报道了榆干离褶伞(*Lyophyllum ulmarium*, L. u) 发酵液、金针菇(*Flammulina velutipes* F. v) 发酵液能够水解纤维蛋白, 并对试验动物有抗凝血、降血脂作用<sup>[12-13]</sup>。

**1.3 海洋生物类** 海洋生物种类繁多, 这些海洋动植物及微生物代谢产物往往具有多种生物活性, 才能在竞争激烈的海洋生态环境中得以存活、繁衍。在海洋生物源溶栓性药物筛选中, Matsubara 等从海洋绿藻(*Codium intricatum*) 分离出 2 种纤溶酶<sup>[14]</sup>, Choi 等也从海洋绿藻(*Codium fragile*) 中分离出 1 种纤溶酶, 确定分子量为 48.9 kD, 但是该酶 N 端氨基酸序列组成为 APKASTDQTLPL, 与现有已知纤溶酶不同<sup>[15]</sup>。璩竹玲等发现, 海洋假单胞菌碱性蛋白酶直接溶解纤维蛋白作用强, 且能显著延长大鼠颈动脉血栓形成时间和血小板的最大聚集率<sup>[16]</sup>。王佃亮等分析一种相对低分子质量为 10

**基金项目** 浙江省水产品加工产业创新团队项目(2011R09031-08); 浙江海洋学院科研启动经费资助项目; 浙江海洋学院大学生科技创新项目(2012 年)。

**作者简介** 范荟(1991-), 女, 浙江金华人, 本科生, 专业: 食品科学与工程。\* 通讯作者, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事水产品加工与贮藏、食品化学与营养支持研究。

**收稿日期** 2013-09-02

kD 新型海洋纤溶酶的体外溶栓效果时发现,该纤溶酶的效果优于对照物蚓激酶,认为可能与该酶对纤维蛋白选择性有关<sup>[17]</sup>。杨慧宁等在优化的纳豆枯草杆菌液态发酵条件研究基础上,将海参与水按照 1:2 比例混合、匀浆,灭菌后作为发酵培养基用于纳豆枯草杆菌发酵,结果发酵 3 d 时海参培养基发酵液的溶栓酶活力最高达到 245.75 IU/ml,还略高于纳豆枯草杆菌液态发酵液的酶活力<sup>[18]</sup>。Mahajan 等从海洋中分离到一株枯草杆菌 ICTF-1,该菌能够产生分子量为 28 kD 的纤溶酶<sup>[19]</sup>。雷丹青等从广西沿海裸体方格星虫内脏中分离、纯化得到相对分子质量为 33 250 的纤溶酶,不仅能够直接溶解纤维蛋白,而且还具有激活纤溶酶原作用<sup>[20]</sup>。

## 2 纤溶酶制备

### 2.1 纤溶菌发酵条件优化

在获得了纤溶菌或高产诱变菌株后,可以通过发酵条件的优化进一步提高发酵液中纤溶酶含量或活性。与一般微生物发酵一样,碳源、氮源、无机盐等培养基组成,发酵温度、发酵时间、发酵液初始 pH 以及摇床转速等均会对发酵产物中纤溶因子的含量及活性有影响。Matsubara 等采用响应面分析法优化出分离自海洋绿藻 (*Codium intricatum*) 的溶栓菌最优发酵培养基,含有 9.05% EG 4000, 5.06% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 发酵时间 118.77 h, 发酵温度 37.57 °C, 初始发酵 pH 6.52<sup>[14]</sup>。谢秋玲等以 2% 木糖为碳源, 3% 大豆蛋白胨为氮源, 发酵 4 d 所得纤溶酶的活力为 787.1 U/ml<sup>[21]</sup>。王正刚等以 2% 甘油为碳源, 20% 豆饼粉蛋白酶解液为氮源, 当发酵时间为 16 h 时所产纤溶酶活力最高<sup>[22]</sup>。胡升等报道, 纳豆菌在最佳液体发酵培养基 (胰蛋白胨 22.7 g/L、木糖 20.0 g/L、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.37 g/L、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g/L、CaCl<sub>2</sub> 0.2 g/L、MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/L) 和最佳发酵条件 (发酵温度 30 °C、pH 7.0、接种量 4%、种龄 9 h、装液量 25 ml/250 ml) 下, 发酵液中纳豆激酶浓度由优化前 1 005.73 IU/ml 提高到 1 314.48 IU/ml<sup>[23]</sup>。朱健辉等研究发现, 当纳豆杆菌液态发酵培养基含有麦芽糖 2%, 酵母膏 4%, CaCl<sub>2</sub> 0.03%, 发酵 pH 7.0, 接种量为 1%, 装液量 100 ml/500 ml 挡板瓶, 在 34 °C 下 200 r/min 培养 48 h, 纤溶酶的活力达到 4 300 U/ml<sup>[24]</sup>。Mukherjee 等在系统研究一株具有纤溶酶活性的碱性蛋白酶发酵条件基础上, 通过试验优化得到活性为 749 000 U/L 的碱性蛋白酶发酵液<sup>[25]</sup>。Mahajan 等报道, 经发酵条件优化后, 枯草杆菌 ICTF-1 的纤溶酶活性由未优化前的 3 420 U/ml 提高到 8 814 U/ml<sup>[19]</sup>。

由上述文献报道可以看出, 纤溶菌发酵条件优化除了筛选菌株生长繁殖所必需的碳源和氮源外, 一些必要的盐类对纤溶菌产纤溶活性也发挥着重要作用。另外, 不同菌株的最佳发酵时间似乎无规律性, 从最短的十几小时到最长的数日均有报道。所以, 在纤溶菌优化条件研究中, 应根据不同菌株来源, 系统分析各个发酵影响因素, 然后挑选影响显著性因素进行试验方案优化, 才能有效提高发酵液中纤溶因子的含量。

### 2.2 纤溶酶的分离纯化

无论是微生物发酵制备溶栓型发酵液, 还是直接从动植物中提取溶栓型蛋白粗提液, 均需要

进行分离纯化处理才能有效提高纤溶酶的活力, 并且得到纯纤溶酶用于理化性质研究。从现有文献报道来看, 纤溶酶的分离纯化主要是采用蛋白质和酶的分离纯化方法进行。如: 刘晓兰等分离纯化蛹虫草深层培养发酵液中 2 种纤维酶时, 依次采用硫酸铵盐析除去发酵液中多糖和部分杂蛋白, 接着用分离范围为 1 000 ~ 5 000 的 Sephadex G25 凝胶过滤完成样品的脱色和缓冲液交换, 然后再根据样品中待分离组分疏水性及所带电荷不同采用 Phenyl-Sepharose HP 疏水柱层析和 CM-Sepharose FF 离子交换柱层析进一步提高纤溶酶的纯度, 最后用 Superdex 75 凝胶色谱分离得到纤溶酶 I 和纤溶酶 II, 其纯化倍数分别为 36.07 倍和 41.33 倍, 回收率分别为 5.79% 和 4.00%<sup>[11]</sup>。此外, 一些新的分离纯化技术也被应用到纤溶酶分离中, 例如: 陆瑾等采用金属螯合亲和双水相分配技术对纳豆激酶进行分离纯化, 在优化后的分配条件下, 将分析系统放大到 100 g 时酶活收率达到 90%, 纯化因子为 2.0, 而在两次分配分离流程系统纯化因子达到 3.52, 酶总收率为 81%<sup>[26]</sup>。苏俊彩等将液体反相悬浮法制取的壳聚糖微球表面偶联上纳豆激酶的亲和配体——大豆蛋白, 然后借助这种亲和吸附介质来吸附发酵粗酶液中纳豆激酶, 经测定, 最大吸附量达到 3 926.56 U/g, 纳豆激酶的收率达到 52.3%, 纯化倍数可达 18.1 倍<sup>[27]</sup>。

## 3 溶栓发酵液的其他生物活性

纤溶菌在生长繁殖过程中可以产生大量的胞外酶, 而水解酶系的胞外酶能够分解发酵基料中蛋白质为多肽、寡肽类或直接生成氨基酸类, 也有可能生成其他活性物质类, 这些水解生成的营养物质一方面可用于纤溶菌的生长繁殖, 另一方面发酵液中富集活性物质赋予溶栓发酵液具有多种生物活性。

### 3.1 抑菌作用

饶颖竹等以米曲霉为菌种发酵制得成熟纳豆, 其中 60% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 分级沉淀物不仅具有体外溶栓性, 而且对大肠杆菌具有一定的抑制作用<sup>[28]</sup>。孙月娥等报道, 豆豉纤溶酶生产菌发酵液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有抑菌效果, 并且在 pH 4.0 ~ 10.0, 加热温度 4 ~ 80 °C, 该发酵液的抑菌活性变化不大, 认为豆豉纤溶酶生产菌的抑菌作用不仅与菌间的生物拮抗作用有关, 而且发酵液中可能含有抑菌物质 2,6-吡啶二酸<sup>[29]</sup>。曹小红等从纳豆芽孢杆菌 TK-1 的发酵液中分离得到抑菌活性的脂肽, 能够显著抑制沙门氏菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌对 96 孔板固体表面的粘附, 该脂肽抑菌谱较广, 对灰霉和链孢霉的抑菌能力强<sup>[30]</sup>。

### 3.2 抗氧化和降脂作用

豆豉纤溶酶生产菌的发酵液对麻油过氧化具有一定抑制作用, 而且抑制氧化作用随着发酵液添加量的增加和储存时间的延长而增强<sup>[29]</sup>。祁红兵等用纳豆芽孢杆菌发酵小麦麸皮, 结果麸皮发酵液有很强的抗氧化活性, 对羟自由基和超氧阴离子自由基清除率分别比麸皮水提液高了 2.3 倍和 6.7 倍, 麸皮发酵物的抗氧化能力与 V<sub>E</sub> 接近, 能有效地抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导红细胞氧化溶血作用<sup>[31]</sup>。笔者在前期研究中同样发现, 用纳豆芽孢杆菌发酵水产蛋白, 所得发酵液不仅抗氧化性增强, 而且还有助于提高水产蛋白

的溶解性、乳化性等食品功能性<sup>[32]</sup>。纳豆激酶粗提液除了具有溶栓作用外,还能显著地降低小鼠试验性高脂血症<sup>[33]</sup>,而贾爱萍等在研究纤溶酶对糖尿病性与非糖尿病性脑梗死患者的疗效时发现纤溶酶还具有改善血脂代谢作用,其中对糖尿病性脑梗死治疗效果优于非糖尿病性脑梗死患者<sup>[34]</sup>。

**3.3 调节肠道作用** 纤溶菌发酵液营养丰富,包括小分子肽和游离氨基酸,能够被快速吸收,为肠道有益菌的生长繁殖提供营养保证。据报道,米糠纳豆芽孢杆菌的发酵液除了有很强的纤溶作用外,对双歧杆菌也有促生长作用,即使发酵液经胃蛋白酶和胰蛋白酶消化后,对双歧杆菌仍有 51.6% 的促生长率<sup>[32]</sup>。

#### 4 结语

纤溶菌来源广泛,发酵法制备的纤溶酶具有多种生物活性。未来纤溶酶及溶栓型发酵液还可进一步开展以下研究:筛选对人体安全性高、副作用小的纤溶菌株,使用工程菌用于纤溶因子的大量制备;从食品营养学角度研究纤溶因子与食品组分间的分子相互作用,为食品中添加纤溶成分辅助血栓病人食疗奠定基础。

#### 参考文献

- [1] SUMI H, HAMADA H, TSUSHIMA H, et al. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable chesse natto, a typical and popular soybean food in the Japanese diet[J]. *Experientia*, 1987, 15: 1110 - 1111.
- [2] 刘美艳, 张健, 程冬梅. 牛肉酱纤溶酶产生菌发酵条件的优化[J]. *江苏农业科学*, 2006(6): 375 - 377.
- [3] 宋园亮, 黄文宇, 张忠华, 等. 云南传统发酵豆豉中高产豆豉纤溶酶菌株的筛选及其酶谱分析[J]. *生物技术通报*, 2011(5): 132 - 137.
- [4] KIM H K, KIM G T, KIM D K, et al. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermented fish[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, 84(4): 307 - 312.
- [5] CHANG C T, WANG P M, HUNG Y F, et al. Purification and biochemical properties of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis*-fermented red bean[J]. *Food Chemistry*, 2012, 133(4): 1611 - 1617.
- [6] MONTRIWONG A, KAEWPHUAK S, RODTONG S, et al. Novel fibrinolytic enzymes from *Virgibacillus halodinitrificans* SK1-3-7 isolated from fish sauce fermentation[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(12): 2379 - 2387.
- [7] 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 - 24.
- [8] 李宝库. 高活性纤溶酶产生菌的筛选及发酵条件优化研究[D]. 保定: 河北大学, 2005.
- [9] 梁思宇. 枯草芽孢杆菌溶纤酶高产菌株的选育及发酵条件的优化[D]. 南京: 南京农业大学, 2000.
- [10] 何叶喧. 中草药牛膝、茜草纤溶酶的筛选与分离纯化[D]. 保定: 河北大学, 2006.
- [11] 刘晓兰, 张雯舒, 郝喜群, 等. 蛹虫草发酵产物新纤溶酶的分离纯化[J]. *华南理工大学学报: 自然科学版*, 2012(5): 111 - 118.
- [12] 沈明花, 彭瀛, 宋晓琳. 榆干离褶伞发酵液的溶栓与降血脂作用[J].

食品与发酵工业, 2011, 37(10): 28 - 30.

- [13] 沈明花, 彭瀛, 宋晓琳. 金针菇发酵液的溶栓作用研究[J]. *食品科学*, 2012, 33(17): 246 - 248.
- [14] MATSUBARA K, SUMI H, HORI K, et al. Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from a marine green alga, *Codium intricatum*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 119(1): 177 - 181.
- [15] CHOI J H, SAPKOTA K, PARK S E, et al. Thrombolytic, anticoagulant and antiplatelet activities of codiase, a bi-functional fibrinolytic enzyme from *Codium fragile*[J]. *Biochimie*, 2013, 95(6): 1266 - 1277.
- [16] 璩竹玲, 刘赛, 刘晨光, 等. 海洋假单胞菌碱性蛋白酶的纤溶及抗血栓形成作用[J]. *青岛大学医学院学报*, 2003(2): 49 - 51.
- [17] 王佃亮, 刘万顺, 韩宝芹, 等. 一种新型海洋纤溶酶体外抗凝与溶栓作用研究[J]. *中国海洋药物*, 2006(4): 40 - 45.
- [18] 杨慧宁, 张雪花, 王运吉. 海参液态发酵制备枯草杆菌蛋白酶的研究[J]. *水产科学*, 2006, 25(11): 559 - 562.
- [19] MAHAJAN P M, NAYAK S, LELE S S. Fibrinolytic enzyme from newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* ICTF-1: Media optimization, purification and characterization[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 113(3): 307 - 314.
- [20] 雷丹青, 李肖肖, 廖共山. 广西沿海裸体方格星虫纤维蛋白溶解酶的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2013, 25(7): 897 - 902.
- [21] 谢秋玲, 郭勇. 纳豆激酶液体发酵条件的优化[J]. *华南理工大学学报: 自然科学版*, 1999, 27(5): 127 - 131.
- [22] 王正刚, 丁贵平, 蔡正森. 纳豆激酶的发酵工艺研究[J]. *氨基酸与生物资源*, 2001, 23(2): 17 - 21.
- [23] 胡升, 梅乐和, 姚善涇. 响应面法优化纳豆激酶液体发酵[J]. *食品与发酵工业*, 2003, 29(1): 13 - 17.
- [24] 朱健辉, 杜连祥, 路福平, 等. 高产纳豆激酶液态发酵工艺的优化[J]. *工业微生物*, 2007, 37(1): 20 - 24.
- [25] MUKHERJEE A K, RAI S K. A statistical approach for the enhanced production of alkaline protease showing fibrinolytic activity from a newly isolated Gram-negative *Bacillus* sp. strain AS-S20-I[J]. *New Biotechnology*, 2011, 28(2): 182 - 189.
- [26] 陆瑾, 赵瑁, 林东强, 等. 金属螯合双水相亲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 - 469.
- [27] 苏俊彩, 董超, 史延茂, 等. 大豆蛋白偶联壳聚糖微球介质提取纳豆激酶的研究[J]. *大豆科学*, 2011, 30(4): 652 - 656, 662.
- [28] 饶颖竹, 陈蓉, 阮倩玲, 等. 纳豆激酶粗提液的体外溶栓抑菌实验[J]. *蛇志*, 2004, 16(1): 7 - 10.
- [29] 孙月娥, 钱和. 豆豉纤溶酶生产菌发酵液功能性研究[J]. *江苏调味副食品*, 2005, 22(5): 22 - 25, 28.
- [30] 曹小红, 廖振宇, 王春玲, 等. *Bacillus natto* TK-1 产脂肽的纯化、抑菌活性及其表面活性剂特性[J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(1): 44 - 48.
- [31] 祁红兵, 陈钧, 何佳, 等. 纳豆芽孢杆菌发酵麸皮的抗氧化功能研究[J]. *中国粮油学报*, 2008, 23(1): 32 - 35.
- [32] SONG R, WEI R B, LUO H Y. Biochemical properties and stability of antioxidative activity of half-fin anchovy (*Setipinna taty*) fermented product[J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, DOI: 10.1080/10498850.2013.782519.
- [33] 袁淑云. 纳豆激酶粗提液对小鼠试验性高脂血症的降脂作用[J]. *现代医院*, 2005, 5(5): 10 - 12.
- [34] 贾爱萍, 张海林, 邢丽, 等. 纤溶酶对糖尿病与非糖尿病性脑梗死患者的疗效及对血纤维蛋白原和血脂的影响[J]. *河北医药*, 2013, 35(13): 1974 - 1975.

(上接第 12449 页)

- [7] 郑新章, 刘立全. 国际低焦油卷烟科研新成果及其发展趋势[J]. *烟草科技*, 1998(1): 8 - 10.
- [8] SHEPHERD R J K. "Green" filters: papers role reassessed[J]. *Tob Rept*, 1993, 120(8): 46, 48, 50.
- [9] ARTERBERY C W, CALLAHAN W T, KERITSIS G D, et al. Concentric

smoking filter having cellulose acetate tow periphery and carbon - particle - loaded web filter core; US, 5365951 [P]. 1994 - 11 - 22.

- [10] 宋焱, 宋煜. 椰芒丝纯天然植物纤维滤嘴及其制作方法: 中国, 03108942. 9 [P]. 2004 - 10 - 13.
- [11] 胡素霞, 程占刚, 叶明樵, 等. 通风稀释沟槽滤嘴棒: 中国, 200820066360. 1 [P]. 2009 - 01 - 21.