

## 青刺果抗菌肽组分的分离及其稳定性分析

朱 薪, 康山明, 张天雄, 王雪峰, 范江平, 普岳红

(云南农业大学 食品科学技术学院, 昆明 650201)

**摘要:**旨在高值化利用青刺果榨油后副产物青刺果粕中的蛋白质,以青刺果粕为原料,提取青刺果蛋白并制备蛋白酶解物,采用活菌吸附法联合反相高效液相色谱(RP-HPLC)从蛋白酶解物中筛选出抗菌肽组分,评价其抑菌活性,并对抑菌活性最好的组分进行稳定性分析。结果表明:筛选出的3个抗菌肽组分(F1、F2和F3)中,F2组分抑菌活性最好,当其质量浓度为10 mg/mL时对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌活性分别达到45.5%和39.1%;抗菌肽组分F2抑菌活性随温度升高和盐溶液浓度增加均降低,最适pH为6.0,在酸性环境中极不稳定,对酸性蛋白酶、碱性蛋白酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶的耐受性均较差,对中性蛋白酶耐受性较好。综上,青刺果粕中的蛋白酶解物具有抑菌活性,具有开发青刺果抗菌肽的潜力。

**关键词:**青刺果;抗菌肽;分离;抑菌活性;稳定性

中图分类号:TS229;TQ645

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2024)02-0042-05

### Isolation and stability of antimicrobial peptide

#### fraction from *Prinsepia utilis* Royle

ZHU Xin, KANG Shanming, ZHANG Tianxiong, WANG Xuefeng,

FAN Jiangping, PU Yuehong

(College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

**Abstract:** In order to make high value use of the proteins in the by-products of *Prinsepia utilis* Royle oil extraction, *Prinsepia utilis* Royle proteins were extracted from the meal of *Prinsepia utilis* Royle and then hydrolyzed to prepare hydrolysates. The antimicrobial peptide fractions were screened from the hydrolysates by using live bacterial adsorption combined with reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), their antibacterial activities were evaluated, and the stability of the fraction with the best antibacterial activity was analyzed. The results showed that among the three antimicrobial peptide fractions (F1, F2 and F3) screened, the F2 fraction had the best antibacterial activity, and its antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* reached 45.5% and 39.1%, respectively, at a mass concentration of 10 mg/mL. The antibacterial activity of the antimicrobial peptide fraction F2 was reduced with the increase of temperature and salt solution concentration, and its optimal pH was 6.0, and it was extremely unstable in an acidic environment. The antimicrobial peptide fraction F2 was poorly tolerated by acid protease, alkaline protease, pepsin and trypsin, and better tolerated by neutral protease.

In conclusion, the enzymatic hydrolysates of protein in the meal of *Prinsepia utilis* Royle have antibacterial activity, and has potential for the development of antimicrobial peptides from *Prinsepia utilis* Royle.

**Key words:** *Prinsepia utilis* Royle; antimicrobial peptides; separation; antibacterial activity; stability

收稿日期:2022-09-23;修回日期:2023-11-14

基金项目:国家自然科学基金地区项目(31960462);云南省基础研究计划面上项目(2019FB052);云南省农业联合专项重点项目(202101BD070001-013);云南省青年科技人才托举工程项目

作者简介:朱 薪(1998),男,在读硕士,研究方向为食品科学(E-mail)2775438655@qq.com。

通信作者:王雪峰,副教授,博士(E-mail)364135728@qq.com。

青刺果(*Prinsepia utilis* Royle)又称打油果,为多年生扁核木属蔷薇科植物,主要分布于我国云南、四川等西南地区,是一种常见的食药两用的木本油料植物<sup>[1-2]</sup>。青刺果中含有丰富的营养物质,如脂肪、蛋白质、酚类等,其中蛋白质含量高达46.97%<sup>[3]</sup>,可作为优良植物蛋白的来源。此外,青刺果具有护肤和保健等功能价值<sup>[4]</sup>。目前对青刺果的研究主要集中于油脂,对青刺果蛋白的研究相对较少,导致榨油后青刺果粕中的蛋白质资源存在利用率低的情况,因此对粕中蛋白质进一步的开发利用具有重要意义。

随着抗生素的广泛使用,越来越多的菌株对抗生素产生了耐药性,导致抑制病原菌的难度越来越大,寻找新的抗菌物质来替代抗生素成为未来健康发展的必然选择。在选择抗菌物质的过程中,抗菌肽由于作用迅速、不会产生污染和耐药性而被人们广泛关注,其作为抗生素替代物具有良好的开发前景和应用潜力<sup>[5-7]</sup>。王兴妮等<sup>[8]</sup>研究发现,从青刺果粕中提取的粗蛋白,经酶解后得到的蛋白水解物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制率分别为83.57%和64.38%。和丽等<sup>[9]</sup>以青刺果粕为原料,通过复合酶酶解制备的蛋白水解物对金黄色葡萄球菌的抑制率为31.62%。上述研究表明青刺果粕中含有抗菌肽组分,有望成为开发抗菌肽的潜在原料。

本文以青刺果粕为原料,采用酶法制备了青刺果蛋白酶解物,通过活菌吸附法联合反相高效液相色谱(RP-HPLC)从蛋白酶解物中筛选出抗菌肽组分,并测定了抗菌肽组分的抑菌活性和稳定性,以期青刺果抗菌肽的开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

青刺果粕,香格里拉碧罗雪山生物科技公司;金黄色葡萄球菌 CICC10003、大肠杆菌 CICC10384,中国工业菌种保藏中心;乙腈,德国默克股份有限公司;三氟乙酸(TFA),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、复合蛋白酶,上海源叶生物科技有限公司;盐酸、氯化钠、氢氧化钠,天津市风船化学试剂科技有限公司;PBS缓冲液,赛默飞世尔科技有限公司;LB肉汤,广东环凯微生物科技有限公司。

#### 1.1.2 仪器与设备

TGL20M 高速冷冻离心机;RE-52A1A 旋转蒸发仪;SCIENTZ-18N 真空冷冻干燥机;Multiskan Go 酶联免疫检测仪,美国 Thermo Scientific 公司;

Aglient 1200 高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;DHP-600 电热恒温培养箱;LDZM-60KCS 立式压力蒸汽灭菌锅;UV-1800CP 紫外分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;STARTER3100 pH计;Merck Millipore 超滤杯。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 青刺果蛋白的提取

参考王雪峰等<sup>[10]</sup>的方法并稍加修改。将青刺果粕磨成粉,称取100 g青刺果粕粉,加入1 L NaCl溶液(0.3 mol/mL),将pH调至7.15,在30℃水浴下充分搅拌30 min后过滤,收集滤液,在40℃下旋转蒸发滤液至原滤液体积的1/3,然后置于-80℃下进行预冻,再采用真空冷冻干燥技术进行脱水,得到青刺果蛋白粉,置于4℃冰箱保存备用。

#### 1.2.2 青刺果蛋白酶解物的制备

青刺果蛋白的酶解方法参考文献[11-13]并稍加修改,具体的操作流程:称取青刺果蛋白粉→加入超纯水溶解(料液比1:30)→加入复合蛋白酶(4.5%)→匀浆搅拌5 min→55℃水浴酶解4.5 h并保持pH为7→沸水浴灭酶10 min→离心(4 000 r/min,15 min)→收集上清液→超滤(3 kDa)→透析(透析袋 MW100~500 Da)12 h→收集透析液,浓缩→真空冷冻干燥→青刺果蛋白酶解物。将青刺果蛋白酶解物置于-20℃冰箱保存备用。

#### 1.2.3 青刺果抗菌肽组分的分离

##### 1.2.3.1 吸附菌体的确定

###### (1) 菌体活化

将1 mL菌种(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌)分别接种到已灭菌的培养基中,放入摇床培养(37℃,24 h)得到第一代大肠杆菌和金黄色葡萄球菌菌体悬浮液;第二代菌体悬浮液的培养则采用1 mL的一代菌体悬浮液,按照获取第一代菌体悬浮液的方法进行操作,以此类推,得到第四代菌体悬浮液,储存在4℃冰箱备用。

###### (2) 菌体对抗菌肽组分的吸附

参照和丽等<sup>[9]</sup>的方法并稍加修改。分别取对数期的第四代大肠杆菌和金黄色葡萄球菌悬浮液离心2 min(4 000 r/min),用生理盐水洗涤菌体3次,然后在37℃下用不同质量浓度(5、10、20 mg/mL)青刺果蛋白酶解物溶液和菌体振荡反应2 h,离心后取上清液过0.22 μm滤膜,滤出物用PBS缓冲液冲洗3次,合并滤液,用酶标仪在600 nm波长下测定其吸光值,以不加菌体的青刺果蛋白酶解物溶液作为对照组,按公式(1)计算菌体吸附后抑菌组分保留率(R)。根据大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌组分保留率选择抗菌肽吸附菌体。

$$R = A_1/A_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: $A_0$  为对照组的吸光值; $A_1$  为样品组的吸光值。

### 1.2.3.2 抗菌肽组分分离

对 1.2.3.1 中确定的抗菌肽菌体吸附前后的青刺果蛋白酶解物溶液进行 RP-HPLC 分析,使用半制备柱分离抗菌肽组分。RP-HPLC 条件:Eclipse XDB-C18 色谱柱(分析柱 250 mm × 4.6 mm × 5 μm;半制备柱 250 mm × 9.4 mm × 5 μm);柱温 25 °C;紫外检测波长 215 nm;流速 0.5 mL/min(分析柱)、2 mL/min(半制备柱);最大压力 3 MPa;上样量 10 μL(分析柱)、1 mL(半制备柱);采用 5% 流动相 A(0.1% TFA + 100% 乙腈)和 95% 流动相 B(0.1% TFA + 100% 水)开始运行保持 0.01 min,25 min 内线性梯度上升至 95% 流动相 A 和 5% 流动相 B 至结束。

### 1.2.4 青刺果抗菌肽组分抑菌活性的测定

参照 Zhao 等<sup>[14]</sup>的方法取对数期的第四代大肠杆菌和金黄色葡萄球菌菌体悬浮液离心 2 min(4 000 r/min),收集菌体,用生理盐水洗涤至上清液无浑浊时,离心收集菌体,用 PBS 缓冲液悬浮稀释 3 倍至菌液浓度为 10<sup>6</sup> CFU/mL。取 50 μL 抗菌肽组分溶液(5、10 mg/mL)、190 μL LB 肉汤和 10 μL 待测菌液于 96 孔板混匀,对照组选用 PBS 缓冲液。将 96 孔板放置于 37 °C 的恒温培养箱培养 24 h 后,用酶标仪在 600 nm 波长下测定吸光值,按公式(2)计算抑菌活性(Y)。

$$Y = (A_0 - A_1)/A_0 \times 100\% \quad (2)$$

式中: $A_0$  为对照组的吸光值; $A_1$  为样品组的吸光值。

### 1.2.5 抗菌肽组分稳定性的测定

用无菌水配制质量浓度为 10 mg/mL 的抗菌肽溶液,参考文献[15-17]的处理方法考察抗菌肽溶液的稳定性,其中:热稳定性,抗菌肽溶液分别经 -20、4、20、40、60、80 °C 处理 30 min 后,迅速冷却至室温;酸碱稳定性,分别调节抗菌肽溶液 pH 至 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0,静置 1 h 后将 pH 调回至 7.2;离子强度稳定性,在抗菌肽溶液中分别加入等体积质量分数为 5%、10% 和 15% 的 NaCl、KCl 和 MgCl<sub>2</sub> 溶液;蛋白酶水解能力的稳定性,抗菌肽溶液中分别加入等体积质量浓度为 1 mg/mL 的胃蛋白酶、胰蛋白酶溶液,在 37 °C 水浴处理 1 h,分别加入等体积质量浓度为 1 mg/mL 的酸性、中性、碱性蛋白酶溶液,于 45 °C 水浴处理 1 h,沸水浴灭酶 10 min 后迅速冷却至室温。分别取 50 μL 处理后的抗菌肽溶液、190 μL LB 肉汤培养基和 10 μL 稀释好的金黄色葡萄球菌测试液于 96

孔板中,于 37 °C 下孵育 12 h,用酶标仪在 600 nm 波长下测定吸光值。以无菌水作为空白对照,按公式(2)计算抑菌活性,并以未处理的抗菌肽溶液的抑菌活性为 100%,计算各处理组抗菌肽溶液的相对抑菌活性。

### 1.2.6 数据统计与分析

本文所有实验均重复 3 次,利用 Microsoft Office Excel 2019 进行数据收集整理,利用 IBM SPSS Statistics 25 对数据进行统计学分析,用 GraphPad Prism8 绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌体对青刺果抗菌肽组分的吸附效果

菌体对青刺果抗菌肽组分吸附效果如图 1 所示。

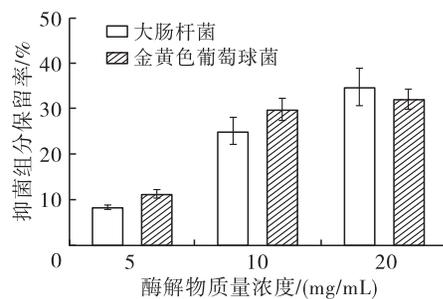


图 1 菌体对青刺果抗菌肽组分的吸附效果

由图 1 可知,随着酶解物质量浓度的升高,抑菌组分保留率呈升高的趋势,表明菌体对抗菌肽组分的吸附效果越来越弱,在酶解物质量浓度为 5 mg/mL 时,菌体对抗菌肽组分的吸附效果最强,这可能是因为酶解物质量浓度为 5 mg/mL 时,菌体的吸附已经达到饱和状态。在酶解物质量浓度为 5 mg/mL 和 10 mg/mL 时,金黄色葡萄球菌的抑菌组分保留率始终大于大肠杆菌的,表明大肠杆菌对抗菌肽组分的吸附效果强于金黄色葡萄球菌的,因此选择大肠杆菌作为抗菌肽吸附菌体。

### 2.2 大肠杆菌吸附前后青刺果蛋白酶解物溶液的 RP-HPLC 分析

大肠杆菌吸附前后青刺果蛋白酶解物溶液的 RP-HPLC 谱图如图 2 所示。

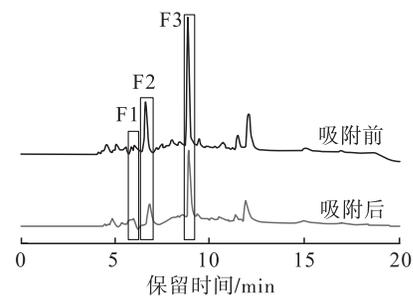
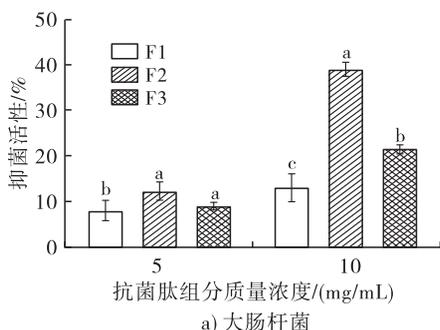


图 2 吸附前后青刺果蛋白酶解物溶液的 RP-HPLC 图

由图 2 可以看出,菌体吸附后青刺果蛋白酶解物溶液中组分 F1、F2、F3 的峰强均减小,说明 3 个

组分被大肠杆菌有效吸附。通过半制备色谱对其进行分离,考察3个组分对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性。



注:不同字母代表组内存在显著性差异( $p < 0.05$ )。下同

图3 青刺果抗菌肽组分 F1、F2 和 F3 的抑菌效果

由图3可知,随着抗菌肽组分 F1、F2、F3 质量浓度的升高,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果增加。青刺果抗菌肽组分 F1、F2、F3 质量浓度为 10 mg/mL 时,其对大肠杆菌的抑菌活性分别为 13.2%、39.1% 和 21.3%,对金黄色葡萄球菌的抑菌活性分别为 18.4%、45.5% 和 31.4%。青刺果抗菌肽组分 F1、F2 和 F3 对金黄色葡萄球菌的抑制效果强于大肠杆菌,组分 F2 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果优于 F1 和 F3 ( $p < 0.05$ )。研究表明,抗菌肽的抑菌活性不仅与其疏水性有关<sup>[18]</sup>,也与其肽链组成有关<sup>[19]</sup>。基于上述分析,选择青刺果抗菌肽组分 F2 研究其稳定性。

## 2.4 抗菌肽组分 F2 的稳定性

### 2.4.1 热稳定性

青刺果抗菌肽组分 F2 的热稳定性分析结果如图4所示。

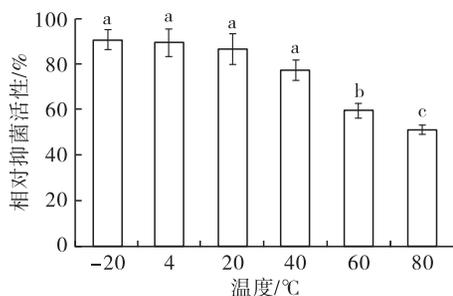


图4 青刺果抗菌肽组分 F2 的热稳定性

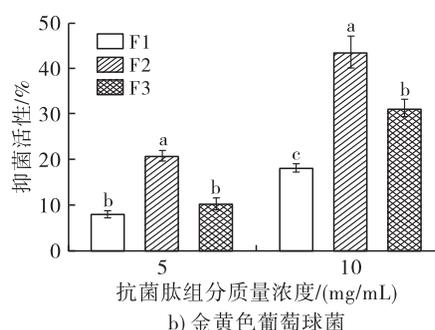
由图4可知,抗菌肽组分 F2 在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  时的相对抑菌活性为 90.74%,  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  时相对抑菌活性降低至 86.73%,  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  时相对抑菌活性下降至 51.23%,可见抗菌肽 F2 的抑菌活性随着温度升高有所降低,经高温处理后仍具有一定的抑菌活性,在使用过程中为了保持其活性应尽可能低温保存。

### 2.4.2 酸碱稳定性

青刺果抗菌肽组分 F2 的酸碱稳定性分析结果

## 2.3 青刺果抗菌肽组分的抑菌活性

青刺果抗菌肽组分 F1、F2 和 F3 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果如图3所示。



如图5所示。

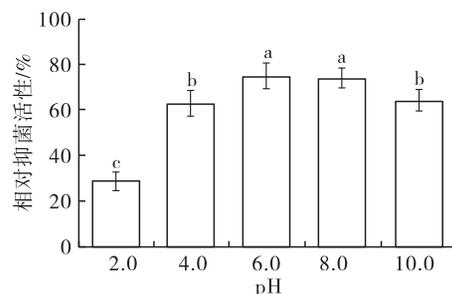


图5 青刺果抗菌肽组分 F2 的酸碱稳定性

由图5可知,青刺果抗菌肽组分 F2 的相对抑菌活性随着 pH 的增加呈先增加后减小的趋势,在酸性和碱性环境中的相对抑菌活性较低,在 pH 为 6.0 ~ 8.0 时相对抑菌活性较好,在 pH 为 6.0 时稳定性最佳,此时相对抑菌活性为 75.51%。这与宋贤娟等<sup>[20]</sup>对辣木籽抗菌肽的研究结果相似,可能是因为过酸和过碱的环境使抗菌肽的结构发生变化从而导致其抑菌活性下降。

### 2.4.3 离子强度稳定性

盐溶液环境对抗菌肽的抑菌效果会产生一定的影响<sup>[21]</sup>。青刺果抗菌肽组分 F2 的离子强度稳定性分析结果如图6所示。

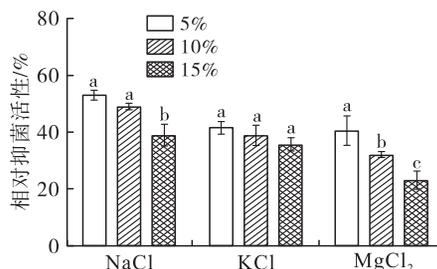


图6 青刺果抗菌肽组分 F2 的离子强度稳定性

由图6可知,盐溶液显著影响抗菌肽组分 F2 的相对抑菌活性,随着离子浓度的升高,相对抑菌活性呈下降趋势,在高浓度的 KCl、NaCl、MgCl<sub>2</sub> 环境中仅

能保持一定的抑菌活性,其中抗菌肽组分 F2 对  $MgCl_2$  溶液的敏感度最高。

#### 2.4.4 蛋白酶水解能力稳定性

青刺果抗菌肽组分 F2 的蛋白酶水解能力稳定性分析结果如图 7 所示。

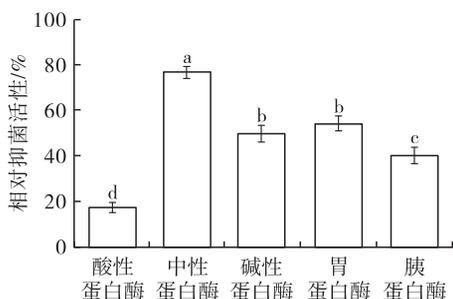


图 7 青刺果抗菌肽组分 F2 的蛋白酶水解能力稳定性

由图 7 可知,抗菌肽组分 F2 的相对抑菌活性受酸性蛋白酶(木瓜蛋白酶)的影响最大,酸性蛋白酶作用后其相对抑菌活性仅为 18.4%。抗菌肽组分 F2 对其他蛋白酶同样不耐受,除了中性蛋白酶,抗菌肽组分 F2 在其他酶作用下的相对抑菌活性均低于 55%,在中性蛋白酶作用下相对抑菌活性为 77.6%。这表明抗菌肽组分 F2 受酶解影响较大,在实际应用中应注意酶解对抗菌肽的影响。

### 3 结论

本研究以青刺果粕为原料,经青刺果蛋白提取、酶解后得到青刺果肽,从中筛选出抑菌活性较好的抗菌肽组分 F2,并研究了抗菌肽组分 F2 在不同温度、pH、盐溶液和蛋白酶处理条件下的稳定性。结果表明:抗菌肽组分 F2 质量浓度为 10 mg/mL 时,对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制效果最好,抑菌活性分别达到 45.5% 和 39.1%;抗菌肽组分 F2 在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下的相对抑菌活性最佳,达到 90.74%;当 pH 为 6.0 时,抗菌肽组分 F2 的相对抑菌活性最好,其在酸性环境中最不稳定;随着 NaCl、KCl 和  $MgCl_2$  溶液浓度的升高,抗菌肽组分 F2 的相对抑菌活性下降,且 F2 对  $MgCl_2$  溶液最为敏感;抗菌肽组分 F2 对中性蛋白酶耐受性较好,其相对抑菌活性达到 77.6%,而经酸性蛋白酶处理后的相对抑菌活性最低。以上结果为青刺果抗菌肽的后续开发利用提供一定的理论依据。

#### 参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典: 附编[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.

[2] 高凡丁, 张成庭, 蔡圣宝. 青刺果种子和油粕中的营养成分对比及酚类物质组成和抗氧化活性分析[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(2): 151-158.

[3] 张瑞琳, 吴文惠, 张静怡, 等. 还原性青刺果果实蛋白生物化学特性的研究[J]. 天然产物研究与开发,

2017, 29(9): 1595-1601.

[4] 和琼姬, 和加卫, 王宇萍, 等. 青刺果研究概述[J]. 中国农学通报, 2016, 32(7): 74-78.

[5] 赵飞, 滕达, 杨娜, 等. 抗菌肽 NZ2114 对多重耐药 2 型猪链球菌感染小鼠的治疗效果评价[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(4): 1089-1097.

[6] 靳纯焜, 叶耿坪, 唐新仁. 反刍动物饲用抗生素替代物研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(1): 77-85.

[7] 奚锦, 王文佳, 罗绂重, 等. 抗菌肽的研究现状[J]. 贵阳中医学院学报, 2019, 41(6): 88-90.

[8] 王兴妮, 李莉蓉. 青刺果粕蛋白水解产物/多糖/纳米  $TiO_2$  复合薄膜的制备以及性能研究[C]//中国食品科学技术学会第十九届年会论文摘要集. 北京: 中国食品科学技术学会, 2022: 427-428.

[9] 和丽, 熊海涛, 王雪峰, 等. 响应面试验优化复合酶法制备青刺果抗菌肽的工艺研究[J]. 中国油脂, 2021, 46(6): 33-37.

[10] 王雪峰, 陈越, 赵琼, 等. 响应面试验优化酶法制备辣木籽多肽工艺及其抑菌活性分析[J]. 现代食品科技, 2019, 35(1): 173-181, 214.

[11] 高义霞, 周向军, 魏苇娟, 等. 豆渣蛋白肽的酶解工艺、抗氧化作用及其特性研究[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(4): 46-52, 67.

[12] 张杨, 胡磊, 汪少芸, 等. 响应面优化酶解法制备蒲公英蛋白抗氧化肽工艺[J]. 食品工业科技, 2016, 37(5): 258-262.

[13] 宫俊峰, 闫碧轩, 贾亚婷, 等. 乳清分离蛋白酶解工艺[J]. 食品工业, 2019, 40(6): 145-148.

[14] ZHAO Q, SHI Y, WANG X, et al. Characterization of a novel antimicrobial peptide from buffalo casein hydrolysate based on live bacteria adsorption[J]. J Dairy Sci, 2020, 103(12): 11116-11128.

[15] 赵萍. 抗菌肽 polybia-MPII 及其类似物抗菌活性、细胞毒性和酶解稳定性的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2019.

[16] 肖建辉. 麻疯树籽粕脱毒及其抗菌肽的细胞膜色谱制备法和抗菌机理的研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2012.

[17] 唐鹏杰, 韩秋煜, 包斌, 等. 海洋生物活性肽的制备、分离纯化及构效关系研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(24): 488-495.

[18] WU Q, PATOČKA J, KUČA K. Insect antimicrobial peptides, a mini review[J/OL]. Toxins, 2018, 10(11): 461[2022-09-23]. <https://doi.org/10.3390/toxins10110461>.

[19] WANG J, DOU X, SONG J, et al. Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era[J]. Med Res Rev, 2019, 39(3): 831-859.

[20] 宋贤娟, 鲁媛媛, 王雪峰, 等. 不同储存、加工条件下辣木籽抗菌肽的抑菌稳定性[J]. 中国油脂, 2023, 48(5): 26-29.

[21] 申艳敏, 李荣誉, 张国祖, 等. 抗菌肽 LL-37 的抑菌作用及其稳定性研究[J]. 畜牧与兽医, 2013, 45(6): 75-77.