

新疆阿勒泰和温泉县冷水鱼肠道产低温蛋白酶菌株的筛选及其酶学性质的研究

张建荣, 倪永清* (石河子大学食品学院, 新疆石河子 832000)

摘要 [目的]从50株冷水鱼肠道产蛋白酶菌株中筛选优良产酶菌株,并研究其酶学性质,为高效低温蛋白酶技术的研发奠定基础。[方法]对比脱脂乳平板初筛结果确定供试菌株,对选定菌株进行表型及16S rRNA/26S rRNA序列同源性分析,确定产酶菌株的进化地位。用Folin酚显色法复筛,并研究最佳产酶菌株所产蛋白酶的酶学性质。[结果]从6株供试菌株中筛选出一株高产酶菌株P-D-10,初步鉴定隶属于*Pseudomonas*。酶学性质的初步研究显示,P-D-10产生的蛋白酶最适反应pH在8.5左右;在0~60℃均有催化活性;具有10和40℃2个最适酶活温度;热稳定性较差,在70℃水浴10min后剩余酶活力仅为20.14%。除了Tween-80对该酶活力有促进作用外,其他金属离子、还原剂、表面活性剂和金属离子螯合剂对该酶活力均有不同程度的抑制作用。[结论]筛选获得的高产酶菌株P-D-10隶属于*Pseudomonas*,是一株具有研究与应用潜力的产低温蛋白酶菌株。

关键词 冷水鱼;肠道微生物;低温蛋白酶;酶学特征

中图分类号 S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)08-03388-04

Screening of Strains Producing Cold-active Proteases from the Intestinal Tracts of Cold-water Fish from Wenquan County and Altay in Xinjiang and Study on Enzymatic Properties

ZHANG Jian-rong et al (School of Food Sciences, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000)

Abstract [Objective] The study aimed to screen high-yield cold-active protease strain and study its enzymatic properties, lay a foundation for development of high-efficiency cold-active proteases. [Method] Among 50 strains producing proteases, 6 strains with larger diameter ratio of hydrolyzation halo and colony were selected as original strain. Morphological observation, enzyme activity determination and the phylogenetic analysis were carried out. [Result] The high-yield strain P-D-10, belonged to *Pseudomonas*, was finally obtained through the second screening with Foline-Phenol method. The extracellular proteases of strain P-D-10 were able to hydrolyze casein at 0-60℃, the optimum reaction pH and temperature was pH 8.5, 10℃ and 40℃, respectively. The protease was susceptible to heat and retained only 20.14% enzyme activity at 70℃ for 10 min. With the exception of Tween-80, the rest of metal ion, surfactant, reductant and chelant all inhibited enzyme activity of the extracellular proteases of strain P-D-10 in different extent. [Conclusion] The high-yield enzyme strain P-D-10 belongs to *Pseudomonas* and is a potential strain in the research and application of cold-active proteases.

Key words Cold-water fish; Intestinal microorganism; Cold-active proteases; Enzymatic properties

蛋白酶在食品、洗涤剂、制革、纺织、化妆、废物处理、医药等工业领域有着广泛应用^[1-2],目前占全球酶工业市场份额的60%~65%^[3]。与中、高温蛋白酶相比,低温蛋白酶能够在低温下发挥作用,温和的热处理即可使酶失活,基于这一优点,低温蛋白酶是目前研究较为深入的一种适冷酶类。目前,对低温蛋白酶的研究主要集中在产酶菌株的筛选、酶学性质、酶的纯化、酶结构与功能的关系以及酶的工业应用等领域^[4]。迄今为止,已报道的低温蛋白酶多为碱性蛋白酶类,大都来源于冰川、深海、南北两极等极端环境中的低温微生物^[5-7],而从冷水鱼肠道中分离筛选产低温酶菌株的研究较少^[8]。为此,笔者从实验室保藏的50株冷水鱼肠道产蛋白酶菌株中筛选出6株高产酶菌株,并对其进行了复筛和酶学性质的研究,以期丰富低温酶资源及今后的工业应用和鱼类养殖提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试鱼。冷水鱼采自新疆阿勒泰额尔齐斯河流域

(2011年7月)和温泉县赛里木湖(2012年5月)。

1.1.2 供试菌。实验室保藏的50株冷水鱼肠道产蛋白酶菌株。

1.1.3 培养基。复筛培养基:脱脂乳5g/L,营养琼脂4g/L,琼脂15g/L,pH7.2。

1.1.4 试剂与仪器。脱脂乳购自美国BD公司;Nutrient Agar和Casein购自北京Solarbio公司;Foline-Phenol和L-Tyrosine购自美国Sigma公司;其他试剂均为国产分析纯。Heraeus Multifuge X3G高速冷冻离心机和Fresco 21微量离心机均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;Ultrospec 5300紫外-可见分光光度计购自Amersham Biosciences公司;ZHWHY-2102双层恒温培养振荡器购自上海智城分析仪器制造有限公司;AK-8D型水浴锅购自江苏金坛市医疗器械厂。

1.2 方法

1.2.1 高产酶菌株的鉴定。产酶菌株的生理生化参照东秀珠等的《常见细菌系统鉴定手册》进行。参照文献^[9-10]提取供试菌株DNA,并用通用引物27f(5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492r(5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')扩增细菌16S rRNA,用引物NL1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')和NL4(5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')扩增酵母菌26S rRNA。扩增产物送北京三博远志生物技术有限责任公司测序。测序结果提交到GenBank数据库中,用Blast进行相关序列搜索,获得相关属、种的序列后用

基金项目 新疆生产建设兵团博士资金专项(2011BB009);新疆生产建设兵团青年科技创新资金专项(2011CB001);石河子大学自然科学基金重点项目(ZRXX20104001)。

作者简介 张建荣(1986-),男,甘肃天水人,硕士研究生,研究方向:冷水鱼肠道产酶菌多样性。*通讯作者,副教授,博士后,硕士生导师,从事环境微生物学研究,E-mail:niyqlzu@sina.com。

收稿日期 2013-03-18

Clustal X 1.81 软件对齐^[11]。进化距离采用 Mega v. 4.0 软件的邻接法,依据 P-distances 法和 Kimura 2-parameter 双参数法进行。进化树分支模式的稳定性用 Mega v. 4.0 分析^[12],采用 Bootstrap 法,重复次数为 1 000。

1.2.2 蛋白酶活力的测定。采用 Folin 酚试剂显色法^[13]。在 40 °C 下每分钟催化酪蛋白产生 1 μg 的酪氨酸的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.2.3 菌株生长曲线和产酶曲线的测定。从实验室分离鉴定的 50 株产蛋白酶菌株中挑选出 6 株水解圈与菌落直径比值较大的菌株,活化后以 5% 的接种量接种在脱脂乳液体培养基中,250 ml 锥形瓶中装液量为 100 ml,置于各菌株最适生长温度下摇床发酵,转速为 180 r/min。每隔 2 h 在 600 nm 波长下测定一次 OD 值,同时取菌液在 8 000 r/min 离心 10 min,测定上清液中的酶活力。

1.2.4 高产酶菌株粗酶液的制备。根据复筛过程中检测到的高产酶菌株生长特征和产酶特征,筛选出最佳产酶菌株,重新摇床发酵,在其最佳产酶时期取发酵液,8 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,上清液即为粗酶液,分成小份在 4 °C 保藏备用。

1.2.5 酶学性质的研究。

1.2.5.1 最适催化温度和最适催化 pH 的测定。通过测定 0 ~ 60 °C 不同温度梯度下的酶活力,确定酶的最适催化温度。

配制含有 0.5% (W/V) 酪蛋白的缓冲体系,设置 pH 梯度在 4.0 ~ 10.0,确定酶的最适催化 pH。每组试验 3 次重复。

1.2.5.2 金属离子、表面活性剂、还原剂和金属离子螯合剂对酶活力的影响。配制含有金属离子(Co²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺、Mg²⁺、K⁺、Fe²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺)、表面活性剂(Tween-80、Triton X-100、SDS、CTAB)、还原剂(β-ME)和金属离子螯合剂(EDTA)的缓冲液体系,上述物质的终浓度为 1 mmol/L 或 1% (V/V),在最适催化温度和 pH 下测定酶活力,把不加上述物质的酶活力定义为 100%。

1.2.5.3 酶热稳定性的测定。分别在 50、60、70 °C 条件下处理粗酶液 10、20、30 min 后,在酶的最适催化温度和 pH 条件下测定酶活力,把未处理的酶活力定义为 100%。

2 结果与分析

2.1 产酶菌株的初筛 依据菌落形态、颜色、细胞形态、革兰氏染色、最适生长温度以及平板初筛时的产酶情况,从 50 株冷水鱼肠道产蛋白酶菌株中初步确定了 6 株水解圈与菌落直径比值较大的菌株(表 1)。结果表明,6 株选定菌株的最适生长温度为 16 °C 或 24 °C,生长温度范围均在 4 ~ 37 °C,属耐冷菌范畴。L-J-9 镜检确定为酵母菌,其他 5 株菌革兰氏染色均为阴性。除 P-Q-4 和 P-Q-10 产 1 种胞外蛋白酶外,其他 4 株菌均可产生 2 种胞外水解酶。对 6 株菌的整体产酶情况而言,蛋白酶活力占绝对优势。

表 1 冷水鱼肠道产酶菌株的特性及产酶情况

菌株	宿主	最适生长温度//°C	革兰氏染色	细胞形态	产酶情况	
					蛋白酶 (D/d)	淀粉酶 (D/d)
P-D-10	<i>Tinca tinca</i> L.	16	G ⁻	Rod	+ (6.67)	-
A-Q-1	<i>Salvelinus fontinalis</i> Mitchill	24	G ⁻	Rod	+ (6.90)	+ (3.34)
P-Q-1	<i>Salvelinus fontinalis</i> Mitchill	24	G ⁻	Rod	+ (6.44)	+ (3.43)
P-Q-4	<i>Salvelinus fontinalis</i> Mitchill	16	G ⁻	Rod	+ (6.22)	-
A-R-1	<i>Scardinius erythrophthalmus</i> L.	24	G ⁻	Coccioid	+ (4.02)	+ (3.45)
L-J-9	<i>Lota lota</i> L.	16	nd	Ovate	+ (5.81)	+ (2.45)

注: +. 检测到酶活; -. 未检测到酶活; D/d. 水解圈直径与菌落直径之比; nd. 未检测。

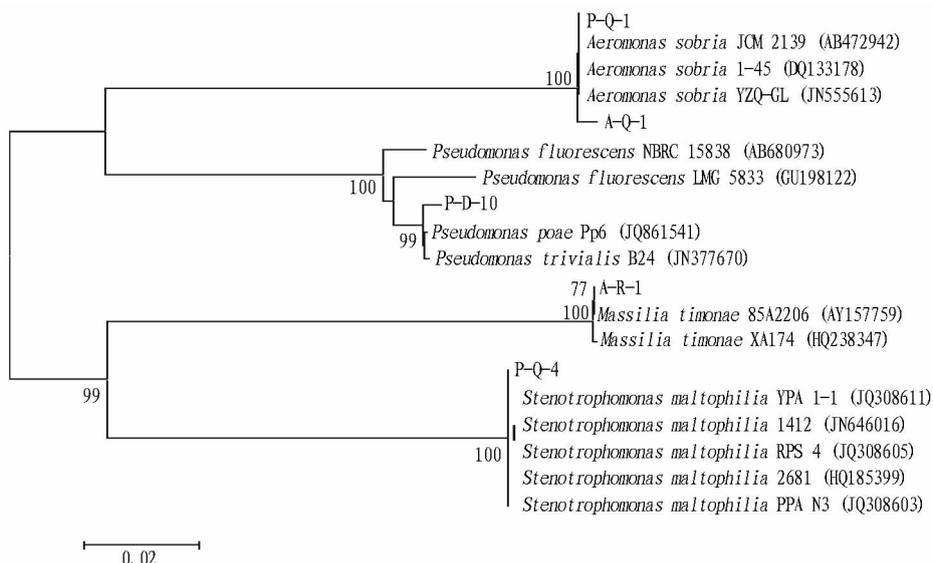


图 1 产酶菌株的系统发育分析

2.2 高产酶菌株的系统发育分析 将6株产酶菌株的16S或26S rDNA序列提交NCBI,通过Blast在GenBank数据库中已与发表的序列进行同源性比对,选取同源性98%以上的序列构建系统发育树。经搜索比对发现,酵母菌L-J-9与菌株 *Sporobolomyces roseus* ESAB18 (AJ749836)和 *Sporobolomyces roseus* I-Y375b (GU585220)的26S rDNA D1/D2区同源性达100%(未建树),可确定属于该种。由图1可见,菌株P-Q-1和A-Q-1隶属于 *Aeromonas*,与已知种 *Aeromonas sobria* 系统发育关系最接近,序列同源性达99%;菌株P-D-10在系统发育树上与 *Pseudomonas poae* 关系最近;菌株A-R-1隶属于

Massilia,与已知菌株 *Massilia timonae* 的序列同源性达99%;菌株P-Q-4在系统发育树上与属 *Stenotrophomonas* 的已知菌株 *Stenotrophomonas maltophilia* 关系最近,在相似性99%水平聚为一群。

2.3 菌株生长曲线和产酶曲线 由图2可知,菌株P-D-10、P-Q-4、L-J-9在最适生长温度下摇瓶30h左右才能检测到酶活,检测到酶活后10h左右酶活力达到最大,在菌株达到稳定期时酶活力迅速下降。菌株A-Q-1、P-Q-1、A-R-1在摇瓶8h就可检测到酶活,酶活力曲线和菌株的生长曲线相关性很强,在菌株生长进入稳定期后酶活力也趋于最大。

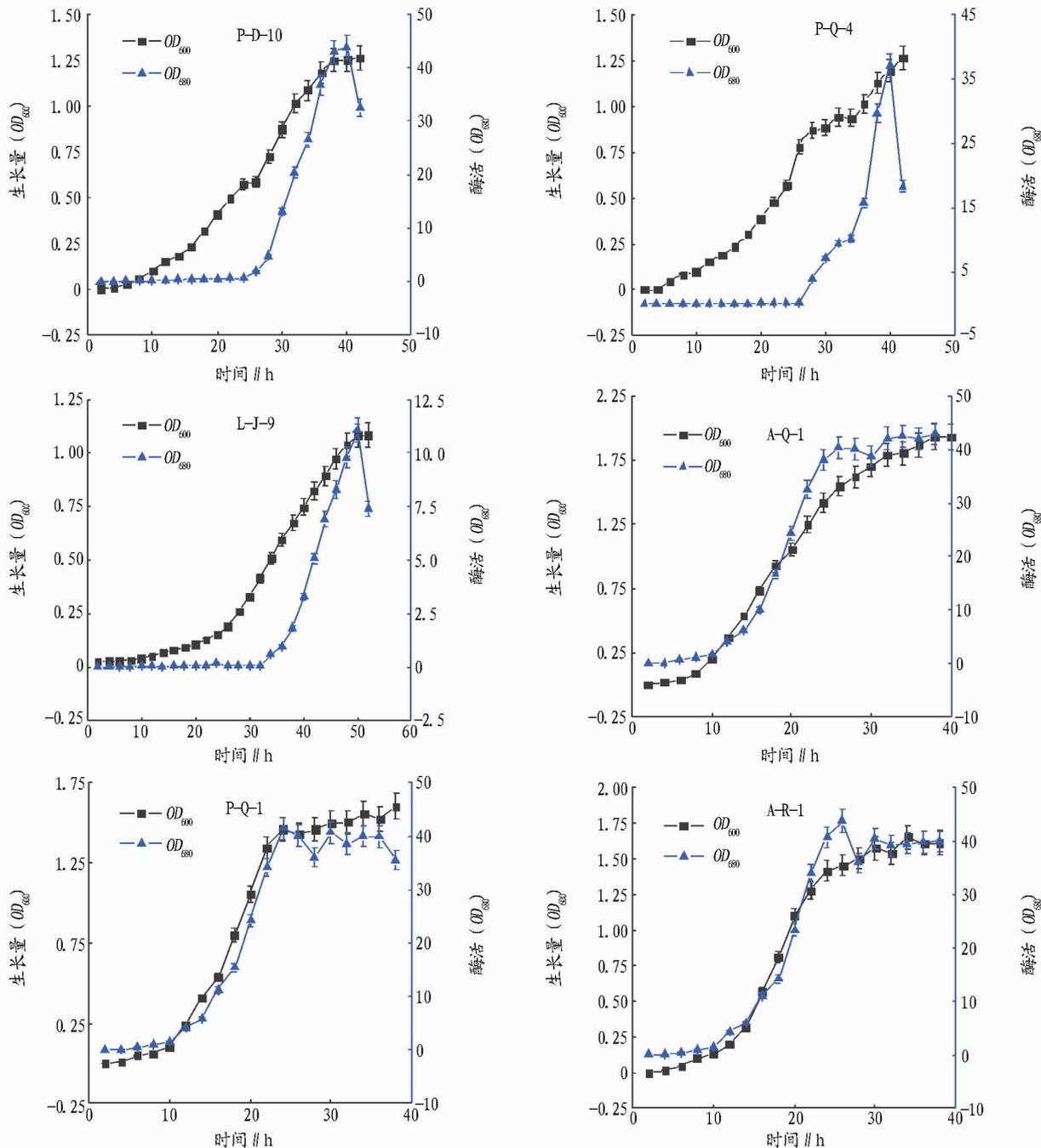


图2 6株产酶菌株生长量与酶活力的关系

2.4 P-D-10的蛋白酶特征 结果表明,P-D-10胞外蛋白酶

在0~60℃均有催化活性,具有10℃和40℃2个最适酶活

温度(图3);在 pH 4.0~10.0 范围内均有催化活性,最适催化 pH 为 8.5(图4);热稳定性较差,在 70 °C 水浴 10 min 后剩余酶活力仅为 20.14%(图5)。除了 Tween-80 有助于该酶酶活力的提高之外,其他金属离子、表面活性剂、还原剂和金属离子螯合剂对该酶酶活力均有不同程度的抑制作用。与金属离子相比,表面活性剂、还原剂和金属离子螯合剂对该酶酶活力的抑制作用较大,在加入 β -ME 的反应体系中检测到的相对酶活力仅为 2%(图6)。

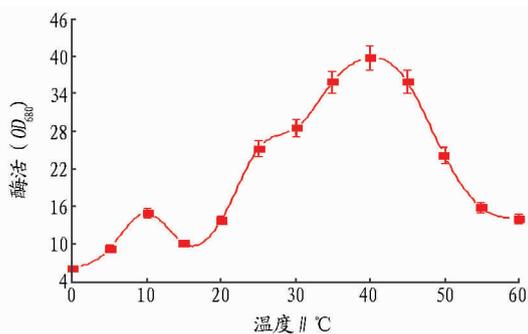


图3 反应温度对 P-D-10 蛋白酶活力的影响

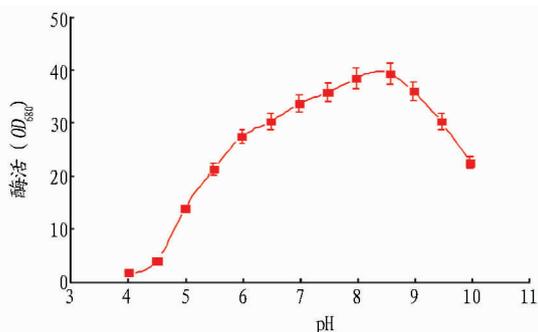


图4 pH 对 P-D-10 蛋白酶活力的影响

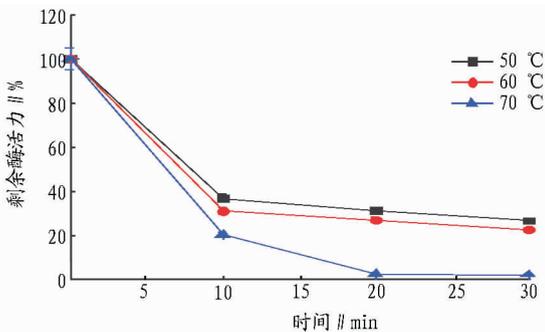


图5 温度对 P-D-10 蛋白酶稳定性的影响

3 讨论

蛋白酶广泛存在于动物、植物和微生物中,随着分子生物学技术和酶工程的发展,微生物已成为工业酶制剂的主要来源。在已知的蛋白酶中,由于其催化温度、pH 和离子强度等范围较窄,很难满足工业生产的实际需求;同时,不同领域对蛋白酶种类和性质的要求也各不相同,这就需要开发大量的蛋白酶来满足工业生产的各种需求。

该研究所选择的 6 株高产酶菌株复筛时测定的酶活力结果和平板初筛时测定的结果相关性不强,平板初筛时菌株 A-Q-1 的酶活力最强,然而发酵复筛时发现菌株 P-D-10 的酶

活力最强,这与许褪森^[13]的研究结果一致。导致这一结果的原因可能与菌株分泌胞外酶的特征有关。另外,菌株 A-Q-1 和 P-D-10 进入生长稳定期后酶活力曲线走势不同。菌株 A-Q-1 生长进入稳定期后酶活力达到最大并在一段时间内保持稳定;而菌株 P-D-10 进入生长稳定期后酶活力曲线呈下降趋势。平板初筛在 60 h 后测量水解圈大小,而菌株 P-D-10 和 A-Q-1 在生长 40 h 就进入稳定期,2 株菌进入稳定期后酶活力曲线走势差异较大,该种走向的不同可能导致平板初筛与发酵复筛得到的结果相关性不强。因此,不能单一地用水解圈直径与菌落直径之比来评价产酶菌株的酶活力高低。

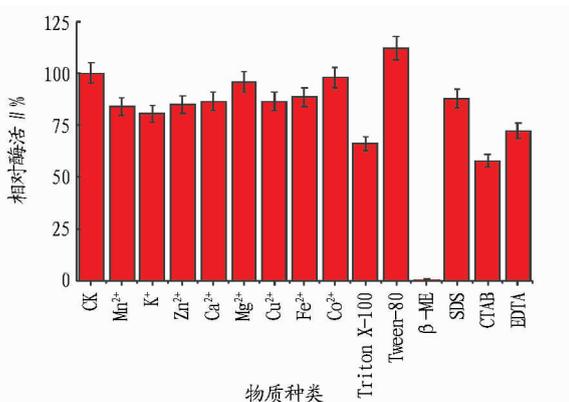


图6 金属离子、表面活性剂、还原剂和金属离子螯合剂对 P-D-10 胞外蛋白酶活力的影响

菌株 P-D-10、P-Q-4、L-J-9 的最适生长温度是 16 °C,该 3 株菌的生长曲线和酶活力曲线相关性不强,菌株接种后 30 h 左右才可检测到酶活,这可能与菌株自身以及培养温度有关。大量研究发现^[14],低温微生物在低温条件下倾向于提高酶合成量来弥补低温引起的反应速率的下降。上述 3 株菌属于低温微生物,生长速度较慢,在一定程度上可能影响酶量的累积,所以酶活力在菌株接种后数小时内未能检出。相反,菌株 A-Q-1、P-Q-1、A-R-1 的生长曲线和酶活力曲线相关性很好,菌株接种后 8 h 就可检测到酶活,该 3 株菌的最适生长温度是 24 °C,与 P-D-10、P-Q-4、L-J-9 3 株菌相比,在较高温度条件下培养,可能提高菌株的生长速度和酶分泌量,使酶活力在菌株接种后很快被检出。

菌株 P-D-10 所分泌的胞外蛋白酶在 0~60 °C 范围内均有催化活性,具有 2 个最适催化温度,分别为 10 °C 和 40 °C。由此推测菌株 P-D-10 可能具有 1 对同工酶。目前,也有学者发现在低温微生物中存在同工酶,如 Ochiai 等^[15]发现的嗜冷弧菌 NADP⁺ 异柠檬酸脱氢酶的同工酶,同工酶 I 的最适催化温度在 35~40 °C,同工酶 II 的最适催化温度为 20 °C;辛明秀等^[16]发现南极嗜冷酵母 Y18 的 α -酮戊二酸脱氢酶的同工酶最适反应温度分别为 20 和 40 °C。这些同工酶的存在拓宽了低温微生物的生长温度范围,使低温微生物能够在一定范围的低温条件保证生命活动的正常进行。

菌株 P-D-10 所分泌的胞外蛋白酶具有 2 个最适催化温度,在 0 °C 条件下该酶的相对酶活力为 14%,并与史劲松

2.4 片状临时生活绿地 片状临时生活绿地是指森林公园、湿地、自然保护区或旅游风景区之类可以在灾后重建期间提供人民基础生活的大型绿地空间。

2.4.1 南京市主城片状临时生活绿地分布情况。南京市主城片状临时生活绿地主要包括钟山风景区、雨花台风景区、夹江风景区和燕子矶-幕府山风景区在内的南京市大型风景、生态园区。

2.4.2 片状临时生活绿地的规划要求。作为重大灾难的灾后生活用地,首先它必须能够容纳数万人甚至更多灾民和救援医护人员,所要求配备的基础设施也要更加完善,以保证在灾后数周甚至更长时间内人民的生活安全,更好地支持灾区的灾后重建工作^[9]。该类绿地应配备的设施包括信息通讯设备、消防救助设备、医疗设备、应急生活资料的提供、防疫尸体处理场所、应急住宅设备及灾害复原机能设备等一系列基础应灾设施。

3 结语

防灾绿地的规划已被许多城市纳入规划项目之一,并已成为一个社会发展进步的重要体现。南京市作为江苏省省会,拥有众多人口和许多珍贵的历史文物古迹,完善城市防灾体系对于保护历史古迹、保障人民生命财产安全都有重大意义。

该研究初步完善了南京市防灾减灾绿地的布局,完善了防灾绿地体系,不仅有助于城市功能的完善,还提升了南京

城抗灾减灾的强度,更重要的是能保护人民的生命财产安全不受灾难威胁,为市民提供更加安全的生活空间,达到在灾难时为城市居民提供足够避难空间的目的,最大限度地降低伤害,防止二次灾难,为营救工作和灾后重建提供了缓冲^[10]。

在今后的研究中,探索如何将城市绿地的功效发挥到最大及合理地部署防灾绿地,做到平时和灾时的平衡协调是一个重要课题,只有不断完善这方面的理论体系,才能够帮助人们真正做到防微杜渐,将灾难的伤害降到最低。

参考文献

- [1] 徐波,李金路,赵锋,等. CJJ/T85-2002,城市绿地分类标准[S]. 北京:中国建筑工业出版社,2002.
 - [2] 陈亮明,章美玲. 城市绿地防灾减灾功能探讨——以北京元大都遗址公园防灾绿地建设为例[J]. 安徽农业科学,2006,34(3):452-453.
 - [3] 周建东,王浩. 城市绿地防灾减灾功能与对策研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(35):5419-5421.
 - [4] 康亮,朱红霞. 上海城市绿地防灾避难功能研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(7):2945-2947.
 - [5] 章美玲. 城市绿地防灾避难功能探讨[D]. 长沙:中南林学院,2005.
 - [6] 包志毅,陈波. 城市绿地系统建设与城市减灾防灾[J]. 自然灾害学报,2004(2):155-159.
 - [7] 卢秀梅,薛振林,赵志刚. 城市防灾公园规划问题[J]. 河北理工学院学报,2006,28(4):135-138.
 - [8] 许浩. 国外城市绿地系统规划[M]. 北京:中国建筑工业出版社,2006.
 - [9] 李洪远,杨洋. 城市绿地分布状况与防灾避难功能[J]. 城市减灾,2005(2):9-13.
 - [10] 张式煜. 上海城市绿地系统规划[J]. 城市规划汇刊,2002(6):14-16.
- (上接第 3391 页)
- 等^[4]分离的低温蛋白酶相比,显示了较高的低温催化能力,从最适催化温度以及 0℃ 的酶活力来看,菌株 P-D-10 所分泌的胞外蛋白水解酶属于低温蛋白酶的范畴,在后续研究工作中将通过基因克隆、异源表达等手段进一步探究该酶的基因序列和蛋白质结构。
- 参考文献**
- [1] RAO M B, TANKSALE A M, GHATGE M S, et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1998, 62(3):597-635.
 - [2] 唐兵,周林峰,陈向东,等. 嗜热脂肪芽孢杆菌高温蛋白酶的产生条件及酶学性质[J]. 微生物学报,2000,40(2):188-192.
 - [3] VENUGOPAL M, SARAMMA A V. Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive[J]. Proc Biochem, 2006,41(6):1239-1243.
 - [4] 史劲松,许正宏,吴奇凡,等. 冰川环境耐冷菌的冷适蛋白酶分离纯化及酶学性质[J]. 应用与环境生物学报,2006,12(1):72-75.
 - [5] SECADES P, ALVAREZ B, GUIJARRO J. Purification and properties of a new psychrophilic metalloprotease (Fpp2) in the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*[J]. Fems Microbiol Lett, 2003,226(2):273-279.
 - [6] TURKIEWICZ M, GROMEK E, KALINOWSKA H, et al. Biosynthesis and properties of an extracellular metalloprotease from the marine bacterium *Sphingomonas paucimobilis*[J]. J Biotechnol, 1999,70(1/3):53-60.
 - [7] VAZQUEZ S, RUBERTO L, CORMACK W M. Properties of extracellular proteases from three psychrotolerant *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Antarctic soil[J]. Polar Biol, 2005,28(4):319-325.
 - [8] LAZADO C C, CAIPANG C M A, KIRON V. Enzymes from the gut bacteria of *Atlantic cod, Gadus morhua* and their influence on intestinal enzyme activity[J]. Aquacul Nutr, 2012,18(4):423-431.
 - [9] MASCO L, HUYS G, GEVERS D, et al. Identification of *Bifidobacterium* species using rep-PCR fingerprinting[J]. Syst Appl Microbiol, 2003,26(4):557-563.
 - [10] BRANDA E, TURCHETTI B, DIOLAIUTI G, et al. Yeast and yeast-like diversity in the southern most glacier of Europe (Calderone Glacier, Apennines, Italy)[J]. Fems Microbiol Ecol, 2010,72(3):354-369.
 - [11] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Res, 1997,25(24):4876-4882.
 - [12] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Mol Biol Evol, 2007,24(8):1596-1599.
 - [13] 许焜森. 鲈鱼肠道内产蛋白酶菌的分离与筛选[J]. 安徽农业科学, 2008,36(11):4544-4546.
 - [14] 陈琳. 产低温蛋白酶菌株 *Halomonas* sp. SD-02 的分离鉴定及其酶的提纯与特性研究[D]. 长春:东北师范大学,2007.
 - [15] OCHIAI T, FUKUNAGA N, SASAKI S. Purification and some properties of two NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenases from an obligately psychrophilic marine bacterium, *Vibrio* sp., strain ABE-1[J]. J Biochem, 1979,86(2):377-384.
 - [16] 辛明秀,周培瑾. 温度对嗜冷酵母糖代谢途径某些关键酶的活性效应[J]. 微生物学报,2000,40(5):518-522.
 - [17] GU Y L, LIU S N, ZHANG H, et al. Properties of alkaline protease produced by strain I 13[J]. Agricultural Science & Technology, 2011,12(2):163-164,170.
 - [18] 王玲萍,刘雪珠. 真鲷胃肠道产蛋白酶菌株的分离与筛选[J]. 饲料研究,2011(04):69-70.