

武中庸, 热孜万古力·赛买提, 车敏娜, 等. 响应面法优化紫色马铃薯花青素超声波提取工艺[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(6): 1379-1385.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.06.026

响应面法优化紫色马铃薯花青素超声波提取工艺

武中庸, 热孜万古力·赛买提, 车敏娜, 赫欣睿, 陈士恩
(西北民族大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730124)

摘要: 在单因素试验的基础上, 选取料液比、超声波功率、提取时间、提取温度为自变量, 花青素含量为响应值, 采用响应面中心复合试验设计(CCD)方法优化了紫色马铃薯花青素超声波提取工艺。结果表明: 回归模型具有高度显著性, 回归方程对试验结果拟合较好, 可用于花青素提取条件预测; 最佳工艺条件为液料比 28:1、超声波功率 380 W、提取时间 18 min、提取温度 47 ℃, 在此条件下花青素提取率为 602 mg/kg。

关键词: 紫色马铃薯; 花青素; 超声波辅助提取; 响应面法

中图分类号: TS264.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)06-1379-07

Optimization of ultrasonic-assisted extraction process for anthocyanin from purple potato by response surface analysis

WU Zhong-yong, RE ZIWANGULI Sai-mai-ti, CHE Min-na, HE Xin-rui, CHEN Shi-en
(College of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730124, China)

Abstract: On the basis of single-factor test, the processing parameters, including solvent-material ratio, ultrasonic power, extraction time and temperature were investigated. The extraction rate of purple potato anthocyanin was chosen as response value, and the ultrasonic-assisted extraction process for anthocyanin from purple potato was optimized by utilizing central composite design (CCD) design and response surface analysis. The result indicated that the model was highly significant, and the established regression equation for purple potato anthocyanin had an excellent goodness of fit. Therefore, the anthocyanin from purple potato could be analyzed and predicted by the model. The optimum technological conditions were solvent-material ratio of 28:1, ultrasonic power of 380 W, extraction time of 18 min, extraction temperature of 47 ℃. Under these conditions, the extraction ratio of purple potato anthocyanin was up to 602 mg/kg.

Key words: purple potato; anthocyanin; ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology

紫马铃薯又名紫土豆、黑土豆, 是通过杂交方法育成的新马铃薯品种^[1]。紫马铃薯不但营养丰富而且富含花青素。花青素是一类广泛存在于植物中

的水溶性天然色素, 因其常以糖苷形式存在故又名花色苷, 属于黄酮多酚类化合物^[2-4]。花青素具有抗氧化及清除自由基^[5]、增强人体免疫力^[6]、抗癌^[7]、增强视力^[8]、降脂减肥^[9]等作用, 在食品、化妆品、医药领域有着巨大的应用潜力, 是替代合成色素的理想材料。

随着技术的发展, 超临界 CO₂ 萃取技术、液态静高压脉冲电场技术等高新技术的应用大大提高了花青素的提取质量和效率^[10], 但设备条件要求高这

收稿日期: 2017-05-04

基金项目: 教育部动物医学生物工程创新团队项目 (IRT13091); 国家科技支撑计划项目 (2015BAD29B05)

作者简介: 武中庸 (1990-), 男, 河北沧州人, 硕士研究生, 研究方向为食品安全与品质控制, (E-mail) 272251424@qq.com

通讯作者: 陈士恩, (Tel) 0931-4512986; (E-mail) chshien@163.com

一因素大大限制了高新技术应用。目前,溶剂法仍是国内外提取花青素的主要方法,常用提取剂以甲醇、乙醇、丙酮等有机溶剂为主。常用的花青素定量分析方法主要有:直接测定法^[11]、高效液相色谱法^[12]和 pH 示差法^[13]。直接测定法操作简单,但其准确度较低;高效液相色谱法具有较高的灵敏度和分析速度,但其成本较高;pH 示差法依据花青素分子结构和特征光谱随 pH 值的改变而改变的原理^[14],多用于测定体系中有干扰物的花青素含量测定,其操作简单,易于推广^[15-16]。响应曲面法可以用较少的试验量有效、快速地确定多因素系统的最佳条件,该方法常用于优化花青素综合分离工艺条件^[17-19]。本研究采用响应面中心复合试验设计(CCD)方法对影响花青素提取率的料液比、超声功率、超声时间、提取温度等条件进行优化,以期对紫马铃薯资源的充分利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

紫马铃薯,产于甘肃省定西市。盐酸、乙醇、氯化钠、醋酸钾、柠檬酸、氯化钾、醋酸、醋酸钠等,分析纯,购自国药集团化学试剂公司。

1.2 仪器与设备

TU-1901 紫外分光光度计,北京普析通用有限公司产品;KQ2200B 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司产品;GT1-1 高速离心机,广州柏斯特仪器有限公司产品。

1.3 紫马铃薯预处理^[20]

新鲜紫色马铃薯→清洗、去皮、切片→50℃干燥→粉碎过 80 目筛→紫马铃薯粉→4℃冰箱保存待用。

1.4 花青素提取工艺流程

紫马铃薯粉→加入提取剂→超声波提取→离心(5 000 r/min, 10 min)→上清液→花青素粗提液。

1.5 紫马铃薯花青素最大吸收波长的测定

将紫马铃薯花青素溶液在 200~800 nm 波长范围内扫描,从而确定紫马铃薯花青素在可见光区的最大吸收波长。

1.6 紫马铃薯花青素含量的测定

紫马铃薯花青素含量采用 pH 示差法^[21-23]测定。取待测液 1 ml,分别用 pH1.0 和 pH4.5 的缓冲液定容至 10 ml。两种溶液分别测定在 528 nm 和

700 nm 波长处的吸光度(A)。每个样品平行测定 3 次,取平均值。计算吸光度差值(ΔA), $\Delta A = (A_1 - A_2) - (A_3 - A_4)$,式中, A_1 为 pH1.0 溶液 528 nm 处的吸光度, A_2 为 pH1.0 溶液 700 nm 处的吸光度, A_3 为 pH4.5 溶液 528 nm 处的吸光度, A_4 为 pH4.5 溶液 700 nm 处的吸光度。再计算花青素提取率(Y, mg/kg), $Y = \Delta A \cdot V \cdot M \cdot DF \cdot 1\,000 / (\varepsilon \cdot m)$,式中,V 为稀释后体积(ml),M 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的摩尔质量(449.2),DF 为稀释倍数, ε 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的摩尔消光系数(26 900),m 为样品质量(mg)。

1.7 紫马铃薯花青素提取的单因素试验

1.7.1 提取剂中柠檬酸浓度 配制浓度为 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% 的柠檬酸溶液,分别与 95%乙醇按 10:1 的体积比混合,配制成不同浓度的柠檬酸-乙醇提取液。取 1 g 紫马铃薯粉按液料比 10:1 混合,在 50℃、超声波功率 200 W 条件下提取 10 min,提取液 5 000 r/min 离心 10 min,上清液过滤后即为花青素提取液。将花青素提取液分别在 pH1.0 和 pH4.5 缓冲液下进行稀释,利用紫外可见分光光度计测定吸光度差值 ΔA 。计算花青素提取率,根据最大花青素提取率确定最适宜的柠檬酸浓度。

1.7.2 提取剂中柠檬酸与乙醇体积比 将 2%柠檬酸溶液与 95%乙醇(体积分数)分别以 4:1、5:1、6:1、7:1、8:1 和 9:1 的体积比混合,配制成柠檬酸-乙醇提取液。提取液按 10:1 的液料比与 1 g 紫马铃薯粉混合,按照方法 1.7.1 提取花青素。测定 ΔA ,计算花青素提取率,根据最大花青素提取率确定最适宜的柠檬酸与乙醇体积比。

1.7.3 提取剂与原料的液料比 将 2%柠檬酸溶液与 95%乙醇按 10:1 的体积比混合配制成柠檬酸-乙醇提取液,将提取液与 1 g 紫马铃薯粉分别以 10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1 的比例混合,按照方法 1.7.1 提取花青素。测定 ΔA ,计算花青素提取率,根据最大花青素提取率确定最佳液料比。

1.7.4 提取温度 将 2%柠檬酸溶液与 95%乙醇按 10:1 的体积比混合配制成柠檬酸-乙醇提取液,提取液按液料比 10:1 与 1 g 紫马铃薯粉混合,分别于 25℃、35℃、45℃、50℃、55℃、60℃下提取花青素,方法和其余条件同方法 1.7.1。测定 ΔA ,计算

花青素提取率,根据最大花青素提取率确定最佳提取温度。

1.7.5 超声波功率 将 2%柠檬酸溶液与 95%乙醇按 10 : 1 的体积比混合配制成柠檬酸-乙醇提取液,提取液按液料比 10 : 1 与 1 g 紫马铃薯粉混合,分别在超声波功率 200 W、250 W、300 W、350 W、400 W、450 W 和 500 W 条件下提取花青素,方法和其余条件同方法 1.7.1。测定 ΔA ,计算花青素提取率,根据最大花青素提取率确定最佳超声波功率。

1.7.6 提取时间 将 2%柠檬酸溶液与 95%乙醇按 10 : 1 的体积比混合配制成柠檬酸-乙醇提取液,提取液按液料比 10 : 1 与 1 g 紫马铃薯粉混合,按照方法 1.7.1 提取花青素,提取时间分别为 10 min、15 min、20 min、25 min、30 min。测定 ΔA ,计算花青素提取率,根据最大花青素提取率确定最佳提取时间。

1.8 紫马铃薯花青素提取的响应面试验

根据中心复合试验设计(CCD)方法原理,以料液比(A)、超声波功率(B)、提取时间(C)、温度(D)为自变量,以花青素提取量为评判指标,考察 4 个因素对提取量的影响。设计 4 因素 3 水平响应面分析试验对提取工艺进行优化。各因素及水平编码见表 1。

表 1 紫马铃薯花青素提取工艺优化响应面因素水平表

Table 1 Coded values and corresponding actual values of the optimization parameters of extraction process for anthocyanin from purple potato by response surface methodology

水平	料液比(A) (ml/g)	超声波功率(B) (W)	提取时间(C) (min)	温度(D) (℃)
-1	25.0	350	15.0	45.0
0	27.5	375	17.5	47.5
1	30.0	400	20.0	50.0

2 结果与分析

2.1 紫马铃薯花青素最大吸收波长

将紫马铃薯花青素粗提液在 200~800 nm 波长下扫描,得到紫马铃薯花青素在可见光区的最大吸收峰图谱(图 1)。确定紫马铃薯花青素的最大吸收波长为 528 nm。

2.2 紫马铃薯花青素提取工艺条件单因素试验结果

2.2.1 提取剂中最适宜柠檬酸浓度 花青素在酸性条件下比较稳定,但过强的酸性环境也会影响其

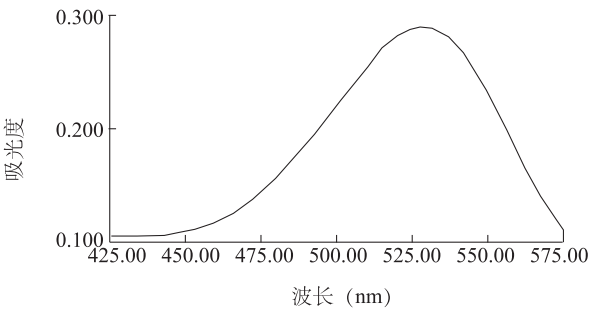


图 1 紫马铃薯花中花青素可见光谱图
Fig.1 The visible spectrum of purple potato anthocyanins

稳定性。由图 2 可知,花青素提取率随提取剂中柠檬酸浓度升高而增加,且在柠檬酸浓度为 2%时达到最大。因此确定最适宜柠檬酸浓度为 2%。

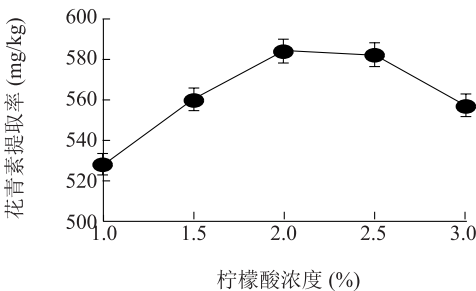


图 2 柠檬酸浓度对花青素提取率的影响
Fig.2 Effect of citric acid concentration on extraction rate of anthocyanin

2.2.2 提取剂中最适宜柠檬酸与乙醇体积比 花青素提取率随柠檬酸与乙醇体积比的升高而增加,当体积比为 6 时达到最大,随后开始下降(图 3)。原因可能为当体积比为 6 时,体系 pH 为花青素最适宜酸性条件。

2.2.3 提取剂与原料的最佳液料比 由图 4 可知,花青素提取率在液料比为 30 时达到最大。液料比过低不利于提取剂和原料的充分接触,而液料比过大会造成提取物被过分稀释,这都不利于花青素的提取。因此选择液料比 30 ml/g 为最佳液料比。

2.2.4 最佳提取温度 由图 5 可知,花青素提取率随提取温度升高而增加,50℃时花青素提取率最大,随后呈下降趋势。较高的温度有助于破坏组织结构,加快分子运动速度,从而促进花青素析出,但是过高温也会影响花青素的稳定性。因此,确定最佳提取温度为 50℃。

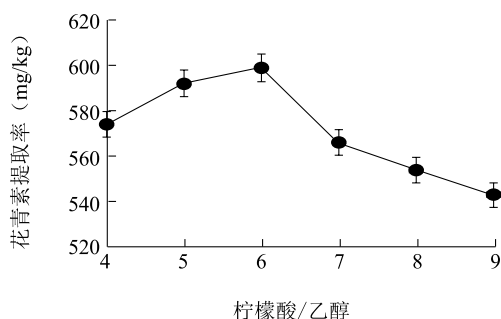


图3 柠檬酸和乙醇体积比对花青素提取率的影响

Fig.3 Effect of citric acid and ethanol volume ratio on extraction rate of anthocyanin

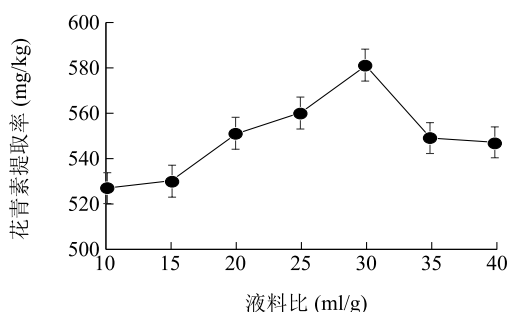


图4 液料比对花青素提取率的影响

Fig.4 Effect of solvent-material ratio on extraction rate of anthocyanin

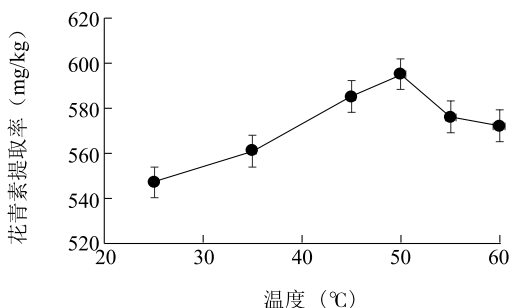


图5 温度对花青素提取率的影响

Fig.5 Effect of temperature on extraction rate of anthocyanin

2.2.5 最佳超声波功率 花青素提取率随超声波功率增加而升高,且增幅较大,当超声波功率为 350 W 时,花青素提取率达到最大值,随后呈下降趋势(图 6)。超声波在提取溶液中产生的空化效应和机械作用可以有效破碎植物细胞壁,使有效成分呈游离状态并溶入提取溶剂,因此,一定功率的超声波可促进花青素的提取。当功率过高时,也会使更多的花青素分解酶进入提取液,影响花青素提取率。

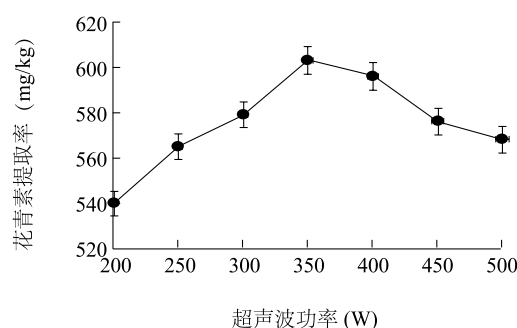


图6 超声波功率对花青素提取率的影响

Fig.6 Effect of ultrasonic power on extraction rate of anthocyanin

2.2.6 最佳提取时间 由图 7 可以看出,花青素提取率随提取时间的延长而呈上升趋势,且在超声波提取 20 min 时达到最大,之后花青素提取率下降明显。超声波处理的时间过长所产生的超声波热效应会使温度上升,导致花青素不稳定以及溶剂挥发,提取率降低。

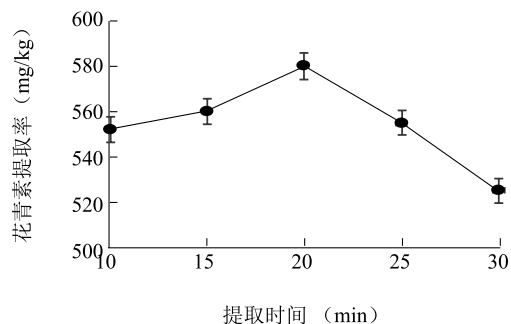


图7 提取时间对花青素提取率的影响

Fig.7 Effect of ultrasonic time on extraction rate of anthocyanin

2.3 紫马铃薯花青素提取工艺条件的响应面优化试验结果

使用 Design-Expert 8.0 软件处理以上数据,得到回归方程: $Y = 604.83 + 6.62A + 1.54B + 2.37C + 0.12D - 10.01A^2 - 7.26B^2 - 6.64C^2 - 6.64D^2 - 0.94AB + 2.19AC - 1.19AD - 0.94BC - 1.06BD - 1.94CD$ 。由回归方差分析结果(表 2)可知,该模型 P 值小于 0.000 1,表明该模型极显著。各项系数的 P 值越小,说明该项越显著^[14],因此 A 、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 5 项对于该模型最显著。失拟检验结果表明该模型失拟项不显著($P=0.1680$),说明其模拟程度较好,试验结果与预测值间的误差较小,可用于紫马铃薯花青素的提取条件预测。

表 2 紫马铃薯花青素提取回归模型及方差分析

Table 2 Analysis of variance of regression equation of anthocyanin extraction from purple potato

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	6 177.95	14.00	441.28	16.33	< 0.000 1 **
A	1 053.38	1.00	1 053.38	38.99	< 0.000 1 **
B	57.04	1.00	57.04	2.11	0.166 8
C	135.38	1.00	135.38	5.01	0.040 8
D	0.38	1.00	0.38	0.01	0.907 8
A ²	2 748.57	1.00	2 748.57	101.74	< 0.000 1 **
B ²	1 445.86	1.00	1 445.86	53.52	< 0.000 1 **
C ²	1 207.65	1.00	1 207.65	44.70	< 0.000 1 **
D ²	1 207.65	1.00	1 207.65	44.70	< 0.000 1 **
AB	14.06	1.00	14.06	0.52	0.481 7
AC	76.56	1.00	76.56	2.83	0.113 0
AD	22.56	1.00	22.56	0.84	0.375 2
BC	14.06	1.00	14.06	0.52	0.481 7
BD	18.06	1.00	18.06	0.67	0.426 3
CD	60.06	1.00	60.06	2.22	0.156 7
残差	405.25	15.00	27.02		
失拟性	336.42	10.00	33.64	2.44	0.168 0
纯误差	68.83	5.00	13.77		
总差	6 583.20	29.00			

A: 料液比 (ml/g); B: 超声波功率 (W); C: 提取时间 (min); D: 温度 (℃)。** 表示极显著。R² = 0.938 4, R_{adj2} = 0.881 0。

为进一步研究各因素间交互作用以确定最佳条件,通过 Design-Expert8.0 软件绘制响应面曲线图进行可视化分析。图 8 为液料比 (A)、超声波功率 (B)、提取时间 (C) 和温度 (D) 两两间的响应面曲线图,可以直接明了显示各因素对花青素提取率的影响。由图 8 可知,本研究所建立的模型具有最大值。根据模型拟合结果,紫马铃薯花青素的最佳提取工艺条件为:液料比 28.4 (ml/g)、超声波功率 376.79 W、提取时间 18.1 min、提取温度 47.34 ℃,花青素提取率最大理论值为 606.36 mg/kg。为便于操作,将工艺参数修正为:液料比 28 ml/g、超声波功率 380 W、提取时间为 18 min、提取温度为 47 ℃,在此条件下花青素提取率为 602 mg/kg。

3 讨论

花青素在酸性条件下稳定性较好,常用柠檬酸等增加提取剂的酸性^[24-25]。超声波能够使溶剂进入提取物细胞的速率加快,缩短提取周期,且不影响

产品品质^[26]。高温也能增强细胞壁渗透性,增加提取物的溶解度和扩散系数,从而提高提取率,然而温度过高会引起花青素的降解。由于超声波产生的热效应会使温度以 0.25 ℃/min 的速率上升^[27],因此控制提取时间和温度是增加提取率的重要措施。有研究表明,紫马铃薯花青素的耐受温度是 60~70 ℃^[28-29]。花色苷含量测定方法有多种,张玥等^[30]比较研究了直接测定法、单 pH 测定法、pH 示差法、差减法对紫色马铃薯花色苷的分析效果,结果表明 pH 示差法简单、快速、精确,适用于紫色马铃薯花色苷含量的测定。王亚云等^[29]以盐酸酸化乙醇为提取剂提取紫色马铃薯花色苷,并对提取工艺进行了优化,得到最佳提取工艺条件为:提取前用提取溶剂浸泡紫色马铃薯粉 1 h,乙醇体积分数 50%,提取温度 60 ℃,提取时间 120 min,料液比 1:10,在此条件下花色苷提取率可达到 542.3 mg/kg。本研究在单因素试验的基础上,采用超声波辅助酸性乙醇提取法提取紫马铃薯花青素,并采用响应面法

对提取工艺进行优化,获得的紫马铃薯花青素最佳提取工艺条件为液料比 28 ml/g、超声波功率 380 W、提取时间 18 min、提取温度 47 °C,在此条件下花

青素提取率为 602 mg/kg。本方法具有安全无毒、成本低、提取率较高、操作简单的特点。

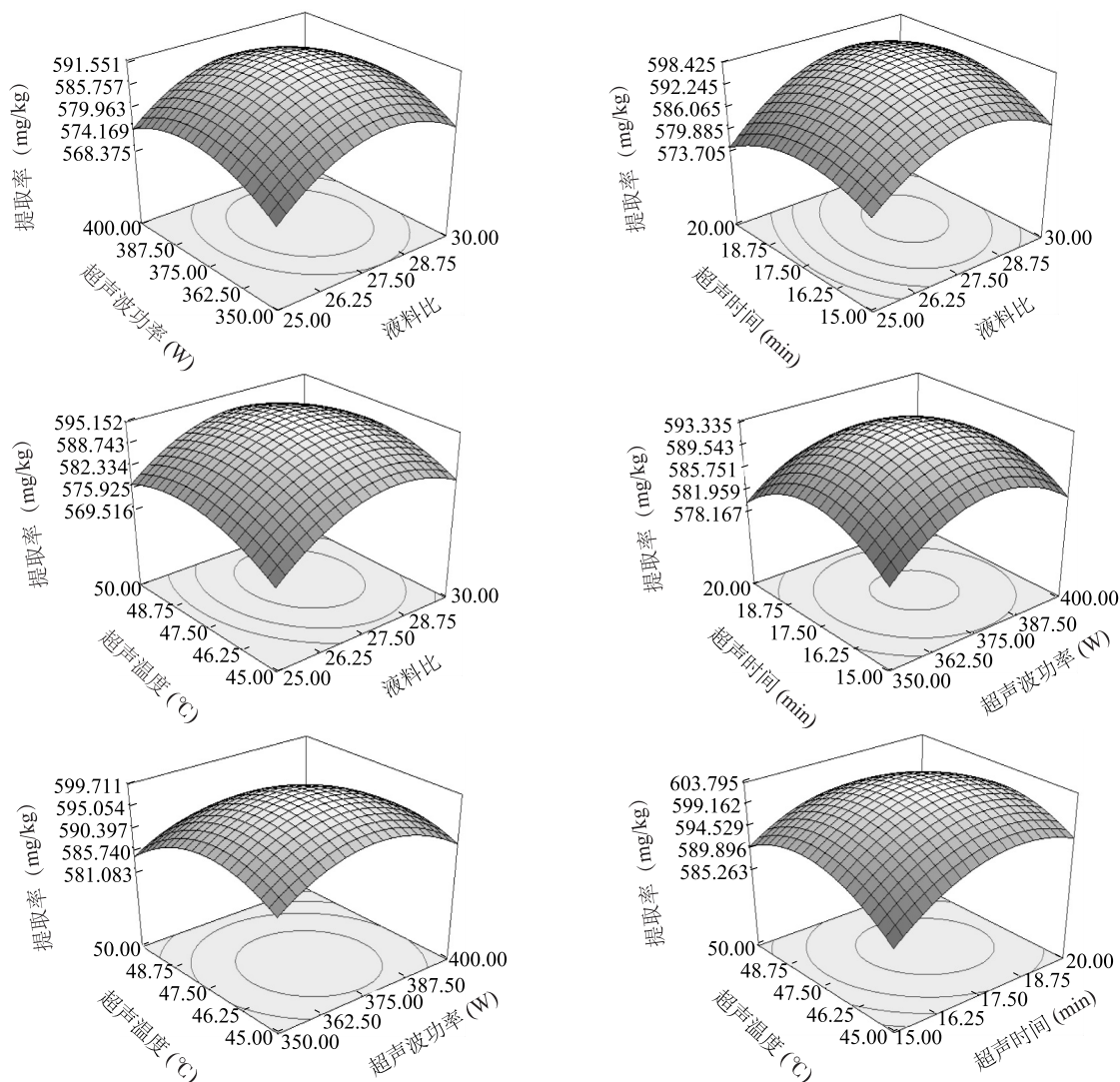


图8 两因素交互作用对花青素提取率的响应曲面

Fig.8 Response surface plots for the interactions of two variables on extraction rate of anthocyanin

参考文献:

- [1] 王 兰,邓放明,赵玲艳.紫色马铃薯保健功效及其利用研究进展[J].中国酿造,2015,34(7):117-120.
- [2] 肖继坪,王 琼,白 磊.彩色薯类花色苷功能研究及开发利用[J].食品研究与开发,2015,36(13):122-126.
- [3] MASQUELIER J, MICHAUD J, LAPARRA J. Flavonoides et pycnogenols[J]. International Journal for Vitamin & Nutrition Research, 1979,49: 307-311.
- [4] HAYASHI K, HIBASAMI H, MURAKAMI T, et al. Induction of

- apoptosis in cultured human stomach cancer cells by potato anthocyanins and its inhibitory effects on growth of stomach cancer in mice[J]. Food Science and Technology Research, 2006,12(1): 22-26.
- [5] EZEKIEL R, SINGH N, SHARMA S, et al. Beneficial phytochemicals in potato-a review[J]. Food Research International, 2013, 50(2):487-496.
- [6] TSUDA T. Regulation of adipocyte function by anthocyanins: possibility of preventing the metabolic syndrome[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(3): 642-646.
- [7] WANG L S, STONER G D. Anthocyanins and their role in cancer

- prevention[J]. *Cancer Letters*, 2008, 269(2): 281-290.
- [8] 彭强,高彦祥,袁芳.紫甘薯及其花色苷的研究与开发进展[J].*食品科学*, 2011, 32(23): 401-405.
- [9] 吕春茂,王新现,董文轩,等.响应面法优化越橘花色苷微波辅助提取工艺参数[J].*食品科学*, 2011, 32(6): 71-75.
- [10] 于东,陈桂星,方忠祥.花色苷提取、分离纯化及鉴定的研究进展[J].*食品发酵工业*, 2009, 35(3): 127-133.
- [11] 唐琳,李子江,赵磊,等.两种pH值法测定玫瑰花花色苷含量的比较[J].*食品科学*, 2009, 30(18): 310-313.
- [12] 殷丽琴,彭云强,钟成,等.高效液相色谱法测定8个彩色马铃薯品种中花青素种类和含量[J].*食品科学*, 2015, 36(18): 143-147.
- [13] 杨兆艳.pH示差法测定桑椹红色素中花青素含量的研究[J].*食品科技*, 2007, 32(4): 201-203.
- [14] 孙婧超,刘玉田,赵玉平,等.pH示差法测定蓝莓酒中花色苷条件的优化[J].*中国酿造*, 2011(11): 171-174.
- [15] FULEKI T, FRANCIS F J. Quantitative methods for anthocyanins. 2. Determination of total anthocyanins and degradation index for cranberry juice[J]. *Journal of Food Science*, 1968, 33(1): 73-83.
- [16] 张艳侠,徐超,张立华. pH示差法测定茄子皮中花青苷条件的优化[J].*江苏农业科学*, 2015, 43(7): 338-340.
- [17] 李新莹,姚舜.响应面法优化甘蔗梢提取物中花青素的分离工艺[J].*食品科学*, 2015, 36(2): 7-11.
- [18] 李健,王金秋,刘宁,等.响应面优化超声辅助提取紫茄皮中花青素工艺[J].*哈尔滨商业大学学报(自然科学版)*, 2015, 31(6): 704-709.
- [19] 陈建国,梁寒峭,李金霞,等.响应曲面法优化黑青稞花青素的提取工艺[J].*食品工业*, 2016, 37(1): 80-83.
- [20] PATIL G, MADHUSUDHAN M C, BABU B R, et al. Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish[J].*Chemical Engineering and Processing*, 2009, 48(1): 364-369.
- [21] 赵贝塔,刘邻渭,崔玉婷.响应面法优化超声提取墨石榴皮中花青素[J].*西北农业学报*, 2014, 23(6): 201-208.
- [22] 潘利华,王建飞,叶兴乾,等.蓝莓花青素的提取工艺及其免疫调节活性[J].*食品科学*, 2014, 35(2): 81-86.
- [23] 吴奇辉.紫马铃薯花色苷分离纯化及降脂减肥活性研究[D].杭州:浙江大学, 2014.
- [24] ESCRIBANO-BAION M T, SANTOS-BUELGA C, RIVAS-GONZALO J C. Anthocyanins in cereals[J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1054(1/2): 129-141.
- [25] 张俊霞,冯永森,陈琦,等.内蒙古武川县紫土豆中花青素的提取工艺优化[J].*内蒙古农业大学学报*, 2013, 34(6): 115-119.
- [26] EBRINGEROVÁ A, HROMÁDKOVÁ Z. An overview on the application of ultrasound in extraction, separation and purification of plant polysaccharides[J]. *Central European Journal of Chemistry*, 2010, 8(2): 243-257.
- [27] 李珍,哈益明,李安,等.响应面优化苹果皮渣多酚超声提取工艺研究[J].*中国农业科学*, 2013, 46(21): 4569-4577.
- [28] 王仁雷,周峰,周泉澄,等.紫马铃薯花色苷的提取纯化与鉴定[J].*食品科学*, 2011, 32(22): 55-59.
- [29] 王亚云,郭鲜蒲,袁锴,等.紫色马铃薯中花色苷提取工艺的研究[J].*中国食品添加剂*, 2016(3): 122-126.
- [30] 张玥,龙君,文云.紫色马铃薯花色苷定量分析方法的比较[J].*湖南农业科学*, 2012(9): 25-28.

(责任编辑:张震林)