

## 谷氨酰胺转氨酶发酵工艺优化及其酶学性质

王兴吉, 刘文龙\*, 郭庆亮, 张杰 (山东隆科特酶制剂有限公司, 山东省酶制剂生物发酵技术重点实验室, 山东临沂 276400)

**摘要** [目的]研究茂源链霉菌 LD195 产 TGase 的最佳发酵工艺条件,并探讨 TGase 的酶学特性。[方法]采用  $L_9(3^4)$  正交试验对产谷氨酰胺转氨酶的茂源链霉菌菌株培养基和培养条件进行优化。[结果]最佳无机盐配方为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.0 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.5 g/L,  $\text{CaCl}_2$  3.0 g/L, 最佳培养条件为培养温度 30 °C, 装液量 25 mL, 摇床转速 200 r/min, 接种量 10%。该谷氨酰胺转氨酶的最适反应温度为 50 °C, 在 40~60 °C 条件下保温 30 min 酶活基本没有损失; 最适反应 pH 为 6.0, 在 pH 为 5.0~7.0 条件下保存 30 min 仍具有 85% 以上酶活; 同时  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  会强烈抑制酶的活性。[结论]茂源链霉菌 LD195 产 TGase 具有良好的耐酸性和耐热性, 在商业化生产中具有广阔前景。

**关键词** 培养基; 茂源链霉菌; 谷氨酰胺转氨酶; 酶学性质

**中图分类号** S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)32-0161-04

## Fermentation Process Optimization of Transglutaminase and Its Enzymatic Properties

WANG Xing-ji, LIU Wen-long\*, GUO Qing-liang et al (Shandong Long Kete Enzyme Co., Ltd., Shandong Province Key Laboratory of Enzyme Preparation Fermentation Technology, Linyi, Shandong 276400)

**Abstract** [Objective] To investigate the optimum fermentation conditions of TGase produced by *Streptomyces lanceolata* LD195 and explore the enzymatic properties of TGase. [Method]  $L_9(3^4)$  orthogonal design on media and culture conditions of *Streptomyces lanceolata* were optimized. [Result] The best medium:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.0 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.5 g/L,  $\text{CaCl}_2$  3.0 g/L. The optimal culture conditions: culture temperature 30 °C, bottling capacity 25 mL, agitation rate 200 r/min, inoculums size 10%. The produced TGase exhibited optimum activity at 50 °C and pH 6.0. It was stably incubated in 40~60 °C for 30 min and the remained enzyme activity was above 85% dealt with pH 5.0~7.0 for 30 min. The enzyme was strongly inactivated by  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ . [Conclusion] TGase produced by *Streptomyces lanceolata* LD195 has good acid resistance and heat resistance, and which has broad prospects in commercial production.

**Key words** Medium; *Streptomyces lanceolata*; Transglutaminase; Enzymatic properties

谷氨酰胺转氨酶 (Transglutaminase, EC2.3.2.13, TGase), 又称转谷氨酰胺酶 (TGase), 是一种催化酰基转移反应的转移酶, 是由 331 个氨基酸组成的分子量约 38 000 的具有活性中心的单体蛋白质, 可催化蛋白质多肽发生分子内和分子间共价交联<sup>[1-2]</sup>, 从而改善蛋白质的结构和功能, 影响蛋白质的性质, 如发泡性、乳化性、乳化稳定性、热稳定性、保水性和凝胶能力等, 进而改善食品的风味、口感、质地和外观等, 目前已经被广泛应用于食品工业。但由于其生产成本过高, 严重限制了该酶的推广及使用<sup>[3]</sup>。

微生物来源的 TGase (Microbial transglutaminase, MTG) 主要来自于芽孢杆菌属 (*Bacillus* spp.) 和链霉菌属 (*Streptomyces* spp.)。从茂源链轮丝菌 (*Streptomyces mobaraensis*) 中分离得到的 TGase, 酶分子量为 37.9 kD, 由 331 个氨基酸组成, 活性中心含有 1 个半胱氨酸残基, 活性不依赖钙离子<sup>[4]</sup>。此外, 研究者在 *Streptomyces hygroscopicus*<sup>[5]</sup>、*Streptomyces griseoverticillatunt*<sup>[6]</sup>、*Bacillus circulans*<sup>[7]</sup>、*Streptomyces libani*<sup>[8]</sup> 及 *Bacillus subtilis*<sup>[9]</sup> 等微生物中也发现了 TGase 的存在, 并且进行了酶纯化、发酵工艺优化、基因工程表达等相关研究, 取得了一定成果。目前仅 *S. mobaraensis* 来源的 TGase 实现了商业化生产, 其他微生物仍处于研究阶段。该研究探讨了茂源链霉菌产 TGase 的最佳发酵工艺条件, 分析了 TGase 的酶学特性, 以期能为 TGase 的商业化生产提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株** 茂源链霉菌为山东隆科特酶制剂有限公司山东省酶制剂生物发酵技术重点实验室筛选保藏菌种 (*Streptomyces lanceolata*), 命名为 LD195。

**1.2 培养基及其优化****1.2.1 基础培养基。**

**1.2.1.1 斜面培养基。** 麦芽粉 3 g/L, 酵母膏 4 g/L, 葡萄糖 4 g/L, 琼脂粉 15 g/L, pH 7.0。

**1.2.1.2 种子培养基。** 葡萄糖 30 g/L, 酵母膏 5 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 大豆粉 15 g/L, 磷酸氢二钠 2.0 g/L, 磷酸二氢钾 2.5 g/L, 硫酸镁 1.0 g/L, 氯化钙 5.0 g/L, pH 7.0。

**1.2.1.3 发酵培养基。** 葡萄糖 30 g/L, 酵母膏 5 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 大豆粉 15 g/L, 磷酸氢二钠 2.0 g/L, 磷酸二氢钾 2.5 g/L, 硫酸镁 1.5 g/L, 氯化钙 3.0 g/L, pH 7.0。

**1.2.1.4 孢子萌发培养基。** 2 × YT 培养基。

**1.2.2 无机盐优化的正交设计试验。** 选用  $L_9(3^4)$  正交表, 对“1.2.1”基础培养基的无机盐进行正交设计试验, 以找出菌体发酵最好的优化培养基, 试验因素及水平见表 1。

表 1 无机盐优化正交设计试验因素及水平

Table 1 Experimental factors and level of orthogonal design of inorganic salt optimization g/L

水平 Level	试验因素 Experimental factors			
	A. $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	B. $\text{KH}_2\text{PO}_4$	C. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	D. $\text{CaCl}_2$
1	1.0	2.0	0.5	1.0
2	2.0	2.5	1.0	3.0
3	3.0	3.0	1.5	5.0

**基金项目** 山东省科技重大专项(2014CGZH1305)。

**作者简介** 王兴吉(1970—), 男, 山东沂水人, 工程师, 硕士, 从事酶制剂生产与开发研究。\* 通讯作者, 工程师, 硕士, 从事酶制剂生产与开发研究。

**收稿日期** 2017-08-28

### 1.3 培养方法及培养条件的优化

#### 1.3.1 培养方法。

1.3.1.1 斜面种子培养。试管种子 32 ℃ 恒温培养 7 d。

1.3.1.2 摇瓶种子培养。取 1 环生长好的斜面培养物,接种至装有 100 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中,30 ℃、200 r/min 培养 24 h。

1.3.1.3 摇瓶发酵培养。按接种量 10% 将种子液接种于装有 25 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,30 ℃、200 r/min 培养 45 h。

1.3.2 培养条件优化的正交设计试验。选用  $L_9(3^4)$  正交表,对“1.3.1”中培养条件进行一次正交设计试验,以找出菌体发酵最好的培养条件,试验因素及水平见表 2。

表 2 培养条件优化正交设计试验因素及水平

Table 2 Experimental factors and level of orthogonal design of cultural condition optimization

水平 Level	试验因素 Experimental factors			
	A. 培养温度 Culture temperature//℃	B. 装液量 Bottling capacity//mL	C. 摇床转速 Rotation speed//r/min	D. 接种量 Inoculation amount//%
1	25	20	100	10.0
2	30	25	150	12.5
3	35	30	200	15.0

1.4 酶活测定方法 比色法测定酶活<sup>[10-11]</sup>:以  $\alpha$ -NA-CBZ-GLN-GLY 为作用底物,L-谷氨酸- $\gamma$ -单羟胺酸(L-glutamic acid  $\gamma$ -monohydroxamate)做标准曲线。1 个单位 TGase 的酶活为 1 min 催化生成 1  $\mu$ mol L-谷氨酸- $\gamma$ -单羟胺酸的酶量(U/mL)。酶活测定条件:37 ℃ 条件下反应 10 min。试剂 A:将 100 mg 底物  $\alpha$ -NA-CBZ-GLN-GLY 完全溶解于 2 mL 0.2 mol/L NaOH 中,依次加入 4 mL 0.2 mol/L pH6.0 的 Tris(三羟甲基氨基甲烷)-HCl 缓冲液、2 mL 0.1 mol/L 盐酸羟胺、2 mL 0.01 mol/L 还原型谷胱甘肽,用 NaOH 固体调 pH 至 6.0。试剂 B:3 mol/L HCl、12% TCA、5%  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  这 3 种试剂以 1:1:1 混合配制。

准备 0~12  $\mu$ mol/mL 的 L-谷氨酸- $\gamma$ -单羟胺酸标准溶液,取 40  $\mu$ L 标准溶液于 1.5 mL EP 管中,加 100  $\mu$ L 试剂 A,7 ℃ 保温 10 min,加入 40  $\mu$ L 试剂 B 终止反应。在吸光度 525 nm 下进行比色,绘制出标准曲线。以 100 ℃ 加热 10 min 后离心的上清液作为空白。

#### 1.5 TGase 的酶学性质测定

1.5.1 TGase 反应的最适温度。通过离子交换层析、凝胶过滤等方法,纯化谷氨酰胺转氨酶,对其酶学性质进行测定。

将纯化后的酶液在 pH5.0 条件下,分别放置于 20、30、40、50、60、70 ℃ 保温 30 min 测定酶活,以处理前酶液的酶活为 100%,得到相对酶活,从而确定最适反应温度。

1.5.2 TGase 反应的最适 pH。将酶反应底物分别溶于 pH 为 3.0~5.0 的 50 mmol/L 的醋酸缓冲液,pH 为 6.0~9.0 的 50 mmol/L Tris-盐酸缓冲液中,设置 pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 共 7 个梯度;将纯化后的酶液经 pH 为 3.0~5.0 的 50 mmol/L 的醋酸缓冲液,pH 为 6.0~9.0 的 50 mmol/L Tris-盐酸缓冲液处理,分别在 50 ℃ 下放置 30 min,与相应的 pH 底物混合后测定酶活,以处理前酶液的酶活为 100%,得到相对酶活。

1.5.3 金属离子对 TGase 酶活的影响。将纯化后的酶液分别加入一定浓度(5 mmol/L)的各种金属离子,在 37 ℃ 下保温 30 min,测定添加不同金属离子后的残余酶活,以不经处理的酶液的酶活为 100%,得到相对酶活。

## 2 结果与分析

2.1 优化培养基正交试验结果分析 从表 3 可以看出,正交设计试验中 4 因素对菌体发酵无特别明显影响,由极差分析比较结果可知,该试验中 4 因素的相对影响顺序由大到小为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ ,即菌体发酵产酶的最高组合为  $\text{A}_2\text{B}_2\text{C}_3\text{D}_2$ ,即菌体发酵产酶最高的无机盐组合为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.0 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.5 g/L、 $\text{CaCl}_2$  3.0 g/L。

同时,通过正交试验可以看出菌体对钙离子的依赖性不强,微生物来源的 TGase(MTG)不依赖于钙离子的存在,与动植物来源的 TGase 完全不同<sup>[12]</sup>。动物来源的 TGase 分子量不等,需要钙离子激活,酶活性中心为半胱氨酸残基位点。动物来源的 TGase 以豚鼠肝脏的 TGase(GTG)研究最为深入,该酶的分子量为 90 kD,其酶促反应需要钙离子激活,对底物特异性强<sup>[13]</sup>。MTG 对钙离子的依赖性和底物特异性都低,因此对钙离子的需求较少,正交试验中钙离子的影响较小也验证了这一点。

2.2 培养条件优化试验结果分析 从表 4 可以看出, $\text{A}_2\text{B}_2\text{C}_3\text{D}_1$  为最优组合,即培养温度 30 ℃,装液量为 25 mL,摇床转速为 200 r/min,接种量为 10% 时,菌体发酵产酶最好。同时,由极差分析比较可以看出培养条件对菌体产酶影响的主次顺序为培养温度、接种量、装液量、摇床转速。培养温度对菌体生长影响最大,由于选择摇床转速幅度较小,其对菌体生长影响较小。

#### 2.3 酶学性质

2.3.1 TGase 反应的最适温度及热稳定性。将纯化后的酶液分别放置在 20、30、40、50、60、70 ℃ 进行酶活测定。由图 2 可知,50 ℃ 时,TGase 相对酶活最高,接近 100%,该酶的最适反应温度为 50 ℃ 左右。在 40~60 ℃ 时,相对酶活为 75% 以上,说明在此温度范围内,该酶比较稳定。

2.3.2 TGase 反应的最适 pH 及稳定性。将酶反应底物分别溶于 pH 为 3.0~5.0 的 50 mmol/L 的醋酸缓冲液,pH 为 6.0~9.0 的 50 mmol/L Tris-盐酸缓冲液中,测定酶在不同 pH 下的酶活。由图 3 可知,TGase 的最适反应 pH 为 6.0 左

右。TGase 在不同 pH 下 50 ℃ 放置 30 min 后,酶在 pH 为 5.0~7.0 时酶活相对稳定。5.0~7.0 时较稳定,相对酶活为 85% 以上,说明该酶在 pH

表 3 培养基优化正交设计试验结果

Table 3 Results of orthogonal design test of medium optimization

试验号 Test number	因素水平 Factor level				TGase 酶活 Enzyme activity of TGase//U/mL
	A. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	B. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	C. MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	D. CaCl <sub>2</sub>	
1	1	1	1	1	14.230
2	1	2	2	2	14.450
3	1	3	3	3	15.053
4	2	1	2	3	15.150
5	2	2	3	1	16.320
6	2	3	1	2	15.787
7	3	1	3	2	14.656
8	3	2	1	3	13.987
9	3	3	2	1	13.874
K <sub>1</sub>	43.733	44.036	44.004	44.424	
K <sub>2</sub>	47.257	44.757	43.474	44.893	
K <sub>3</sub>	42.517	44.714	46.029	44.190	
k <sub>1</sub>	14.578	14.679	14.668	14.808	
k <sub>2</sub>	15.752	14.919	14.491	14.964	
k <sub>3</sub>	14.172	14.905	15.343	14.730	
R	R <sub>1</sub> = 1.580	R <sub>2</sub> = 0.240	R <sub>3</sub> = 0.852	R <sub>4</sub> = 0.234	
主次顺序 Important order	A > C > B > D				
优水平 Optimal level	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub> /B <sub>3</sub>	C <sub>3</sub>	D <sub>2</sub>	
最优组合 Optimal combination	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> D <sub>2</sub>				

表 4 培养条件优化正交设计试验结果

Table 4 Results of orthogonal design test of cultural condition optimization

试验号 Test number	因素水平 Factor level				TGase 酶活 Enzyme activity of TGase//U/mL
	A. 培养温度 Culture temperature	B. 装液量 Bottling capacity	C. 摇床转速 Rotation speed	D. 接种量 Inoculation amount	
1	1	1	1	1	14.310
2	1	2	2	2	14.450
3	1	3	3	3	14.053
4	2	1	2	3	15.750
5	2	2	3	1	16.420
6	2	3	1	2	16.087
7	3	1	3	2	15.656
8	3	2	1	3	15.287
9	3	3	2	1	15.874
K <sub>1</sub>	42.813	45.716	45.684	46.604	
K <sub>2</sub>	48.257	46.157	46.074	46.193	
K <sub>3</sub>	46.817	46.014	46.129	45.090	
k <sub>1</sub>	14.271	15.239	15.228	15.534	
k <sub>2</sub>	16.086	15.386	15.358	15.398	
k <sub>3</sub>	15.606	15.338	15.376	15.030	
R	R <sub>1</sub> = 1.815	R <sub>2</sub> = 0.147	R <sub>3</sub> = 0.148	R <sub>4</sub> = 0.504	
主次顺序 Important order	A > D > C > B				
优水平 Optimal level	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	D <sub>1</sub>	
最优组合 Optimal combination	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> D <sub>1</sub>				

**2.3.3 金属离子对 TGase 酶活的影响。**金属离子对酶活的影响主要分为激活作用及抑制作用<sup>[14-15]</sup>。由表 5 可知,Na<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 对该酶活性没有明显的抑制作用,而 Fe<sup>3+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 会强烈抑制酶的活性,由于所选用金属离子浓度较高,金属离子没有表现出激活作用,对于低浓度下金属离子对酶的激活作用尚未验证<sup>[16]</sup>。

### 3 结论

通过正交设计试验确定茂源链霉菌培养基中无机盐的

最优组合为 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0 g/L、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.5 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5 g/L、CaCl<sub>2</sub> 3.0 g/L。通过试验确定最佳发酵条件为培养温度 30 ℃、装液量 25 mL、摇床转速 200 r/min、接种量 10%。

该谷氨酰胺转氨酶的最适反应温度为 50 ℃,在 40~60 ℃ 条件下保温 30 min 酶活维持在 75% 以上;最适反应 pH 为 6.0,在 pH 为 5.0~7.0 条件下保存 30 min 仍具有 85% 以上酶活;Fe<sup>3+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 会强烈抑制酶的活性。

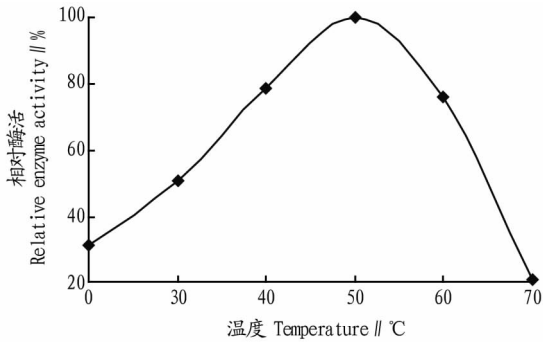


图1 TGase 反应最适温度

Fig.1 The optimal reaction temperature of TGase

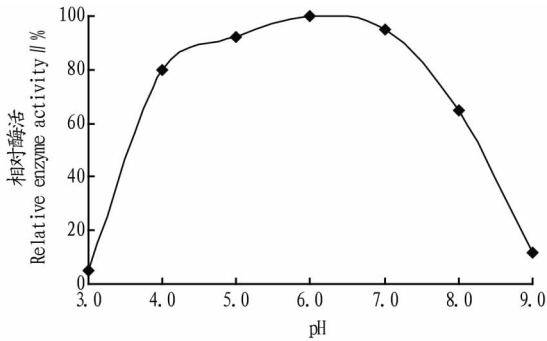


图2 TGase 反应最适 pH

Fig.2 The optimal reaction pH of TGase

表5 不同金属离子对相对酶活的影响

Table 5 Effects of different metal ions on relative enzyme activity

序号 Serial number	金属离子 Metal ion	相对酶活 Relative enzyme activity / %
1	对照	100.0 ± 0.7
2	Na <sup>+</sup>	98.2 ± 0.6
3	Mg <sup>2+</sup>	93.2 ± 0.4
4	K <sup>+</sup>	96.2 ± 3.2
5	Fe <sup>3+</sup>	10.0 ± 0.9
6	Ca <sup>2+</sup>	99.0 ± 0.7
7	Cu <sup>2+</sup>	2.3 ± 1.6
8	Zn <sup>2+</sup>	6.2 ± 0.9
9	Mn <sup>2+</sup>	72.2 ± 5.2

## 参考文献

- [1] DUBE M, SCHÄFER C, NEIDART S, et al. Texturisation and modification of vegetable proteins for food applications using microbial transglutaminase [J]. *Eur Food Res Technol*, 2007, 225: 287–299.
- [2] NONAKAM M, SAWA A, MATSUURA Y, et al. Deamidation of several food proteins using free and immobilized Ca<sup>2+</sup>: Independent microbial transglutaminase [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60(3): 532–533.
- [3] MOTOKI M, KUMAZAWA Y. Recent research trends in transglutaminase technology for food processing [J]. *Food Sci Technol Res*, 2000, 6(3): 151–160.
- [4] ANDO H, ADACHI M, UMEDA K, et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms [J]. *Agricultural & biological chemistry*, 1989, 53(10): 2613–2617.
- [5] CUI L, ZHANG D X, DU G C, et al. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus* [J]. *Food chemistry*, 2007, 105(2): 612–618.
- [6] MOTOKI M, SEGURO K. Transglutaminase and its use for food processing [J]. *Trends Food Sci Tech*, 1998, 9(5): 204–210.
- [7] DE BARROS SOARES L H, ASSMANN F, AYUB MAZ. Purification and properties of a transglutaminase produced by a *Bacillus circulans* strain isolated from the Amazon environment [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2003, 37(3): 295–299.
- [8] UMEZAWA Y, OHTSUKA T, YOKOYAMA K, et al. Comparison of enzymatic properties of microbial transglutaminase from *Streptomyces* sp [J]. *Food Sci Technol Res*, 2002, 8: 113–118.
- [9] SUZUKI S, LZAWA Y, KOBAYASHI K, et al. Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(11): 2344–2351.
- [10] 许建军, 江波, 许时婴. 比色法快速测定乳酸菌谷氨酸脱羧酶活力及其应用 [J]. *微生物学通报*, 2004, 31(2): 66–71.
- [11] 杨帆, 李江华, 徐岩, 等. 谷氨酸脱羧酶发酵工艺的优化 [J]. *食品与生物技术学报*, 2008, 27(4): 107–111.
- [12] 崔艳华, 张兰威. 谷氨酰胺转氨酶研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2009(1): 31–36.
- [13] URABE H, AOYAGI N, OGAWARA H, et al. Expression and characterization of the *Streptomyces coelicolor* serine/threonine protein kinase PkaD [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72(3): 778–785.
- [14] DEMIRHAN E, APER D K, OZBEK B. Effect of hydrolysis products and Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ions on whey lactose hydrolysis and β-galactosidase stability [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2008, 83(5): 625–636.
- [15] FLORES M V, ERTOLA R J, VOGET C E. Effect of monovalent cations on the stability and activity of *Kluyveromyces lactis* β-galactosidase [J]. *Food Sci Technol*, 1996, 29(5): 503–506.
- [16] YOKOYAMA K, NIO N, KIKUCHI Y. Properties and application of microbial transglutaminase [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(4): 447–454.
- [17] 徐青, 苗迎军, 张边江, 等. 海水胁迫对2种生态型马齿苋种子萌发的影响 [J]. *农学学报*, 2015, 5(4): 64–67.
- [18] 张边江, 唐宁, 华春, 等. 海水胁迫下马齿苋光合及抗氧化生理特性研究 [J]. *草地学报*, 2015, 23(4): 878–882.
- [19] ALAM M A, JURAIMI A S, RAFII M Y, et al. Screening of purslane (*Portulaca oleracea* L.) accessions for high salt tolerance [J]. *Scientific world journal*, 2014(3): 1–12.
- [20] DE LACERDA L P, LANGE L C, COSTA FRANCA M G, et al. Salinity reduction and biomass accumulation in hydroponic growth of purslane (*Portulaca oleracea*) [J]. *International journal of phytoremediation*, 2015, 17(1/2/3/4/5/6): 235–241.
- [21] 王乐, 张玉霞, 沈祥军. PEG 模拟干旱处理对马齿苋种子萌发的影响研究 [J]. *中国园艺文摘*, 2015(10): 26–28.
- [22] 刘文利, 叶建军, 余世孝, 等. 景天类和马齿苋类植物耐旱性快速评价方法初探 [J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(23): 13907–13910, 13917.
- [23] D' ANDREA R M, ANDREO C S, LARA M V. Deciphering the mechanisms involved in *Portulaca oleracea* (C4) response to drought: Metabolic changes including crassulacean acid-like metabolism induction and reversal upon re-watering [J]. *Physiologia plantarum*, 2014, 152(3): 414–430.
- [24] YANG Y Q, CHEN J H, LIU Q, et al. Comparative proteomic analysis of the thermotolerant plant *Portulaca oleracea* acclimation to combined high temperature and humidity stress [J]. *Journal of proteome research*, 2012, 11(7): 3605–3623.
- [25] ALAM M A, JURAIMI A S, RAFII M Y, et al. Genetic diversity analysis among collected purslane (*Portulaca oleracea* L.) accessions using ISSR markers [J]. *Comptes rendus biologiques*, 2015, 338(1): 1–11.
- [26] OCAMPO G, COLUMBUS J T. Molecular phylogenetics, historical biogeography, and chromosome number evolution of *Portulaca* (*Portulacaceae*) [J]. *Molecular phylogenetics and evolution*, 2012, 63(1): 97–112.
- [27] AMIRUL A M, JURAIMI A S, RAFII M Y, et al. Genetic improvement of purslane (*Portulaca oleracea* L.) and its future prospects [J]. *Molecular biology reports*, 2014, 41(11): 7395–7411.
- [28] 王锦军. 药食两用植物马齿苋植物学研究进展 (2000~2010年) [J]. *荆楚理工学院学报*, 2011, 26(2): 76–80.

(上接第141页)