

产果胶酸裂解酶的耐盐碱性菌株分离及培养条件

赵庆新<sup>1,2</sup>, 韩丰敏<sup>2</sup>

(1 盐城师范学院生命科学与技术学院, 江苏 盐城 224002)  
(2 南京师范大学生命科学学院微生物工程重点实验室, 江苏 南京 210097)

[摘要] 从江苏省沿海滩涂国家丹顶鹤自然保护区盐碱土样中, 分离得到一株果胶酸裂解酶产生菌 ZQX8, 经形态、生理生化特征和 16S rDNA 鉴定, 初步鉴定为枯草芽孢杆菌。该菌株的最佳培养条件为 37℃、pH 6.5, 0.1~0.25 mol/L NaCl, 但在 pH 7~9 之间, 0.5~1.0 mol/L NaCl 浓度下仍然能较好的生长, 表现出一定的耐盐性和耐碱性。该菌分泌的胞外果胶酸裂解酶的最佳底物为果胶酸, 在培养基中酶活达到 4 U/mL。该果胶酸裂解酶在 40~60℃, pH 8~10 的碱性条件下酶活较高, 在 600 mmol/L NaCl 存在的条件下, 也能保持较高的酶活, 显示该酶具有一定的耐碱性和耐盐性。  
[关键词] 盐碱土, 枯草芽孢杆菌, 果胶酸裂解酶, 耐盐性, 耐碱性  
[中图分类号] Q939.9 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2007)04-0089-05

Isolation of Salt-Resistant and Salkali-Resistant Pectate Lyase Producing Strains and Its Cultural Conditions

Zhao Qingxin<sup>1,2</sup>, Han Fengmin<sup>2</sup>

(1. College of Life Science and Botechnology, Yancheng Teachers University, Yancheng 224002, China)  
(2. Key Lab for Microbial Technology in the School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract** One pectate lyase producing strain ZQX8 was separated from the saline soil in Yancheng National *Grus japonensis* Nature Reserve, Jiangsu Province. Through modality of bacteria specialty in physiologic and biochemical and 16S rDNA, we identified the bacteria to be *Bacillus subtilis*. The results showed that the most optimal culture conditions of this bacterium was incubating at 37 °C, pH 6.5, with 0.1~0.25 mol/L NaCl. But incubating at 0.5~1.0 mol/L NaCl and pH 7~10, the strain could still grow, and this showed that the strain might have endurify against salt and salkali. The strain could secrete pectate lyase with enzyme activity 4U/mL medium. The optimum substrate of this enzyme was polygalacturonic acid and the optimum conditions was 40~60℃, pH 8~10. The activity of the enzyme still remained at the higher concentration of 600mmol/L NaCl. The enzyme might have both salt resistant and salkali-resistant property.  
**Key words** saline soil, *Bacillus subtilis*, pectate lyase, salt resistant, salkali-resistant

0 引言

果胶是一类富含半乳糖醛酸的多糖, 主要存在于高等植物初生细胞壁和中胶层中<sup>[1-3]</sup>。果胶的降解需要各种果胶酶的作用, 如果胶酸酯裂解酶 (pectin lyase)、果胶酸裂解酶 (pectate lyase)、果胶酸水解酶 (polygalacturonase)等<sup>[3]</sup>。果胶酸裂解酶是一类多糖裂解酶, 由细菌<sup>[4]</sup>、真菌<sup>[5]</sup>、植物<sup>[6]</sup>和线虫<sup>[7]</sup>等生物产生, 分布在 5 个多糖裂解酶家族。1962 年微生物果胶酸裂解酶在 *Erwinia carotovora* 和 *Bacillus* spp 的培养液中首次发现, *Erwinia chrysanthemi* 能够表达 5 种不同的果胶酸裂解酶<sup>[4]</sup>, 能够将各种双子叶植物的薄壁组织

收稿日期: 2007-03-22 修回日期: 2007-05-10  
基金项目: 江苏省教育厅高校自然科学指导性项目 (07KJD180237) 资助。  
作者简介: 赵庆新 (1966—), 博士, 副教授, 主要从事分子酶学与酶工程的教学与研究。E-mail: zhaoqingxinj@ yahoo.com.cn

细胞分离<sup>[4,5]</sup>, 部分来自 *Bacillus chrysanthemi* 和 *Bacillus subtilis* 的果胶酸裂解酶胶酸裂解酶的酶学性质和空间结构已经被详细研究. 前人在许多微生物果胶酸裂解酶的表达调控、原位重组表达和异源重组表达等方面进行了广泛研究, 部分微生物果胶酸裂解酶重组组织表达工程菌已经被开发为工业产酶菌株<sup>[6]</sup>.

果胶酸裂解酶对植物细胞壁的降解有十分重要的作用, 在蔬菜水果加工、酒类和饮料的澄清过程中有清除果胶的显著作用, 另外对自然纤维的加工也有重要的价值. 但不同的工艺环节中需要不同特性的酶, 如耐盐性、极端偏碱性、极端偏酸性和极端高温型等<sup>[8]</sup>, 耐盐性果胶酸裂解酶前人未有具体报道. 前人虽然对不同金属离子在低浓度条件下对果胶酸裂解酶活性的影响有所研究, 但耐高盐浓度的果胶酸裂解酶的分离、酶学性质和其耐盐机制等方面的研究尚处于空白. 耐盐性果胶酸裂解酶的研究对果胶酸裂解酶的基础研究和工业应用有十分重要的意义. 本研究分离得到的有一定耐盐性和耐碱性的枯草芽孢杆菌菌株 ZQX8 能够分泌具有耐盐性和偏碱性的果胶酸裂解酶, 现报道如下.

# 1 实验材料和方法

## 1.1 实验材料

江苏省沿海滩涂国家丹顶鹤自然保护区盐碱土样.

## 1.2 培养基

### 1.2.1 富集培养基

酵母粉提取物 5 g 蛋白胨 10 g 葡萄糖 10 g NaCl 10 g 果胶适量, 加水至 1 000 mL, pH 7.0~7.2 112℃灭菌 30 min

### 1.2.2 果胶酸裂解酶产生菌筛选培养基

果胶酸 (Sigma) 4 g 胰化蛋白胨 10 g NaCl 10 g 琼脂 15~20 g 加水至 1 000 mL, pH 7.0~7.2 112℃灭菌 30 min

## 1.3 果胶酸裂解酶产生菌的分离方法

### 1.3.1 盐碱土菌的富集

将江苏省沿海滩涂国家丹顶鹤自然保护区盐碱土样接种在富集培养液中, 37℃, 200 r/min 条件下培养 10 h 待菌长出后, 用无菌移液管吸取 5 mL 菌液转至另外装有 100 mL 富集培养液的三角瓶中, 同样条件下培养 10 h

### 1.3.2 果胶酸裂解酶产生菌的分离纯化

将培养 10 h 的菌液用平板稀释法, 在筛选培养基上涂布, 37℃静止培养 10 h 获得单菌落. 再反复纯化.

### 1.3.3 果胶酸裂解酶酶活测定

将果胶酸裂解酶产生菌活化后, 接种在 LB 液体培养基中 (pH 为 7.0 NaCl 浓度为 0.15 mol/L), 于 37℃下培养 12 h, 500 mL 菌液在 6 000 g 25℃条件下离心 10 min 后收集菌体; 用 pH 为 7.0 20 mmol/L  $K_2HPO_4$  缓冲溶液洗涤 2 次; 用含 1% 果胶酸的 20 mmol/L  $K_2HPO_4$  于 37℃, 200 r/min 下培养 24 h 之后, 在 1 000 g 4℃条件下离心 10 min 留上清. 检测上清的酶活, 果胶酸裂解酶活性检测的反应体系为: 0.5 mL 反应液, 内含 25 mmol/L NaAc/HAc 和 25 mmol/L Tris/HCl (pH 3.5~11), 0.1% 果胶酸, 1 mmol/L  $CaCl_2$  和 200  $\mu$ L 上清, 在 40℃反应 10 min<sup>[9]</sup>. 反应结束后, 加 1 mL 0.02 mol/L HCl 终止反应, 然后在 235 nm 检测光吸收值的变化. 一个酶活单位定义为每 min 释放的 1  $\mu$ mol 不饱和半乳糖醛酸 (unsaturated galacturonic acid) 的酶量. 在 235 nm, 不饱和半乳糖醛酸光吸收系数为 4 800  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ <sup>[10]</sup>. 检测不同金属离子对果胶酸裂解酶活性影响时, 在反应体系中添加一定浓度的相应的离子.

## 1.4 菌种鉴定

### 1.4.1 形态鉴定

用显微镜观察菌体形态、鞭毛、芽孢及菌落特征.

### 1.4.2 生理生化试验

菌体与氧气的关系、乙酰甲基甲醇 (V. P) 实验、糖发酵实验、淀粉水解实验的方法、产硫化氢实验、明胶液化、硝酸盐还原、吲哚试验等参考文献 [11] 的方法进行.

1.4.3 16S rDNA 鉴定

细菌 DNA 提取参照 Sambrook 等方法<sup>[12]</sup>, 16S rDNA 扩增, 参照文献<sup>[13]</sup> (sense primer CCTAATACAT-GCCAAGTC, antisense primer CGGCTGCTGGCACGTAG, 设计参照 Suzuki 和 Giovannoni 方法<sup>[14]</sup>). 根据 NCBI BLAST 服务器 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.html>), 搜索与 ZQX8 16S rDNA 具有较近亲缘关系的细菌 16S rDNA, DNA 序列比对分析用 DNAMAN 软件.

1.5 培养条件对果胶酸裂解酶产生菌生长的影响

1.5.1 温度对 ZQX8 的影响

将 ZQX8 活化后, 接种在 LB 液体培养基中, 起始 OD 值为 0.05 分别于 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 37℃ 和 45℃, 200 r/min 条件下培养, 在不同时期检测菌株的生长状况.

1.5.2 pH 对 ZQX8 的影响

将 ZQX8 活化后, 接种在 LB 液体培养基中 (LB 中添加 20 mmol/L NaCl 和 20 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 为 4~9.0). 起始 OD 值为 0.05 于 37℃ 下培养 12 h, 隔 6 h 在 OD<sub>600 nm</sub> 处检测菌株的生长状况.

表 1 ZQX8 菌株与菌落形态和生理生化特征

Table 1 The morphology, colony physiological and biochemical characteristics of ZQX8 strain			
形态特征	ZQX8 菌落特征	实验	结果
有无芽孢	有芽孢	菌体与氧气的关系	兼性
有无鞭毛	周生鞭毛	乙酰甲基甲醇 (V.P)	阴性
菌落形状	圆形	产硫化氢	阳性
菌落边缘	边缘不整齐	明胶液化	阳性
菌落光滑度	菌落表面不光滑	硝酸盐还原	阴性
菌落干燥度	菌落表面干燥	淀粉水解	阴性
菌落是否隆起	菌落表面隆起	吲哚试验	阴性
菌落透明度	菌落不透明	糖发酵试验	产酸不产气

表 2 ZQX8 16S rDNA EF570117 和不同的 *Bacillus spp* 16S rDNA 比对

Table 2 Alignment of ZQX8 16S rDNA EF570117 and different <i>Bacillus spp</i> 16S rDNA						
序列接受号	RNA 及其来源	最高分值	总分	可信度	错值	一致性
AB286650.1	<i>Bacillus subtilis</i> gene for 16S rRNA, partial sequence	784	784	100%	0.0	97%
EF433403.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. spizizenii strain BCRC 10447 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	97%
EF433402.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. spizizenii strain BCRC 17366 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	97%
DQ207730.2	<i>Bacillus subtilis</i> strain CCM 1999 16S ribosomal RNA gene complete sequence	784	784	100%	0.0	97%
EF032678.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain AU30 16S ribosomal RNA gene partial sequence	784	784	100%	0.0	97%
DQ219358.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. spizizenii strain PDA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	97%
AY553095.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain MO2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	97%
AY162133.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain BZ15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	97%
AY162132.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain MA12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	97%
AY162131.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain HP6-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	97%
AY162128.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain HAZ14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	97%
AY162127.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain HAZ2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	97%
AY162126.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain GA1-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	97%
DQ071266.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain CICC 10159 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	97%
AF318900.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain N10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	97%
AF333249.1	<i>Bacillus subtilis</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	97%

1. 5. 3 盐浓度对 ZQX8生长的影响

将 ZQX8活化后,接种在 LB液体培养基中 (pH 为 7. 0 NaCl 浓度分别为 0~ 3 mol/L). 起始 OD 值为 0. 05 于 37℃下培养 12 h 隔 6 h在 OD<sub>600 nm</sub> 处检测菌株的生长状况.

2 结果

2. 1 产果胶酸裂解酶菌株的筛选与鉴定

经过筛选得到一株产果胶酸裂解酶的菌株 ZQX8 培养基上清中果胶酸裂解酶活可达 4 U /mL 参照 Bergey手册, 菌体特征及生理生化特征 (表 1)显示 ZQX8属于芽孢杆菌属. 根据 16S rDNA 的保守序列, 设计引物,通过 PCR 反应得到 16S rDNA 片段, NCBI accession number为 EF570117, 通过 Blast分析, ZQX8 16S rDNA 与不同的 *Bacillus subtilis* 16S rDNA (AB286650 等) 之间有 97% 的一致性 (表 2), 与其它 *Bacillus* 的同源性低于 97%, 初步鉴定 ZQX8菌株归于为枯草芽孢杆菌.

2. 2 ZQX8培养条件

温度、pH 和 NaCl浓度等条件对 ZQX8菌株的生长影响研究表明, 产果胶酸裂解酶菌 ZQX8的最佳生长温度为 35~ 37℃ (图 1A), 低于 30℃生长速度明显下降; 最适宜生长 pH 为 6. 5 在 pH 为 7~ 9时, 还能较好地生长, 在 pH < 5. 5时生长几乎停滞, 显示一定的耐碱性 (图 1B); 最适宜的 NaCl浓度为 0. 1~ 0. 2 mol/L (图 1C), 但在 0. 5~ 1. 0 mol/L NaCl浓度下, ZQX8仍然能维持比较好的生长, 表现出一定的耐盐性.

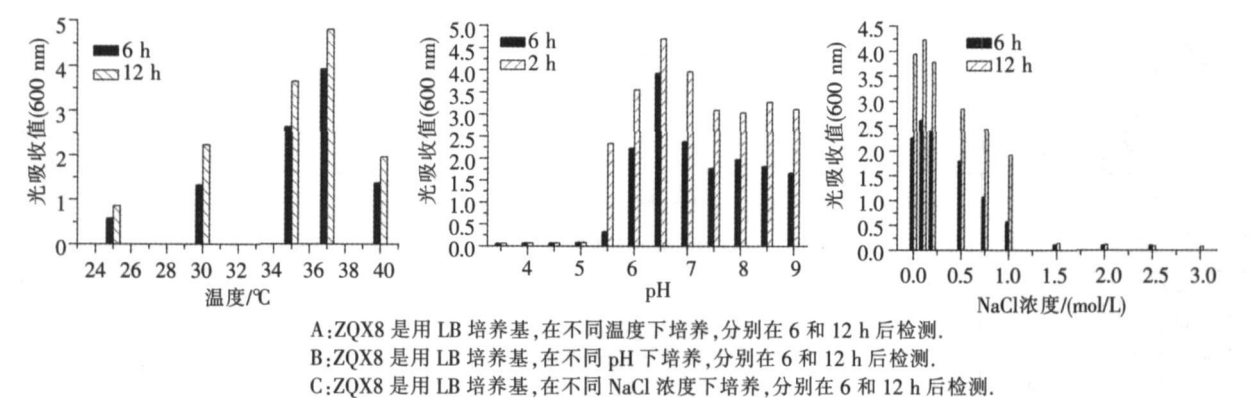


图 1 温度、pH 和 NaCl 对 ZQX8 生长的影响

Fig.1 The effect of temperature, pH and NaCl concentration on the growth of ZQX8

2. 3 培养基上清中果胶酸裂解活性

用不同的底物检测培养基上清中果胶裂解活性研究表明, ZQX8培养基上清中无果胶酸酯裂解酶活性, 有果胶酸裂解酶活性. 果胶酸裂解酶的最佳酶反应温度是 45℃, 最佳 pH 是 9. 0 最高酶活为 7. 3 ± 0. 35 U /mg 最适宜的底物是果胶酸. Ca<sup>2+</sup> 是 ZQX8果胶酸裂解酶的辅因子; 在 Ca<sup>2+</sup> 存在的前提下, Na<sup>+</sup> 浓度在 250 mmol/L 以下时, 对 ZQX8 菌株果胶裂解酶酶活有明显的促进作用 (表 3), 在 5 mmol/L Ca<sup>2+</sup>, 250 mmol/L Na<sup>+</sup> 时酶活可以达到 12. 72 U /mg 而且在 0. 3~ 0. 6 mol/L Na<sup>+</sup> 存在时, ZQX8果胶酸裂解酶还能维持较高的酶活, 另外, Mn<sup>2+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup> 等离子对 ZQX8果胶酸裂解酶都有促进作用. ZQX8果胶酸裂解酶同时具备偏碱性和耐盐性, 与前人报道的果胶裂解酶相比, 在开发和利用方面会有一定的优势.

3 讨论

ZQX8菌株有一定的耐盐性和有一定的耐碱性. 该 ZQX8菌株分泌的果胶酸裂解酶的酶学性质初步研究表明该酶在 40~ 60℃, pH 8~ 10范围内, 能保持较高的酶活. 另外, 与前人报道的其它来源的果胶酸裂解酶相比, ZQX8果胶酸裂解酶表现出较好的耐盐性, 在 Ca<sup>2+</sup> 存在的前提下, Na<sup>+</sup> 浓度在 250 mmol/L 以下时, 对 ZQX8菌株果胶裂解酶酶活有明显的促进作用; 而且在 300~ 600 mmol/L Na<sup>+</sup> 存在时, ZQX8果胶酸裂解酶还能维持较高的酶活; Mn<sup>2+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup> 等离子对 ZQX8果胶酸裂解酶都有促进作用, 这与过去报道的果胶酶相比, 该酶显示对高浓度 Na<sup>+</sup> 的耐受性; Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup> 等金属离子, 在一定浓度下, 对该酶都存在正效应. 金属离子对果胶酸裂解酶的影响, 前人有所报道, 来自 *A. niger* 的果胶酸裂解酶 A 在

Na<sup>+</sup>存在时,酶活增强<sup>[5]</sup>;对于来自*E. chrysanthemi* 3937E. *chrysanthemi* 3937的果胶酸裂解酶 Z<sup>[15]</sup>, Mn<sup>2+</sup>能够代替 Ca<sup>2+</sup>作为辅助因子,但 Mg<sup>2+</sup>对*B. salcalophilus* NTT33的果胶酸裂解酶 A<sup>[4]</sup>酶活有抑制作用. 上述有关的酶性质研究表明,该菌果胶酸裂解酶符合棉纺织品脱胶和有关植物药物材料在碱性和高盐条件下加工的工艺条件要求.

表 3 金属离子对 ZQX8菌株果胶裂解酶粗蛋白比活的影响

Table 3 The effect of different metal ions on the activity of crude pectate lyase from ZQX8

金属离子	酶活 /(U /mg)	金属离子	酶活 /(U /mg)
control	0. 02	1 0mM Na <sup>+</sup>	10. 51
1 mmol/L Ca <sup>2+</sup>	7. 20	20 mm ol/L Na <sup>+</sup> , 5 mmo l/L Ca <sup>2+</sup>	10. 50
2 mmol/L Ca <sup>2+</sup>	10. 35	40 mm ol/L Na <sup>+</sup> , 5 mmo l/L Ca <sup>2+</sup>	10. 53
5 mmol/L Ca <sup>2+</sup>	12. 40	60 mm ol/L Na <sup>+</sup> , 5 mmo l/L Ca <sup>2+</sup>	10. 53
10 mm ol/L Ca <sup>2+</sup>	0. 10	80 mm ol/L Na <sup>+</sup> , 5 mmo l/L Ca <sup>2+</sup>	10. 56
1 mmo l/L Mn <sup>2+</sup>	0. 25	100 mm ol/L Na <sup>+</sup> , 5 mmol/L Ca <sup>2+</sup>	11. 56
2 mmo l/L Mn <sup>2+</sup>	0. 4	150 mm ol/L Na <sup>+</sup> , 5 mmol/L Ca <sup>2+</sup>	12. 70
5 mmo l/L Mn <sup>2+</sup>	0. 45	200 mm ol/L Na <sup>+</sup> , 5 mmol/L Ca <sup>2+</sup>	12. 78
10 mmo l/L Mn <sup>2+</sup>	0. 02	250 mm ol/L Na <sup>+</sup> , 5 mmol/L Ca <sup>2+</sup>	12. 72
1 mm ol/L Mg <sup>2+</sup>	0. 15	300 mm ol/L Na <sup>+</sup> , 5 mmol/L Ca <sup>2+</sup>	5. 60
2 mm ol/L Mg <sup>2+</sup>	0. 23	350 mm ol/L Na <sup>+</sup> , 5 mmol/L Ca <sup>2+</sup>	5. 55
5 mm ol/L Mg <sup>2+</sup>	0. 37	500 mm ol/L Na <sup>+</sup> , 5 mmol/L Ca <sup>2+</sup>	5. 54
10 mm ol/L Mg <sup>2+</sup>	0. 03	600 mm ol/L Na <sup>+</sup> , 5 mmol/L Ca <sup>2+</sup>	5. 50

[参考文献]

[ 1 ] 陆长梅,李继影,陈阳,等. XyIII包涵体的纯化与变复性研究[ J]. 南京师大学报:自然科学版, 2004 27( 4): 67-71

[ 2 ] O' NeillM A, A lbersheim P, Darvill J. A. The Pectic Polysaccharides of Prim ary CellW alls[M]. London A cadem ic Press 1990 415-441.

[ 3 ] UhligH. Processing of Fruit Vegetables Enzym es in Industry: Production and Applications[M]. New York VCH, 1990 126-128

[ 4 ] ZhaiC, Cao J, Wang Y. Cloning and expression of a pectate lyase gene from *Bacillus alcalophilus* NTT33[ J]. Enzyme and Microbial Technology 2003 33( 2): 173-178

[ 5 ] Benen JA, KesterH C M, Parenková L, et al Characterization of *Aspergillus niger* pectate lyase A [ J]. Biochemistry 2000 39( 50): 15 563-15 569.

[ 6 ] Kulkauskas R, McCormick S Identification of the tobacco and *Arabidopsis* homologues of the pollen-expressed LAT 59 gene of tomato[ J]. PlantMolecular Biology 1997 34( 5): 809-814

[ 7 ] Huang G, Dong R, Allen R, et al Developmental expression and molecular analysis of two *Meloidogyne incognita* pectate lyase genes[ J]. International Journal for Parasitology 2005 35( 6): 685-692

[ 8 ] 蒋宇,邵蔚蓝.嗜热厌氧产乙醇杆菌乙醇代谢途径的初步研究[ J]. 南京师大学报:自然科学版, 2005 28(3): 69-73

[ 9 ] Collier A, Ried J L, Mark S Mount assay methods for pectic enzymes[ J]. Methods in Enzymology, 1988 161( 35): 329-335

[ 10 ] M am illan J D, Vaughn R H. Purification and properties of a polygalacturonic acid trans-eliminase produced by *clostridium* multiformentans[ J]. Biochemistry 1964 3( 4): 564-572

[ 11 ] Claus D, Berkeley R C W. Genus *Bacillus* In Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology ninth ed[M]. New York Springer 1986 1105-1139.

[ 12 ] Sambrook J, Fritsch E F, ManiatisT. MolecularCloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed New York Cold SpringHarborLaboratory Press 1989.

[ 13 ] Williams CM, RichesterC S, Mackenzi JM, et al Isolation, identification and characterization of a feather-degrading bacterium[ J]. Applied and Environmental Microbiology 1990 56(6): 1509-1515

[ 14 ] SuzukiM T, GiovannoniS J Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR [ J]. Applied and Environmental Microbiology 1996 62( 2): 625-630

[ 15 ] Pissavin C, RobertBaudouy J, Hugouvieux-Cotte-Pattat N. Biochemical characterization of the pectate lyase PeIZ of *Erwinia chrysanthami* 3937[ J]. Biochimica et Biophysica Acta 1998 1383 188-196

[责任编辑: 孙德泉]