响应面法优化猪血浆蛋白制备铁螯合肽的酶解工艺

殷俊峰1,张福生1,朱峰2,郭俊2,范翠玲2,朱梅2,朱林2,赵敏2

(1. 安徽省农业科学院农产品加工研究所,安徽合肥 230031;2. 安徽珠峰生物科技有限公司,安徽太和 236600)

摘要 [目的]优化响应面法对猪血浆蛋白酶解制备铁螯合多肽的工艺。[方法]应用响应面法对猪血浆蛋白酶解制备铁螯合多肽的工艺进行优化,在单因素试验的基础上,选择 pH、水解温度、水解时间为影响因素,以水解度为指标,进行3因素3水平的 Box - Behnken 中 心组合试验设计,采用响应面法分析3个因素对响应值的影响。[结果] 响应面法优化猪血浆蛋白制备蛋白粉的最佳工艺条件为 pH 7.7,温度 46.3℃,水解时间 7.4 h;在此条件下,蛋白的水解度为 35.52%,水解物螯合率为 79.41%。[结论]该工艺可为猪血浆蛋白开 发利用提供新的思路。

关键词 响应面法;猪血蛋白;水解;水解度

中图分类号 S879 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)23-0084-05

Optimization of Enzymatic Hydrolysis Process for Preparation of Fe-Chelating Peptides from Porcine Plasma Proteins by Response Surface Methodology

YIN Jun-feng¹, ZHANG Fu-sheng¹, ZHU Feng² et al (1. Institute of Agricultural Products Processing, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230031;2. Anhui Mount Everest Biotechnology Co., Ltd., Taihe, Anhui 236600)

Abstract [Objective] To optimize the preparation of iron chelate polypeptide by hydrolysis of porcine plasma protein by response surface methodology. [Method] Response surface methodology was used to optimize the preparation of iron chelate polypeptide from porcine plasma protein hydrolysis degree as index, the Box-Behnken central composite experimental design of 3 factors and 3 levels, used the response surface method to analyze the influence of 3 factors on the response value. [Result]In response to the optimized process of preparation of protein powder surface method for preparation of porcine plasma protein pH 7.7, hydrolysis temperature 46.3 $^{\circ}$ C, hydrolysis time 7.4 h, under this condition, hydrolysis degree of protein hydrolysate was 35.52%, chelation rate was 79.41%. [Conclusion] This process can provide new ideas for the development and utilization of pig plasma proteins.

Key words Response surface analysis; Porcine serum protein; Hydrolysate; Degree of hydrolysate

猪血是生猪屠宰后的一种副产品,每100g猪血中含蛋白质16g,高于牛肉、瘦猪肉蛋白质的含量,而且容易消化吸收,猪血蛋白质所含的氨基酸比例与人体中氨基酸的比例接近,富含铁元素,胆固醇比猪肉还低,非常容易被机体利用。猪血血浆中粗蛋白含量超过75%,粗脂肪2%,消化能和代谢能非常高,能满足动物幼崽时期的营养需求,赖氨酸含量高于其他动物源饲料,氨基酸比例平衡,适口性好,蛋白质消化率在95%以上^[1],富含具有生物学特性的蛋白如IgG、IgM等^[2-3]。

铁是人体必需的微量元素之一。缺铁性贫血是指体内 与血红蛋白结合的微量元素铁不足所引发的一种细胞性贫 血,目前服用补铁剂是治疗缺铁性贫血最有效的途径之一。 氨基酸类补铁剂具有抗干扰性好、稳定性强和易吸收等优 点,但它存在着产品单一、价格高和专一性太强的缺点。氨 基酸螯合物种类繁多,诸如天门冬氨酸亚铁、赖氨酸亚铁等 一系列氨基酸亚铁螯合物。姚磊等^[4]通过硫酸亚铁与L-甘氨酸发生螯合反应,最终得到甘氨酸亚铁的螯合率达到 65.43%;张晓鸣等^[5]研究发现,丙酮等有机溶剂可以有效分 离提纯水溶性氨基酸配合物;汪芳安等^[6]通过控制反应条 件,使得氯化亚铁与L-蛋氨酸发生螯合反应,所得蛋氨酸 亚铁产品最终得率为 66.80%;秦卫东等^[7]通过酶解脱脂豆 粕,所得到的氨基酸液与亚铁螯合生成复合氨基酸亚铁。

该研究是以猪血清蛋白作为原料,以碱性蛋白酶水解猪

血浆蛋白,通过单因素试验对水解温度、水解 pH、底物质量 浓度、加酶量和水解时间等工艺参数进行研究,并用响应面 法优化制备铁螯合多肽的最佳工艺参数,以期为猪血蛋白资 源的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料与主要试剂。新鲜猪血,黄山市鑫黄山特产有限公司;盐酸、氢氧化钠(分析纯)、碱性蛋白酶,合肥博美生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器设备。722型分光光度计,上海普元仪器仪 表有限公司;HH-6数显恒温水浴锅、78-I型磁力搅拌器, 江苏省金坛荣华仪器制造有限公司;RJ-TDL-5A 低速台式 大容量离心机,无锡瑞江机械设备有限公司;1000C 电子天 平,上海凯士电子有限公司。

1.2 方法

1.2.1 工艺流程。猪血→离心分离→血浆液→超滤→喷雾 干燥→血浆粉→酶解。

1.2.2 血浆蛋白粉酶解工艺。称取一定量的血浆粉,加入 适量去离子水,放入气浴恒温振荡器振荡溶解,将溶液 pH 调 至反应所需的 pH,加入一定比例的碱性蛋白酶,放入恒温水 浴锅,控制温度与时间。反应结束后,100 ℃水浴 3~5 min, 灭酶。对血浆酶解液进行离心(6 000 r/min, -4 ℃, 15 min),上清液滤纸过滤,冷冻干燥,采用 TNBS 法测定蛋白 质水解度。

1.2.3 基础理化检测。对猪血和血浆蛋白粉中的水分、蛋白质等营养物质的含量进行测定。水分含量按照 GB 5009.

作者简介 殷俊峰(1969—),男,安徽凤阳人,副研究员,从事农产品贮 运保鲜及加工研究。 收稿日期 2017-07-19

3-2010 的方法进行测定;蛋白质含量采用凯氏定氮法测定; 脂肪含量采用索氏抽提法测定:蛋白质水解度的测定采用 TNBS 法测定:铁元素含量采用火焰原子吸收法测定。

1.2.4 氨基酸组成分析。称取样品 0.1 g 于水解管中, 加入 6 mol/L 的盐酸溶液 10 mL 后,充入氮气,待水解管中的空气 排净后拧紧管盖,防止漏气。将充入氮气的旋接管放入 110 ℃的烘箱反应 22 h 后取出冷却,用超纯水定容到 50 mL 的容量瓶中并混匀,取1mL于烧杯中,将液体样品真空干燥 24 h, 加入 3 mL 的 0.2 mol/L 的色谱纯 HCl 溶液, 充分混匀 后取1 mL 液体过0.22 μm 滤膜,经氨基酸自动分析仪检测 其氨基酸组分。

1.2.5 螯合活性测定。参照 GB/T 13885 的方法进行测定。

1.2.6 单因素试验。选择水解温度、pH、水解时间、酶添加 量、底物浓度作为主要单因素,考察各单因素对酶解蛋白的 影响。每组试验重复3次。

1.2.7 响应面试验因素及水平。根据 Box – Behnken 中心 组合试验设计方案,综合单因素试验结果,选择单因素试验 中显著因素(pH、水解温度和时间)进行优化,因素水平设计 见表1。

表1 响应面试验因素和水平

Table 1 Factor and level of response surface experiment

	因素 Factor				
水平		水解温度	水解时间		
Level	pH(A)	Hydrolysis temperature	Hydrolysis time		
		(B)∥℃	(C)//h		
- 1	6	45	4		
0	7	50	6		
1	8	55	8		

1.2.8 数据处理。每次试验重复3次,取平均值。采用 Design-Expert 8.0.5 软件进行响应曲面的分析和作图。

2 结果与分析

2.1 理化性质 猪血血浆蛋白粉的理化指标如表 2 所示。 血浆蛋白是猪血中的主要成分,猪血中蛋白质含量达到4. 30%,猪血血浆蛋白粉中蛋白质含量为79.10%,所以猪血是 血浆蛋白粉加工的主要原材料。

表2 猪血和血浆蛋白粉的理化指标

Table 2 Physical and chemical indexes of pig blood and plasma protein powder

材料 Materia	水分 Moisture content %	蛋白质 Protein %	粗脂肪 Crude fat %	铁元素含量 Iron content mg/kg
猪血 Pig blood	93.15	4.30	0.22	450
血浆蛋白粉 Plasma protein powder	8.66	79.10	0.49	78

2.2 氨基酸组成 猪血加工副产物氨基酸组成分析如表 3 所示。猪血中富含氨基酸,氨基酸种类为16种,其中必需氨 基酸有7种,必需氨基酸总量为43.36%,其中亮氨酸含量最 高,为13.74%;赖氨酸次之,为9.06%。猪血血浆蛋白粉中 必需氨基酸/氨基酸总量为40.80%,其中亮氨酸含量最高,

为9.78%;赖氨酸次之,为8.70%。

表3 猪血加工副产物氨基酸组成分析

Table 3 Amino acid composition analysis of pig blood processing by-

products			%
序号 Serial No.	氨基酸种类 Amino acids	猪血 Pig blood	血浆蛋白粉 Plasma protein powder
1	天冬氨酸(Asp)	12.31	9.93
2	苏氨酸(Thr)*	3.72	5.94
3	丝氨酸(Ser)	5.11	6.09
4	谷氨酰胺(Glu)	10.20	15.62
5	甘氨酸(Gly)	4.01	3.15
6	丙氨酸(Ala)	7.90	5.26
7	半胱氨酸(Cys)	1.17	3.66
8	缬氨酸(Val)*	8.12	6.13
9	蛋氨酸(Met)*	0.89	1.00
10	异亮氨酸(lle)*	0.72	3.31
11	亮氨酸(Leu)*	13.74	9.78
12	酪氨酸(Tyr)	2.72	4.97
13	苯丙氨酸(phe)*	7.11	5.94
14	赖氨酸(Lys)*	9.06	8.70
15	组氨酸(His)	7.38	3.35
16	色氨酸(Trp)*	0	0
17	精氨酸(Arg)	4.47	5.79
必需氨基酸总量 Total essential amino acids	—	43.36	40.80
必需氨基酸/氨基酸总 量 Essential amino acids / amino acids total	—	43.36	40.80
	2		

注:*表示必需氨基酸

Note: * means essential amino acids

2.3 单因素试验

2.3.1 不同酶解温度对血浆蛋白粉水解度的影响。底物浓 度为6%,初始pH为7,蛋白酶添加量为0.4%,分别在30、 40、50、60 ℃下水解4h,测定不同酶解温度下的蛋白水解度, 结果如图1所示。



图1 不同水解温度对蛋白水解度的影响

Fig. 1 Effect of different hydrolysis temperature on hydrolysis degree of protein

由图1可以看出,温度对蛋白酶解有显著影响,水解度 随着温度的升高而逐渐增加,当温度达到50℃,水解度最 大;大于50℃,水解度逐渐减小。这是由于酶解反应随着温 度的升高蛋白酶活性逐渐增大,但是温度过高会降低酶的活 性。因此反应温度应控制在 50 ℃左右。

2.3.2 不同 pH 对血浆蛋白粉水解度的影响。调节初始 pH

分别为5、6、7、8,底物浓度为6%,蛋白酶添加量为0.4%, 45℃下水解4h,测定不同初始pH下的蛋白水解度,结果如 图2所示。



图 2 不同 pH 对蛋白水解度的影响

Fig. 2 Effect of different pH on hydrolysis degree of protein

图2表明,其他条件一定,pH由5提高至7时,水解度随着 pH的升高而增加,在 pH为7时达到最大,然而当 pH继续升高时,水解度又慢慢减小。可能是因为当 pH大于7时,酸碱度影响了底物的空间构象^[8],从而影响了酶与底物的结合,故反应 pH 应控制在7左右。

2.3.3 不同酶解时间对血浆蛋白粉水解度的影响。固定底 物浓度为6%、初始 pH为7、酶添加量为0.4%、水解温度为 45℃,分别水解2、4、6、8、10 h,测定不同酶解时间下的蛋白 水解度,结果如图3所示。





图 3 表明,在 2~6 h 之内,随着酶解时间的增加,蛋白的 水解度快速增大,6 h 达到最大,之后酶解速度放慢,水解度 缓慢降低。因此反应时间应控制在 6 h 左右。

2.3.4 不同浓度酶添加量对血浆蛋白粉水解度的影响。固定底物浓度为 6%、初始 pH 为 7,分别添加 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%的碱性蛋白酶,45 ℃下水解 4 h,测定不同酶添加量对其蛋白水解度的影响,结果如图 4 所示。

图4表明,当酶添加量在0.2%~0.6%时,蛋白水解度 随着酶添加量的增加而增加,在0.6%时达到最大,随后水解 度逐渐减小。可能是由于酶本身也是一种蛋白质,也会发生 酶解,如果量太大则会干扰酶解物的组成^[9-10]。因此,反应 酶添加量应控制在0.6%左右。

2.3.5 不同底物浓度对血浆蛋白粉水解度的影响。调节底





Fig. 4 Effect of different enzyme addition on hydrolysis degree of protein

物浓度分别为 4%、6%、8%、10%、12%, 初始 pH 为 7, 蛋白 酶添加量为 0.4%, 45 ℃下水解 4 h, 测定其不同底物浓度下 的蛋白水解度, 结果如图 5 所示。



图 5 不同底物浓度对蛋白水解度的影响

Fig. 5 Effect of different substrate concentration on hydrolysis degree of protein

图5表明,蛋白水解度随着底物浓度的增加影响不大, 在底物浓度为8%时,水解度相对其他底物浓度时达到最大, 因此反应底物浓度应控制在8%左右。

通过上述5个条件的酶解单因素试验可以得出,pH、水 解时间和温度的变化对血浆蛋白粉的水解度具有显著影响, 而底物浓度和酶添加量的影响不明显。因此,在接下来的响 应面试验中只对 pH、水解时间和温度这3个因素进行工艺 优化,底物浓度和酶添加量将不再作为影响因素进行研究, 选择底物浓度为8%、酶添加量为0.2%作为固定试验条件 不再变化。

2.4 响应面优化试验 根据 Design – Expert 8.0.5 软件设计的 3 因素 3 水平的响应面试验,结果见表 4。

采用 Design – Expert 8.0.5 软件程序对以上的试验数据 进行二次多元回归拟合,分析结果得出血浆蛋白粉水解度的 回归方程为 Y = -230.772 25 + 38.531 5A + 3.302 25B +10.724 25C – 0.037 25AB + 0.331 25AC – 0.053 125BC – 2.527 25A² – 0.027 672B² – 0.746 81C²。为了检验上述方程 的有效性,对回归模型进行方差分析,分析结果得出: $F_{\rm kgg}$ = 104.54, $P_{\rm kgg}$ < 0.000 1^{**}; $F_{\rm A}$ = 302.13, $P_{\rm A}$ < 0.000 1^{**}; $F_{\rm B}$ = 5.58, $P_{\rm B}$ = 0.05; $F_{\rm C}$ = 228.80, $P_{\rm C}$ < 0.000 1^{**}; $F_{\rm AB}$ = 1.95, $P_{\rm AB}$ = 0.20; $F_{\rm AC}$ = 6.18, $P_{\rm AC}$ = 0.04^{*}; $F_{\rm BC}$ = 15.90, $P_{\rm BC}$ = $\begin{array}{l} 0.\ 01^{\;*}\ ;F_{\mathrm{A}^{2}}\ =\ 94.\ 69\ ,P_{\mathrm{A}^{2}}\ <\ 0.\ 000\ 1^{\;*\;*}\ ;F_{\mathrm{B}^{2}}\ =\ 113.\ 53\ ,P_{\mathrm{B}^{2}}\ <\\ 0.\ 000\ 1^{\;*\;*}\ ;F_{\mathrm{B}^{2}}\ =\ 113.\ 53\ ,P_{\mathrm{B}^{2}}\ <\\ 0.\ 000\ 1^{\;*\;*}\ ;F_{\mathrm{HI}}\ =\ 4.\ 35\ ,\\ P_{\mathrm{4\,HI}}\ =\ 0.\ 09\ _{\circ}\end{array}$

表 4 猪血浆蛋白制备铁螯合肽的酶解工艺响应面分析结果 Table 4 Enzymatic hydrolysis process of iron peptide prepared by porcine plasma protein and response surface analysis

		水磁声		
试验号 Test No.	pH(A)	水解温度 Hydrolysis temperature (B)∥℃	水解时间 Hydrolysis time (C)//h	小冊授 Hydrolysis degree %
1	6	50	8	26.96
2	6	50	4	23.07
3	6	40	6	24.58
4	8	50	8	34.11
5	6	60	6	24.44
6	7	40	8	32.29
7	8	50	4	27.57
8	7	60	8	29.27
9	8	40	6	32.60
10	7	40	4	23.98
11	7	50	6	33.43
12	8	60	6	30.97
13	7	50	6	33.90
14	7	50	6	33.19
15	7	50	6	33.64
16	7	60	4	25.21
17	7	50	6	33.05

方差分析表明,模型的差异是极显著的(P < 0.0001), 说明该模型能够解释大部分试验情况的变化,同时失拟差不 明显,这进一步说明了该模型的合理性。因此可以用此模型 对整个试验结果进行分析和预测。

3个因素对血浆蛋白粉水解作用比较复杂。在上述回 归方程的所有一次项中,对于血浆蛋白粉水解作用影响的顺 序为A>C>B,其中A、C2项影响极显著(P<0.0001),所 以pH和时间对血浆蛋白粉水解影响较大;在所有的平方项 中A²、B²、C²3项影响极显著(P<0.0001);而交互项的影响 就相对较小。因此,各因素对血浆蛋白粉水解作用影响的大 小顺序为pH>水解时间>温度。

2.5 响应面分析 采用 Design - Expert 8.0.5 软件,带入试 验数据,分别将模型中的 pH(A)、温度(B)、时间(C)的其中 一个因素固定在 0 水平不变,得到其余 2 个因素之间相互作 用对于蛋白水解度的影响。通过软件的 Model Graph 值分别 合成 3 个因素间交互作用影响的响应面图和等高线图(图 6 ~11)。

2.6 最佳水解工艺条件的确定及其铁螯合活性 根据 Design Expert 8.0.5 软件程序得到血浆蛋白粉酶解的最佳工艺 条件为 pH 7.7,温度 46.3 ℃,时间 7.4 h;在此条件下,蛋白 水解度的预测值为 35.52%。

在上述最佳酶解工艺条件下设计3次平行试验,将3次 平行试验的数值取平均值,得到血浆蛋白粉酶解时蛋白水解 度平均为37.55%,高于预测值0.03%,水解物螯合率为



图 6 pH 与水解温度交互作用影响的响应面

Fig. 6 Response surface diagram of the interaction of pH and hydrolysis temperature



图7 pH 与水解温度交互作用影响的等高线

Fig. 7 Contours of the interaction of pH and hydrolysis temper-

ature



图 8 水解温度与时间交互作用影响的响应面



sis temperature and time



图9 水解温度与时间交互作用影响的等高线

Fig. 9 Contour map of interaction between hydrolysis temperature and time







Fig. 10 Response surface map of interaction between pH and hydrolysis time



图 11 pH 与水解时间交互作用影响的等高线

Contour map of the interaction between pH and hydrol-Fig. 11 ysis time

79.41%。证明了响应面分析法对于酶解工艺的优化结果准 确可靠,有较高实用价值。

(上接第31页)

- [6] 王学奎.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社, 2006.
- [7] WU Y X, VON TIEDEMANN A. Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (Hordeum vulgare L.) exposed to ozone [J]. Environmental pollution, 2002, 116(1): 37-47.
- [8] 孔祥生,易现峰.植物生理学实验技术[M].北京:中国农业出版社, 2008:160-162.
- [9] FILEK M, WALAS S, MROWIEC H, et al. Membrane permeability and micro-and macroelement accumulation in spring wheat cultivars during the short-term effect of salinity-and PEG-induced water stress[J]. Acta physiologiae plantarum, 2012, 34(3): 985-995.
- [10] 方志红,董宽虎. NaCl 胁迫对碱蒿可溶性糖和可溶性蛋白含量的影响 [J]. 中国农学通报,2010,26(16):147-149.
- [11] WANB W B, KIM Y H, LEE H S, et al. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses [J]. Plant physiology and biochemistry, 2009, 47(7): 570-577.

3 结论

猪血经过高速离心分离,将血浆和血细胞分离,过滤浓 缩、喷雾干燥,得到血浆蛋白粉。在 pH、底物浓度、水解温 度、酶解浓度、水解温度对蛋白水解的单因素影响试验中得 出 pH、水解时间和水解温度这3个因素的变化对蛋白水解 度具有很明显的影响,加酶量和底物浓度这2个因素对于蛋 白水解度的影响不大。通过响应面优化试验得出:各因素对 血浆蛋白粉水解作用影响的大小顺序为 pH > 水解时间 > 温 度。该试验结果表明,猪血浆蛋白制备蛋白粉的最佳工艺条 件为 pH 7.7,温度 46.3 ℃,水解时间 7.4 h;在此工艺条件下 猪血清蛋白有很好的酶解效果。

参考文献

- [1] 赵艳,张凤枰,刘耀敏,等. 高效液相色谱法测定血浆蛋白粉中免疫球 蛋白 IgG[J]. 饲料研究,2010(8):47-48.
- [2] ZHOU Z T, LIU X M. The differences betweens pray-dried blood cells and dried whole blood powder [J]. The development and utilization of resources, 2006(10):39-40.
- [3] 刘中勇,马孝斌,高东微,等.猪血浆蛋白粉中 IgG 含量的酶联免疫检测 方法研究[J]. 饲料工业,2010,31(15):42-44.
- [4] 姚磊,赵海田,王静.食品营养强化剂甘氨酸亚铁螯合物的合成工艺 [J]. 食品与发酵工业,2004,30(9):69-71.
- [5] 张晓鸣,杜宣利.甘氨酸亚铁络合物合成工艺的研究[J]. 饲料工业, 1995, 16(10): 9 - 11.
- [6] 汪芳安,黄泽元,王海滨,等. 蛋氨酸亚铁螯合物的合成及表征[J]. 湖 北化工,2001(4):17-19.
- [7] 秦卫东,吕兆启,涂宝军.复合氨基酸亚铁的制备研究[J].中国食品添 加剂,2003(6):42-45.
- [8] 刘萍,陈黎斌,杨严俊. 酶解玉米蛋白制备降血压肽的研究[J]. 食品工 业科技,2006,27(5):117-122.
- [9] CLEMENTE A, VIOQUE J, SÁNCHEZ-VIOQUE R, et al. Protein quality of chickpea (Cicer arietinum L.) protein hydrolysates [J]. Food chemistry, 1999.67(3):269-274.
- [10] 薛照辉,吴谋成,尹经章. 复合酶水解菜籽清蛋白的研究[J]. 中国粮 油学报,2004,19(3):57-61.

- [12] 张兆英,宋立立.园林植物抗寒性鉴定指标的分析[J].黑龙江农业科 学,2012(2):60-62.
- [13] 孙存华,孙存玉,张亚红,等. 低温对香樟膜脂过氧化和保护酶活性的 影响[J]. 广东农业科学,2011,38(4): 58 - 60,65.
- [14] 王萍,张成军,陈国祥,等. 低温对水稻剑叶膜脂过氧化和脂肪酸组分 的影响[J].作物学报,2006,32(4):568-572.
- [15] 柯世省,杨敏文.水分胁迫对云锦杜鹃抗氧化系统和脂类过氧化的影 响[J]. 园艺学报,2007,34(5):1217-1222.
- [16] 谭健晖. 马尾松优良种源苗木对人工低温胁迫的生理生化反应[J]. 林业科学,2013,49(3):51-55.
- [17] 刘春英,陈大印,盖树鹏,等. 高、低温胁迫对牡丹叶 PSII功能和生理特 性的影响[J].应用生态学报,2012,23(1):133-139.
- [18] 李春燕,陈思思,徐雯,等. 苗期低温胁迫对扬麦16 叶片抗氧化酶和渗 透调节物质的影响[J]. 作物学报,2011,37(12): 2293-2298.
- [19] 何丽斯,汪仁,孟祥静,等.茉莉扦插苗对模拟低温的生理响应[J].西 北植物学报,2010,30(12):2451-2458.