

微生物混合发酵的研究及应用

李春笋 郭顺星*

(中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所 北京 100094)

摘要: 由于不同微生物之间的正相互作用, 人们发现应用两种或两种以上微生物混合发酵能更好地解决实践中的许多问题。在过去几年中, 对微生物的混合发酵的应用以及其中微生物之间的相互作用机理的研究取得了明显进展, 主要有以下 4 个方面: (1) 对生物质的降解利用; (2) 对环境污染物的降解; (3) 生产特定的代谢产物; (4) 混合发酵的工艺。综述了微生物混合发酵的应用及相关机理、涉及的微生物和影响因素。

关键词: 微生物, 混合发酵

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 03-0156-06

Studies and Applications on Microbial Mixed Fermentation

LI Chun-Sun GUO Shun-Xing*

(Institute of Medicinal Plant, CAMS & PUMC, Beijing 100094)

Abstract: Owing to the positive interactions between different microorganisms, mixed fermentation has been found more and more effective in practice. Apparent progress has been made on the application and mechanism of mixed fermentation in past ten years, including: (1) degradation and utilization of cellulose, bagasse, cornstalk, etc; (2) degradation of environmental pollution, like Diazinon and PVA; (3) production of specifically metabolite; (4) optimized technics of mixed fermentation. The latest progress on the application, related mechanism, microorganisms, and conditions of mixed fermentation is reviewed in this article.

Key words: Microorganisms, Mixed fermentation

自然界中不同微生物群体之间的相互作用可分为: 中立、偏利共生、协作、互惠共生、竞争、拮抗、捕食、寄生等几种关系^[1]。其中, 包含正相互作用的偏利共生、协作、互惠共生等关系都使混合发酵成为可能, 启发了人们采用不同菌株进行混合发酵。当把几种微生物有机地结合在一起时, 就有可能产生优于单菌发酵的效果。比如, Abouzied 和 Reddy 对黑曲霉的纯培养物及其与酿酒酵母的共培养物直接发酵未经水解的马铃薯淀粉作比较发现共培养时淀粉分解活性、淀粉利用率和乙醇产量相比于纯培养增加了几倍。20 世纪 80 年代初研制出的新型复合微生物制剂 EM 也是一个成功的实例。

混合发酵 (Mixed Fermentation) 一般是指两种或两种以上的微生物发酵, 如最常见的利用纤维素进行发酵, 又叫做同时糖化-发酵法 (SSF, Simultaneous Saccharification and Fermentation) 或水解-发酵并行法 (CHF, Combined Hydrolysis and Fermentation)。其底物常采用自然界中存在的纤维素类物质, 如玉米秸秆、糠类、酒糟等废弃物, 产物

* 联系人 E-mail: sxguo@hotmail.com

收稿日期: 2003-12-01, 修回日期: 2004-02-09

则一般是饲料蛋白、食品和一些化合物（如乙醇、氨基酸等）。

1 混合发酵的微生物组成及应用

混合发酵中涉及到的微生物组成种类繁多，可以分为细菌与细菌、细菌与真菌、真菌与真菌等几种方式。这几种组成的应用方向大致相同，主要有利用纤维素、降解环境污染物、生产单细胞蛋白等方面，具体组成和应用见表 1。

表 1 混合发酵中涉及到的微生物种类组成和应用

微生物组成	应用
<i>Arthrobacter</i> , <i>Streptomyces</i>	降解 Diazinon
<i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	降解对硫磷
<i>Penicillium piscarium</i> , <i>Geotrichum candidum</i>	降解偶氮染料
<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Alcaligenes</i> sp.	降解聚乙烯醇 (PVA)
<i>Thiobacillus thioarparus</i> , <i>Thiobacillus intermedius</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Azotobacter</i> sp.	降解硫氰酸钠
<i>Xanthromonas</i> sp., <i>Plesiomonas</i> sp.	降解直链烷基磺酸钠
<i>Bacteroides cellulosolvens</i> , <i>Clostridium saccharolyticum</i>	降解纤维素
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i> , <i>Clostridium thermocellum</i>	降解纤维素
<i>Pachysolen stipitis</i> , <i>Trichosporon penicillatum</i>	降解纤维素
<i>Clostridium thermocellum</i> , <i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	降解纤维素
<i>Chaetomium cellulolyticum</i> , <i>Candida lipolytica</i>	降解纤维素
<i>Trichosporon fermentans</i> , <i>Pachysolen tannophilus</i>	降解纤维素
<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Candida</i> sp.	降解氨基多糖
<i>Clostridium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Peptococcus</i>	石油开采
<i>Pseudomonas</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Peptococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i>	石油开采
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> , <i>Thiobacillus organoparus</i>	湿法冶金
<i>Neocallimastix frontalis</i> , <i>Methanogens</i>	生产甲烷
<i>Methanobacterium omelianskii</i> , <i>Desulfovibrio vulgaris</i> , <i>Methanosarcina barkeri</i>	生产甲烷
<i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>Proteus vulgaris</i>	生产苹果酸
<i>Propionibacterium shermanii</i> , <i>Bacillus mesentericus</i> / <i>E. coli</i>	生产维生素 B ₁₂
<i>Serratia macescens</i> , <i>E. coli</i>	生产缬氨酸
<i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>E. coli</i>	生产组氨酸
<i>Micrococcus candidus</i> , <i>Aeromonas fomicans</i>	生产赖氨酸
<i>Nocardia</i> sp., <i>Arthrobacter simplex</i>	甾体转化
<i>Arthrobacter</i> , <i>Streptomyces roseochromogene</i>	甾体转化
<i>Gluconobacter oxydans</i> , <i>Gluconobacter</i> sp.	生产 Vc 前体 2-KLG
<i>Gluconobacterium oxydans</i> , <i>Bacillus megaterium</i>	生产 Vc 前体 2-KLG
<i>Lactococcus lactis</i> subsp., <i>Kluyveromyces marxianus</i>	生产乳链菌肽
<i>Penicillium expansum</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	生产展青霉素, 生物降解
<i>Penicillium</i> sp., <i>Aureobasidium terreus</i>	生产纤维素酶, 木聚糖酶
<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Alcaligenes eutrophus</i>	生产 PHA
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Alcaligenes eutrophus</i>	生产 PHA
<i>Aspergillus awamori</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	生产乙醇
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i> , <i>Clostridium thermocellum</i>	生产乙醇
<i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Thermotolerant yeast</i> , <i>Zymomonas mobilis</i>	生产乙醇

续表 1

微生物组成	应用
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	生产乙醇
<i>Rhizosonia solani</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	生产乙醇
<i>Clostridium thermocellum</i> , <i>Acetogenium laxui</i>	生产乙酸
<i>Rhizobium meliloti</i> , <i>Penicillium bilaii</i>	生物化肥
<i>Geotrichum candidum</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Trichoderma lignorum</i>	生产饲料蛋白
<i>Trichoderma reesi</i> , <i>Candida utilis</i>	生产单细胞蛋白
<i>Rizopus niger</i> , <i>Pachysolen tannophilus</i>	生产单细胞蛋白
<i>Candidum</i> sp., <i>Trichoderma koningii</i> , <i>Asperillus oryzae</i> , <i>Candida utilis</i>	生产单细胞蛋白
<i>Pseudomonas</i> , <i>Hyphomicrobium</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Acinetobacter</i>	生产单细胞蛋白
<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Candida arborea</i>	生产单细胞蛋白
<i>Geotrichum candidum</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Cadida utilis</i>	生产单细胞蛋白
<i>Candida tropicalis</i> , <i>Trichoderma viride</i>	生产饲料蛋白
<i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Trichoderma koningii</i>	生产饲料蛋白
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Acetomonas suboxydans</i>	发酵生产饮料
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ,	发酵生产乳酸豆
<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Saccharomyces sake</i>	发酵生产日本饮料 Sake
<i>Bacillus megatherium</i> , <i>Saccharomyces sake</i>	发酵生产米酒
<i>Saccharomyces piriformis</i> , <i>Baeterium veruiforme</i>	发酵生产姜啤酒
<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	发酵生产土耳其酸奶
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	发酵生产嗜酸菌奶
<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	发酵生产酸乳
<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Tetracoccus liquefaciens</i> , <i>Streptococcus cremoris</i>	生产奶酪
<i>Micrococi</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Perlinococcus cerevisiae</i> , <i>Leuconastoe mesenteroides</i>	生产香肠
<i>Bradyrhizobium</i> , <i>Penicillium</i>	生物固氮固磷

注：参考文献略

1.1 生物质的降解与利用 纤维素酶在纤维素的降解利用上起着重要的作用，在一般的纤维素发酵过程中其活性较不稳定，而混合发酵法可以克服纤维素酶生成和活性存在的许多问题。在这种体系中，在一定时间间隔内，酶的生成不受降解物阻遏，酶的活性不受反馈抑制，失活的酶可以由新合成的酶加以补充。在混合发酵体系中酶促作用生成的糖很快被发酵微生物利用，维持了生成糖的低浓度，消除了酶合成作用可能受到的降解物阻遏作用，使酶可以不断的合成。对木质纤维素材料的有效糖化需要不同性质的纤维素酶协同作用：胞内葡聚糖酶、胞外葡聚糖酶、β-葡糖苷酶和木聚糖酶。Garcia 等^[2]根据不同的纤维素酶和木聚糖酶活性筛选出的菌株青霉属 (*Penicillium* sp.) CH-TE-001 和土曲霉 CH-TE-013 在糖化甘蔗渣时表现出协作能力。结果显示与单菌培养相比，CH-TE-001 和 CH-TE-013 的混合培养物可以生产出含高的蛋白成分、高纤维素酶 (主要是 β-葡糖苷酶) 和木聚糖酶活性的培养物过滤液。

不同于单一菌种的发酵，混合体系中的协作效应可以使微生物对纤维素的利用分工明确，从而更好进行。Glancer^[3]发现，选用 *P. stipitis* 和 *T. penicillatum* 混合培养可将玉米秸秆的稀酸水解物转化为菌体蛋白、降解木素并降低化学好氧量 (COD)，选用 *P.*

tannophilus 和 *T. fermentaus* 亦可产生类似反应。该体系中, *P. stipitis* 和 *P. tannophilus* 分别将木糖发酵成乙醇, *T. penicillatum* 和 *T. fermentaus* 以乙醇为生长碳源。Golias 等^[4]研究了同时糖化发酵纤维素生产乙醇的重组菌株克雷白菌 (*K. oxytoca*) P2, 把它与利用纤维素的酵母菌株和与耐热酵母和 *Zymomonas mobilis* 共培养时的现象作了比较, 发现共发酵比两种中任一种的纯培养在相同的接种密度下都更快更多地产出乙醇。

1.2 降解环境中的有毒化合物 处理环境污染物的物理法、化学法和微生物法, 微生物法与其他方法相比较具有很多优点。例如, 微生物种类繁多, 能适应各种环境, 繁殖快, 遗传特性易于改造, 作用条件温和, 不会造成二次污染等等。在自然界中, 经常可以看到多种菌协同降解污染物。从土壤中分离的节杆菌和链霉菌生活在一起时, 能完全降解有机磷杀虫剂地亚农 (Diazinon), 并能利用这种化合物作为唯一的碳源和能源。而单独生活时, 哪一种菌也不能矿化地亚农的嘧啶环, 也不能生长在这种化合物上^[5]。Chapalamadugu 等^[5]利用从自然界分离到的两株假单胞菌降解 N-甲基氨基甲酸酯类杀虫剂 Carbaryl, 其中一种菌可以将底物降解成 α -萘酚, 另一种菌将 α -萘酚再转化为 CO_2 。此外, 微生物的混合培养还可以降解聚乙烯醇 (PVA)^[6] 和直链烷基磺酸钠。

1.3 生产特定的代谢产物 混合发酵可以用来生产很多代谢产物, 如甲烷、乙醇、维生素等等。在生产甲烷的沼气发酵中有许多产甲烷菌和非产甲烷菌参与, 该过程先由厌氧和兼性厌氧的水解性细菌或发酵性细菌分解纤维素形成丙酮、氨、丙酸、乙酸等, 再由产氢产乙酸细菌利用前面产生的有机酸氧化分解成乙酸和分子氢, 最后由严格厌氧的产甲烷菌完成。在此体系中, 非产甲烷菌为产甲烷菌提供生长基质, 并清除有毒物质; 后者则为前者解除反馈抑制, 二者共同维持适宜的 pH 值。胡纯铿等^[7]采用无根根霉 (*Rhizopus arrhizus*) A-23 和普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*) V-81 混合培养发酵 L-苹果酸, 前者产延胡索酸能力强, 后者具有高活性延胡索酸酶, 这样后者就可利用前者产生的延胡索酸生产苹果酸。尹光琳等^[8]用微生物混合培养从 D-山梨醇生产维生素 C 前体-2-酮基-L-古龙酸 (2-KLG)。氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) SCB329 以 D-山梨醇为底物培养时可产生微量 2-KLG, 且能将 L-山梨糖高效转化为 2-KLG; 而葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter* sp.) SCB110 能将 D-山梨醇以较高效率转化为 L-山梨糖, 但不产 2-KLG。将二者在以山梨醇为底物的培养基中混合培养可得代谢产物 2-KLG。混合发酵还可用于生物可降解塑料聚羟基烷酸 (PHA) 的生产。目前, 对 PHA 研究最多的是聚羟基丁酸 (PHB) 和羟基丁酸与羟基戊酸的共聚体 (PHBV)。Tanaka 等使用两种微生物两阶段补料分批发酵生产 PHB。先用乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 将木糖转化成 L-乳酸和乙酸, 离心除去菌体细胞, 在上清液中接种真养产碱菌, 结果 PHB 积累量可达细胞干重的 55%。Kato 等^[9]使用德氏乳杆菌 (*L. delbrueckii*) 和真养产碱菌混合发酵葡萄糖, 并建立数学模型优化和控制 PHB 的发酵生产。此外, 杨幼慧等^[10]还发现一些食品和生活污水厂的活性污泥具有积累 PHA 的能力, 这也是其中的混合微生物群落在起作用。

1.4 其它 利用微生物对自然界含量仅次于纤维素的氨基多糖进行降解和转化, 有可能生成具有生物活性的糖蛋白。王士奎^[11]以 *Beauveria bassiana* 为氨基多糖降解菌, 以 *Candida* sp. 为氨基糖转化菌, 建立了氨基多糖混合菌生物降解和转化模型。微生物的混合培养系统还能起到固磷和固氮的作用。Rice 等^[12]报道了在灭菌的泥煤块上共培养一种可溶磷真菌青霉菌和根瘤菌, 结果表明一种含有 *Penicillium bilaii* 的生物化肥能通过

溶解磷来增加植株对磷的摄入, 在无菌泥煤上共培养可以获得两种菌的共同产物和传输系统。微生物的混合发酵在实践中的应用范围非常广泛, 详见表1。

2 影响混合发酵的因素

微生物发酵的生产水平不仅取决于菌种本身的性能, 而且要在合适的环境条件下才能使其生产能力充分表达出来。为此, 我们需要了解有关菌种对环境条件的要求, 如温度、pH值、氧的需求等。以下对混合发酵中较重要的几个影响因素作一综述。

2.1 混合系统中各微生物之间的相互关系 混合发酵区别于一般微生物发酵的主要不同之处在于该体系由两种或多种微生物组成, 其中一种微生物为另一微生物提供营养来源或互相提供营养, 有的情况下后者还可以通过利用这些产物为前者解除了降解物造成的抑制, 从而组成一个使体系中的各微生物和谐共生的微环境, 这对于微生物在利用一些比较难于利用的底物时尤其有利。如 Murray^[13]对混合培养 *Bacteroides cellulosolvens* 和 *Clostridium saccharolyticum* 分解纤维素进行研究发现, 前者分解纤维素为后者提供碳源, 后者则可以通过利用前者产生的有毒中间产物来解除对前者的反馈抑制。这种微生物之间的相互作用在本文相关部分均有论及。

2.2 pH值 混合发酵中有时可以通过间接但方便的途径来控制 pH值, 而且由于一些对 pH值有影响的中间产物维持在一个较低的浓度水平, pH值会比较恒定。Shimizu等^[14]用乳酸乳球菌和克鲁维酵母混合培养系统生产乳链菌肽, 前者的加入就是为这种特殊的 pH值控制提供途径。因为培养基的 pH值可被克鲁维酵母的乳酸消耗控制, 而克鲁维酵母的特殊乳酸消耗又可通过改变溶解氧(DO)浓度来控制, 这样 pH值的级联控制就与溶解氧(DO)的控制相联系。而且因为乳酸水平保持低浓度, 该法保持 pH值恒定, 同时培养基中积累的乳链菌肽保持高水平。此外, Fang和Liu^[15]还研究了在一混合发酵细菌培养物中 pH对葡萄糖到氢的转化过程中的影响。该体系中 90%以上的葡萄糖在 pH 4.0~7.0 的范围内被降解, 随着 pH的升高, 细菌群落中的种类增多。

2.3 温度 在混合发酵中, 有时过程中所需酶的最佳温度和产生终产物的温度不一致, 这就需要确定二者的折衷温度。比如在混合菌发酵乙醇时, 纤维素酶的最佳温度是 50℃, 而乙醇发酵的最佳温度是 30℃, 有人确定在 *Trichoderma* sp. 和 *S. cerevisiae* 的乙醇混合发酵体系中最佳温度为 40℃^[4]。

2.4 搅拌速度 Farid等^[16]发现, 曲霉(*Aspergillus awamori*)和固定化酿酒酵母混合发酵生产乙醇的过程中, 淀粉水解与葡萄糖、葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶在发酵培养基中的积累受到搅拌速度的影响。72h后 150~200 r/min时获得酶的最大量, 200~300 r/min时观察到最大生长和葡萄糖积累。低搅拌速度(50 r/min)刺激乙醇的生产, 高搅拌速度则会降低乙醇产生。

2.5 反应器 郑裕国等^[17]报道了甘薯原料气升式生物反应器发酵生产单细胞蛋白。结果表明, 气升式生物反应器的发酵结果优于机械搅拌式生物反应器, 而带筛板的气升式生物反应器又优于不带筛板的气升式生物反应器。在氧传递性能考察中, 发现气升式生物反应器内加装筛板可以有效地强化氧传递。

2.6 接种顺序 与其它普通的发酵不同, 微生物的混合发酵中需要注意不同菌的接菌次序, 如前所述, 这关系到微生物之间利用代谢产物的问题。徐坚平等^[18]发现, 在纤维素上接种绿色木霉 96 h后再接种产朊假丝酵母, 混合培养后, 产物中蛋白的含量达

53%以上,胡纯铿等^[7]混合培养发酵L-苹果酸也有固定的接菌顺序,即先接无根根霉A-23,3 d后再接普通变形杆菌V-81培养2 d,产酸水平最高,达 $73.3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.7 接种量比例 混合发酵中不同菌株的接种量比例关系到在共生系统中每一种微生物的生长密度和速度,从而影响整个混合发酵的产物组成。王克明^[19]报道多菌种混合发酵糯米生产稠酒的根霉:酿酒酵母:产香酵母:红曲霉配比为3:1:2:1。王德培等^[20]报道了酵母菌和里氏木霉混合发酵秸秆提高其粗蛋白含量的最优接种量比例为1:4。尹光琳等^[8]在生产2-KLG时也强调掌握好两株菌的比例是获得最佳产物的关键之一。

3 混合发酵的前景展望

微生物混合发酵在生产实践上应用广泛,它可以代替许多情况下单菌发酵所不能进行的生产。这主要是由于多菌发酵是一个生物混合体系,体系中的微生物之间大多具有生长代谢协调作用。但是,从报道的文献来看,在该方向上的研究目前还局限在生产的发酵工艺的初步优化阶段,在菌与菌之间的具体共生协作机理方面还研究得较少,对于实践缺乏有效的理论指导。随着菌与菌之间的细胞生物学、生物化学、分子生物学等各方面研究的不断深入,人们将会更充分的了解有关微生物的具体特性,通过调节各种条件发挥其混合效应,从而不断挖掘混合发酵的巨大应用潜力。另外,由于微生物混合发酵可以利用自然界中大量纤维素资源和改善我们的生态环境,所以它对于实施生态资源的可持续发展战略也具有重要的实际意义。

参 考 文 献

- [1] 池振明编著. 微生物生态学. 济南: 山东大学出版社, 1999. 56~65.
- [2] Kirchner G O, Aguilar M M, Villava P R, *et al.* Appl Biochem Biotechnol, 2002, **98**~**100**: 1105~1114.
- [3] Glancer M. Process Biochemistry, 1989, **24** (3): 109~113.
- [4] Helen G, Geoffrey D J, Grant S A, *et al.* Journal of Biotechnology, 2002, **96** (2): 155~168.
- [5] Chapalamadugu S. Appl Environ Microbiol, 1991, **57** (3): 744~750.
- [6] Shimao M, Saimoto H, Kato N, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1999, **65** (7): 3134~3141.
- [7] 胡纯铿, 王国川. 华侨大学学报(自然科学版), 2000, **21** (1): 76~79.
- [8] 尹光琳, 杜文楚, 乔春红, 等. 微生物学报, 2001, **41** (6): 709~715.
- [9] Katoh T, Yuguchi D, Yushii H, *et al.* J Biotechnol, 1999, **67**: 113~134.
- [10] 杨幼慧, 伍朝晖. 食品与发酵工业, 2002, **28** (8).
- [11] 王士奎. 微生物学通报, 1997, **24** (2): 88~91.
- [12] Rice W A. Soil Biol Biochem, 1994, **27** (4/5): 703~705.
- [13] Murray W D. Appl Environ Microbiol, 1986, **51** (4): 710~714.
- [14] Shimizu H, Mizaguchi T, Tanaka E, *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 1999, **65** (7): 3134~3141.
- [15] Fang H H, Liu H. Bioresour Technol, 2002, **82** (1): 87~93.
- [16] Farid M A, El-Enshasy H A, El-Deen A M N. Journal of Basic Microbiology, 2002, **42** (3): 162~171.
- [17] 郑裕国, 汪 钊, 陈小龙, 等. 农业工程学报, 1999, 1.
- [18] 徐坚平, 刘均松, 孔 维, 等. 微生物学通报, 1995, **22** (4): 222~225.
- [19] 王克明, 庄树宏. 烟台大学学报, 2000, **13** (2): 130~134.
- [20] 王德培, 刘 瑛, 夏兰英, 等. 天津轻工业学院学报, 2002, 2.