

红光对紫色红曲霉生长及色素和桔霉素产量的影响

刘宏¹, 陈迪^{1,2}, 杨华¹, 刘秀丽¹, 陈勉华¹, 李贞景¹, 王昌禄¹

(1. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 食品营养与安全教育部重点实验室, 天津 300457)

(2. 河南工业大学生物工程学院, 河南郑州 450001)

摘要: 本文研究了红光对紫色红曲霉 M9 生长及色素和桔霉素产量的影响。采用高效液相色谱法对六种红曲色素, 包括两种红曲色素: 红斑红曲胺 (rubropunctamine, RUM) 和红曲玉红胺 (monascorubramine, MOM); 两种黄色素: 红曲素 (monascin, MS) 和红曲黄素 (ankaflavin, AK); 两种橙色素: 红斑红曲素 (rubropunctatin, RUN) 和红曲玉红素 (monascorubrin, MON) 以及桔霉素的产量进行测定。结果表明: 持续红光照射促进了紫色红曲霉 M9 菌丝生长、色素合成积累以及孢子形成, 尤其对于闭囊壳的产生有更显著促进作用。5 种不同的红光照射条件促进了 RUM、MOM、MS 和 AK 的产生, 抑制了 RUN、MON 和桔霉素的产生。在光照强度 300 lux, 光照时间 30 min/d, 光照节律 12 h 的最佳光照条件下, RUM、MOM 的产量分别提高了 53.8% 和 75.2%; MS 和 AK 的产量分别提高了 42.2% 和 59.4%; RUN 和 MON 的产量分别降低了 42.6% 和 54.5%; 桔霉素的产量降低了 42.5%。

关键词: 紫色红曲霉 M9; 红光; 生长; 红曲色素; 桔霉素

文章编号: 1673-9078(2017)7-180-185

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.7.026

Effects of Red Light on Growth, Pigments, and Citrinin Production of *Monascus purpureus*

LIU Hong¹, CHEN Di^{1,2}, YANG Hua¹, LIU Xiu-li¹, CHEN Mian-hua¹, LI Zhen-jing¹, WANG Chang-lu¹

(1. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China) (2. College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Red light was used to illuminate *Monascus purpureus* M9 to evaluate its effects on growth, pigments, and citrinin production. The contents of citrinin and six intracellular pigments, rubropunctamine (RUM), monascorubramine (MOM), monascin (MS), ankaflavin (AK), rubropunctatin (RUN), and monascorubrin (MON), from *Monascus purpureus* M9 were measured using high-performance liquid chromatography (HPLC). The results indicated that continuous illumination with red light promoted mycelial growth, the synthesis and accumulation of pigments, and spore formation in *Monascus purpureus* M9, especially the production of cleistothecia. Furthermore, five illumination conditions stimulated the production of RUM, MOM, MS, and AK, but inhibited the yields of RUN, MON, and citrinin. Under the optimal red light illumination condition (light intensity: 300 lux, illumination time: 30 min/d, and lighting regime: 12 h), the yields of RUM, MOM, MS, and AK were increased by 53.8%, 75.2%, 42.2%, and 59.4%, respectively, and those of RUN, MON, and citrinin were decreased by 42.6%, 54.5%, and 42.5%, respectively.

Key words: *Monascus purpureus* M9; red light; growth; pigments; citrinin

光是自然界一种重要的环境信号, 对包括丝状真菌在内的生物体发育和生理过程有着很大影响^[1]。研究表明, 光对丝状真菌的生长、发育、次级代谢产物的产生都有很大的影响。Bayram^[2]报道指出在黑暗条件下促进了构巢曲霉有性繁殖的进行, 在光照条件下

可以刺激有性孢子的萌发。Miyake^[3]发现了蓝光促进了无性孢子的产生而红光促进了有性孢子的产生。综上所述, 光照可以显著影响丝状真菌的生长和繁殖。

红曲霉可以产生多种有益的次级代谢产物, 包括红曲色素、莫纳克林 K、 γ -氨基丁酸、麦角固醇、酶类活性物质等。然而, 肾脏毒素-桔霉素的存在却成为困扰研究者的难题, 这大大影响了红曲产品的开发与应用。红曲色素作为红曲霉产生的主要次级代谢产物, 具有抗癌^[4,5]、抗炎^[6,7]、抗肥胖^[8,9]、抗糖尿病^[10]和调节体内胆固醇水平^[11]等多种生物活性。因此, 提高

收稿日期: 2016-12-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31330059、31571820)

作者简介: 刘宏 (1990-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 发酵食品与微生物资源开发

通讯作者: 王昌禄 (1960-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品科学

红曲色素产量的同时降低桔霉素产量对红曲霉菌种的保存与利用具有重要的理论与现实意义。

光照除了影响丝状真菌的生长繁殖,对次级代谢产物也有很显著的影响。不同颜色的光对微生物的次级代谢产物影响也不同。Miyake^[3]等对红光照射条件下从毛红曲霉 IFO4520 次级代谢产物进行了研究,相比黑暗条件,红光促进了红曲色素、GABA、桔霉素和莫纳克林 K 的产生。Babitha^[12]等研究发现对于紫色红曲霉 LPB97 而言,红光照射增加了红曲色素的产量,相反绿光和蓝光对红曲色素的产生有抑制作用。王昌禄^[13]等研究了红光对紫色红曲霉 M10 代谢的影响,发现红光能够促进红曲色素的产生,但同时也抑制了桔霉素的产生,可推测出红曲色素与桔霉素的代谢途径是两个相互独立的过程。Wang^[14]等在不同的光照时间和光照强度下,对紫色红曲霉 M9 的次级代谢产物进行研究,结果表明在低光照时间与强度下,蓝光可诱导色素产生,而随着光照时间与强度的增加,色素的产生受到抑制。本文主要研究了红光对紫色红曲霉 M9 的菌落形态、菌丝生长、孢子形成和六种红曲色素(RUM、MOM、MS、AK、RUN 和 MON)以及桔霉素产量的影响,旨在为研究其他真菌微生物的生长繁殖提供技术支撑,为优化光照发酵法高产红曲色素低产桔霉素提供理论基础,从而促进红曲更为广泛的应用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

菌种来源:红曲霉菌株(*Monascus purpureus* M9),由天津科技大学食品工程与生物技术学院发酵食品与生物资源开发研究室保藏。

主要试剂:葡萄糖、蛋白胨、NaNO₃、MgSO₄·7H₂O、KH₂PO₄,天津市化学试剂一厂;无水乙醇,天津市江天化工技术有限公司;琼脂粉,北京索莱宝生物科技公司;国产分析纯试剂。乙腈、甲酸,上海安谱科学仪器有限公司;国产色谱纯试剂。

主要培养基:麦芽汁琼脂培养基(MEA):将麦芽磨碎,加入4倍体积水,60℃水浴至麦芽糖度为18~20°BX,8层纱布过滤。置于-20℃冰箱备用。使用时融化麦芽汁,将糖度调为10~12°BX,加入3%琼脂,121℃灭菌20 min。

种子液培养基:葡萄糖6 g,蛋白胨2 g,NaNO₃1 g,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,KH₂PO₄1 g,自来水100 mL,乳酸调pH至5.5左右,121℃灭菌20 min。

液体发酵培养基:大米粉5 g,NaNO₃0.3 g,MgSO₄·7H₂O 0.1 g,KH₂PO₄0.15 g,自来水100 mL,pH自然,121℃灭菌20 min。

固体平板培养基:麦芽糖4 g,可溶性淀粉5 g,蛋白胨3 g,琼脂3 g,自来水100 mL,pH自然,121℃灭菌20 min。

1.1.2 仪器与设备

高速冷冻离心机,J-26XP型;微电脑控制光照培养箱,LRH-250-GII型;紫外-可见分光光度计,Agilent 8453型;高效液相色谱仪,Agilent 1200型。

1.2 实验方法

1.2.1 菌落形态观察

将摇好的种子液过8层纱布,得到孢子悬液,通过血球计数板将孢子浓度调为10⁶个/mL。取20 μL孢子悬液,单点法加在固体平板培养基中心,待菌液被培养基充分吸收后转入装有LED单色灯(红光,700 nm)的恒温培养箱中,调整光照强度为100 lux,光照组置于光源的正下方,黑暗组避光培养,30℃静置培养10 d,分别在第4、7、10 d记录菌落形态。

1.2.2 孢子计数及形态观察

取200 μL浓度为10⁶个/mL的孢子悬液均匀涂布于固体平板培养基上,在培养第4、7、10 d每天取菌丝置于载玻片上,在光学显微镜下观察孢子形态。

取200 μL浓度为10⁶个/mL的孢子悬液均匀涂布于固体平板培养基上,在培养第4、7、10 d每天用打孔器(内径10 mm)在平皿内均匀打孔,置于装有灭菌玻璃珠的试管中,加3 mL、0.2% Tween 80,涡旋振荡洗下孢子,用血球计数板计数,每个样品三个平行。

1.2.3 色素提取

将发酵结束后的红曲霉菌丝体烘干至恒重,用研钵将其磨成粉末状,过80目筛,准确称取0.5000 g的红曲粉末样品,装入10 mL离心管中,加入4 mL、75%乙醇,超声30 min后,3500 r/min离心10 min,然后收集上清液于10 mL容量瓶中,向沉淀中加入3 mL、75%乙醇,混匀,超声30 min,3500 r/min离心10 min,收集上清液,再重复上述操作一次,将三次上清液合并,用75%乙醇定容至10 mL,进行色价测定。稀释10倍后,用孔径为0.22 μm的微孔滤膜过滤,进行HPLC分析。

1.2.4 红曲色素与桔霉素的测定

1.2.4.1 红曲色素色价测定方法

用75%乙醇将红曲色素提取液稀释到待测的倍数,以75%乙醇为空白,采用紫外-可见分光光度计测

定样品在 505 nm 处的吸光度值,因为在 505 nm 对红曲混合色素有最大吸收峰。按照下式计算出样品色价。

$$S = \frac{A \times n}{G}$$

式中: S, 样品色价 (U/g); A, 样品吸光度值; n, 稀释倍数; G, 红曲霉菌丝体干重 (g)。

1.2.4.2 红曲色素高效液相色谱仪 (HPLC) 条件

两种黄色素和两种橙色素 HPLC 条件: 色谱柱: XDB-C18 (5 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm); 流动相: A 泵 (水):B 泵 (乙腈+0.03%三氟乙酸)=37.5%:62.5%。乙腈和水分别过 0.45 μ m 的有机系滤膜和水系滤膜, 然后脱气 30 min。检测器: DAD (二极管阵列检测器), 流速: 1 mL/min, 检测波长: 234 nm, 检测温度: 25 $^{\circ}$ C, 进样量: 20 μ L。

两种红色素 HPLC 条件: 色谱柱: XDB-C18 (5 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm); 流动相: A 泵 (水+0.1%甲酸), B 泵 (乙腈)。乙腈和水分别过 0.45 μ m 的有机系滤膜和水系滤膜, 然后脱气 30 min。检测器: DAD (二极管阵列检测器), 流速: 1 mL/min, 检测波长: 394 nm, 检测温度: 25 $^{\circ}$ C, 进样量: 20 μ L。具体梯度洗脱方法如表 1 所示。

表 1 HPLC 梯度洗脱流动相比例

Table 1 Mobile phase ratio of gradient elution in HPLC

时间/min	流动相 A: 水 (0.1%甲酸) /%	流动相 B: 乙腈/%
0~20	65~35	35~65
20~28	35	65
28~30	35~65	65~35

1.2.4.3 桔霉素 HPLC 条件

色谱柱: XDB-C18 (5 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm); 流动相: A 泵 (水, 甲酸调 pH 为 2.5), B 泵 (乙腈)。乙腈和水分别过 0.45 μ m 的有机系滤膜和水系滤膜, 然后脱气 30 min。检测器: 荧光检测器, 流速: 1 mL/min, 检测波长: 激发波长 (λ_{ex})=331 nm, 发射波长 (λ_{em})=500 nm, 检测温度: 25 $^{\circ}$ C, 进样量: 20 μ L。桔霉素检测采用等度洗脱, 流动相中水与乙腈的比例为 55%:45%。

1.2.5 数据统计分析

数据分析使用 SPSS 17.0 软件, 对实验进行了方差分析。每个实验做三个平行。结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。p<0.05(*), p<0.01(**)。绘图采用 Origin 9.0 软件。

2 结果与讨论

2.1 持续红光照射对 M9 菌落形态的影响

为了研究持续红光照射对 M9 菌落形态的影响, 采用单点法将 M9 菌悬液接种到平板固体培养基上, 在 30 $^{\circ}$ C 光照培养箱中培养 10 d, 光照强度为 100 lux, 分别在培养第 4、7、10 d 对菌落形态进行观察。黑暗培养条件作为对照。结果如图 1 所示。

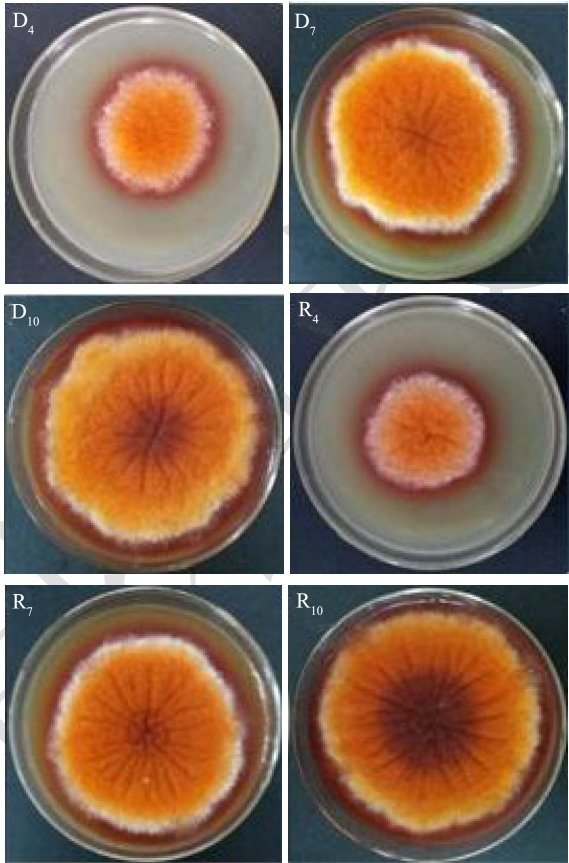


图 1 持续红光照射对紫色红曲霉 M9 菌落形态的影响

Fig.1 Effects of continuous red light exposure on *Monascus purpureus* M9 colony morphology

注: D 表示持续黑暗; R 表示持续红光; 4、7 和 10 表示培养第 4 d, 第 7 d, 第 10 d。

在黑暗条件下与持续红光照射条件下, 菌落直径无明显变化。在黑暗条件下, 起初菌丝是白色的, 第 4 d 时, 从菌落中心到边缘菌丝颜色分别为亮橙色、黄色、白色。随着培养时间的增加, 菌丝的颜色逐渐变深, 直到第 10 d, 菌落中心出现暗红色区域, 菌丝较长且致密, 菌落光滑平坦。有少量辐射状褶皱出现。而在持续红光照射下时, 第 7 d 时出现了很明显地辐射状褶皱, 并且随着培养时间的增加逐渐增多。光照第 10 d, 菌落中心的暗红色区域相比黑暗条件显著增大, 菌丝比黑暗条件下更长并且更稠密。通过以上分析可得持续红光照射显著促进了 M9 菌丝的生长及色素的产生。

2.2 持续红光照射对 M9 孢子形成及数量影响

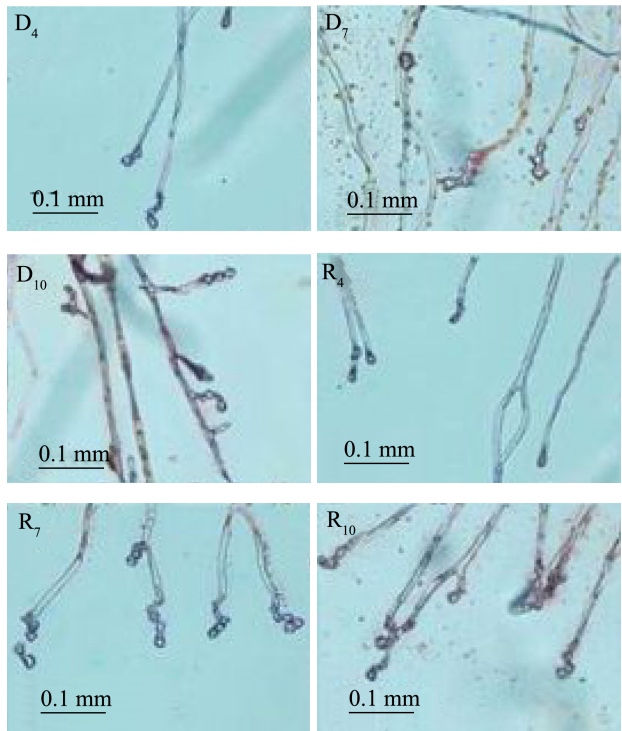


图2 持续红光照射对紫色红曲霉 M9 分生孢子的影响

Fig.2 Effects of continuous red light exposure on *Monascus purpureus* M9 conidia

注: D 表示持续黑暗; R 表示持续红光; 4、7 和 10 表示培养第 4 d、第 7 d 和第 10 d。

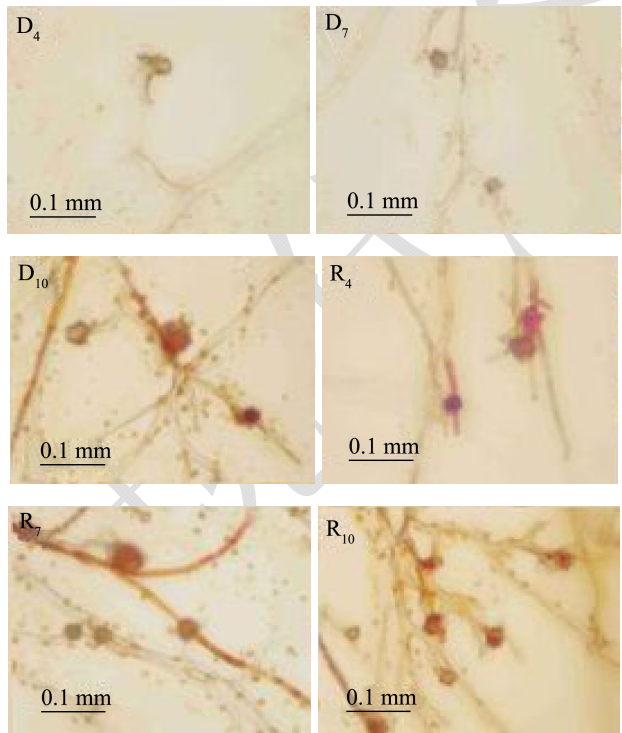


图3 持续红光照射对紫色红曲霉 M9 闭囊壳的影响

Fig.3 Effects of continuous red light exposure on *Monascus purpureus* M9 cleistothecia

注: D 表示持续黑暗; R 表示持续红光; 4、7 和 10: 培

养第 4 d、第 7 d 和第 10 d。

由图 2 和图 3 可以看出, 相比黑暗条件下, 在同一培养时间的持续红光照射下, 分生孢子与闭囊壳都有显著增加, 并且菌丝与孢子的颜色都更加鲜亮。由上述分析可知, 红光可以促进有性与无性孢子的产生, 既有利于 M9 的无性繁殖, 也有利于有性繁殖。红光也很显著地刺激了红曲色素的产生。孢子形成观察所得结果与菌落形态观察结果相一致。

通过血球计数板分别对黑暗条件及持续红光照射培养下第 4、7、10 d 的分生孢子及闭囊壳进行计数。所得结果如图 4 所示。

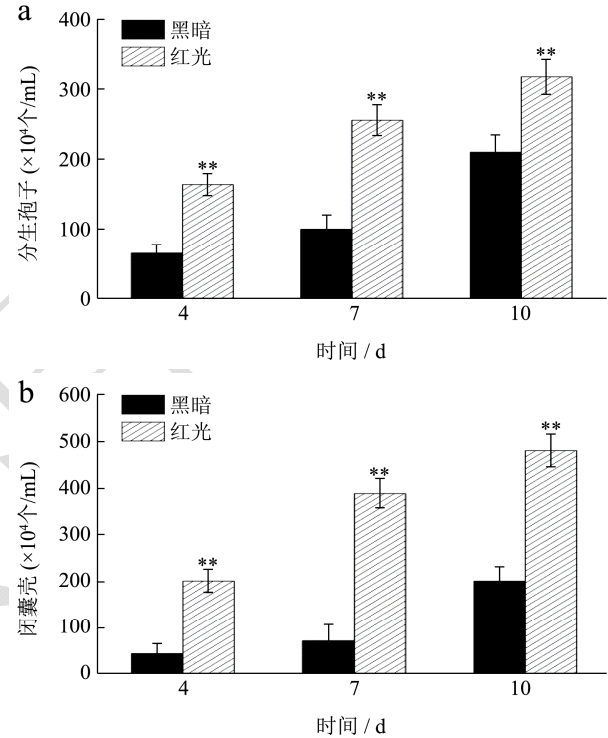


图4 持续红光照射对紫色红曲霉 M9 分生孢子和闭囊壳数量的影响

Fig.4 Effects of continuous red light exposure on quantity of *Monascus purpureus* M9 conidia and cleistothecia

注: a, 分生孢子数量; b, 闭囊壳数量。

由图 4 可知, 随着培养时间的增加, 黑暗和红光照射条件下, 孢子的数量均呈现增长趋势。在同一培养时间下, 红光照射条件下的分生孢子与闭囊壳数量均比黑暗条件下有显著增加, 尤其是闭囊壳数量的增长更为显著。由上述现象可以得知, 持续红光照射显著促进了 M9 无性孢子与有性孢子的产生, 对有性孢子的产生有更显著的促进作用。此结果与菌落形态观察以及孢子形成观察所得结果相一致。

2.3 持续红光照射对 M9 色素产量的影响

为了从整体上评估红光对 M9 产色素的影响, 用

色价值作为衡量色素产量的指标,分别对黑暗条件及持续红光照射培养下第4、7、10 d的红曲色素色价值进行测定。结果如表2所示。

表2 持续红光照射对紫色红曲霉 M9 胞内色素产量的影响

Table 2 Effects of continuous red light exposure on intracellular

pigment production in *Monascus purpureus* M9

培养时间	光源	色价值/(U/g)
第4 d	黑暗	1029.48±22.12
	红光	1482.39±19.53
第7 d	黑暗	2485.23±42.88
	红光	3006.04±53.12
第10 d	黑暗	4039.10±47.89
	红光	4688.92±55.42

由表2的结果可以看出,随着培养时间的增加,黑暗和红光照射条件下,M9的色素产量均不断增加。在同一培养时间下,红光照射条件下的红曲色素产量比黑暗条件下有显著增加。因此,持续红光照射可以促进M9胞内色素的产生。此结果与上述菌落形态、孢子形成的观察结果相一致。

2.4 不同红光照射条件对六种红曲色素及桔

霉素产量的影响

前期研究表明,光照时间、光照强度和光照节律对M9色素的产生有显著的影响,为了进一步研究不同红光照射条件对红曲色素及桔霉素产量的影响,设计如下试验条件进行研究。在光照时间为30 min,光照强度为400 lux,光照节律为18 h的光照条件下,记为400 30(18);在光照时间为30 min,光照强度为300 lux,光照节律为12 h的光照条件下,记为300 30(12);在光照时间为45 min,光照强度为300 lux,光照节律为18 h的光照条件下,记为300 45(18);在光照时间为45 min,光照强度为400 lux,光照节律为12 h的光照条件下,记为400 45(12)。在以上5个光照条件下对六种红曲色素及桔霉素的产量进行研究。黑暗条件作为对照。实验结果如图5所示。

由图5可知,随着光照条件的变化,RUM、MOM、MS和AK的产量都呈现先增加后减少的趋势,而RUN、MON和桔霉素的产量呈现先减少后增加的趋势。相比黑暗条件下,在400 30(18)、300 30(12)、300 45(18)、400 45(12)这5种光照条件下,RUM和MOM的产量分别增加了39.4%和57.3%、53.8%和75.2%、45.6%和70.3%、40.2%和59.5%。MS和AK的产量分别增加了36.7%和44.4%、42.2%和59.4%、39.2%和56.6%、37.9%和47.4%。而RUN和MON的产量

分别降低了32.2%和37.1%、42.6%和54.5%、39.5%和45.6%、33.4%和39.3%。桔霉素的产量分别降低了33.3%、42.5%、40.1%和35.9%。

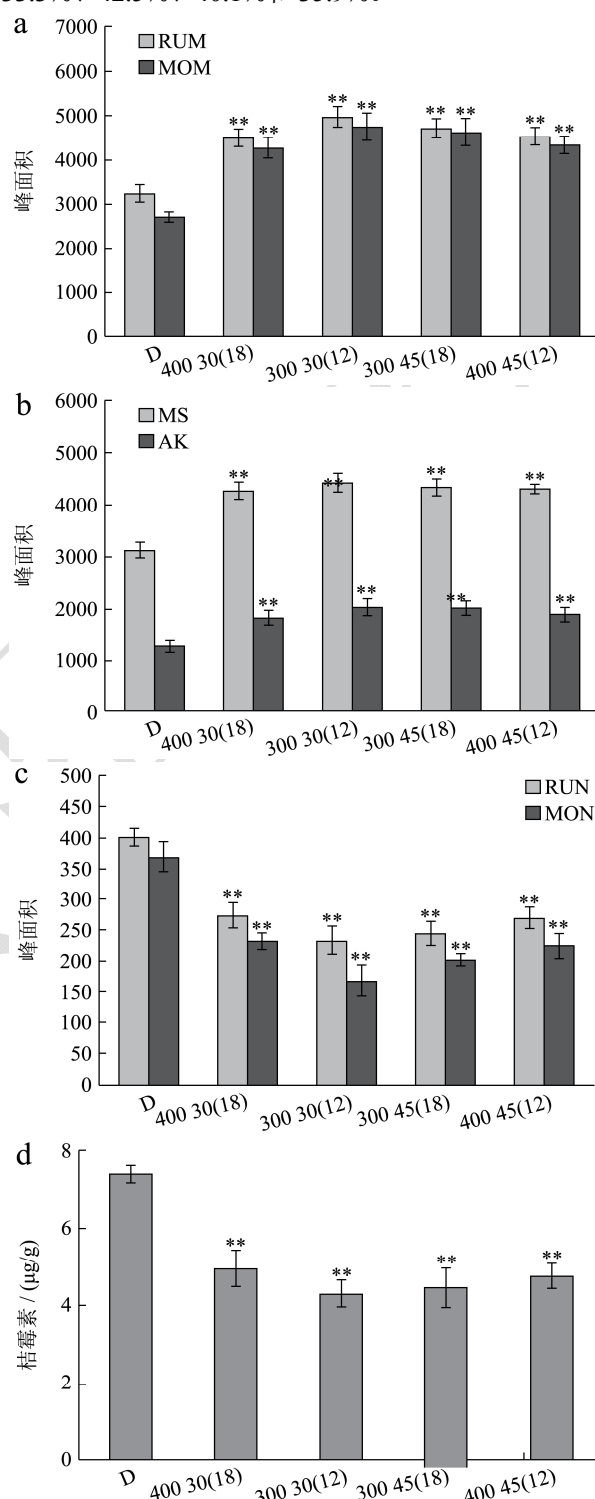


图5 不同红光照射条件对紫色红曲霉 M9 色素和桔霉素产量的影响

Fig.5 Effects of different red light conditions on the production of MPs and citrinin in *Monascus purpureus* M9

注: a, 两种红色素(红斑红曲胺, 红曲玉红胺)的产量; b, 两种黄色素(红曲素, 红曲黄素)的产量; c, 两种橙色素

(红斑红曲素, 红曲玉红素) 的产量; d, 桔霉素产量。

由以上分析可知 RUM、MOM、MS 和 AK 的产量由高到低分别为 300 30(12)>300 45(18)>400 45(12)>400 30(18)>D, RUN、MON 和桔霉素的产量由高到低分别为 D>400 30(18)>400 45(12)>300 45(18)>300 30(12)。因此, 最佳的高产红曲色素低产桔霉素的红光光照条件为光照时间 30 min, 光照强度 300 lux, 光照节律 12 h。在最佳光照条件下, RUM 和 MOM 的产量分别提高了 53.8%和 75.2%; MS 和 AK 的产量分别提高了 42.2%和 59.4%; RUN 和 MON 的产量分别降低了 42.6%和 54.5%; 桔霉素的产量降低了 42.5%。

3 结论

本文通过研究红光对紫色红曲霉 M9 生长、色素及桔霉素产量的影响得出以下结论: (1) 通过对 M9 菌落形态的观察, 发现持续红光照射下菌落的颜色要比黑暗条件下深, 并且有更多的辐射状褶皱出现, 菌丝生长更加稠密。因此, 持续红光照射促进了 M9 菌丝的生长及色素的产生。(2) 通过对 M9 孢子形成及数量的观察可知, 相比黑暗条件, 持续红光照射促进了分生孢子及闭囊壳的形成及生长, 尤其对于闭囊壳的促进作用更为显著。因此, 持续红光照射不仅促进了 M9 的无性繁殖与有性繁殖, 而且对性繁殖的促进作用更为显著。(3) 通过对持续红光照射下 M9 的色价进行检测, 得出持续红光照射促进了红曲色素的产生。(4) 通过研究不同红光照射条件下的六种色素及桔霉素产量, 发现不同的红光照射条件促进了 RUM、MOM、MS 和 AK 的产生, 而抑制了 RUN、MON 和桔霉素的产生。在 300 30(12)的最佳光照条件下, RUM 和 MOM 的产量分别提高了 53.8%和 75.2%; MS 和 AK 的产量分别提高了 42.2%和 59.4%; RUN 和 MON 的产量分别降低了 42.6%和 54.5%; 桔霉素的产量降低了 42.5%。

参考文献

- [1] Tisch D, Schmoll M. Light regulation of metabolic pathways in fungi [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(5): 1259-1277
- [2] Bayram Ö, Krappmann S, Seiler S, et al. *Neurospora crassa* ve-1 affects asexual conidiation [J]. Fungal Genetics and Biology, 2008, 45(2): 127-138
- [3] Miyake T, Mori A, Kii T, et al. Light effects on cell development and secondary metabolism in *Monascus* [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2005, 32(3): 103-108
- [4] Akihisa T, Tokuda H, Ukiya M, et al. Anti-tumor-initiating effects of monascin, an azaphilone pigment from the extract of *Monascus pilosus* fermented rice (red-mold rice) [J]. Chemistry & Biodiversity, 2005, 2(10): 1305-1309
- [5] Zheng Y, Xin Y, Shi X, et al. Anti-cancer effect of rubropunctatin against human gastric carcinoma cells BGC-823 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 88(5): 1169-1177
- [6] Lin C P, Lin Y L, Huang P H, et al. Inhibition of endothelial adhesion molecule expression by *Monascus purpureus*-fermented rice metabolites, monacolin K, ankaflavin and monascin [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91(10): 1751-1758
- [7] Hsu W H, Lee B H, Liao T H, et al. *Monascus*-fermented metabolite monascin suppresses inflammation via PPAR- γ regulation and JNK inactivation in THP-1 monocytes [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(5): 1178-1186
- [8] Kim J H, Kim H J, Kim C, et al. Development of lipase inhibitors from various derivatives of monascus pigment produced by *Monascus* fermentation [J]. Food Chemistry, 2007, 101(1): 357-364
- [9] Kim J H, Kim H J, Park H W, et al. Development of inhibitors against lipase and α -glucosidase from derivatives of monascus pigment [J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 276(1): 93-98
- [10] Lee B H, Hsu W H, Liao T H, et al. The *Monascus* metabolite monascin against TNF- α -induced insulin resistance via suppressing PPAR- γ phosphorylation in C2C12 myotubes [J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(10): 2609-2617
- [11] Kim J H, Kim Y O, Jeun J, et al. L-Trp and L-Leu-OEt derivatives of the monascus pigment exert high anti-obesity effects on mice [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2010, 74(2): 304-308
- [12] Babitha S, Carvahlo J C, Soccol C R, et al. Effect of light on growth, pigment production and culture morphology of *Monascus purpureus* in solid-state fermentation [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(11): 2671-2675

(下转第 140 页)