

文章编号:1673-1689(2011)06-0967-07

连续循环发酵生产 L-乳酸新技术研究

于培星

(河南金丹乳酸科技有限公司,河南 郸城 477150)

摘要:诱变筛选出了耐 pH、高剪切力,适合连续循环发酵生产 L-乳酸新技术的 JD. L-乳酸菌株。确定了连续循环发酵工艺条件:培养基采用棉粕水解液,培养温度 51 ℃,PH 值 6.2,氢氧化钠中和发酵,氧化还原电位值(*rh*)为 -100 mV。流加速率控制在 0.05 h⁻¹。根据连续循环发酵液技术要求,选择了采用 1 μm 的微滤膜作保安过滤。然后 10 nm 的超滤膜、相对分子质量 300 的纳滤设备,确定了菌体循环膜过滤基本参数。

关键词: L-乳酸;菌种选育;连续循环发酵;膜过滤

中图分类号: Q 81

文献标识码: A

New Technology Research of Continuous Cycling Fermentation about L-Lactic Acid Production

YU Pei-xing

(Henan Jindan Lactic Acid Tech Co., Ltd., Henan Dancheng 477150)

Abstract: In this study, A strain, named Lactobacillus plant JD. L which could tolerate low pH and high shearing was selected. Then the nutrient and environmental conditions were optimized and listed as follows: hydrolysate of cottonseed-meal as fermentation medium, temperature 51 ℃, pH 6.2, ORP was -100mv, fed-batch rate 0.05/h Giving the characteristics of the liquid which was produced by continuous fermentation of cell recycling sodium salt method, microfiltration membrane whose diameter is 1 μm was choosed to do protecting filtration. Then, the basic parameter of embrane filtration was determined by ultrafiltration whose diameter is 100nm and nano-filtration equipments whose molecular weight is 300.

Key words: L-lactic acid, strain breeding, continuous cycling fermentation, embrane filtration

L-乳酸^[1]是自然界三大有机酸之一,广泛应用于食品、饮料、医药、日化、印染、皮革、农业、电子等行业^[2],主要用作酸味剂、调味剂、防腐剂、鞣制剂、手性药物前体等^[3]。近几年,随着生物降解材料聚乳酸的出现,用于解决日益严重的白色污染问题,引起了全球的广泛关注^[4-5]。但 L-乳酸生产的高

成本限制了乳酸的进一步推广应用。

通过对连续循环发酵生产 L-乳酸新技术研究进行了菌种选育,连续循环发酵的实现,选用膜过滤进行菌体循环利用以期解决 L-乳酸生产中的工艺复杂、高成本问题。

收稿日期:2010-05-23

基金项目:企业自主攻关项目。

作者简介:于培星(1971—),男,河南郸城人,工学博士,高级工程师,主要从事生物工程方面的研究。

Email: yu394@126.com

1 材料与设备

1.1 菌株

采用的 JD-L-乳酸发酵菌株,由河南金丹乳酸科技有限公司技术中心保存。

1.2 培养基

1.2.1 SL 培养基 酪沅水解物 10 g,葡萄糖 20 g,酵母提取物 5 g,吐温 80 1.0 mL,柠檬酸二钠 2 g,乙酸钠 25 g, KH_2PO_4 6 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.58 g,琼脂 15 g,碳酸钙 10 g,去离子水 1 000 mL,调 pH 值到 6.5。

1.2.2 种子培养基 酪沅水解物 10 g,葡萄糖 100 g,酵母提取物 5 g,吐温 80 1.0 mL,柠檬酸二钠 2 g,乙酸钠 25 g, KH_2PO_4 6 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.58 g,碳酸钙 20 g,去离子水 1 000 mL,调 pH 值到 6.5。

1.2.3 发酵培养基 玉米水解糖 15 g,吐温 80 1.0 mL, KH_2PO_4 6 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.58 g,碳酸钙 30 g,去离子水 1 000 mL,调 pH 值到 6.5。

以上培养基在 115 °C, 0.05 MPa 灭菌 20 min。

1.3 培养方法

将菌种经活化后接种于装有种子培养基 500 mL 的三角瓶中,在恒温振荡培养箱中培养,培养条件:50 °C, pH 6.0,接种体积分数 10%,培养时间 24 h,温度浮动 1~2 °C。

1.4 分析方法

纯度测定:美国 Waters 高压液相色谱测定;还原糖测定:生物传感仪分析法测定;菌体浓度测定:分光光度计法;氨基酸测定:甲醛氮法;总酸的测定:滴定法;L-乳酸含量的测定:生物传感分析法; pH 值的测定:PHS-2C 酸度仪。

1.5 仪器设备

50 L 发酵罐:河南金丹乳酸有限公司生产;250B 型恒温培养箱:江苏金坛大中仪器厂生产;721 型分光光度计:上海精密仪器厂生产;数码生物显微镜:上海光学仪器厂生产;PHS-2C 型酸度计:上海伟业仪器厂生产;SBA-生物传感分析仪:山东省科学院生物研究所生产;台式离心机:上海科学仪器厂生产;微滤膜、超滤膜、纳滤膜。

2 实验方法与内容

2.1 低能离子注入诱变筛选高产菌株

取培养 20 h 的种子液稀释 10 倍,取 0.1 mL 均

匀涂布于无菌平皿上,以无菌风吹干。取镜检无细胞重叠者进行离子注入。离子注入机为西南核物理研究所研制的 LZD900 多功能离子注入机(南京工业大研究室配备),使用以 20 keV 氮离子不同剂量进行注入,靶室真空度为 10^{-3} Pa。将平皿置于靶台上,以 5 s 脉冲式注入,间隔 15 s,然后取出平皿,以 1 mL 无菌水洗脱,涂平板培养基,于 50 °C 培养 48 h 用于单菌落的挑选和存活率的计算。

在每个平板中分别挑取菌落,然后将每支经诱变的菌株接种在发酵培养基中发酵培养,挑出高产菌株。遗传稳定性测定,将突变 JD-L-乳酸菌株进行遗传稳定性实验,进行 10 次传代,测定每次传代后的乳酸产量,检验突变后的菌株的遗传稳定性。

2.2 模拟细胞再循环钠盐法连续发酵工艺试验

采取 1 000 mL 三角瓶→5 L 三角瓶→50 L 发酵罐预发酵加 4 级发酵进行发酵。采用不同发酵培养基进行试验,从中优选。

搅拌速度 20 r/min,装液量 40 L(发酵罐体积为 50 L),培养基同发酵培养基,将种子液按发酵培养基体积的 10% 进行接种、培养,测定菌体浓度(OD_{600})在不同时间内的变化情况。至菌体增殖速度开始下降时添加新鲜培养基,同时流入下一级发酵罐,加满后依次流向第四级发酵罐。将发酵罐 1 中的稀释率分别调节在 0.05、0.1、0.15、0.20、0.25 h^{-1} 的水平上。各稀释率稳定状态的标志为流量,菌体浓度(OD_{600})和基质浓度不再随时间发生变化,在发酵过程中流加 NaOH 溶液保证 pH 值的稳定,在确定的稳定状态的过程中对发酵液每 3 h 进行分析测定。

2.3 发酵料液在不同条件下进行陶瓷膜过滤试验

将模拟连续的发酵料液采用不同质量浓度的氢氧化钠中和,在保证温度情况下,乳酸钠发酵液分别经微滤、超滤试验;超滤膜分离出乳酸钠,可见杂质、大分子蛋白及菌体细胞循环回发酵瓶(罐)进行再利用,测定返回料液量、菌体量,考察死亡率的影响因素。考察滤液质量,然后进入纳滤除盐试验,进一步提高乳酸钠质量,并在可滤性基础上进行综合性能的膜选择试验。

3 结果与讨论

3.1 诱变选育细胞再循环钠盐法连续发酵 JD-L-乳酸菌株

3.1.1 诱变存活曲线 诱变存活率曲线上可以看出其与文献报道的“马鞍型”曲线基本吻合(见图 1),但不同之处是在实验中存活率的第一次下降不

是缓慢的,而是在很低的剂量下就出现了存活率的骤降。还有一点与其它类似菌种注入报道不同,曲线上出现了 2 个峰。在低剂量时存活率急剧下降,随着剂量的增加,存活率有短暂回升,后又逐渐下降,但在中高剂量下又有缓慢的回升最后再逐渐下降。而且在 20 keV 及其它能量下多次试验均发现这种现象。

离子注入细胞的射程较短,低剂量时离子只对细胞表面进行损伤和刻蚀,能量沉积所产生的大量自由基亦会导致 DNA 和生物膜等其它生物大分子的损伤,从而都造成存活率下降。剂量继续增加,大量连续注入电荷的堆积会产生很强的库仑斥力,这种库仑斥力能对被注入细胞形成一个“保护屏障”,阻碍后续注入离子对细胞的损伤,从而达到对细胞的保护作用;而且大量堆积的电荷可形成一个弱电场,这种电场的刺激效应可以激活菌体内的各种酶,尤其是修复酶,从而提高了损伤修复的效率,存活率又有所回升。当剂量上升到一定程度,能量沉积和动量传递所造成的 DNA 和生物膜等其他生物大分子的严重损伤已超出了其所具有的修复能力,而使存活率急剧下降^[6]。针对图 1 出现存活率的两个短暂回复峰,可能是菌体内修复酶的激活及注入电荷积累形成的“保护屏障”,在时间上存在着先后差别,从而使存活率出现 2 个回复峰。

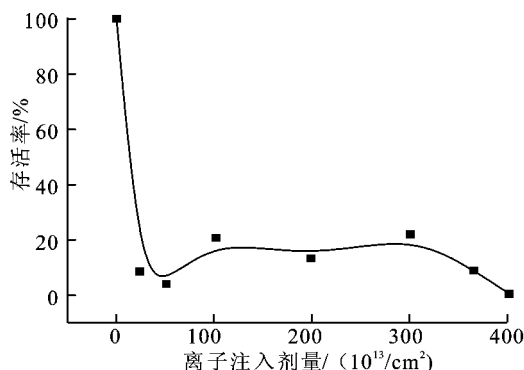


图 1 N^+ 离子注入 JD-S860 的存活率曲线

Fig. 1 Survival rate curve under N^+ ions beam

3.1.2 菌种筛选 将经过筛选平板挑出的菌株,经种子培养基培养后,转入发酵培养基逐个发酵,进行产量测定。同时与出发菌株对照计算突变率。挑取产酸高的菌株,进一步发酵验证。得到的高产菌株,经遗传稳定验证后,进入下一轮诱变筛选。

由图 2 可以看出剂量范围在 100×10^{13} ions/ $cm^2 \sim 200 \times 10^{13}$ ions/ cm^2 之间时正突变率比较高,经 20 keV N^+ 离子注入筛选出 1 株高产突变菌株其 L-乳酸生产能力有了显著的提高,将其命名为 JD. L-乳酸菌株,为了确保筛选到的高产菌的遗传

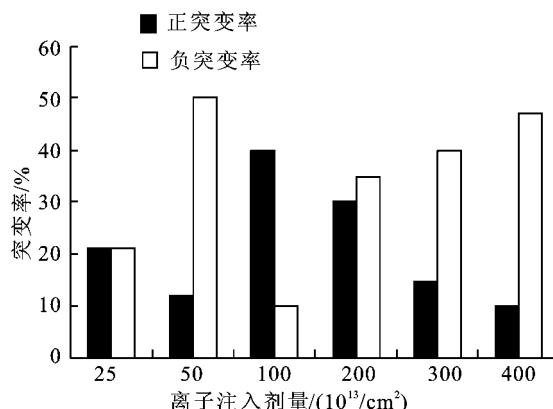


图 2 N^+ 离子注入 JD-S860 的突变率

Fig. 2 Mutation rate of JD-S860 after N^+ implantation dose

稳定性,对其做了遗传稳定性考察。每代实验过程:高产菌株自然分离→单菌落→斜面→种瓶→摇瓶发酵,测 L-乳酸产量。共传 10 代,每代均做 3 个平行样,结果见表 1。从表 1 可以看出,突变菌株的遗传性状比较稳定。

表 1 高产突变株 JD. L-乳酸菌遗传稳定性实验结果

Tab. 1 Testing results of genetic stability about yigh-yielding mutant JD. L- lactobacillus

传代数	产酸率/(g/L)	L-乳酸纯度/%
1	15.4	98.5
2	15.7	99.2
3	16.2	95.7
4	15.3	98.6
5	16.9	99.4
6	16.1	99.0
7	15.2	98.7
8	16.8	99.3
9	15.8	99.1
10	15.9	99.2

3.2 细胞再循环钠盐法连续发酵工艺的确定

3.2.1 不同氮源对菌体生长的影响 在基础培养的基础上,采用不同的有机氮源进行菌株培养,其不同氮源对菌株产酸及糖酸转化率影响的结果见表 2。

表 2 不同氮源对菌株产酸及转化率的影响

Tab. 2 Effect of different nitrogen source on production acid and translation rate of bacterial strain

氮源	24 hOD ₆₀₀	产酸率/%	转化率/%
麸皮	1.3	12.7	91.5
玉米浆	1.5	13.5	90.6
豆粕水解液	1.7	15.6	92.4
棉粕水解液	1.9	16.5	93.5
玉米浆水解液	1.6	14.6	90.2

由表2可以看出,水解氮源对菌体产酸效果较好,其中棉粕水解液效果明显,说明棉粕水解液所含营养成分更适合菌体的需要,选用棉粕水解液作为菌株JD.L-乳酸菌的氮源。

3.2.2 不同温度对菌体产酸的影响 为确定不同培养温度对菌体产酸的影响,分别在不同温度下培养菌体,测定菌体浓度,产酸率,结果见图3。从图可以看出随着温度的升高菌体生长与产酸速度加快,但温度太高不利于菌体的生长与乳酸的生长。51℃时菌体生长与产酸速度最快,超过51℃时随着温度的继续升高菌体生长与产酸速度持续降低;因此确定51℃为发酵的最适温度。

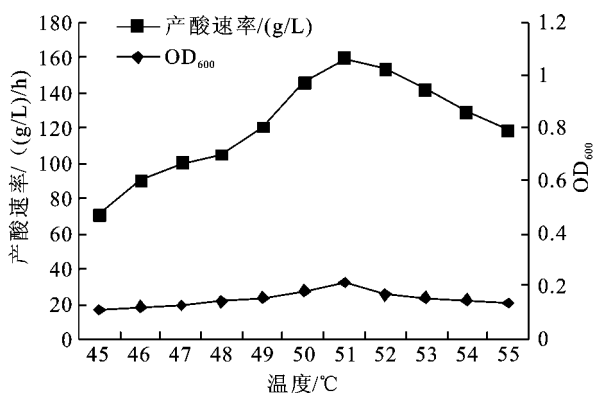


图3 不同温度对OD₆₀₀与产酸速率的影响

Fig. 3 Effect of temperatures on OD₆₀₀ and acid production speed rate

3.2.3 pH值对细胞产酸速率的影响 在发酵过程中分别控制不同的pH值,测定乳酸产酸速率及菌体的浓度如下图所示:从图4可以看出pH值6.2时菌体细胞生长最好,产酸速率也最大,发酵过程中如不对pH值控制,pH值将迅速下降到4.5左右对菌体的生长与产酸速率产生明显的抑制。可见要使JD.L-乳酸菌株进行正常的发酵须将PH控制在6.2左右。

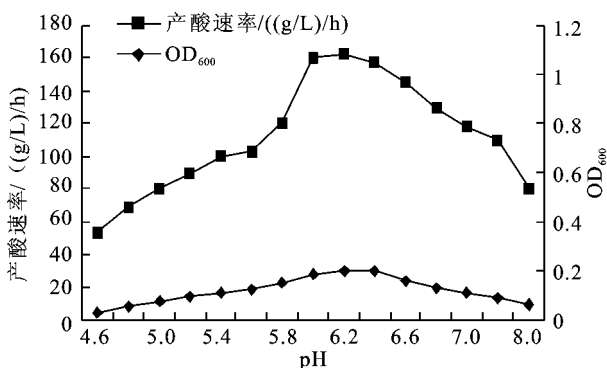


图4 pH对OD₆₀₀与产酸速率的影响

Fig. 4 Effect of pH on OD₆₀₀ and lactic acid productivity

3.2.4 氧化还原电位(rh值)对菌体生长与产酸速率的影响 培养基的rh值影响菌体的生长与代谢

控制;控制rh值可以得到稳定的发酵,在发酵过程中控制不同的rh值测定菌体的生长,产酸速率与转化率如图5所示。

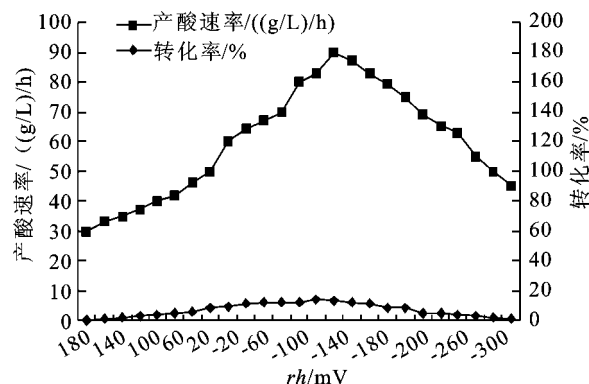


图5 rh对产酸速率和转化率的影响

Fig. 5 Effect of rh on the yield and productivity of lactic acid

从上图可以看出:培养基中不同的氧化还原电位对菌体的生长和代谢有一定的影响,同时也影响着菌体的最终转化率。在-100 mV左右时,菌体的生长,产酸速率及最终转化率最好,因此控制发酵的rh值在-100 mV。

3.2.5 JD.L-乳酸菌株的生长和产酸过程 通过对培养基及发酵工艺条件的研究,确定了发酵所用的营养成分:棉粕水解液作为菌株JDL的氮源,玉米水解糖作为碳源。最佳工艺条件为:培养温度51℃,pH值6.2,ORP值-100 mV,按此最佳条件进行产酸实验,结果如图6所示。

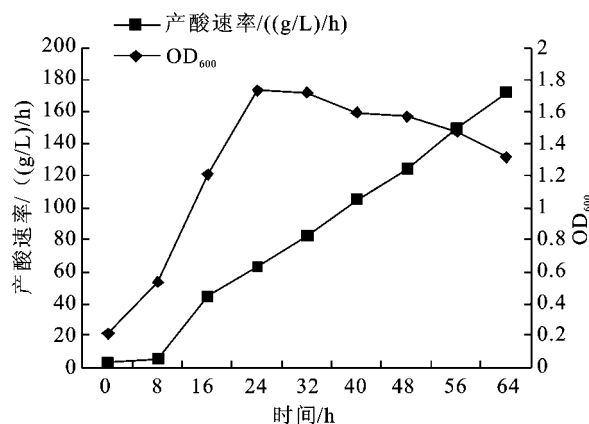


图6 菌株JD.L-乳酸的过程曲线

Fig. 6 Time course of L-lactic acid production

3.2.6 氢氧化钠浓度的确定 为确定氢氧化钠浓度对菌体死亡率的影响,对5、10、15、20、25、30、35 g/dL不同浓度乳酸菌体细胞死亡率结果进行比较,结果如图7。由图可以看出:随着氢氧化钠浓度的不断增大菌体死亡率也逐渐升高,根据生产实际要求和物料平衡结果选择15%。

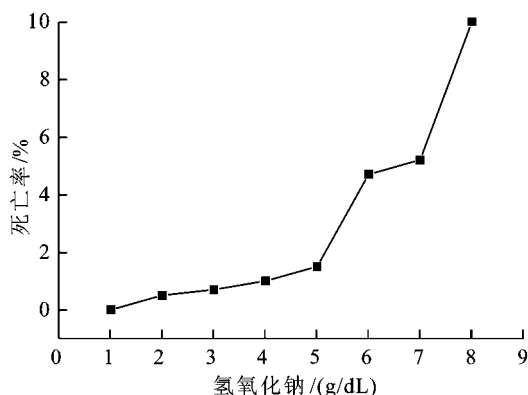


图7 氢氧化钠质量浓度对菌体死亡率的影响

Fig. 7 Effect of the NaOH concentration on the mortality rate of bacterial

根据以上实验确定了 JD. L 乳酸菌的最佳发酵工艺条件:培养基采用棉粕水解液,培养温度 51 °C, pH 值 6.2, 15 g/dL 氢氧化钠中和发酵, r_h 值 -100 mV。

3.2.7 连续发酵过程中的菌体生长动力学模型

根据 Monod 方程 $\mu = \mu_{\max} s / (K_s + s)$

式中, μ 为菌体的比生长速率; $\mu_{\max}$ 为菌体的最大比生长速率; K_s 为半饱和常数; s 为限制性基质浓度。

对一个 CSTR 发酵罐,有关菌体(不计死亡)的物料衡算式为

$$V(dx/dt) = Fx_0 - Fx + \mu Xv$$

式中, V 为发酵罐中培养液的体积; F 为培养液流入(出)的速度; x_0 为流入培养液中的菌体浓度; x 为发酵罐中的菌体浓度。

一般 $x_0 = 0$,

$$dx/dt = (-F/V)x + \mu x = (\mu - D)x$$

式中 D 为稀释速率。在连续发酵达到稳态时 $dx/dt = 0, \mu = D$ 。

依 Lineweaver-burk 方法对 Monod 方程取倒数得:

$$1/\mu = (1/\mu_{\max}) + (K_s/\mu_{\max}) \cdot (1/s)$$

将实验数据作 $1/s \sim 1/\mu$ 图 $1/s \sim 1/\mu$ 图,结果见图 8。

可见 $1/s$ 与 $1/\mu$ 呈线形相关。解得 $\mu_{\max} = 0.24/h, K_s = 0.88 g/L$ 。因此 JDL 菌株在连续培养中以葡萄糖为基质的生长动力学为:

$$\mu = 0.24 s / (0.88 + s)$$

式中半饱和常数为 0.88 g/L,这表明葡萄糖浓度只在较低的情况下才表现出限制菌体生长的作用。

3.3 不同规格膜过滤条件对菌体的影响

为保证超滤的正常进行,采用 1 μm 的微滤膜

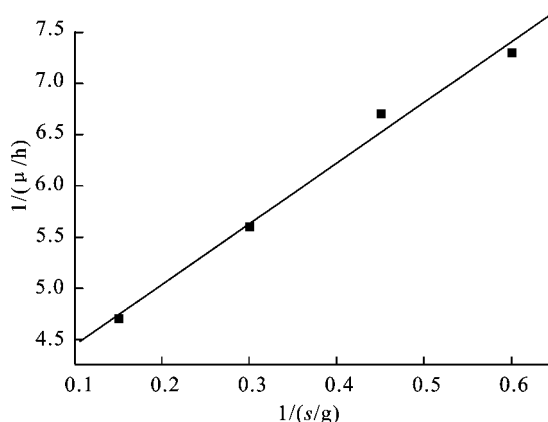


图8 Lineweaver-burk 的曲线

Fig. 8 Curve of Lineweaver-burk

作保安过滤。然后 100 nm 的超滤膜、300 相对分子质量的纳滤设备具体实验结果如下:

3.3.1 不同孔径对 JD. L-乳酸菌浓缩的影响 发酵液采用 0.24 m²,在 0.15 MPa 操作压力选用不同孔径的膜芯下进行浓缩试验,检测膜通量结果如图 9 所示。由图 9 可以看出,3 种孔径的膜管渗透通量的总体走势相同。0.01 μm 在起始的 10 min 内,孔径膜管通量最大。

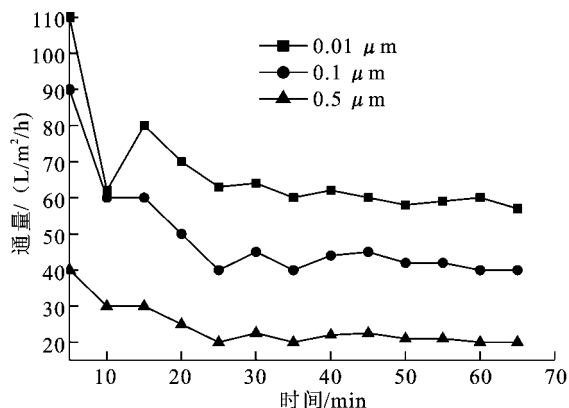


图9 不同孔径的膜对膜通量的影响

Fig. 9 Effect of different aperture on membrane flux

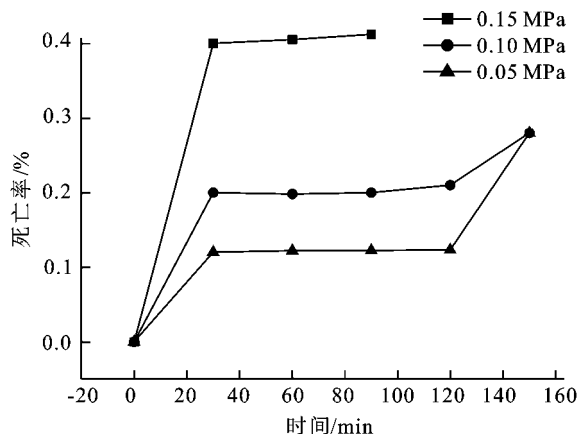


图10 不同压力对 JD. L-乳酸菌细胞死亡率的影响

Fig. 10 Effect of the different concentrated pressure on the cells mortality of JD. L-lactobacillus

3.3.2 不同浓缩压力对 JD₁ L-乳酸菌细胞死亡率的影响 采用 0.05、0.10、0.15 MPa 进行浓缩处理。与不同处理时间取浓缩液,检测菌体细胞的死亡率,如图 10 所示。结果表明,浓缩压力为 0.15 MPa 时,死亡率较小,因此选择浓缩压力为 0.15 MPa。

3.3.3 不同膜面积对 JD₁ L-乳酸菌细胞死亡率的影响 在一定的时间范围内,处理的 40 L 乳酸钠发酵液,膜面积的大小将对浓缩循环次数有明显的影 响,从而影响菌体细胞的死亡率。分别采用过滤面积为 1.0 m² 和 0.24 m² 的膜管(0.1 μm 超滤膜),在 0.15 MPa 的操作压力下,进行浓缩处理,检测 JD₁ L-乳酸菌死亡率。结果如图 11 所示。由图 11 可知,在膜浓缩处理的 10 min 之内,将膜面积由 0.24 m² 增大到 1.0 m²,JD₁ L-乳酸菌细胞死亡率从 0.18 减少到 0.10,二者具有显著的差异。在实际生产中可考虑通过适当的提高膜面积的方式提高乳酸菌细胞的存活率。

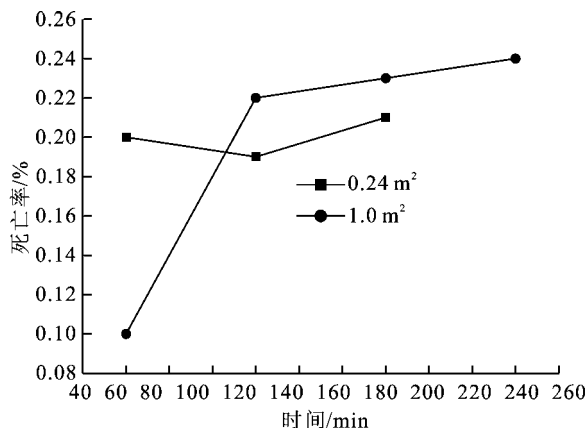


图 11 微滤膜管面积对乳酸菌死亡率的影响

Fig. 11 Effect of Micro-filtration tube area on the mortality of lactobacillus

3.3.4 超滤前后菌体质量浓度的变化 超滤前后菌体质量浓度有显著的变化,菌体量从 21.5 g/L 提高到 81.6 g/L。活菌数也从 2.81×10^8 g/mL 提高到 4.96×10^9 g/mL,超滤前后葡萄糖浓度、乳酸的浓度基本没有变化。再循环菌体发酵的实现将超滤出的菌悬液投入灭过菌的培养基中进行预发酵,然后流加入第一级发酵罐中;稀释率 $D=0.15 \text{ h}^{-1}$ 补充料液浓度 150 g/L,超滤前后菌体浓度变化情况见表 3。

3.3.5 纳滤膜的选择 根据料液特性选择了截留 1 000 相对分子质量、500 相对分子质量、300 相对分子质量的纳滤膜考察对乳酸钠发酵液的除二价以上阴阳离子、残糖性能比较如下表 4。从表可以看出截留相对分子质量为 300 的最为合适,便于提高乳酸钠发酵液质量,利于后提取的实现。

表 3 超滤前后菌体浓度的变化

Tab. 3 Changes of cell concentration before and after ultra-filtration

超滤前菌体浓度/(g/L)			超滤后菌体的浓度/(g/L)		
菌体量	菌数	活菌数	菌体量	菌数	活菌数
21.3	3.1	2.81×10^8	78.4	5.16	4.64×10^9
21.5	3.12	2.83×10^8	80.2	5.25	4.87×10^9
22.3	3.27	2.95×10^8	81.6	5.42	4.96×10^9

表 4 纳滤膜截留率试验结果

Tab. 4 Test results of interception rate about NF

纳滤膜	阴离子截留率/%	阳离子截留率/%	还原糖/
1 000 分子量	0	0	16.2%
500 分子量	21.4%	22.4%	42.1%
300 分子量	89.1%	90.0%	85.3%

3.4 连续循环发酵

为确定最佳发酵条件和后处理所确定的最佳条件的效果,故结合超滤用 50 L 发酵罐进行连续 60 d 的发酵实验,其发酵过程中的产酸速率和糖酸转化率随时间的变化结果见图 12 和图 13,由两图可以看出:连续发酵过程中的糖酸转化速率和转化率在 5 d 左右达到最大值,且以后基本处于稳定期;另外可以得出:与周期 2.5 d 间歇发酵的结果比较,连续发酵的糖酸转化率由原来间歇发酵的 93.7% 提高到 97.2% 左右,提高了 3.5%,产酸速率将提高 0.5 ((g/L)/h)。连续循环发酵即可以实现年产量的增加,又可以降低乳酸成本、节约原材料。

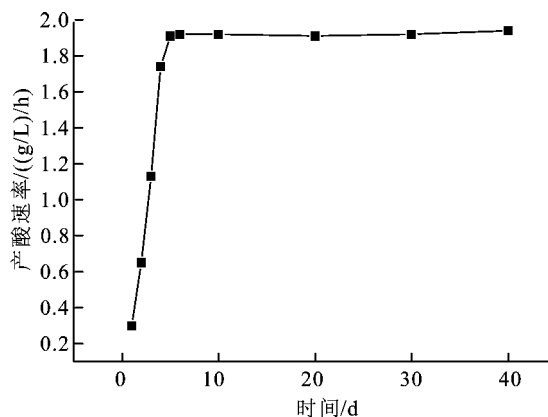


图 12 产酸速率随发酵时间的变化曲线

Fig. 12 Time course of L-lactic acid productivity

4 结 语

1) 诱变筛选出了耐 pH、高剪切力适合细胞再循环钠盐法连续发酵 JD₁ L-乳酸菌株。

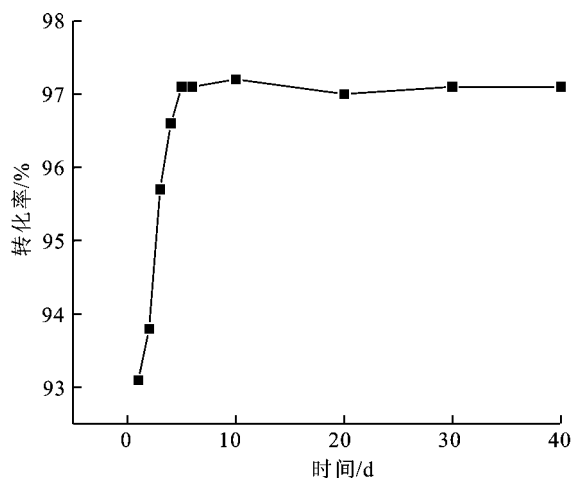


图 13 糖酸转化率随时间的变化曲线

Fig. 13 Time course of L-lactic acid yield

2) 确定料发酵工艺条件:培养基采用棉粕水解液,培养温度 $51\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 值 6.2, 氢氧化钠中和发酵, ORP 值 -100 mV 。流加速率控制在 0.05 h^{-1} 。

3) 根据细胞再循环钠盐法连续发酵液特性,选择了采用 $1\text{ }\mu\text{m}$ 的微滤膜作保安过滤。然后 100 nm 的超滤膜、 300 相对分子质量的纳滤设备;确定了膜过滤基本参数。

4) 该工艺条件的确立为乳酸工业化生产减少工艺流程,提高了糖酸转化率,减少生产成本,打下了良好基础。

参考文献(References):

- [1] Narebski, Anna, Staniszewski, Marek. Separation of fermentation products by membrane techniques[J]. *Separation Science and Technology*, 1997, 32(10): 1669—1682.
- [2] 诸葛健. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1994. 145—147.
- [3] 余增亮. 离子束生物技术引论[M]. 合肥:安徽科学技术出版社, 1996. 176—190.
- [4] 金其荣, 张继民, 徐勤. 有机酸发酵工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1989. 339—406.
- [5] Datta R, Tsai S P, Bonsignore P, et al. Technological and economic potential of poly (lactic-acid) and lactic acid derivatives [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1995, (16): 221—231.
- [6] 卞坡, 谷运红, 霍裕平, 等. 离子束生物效应及应用. [J]. 河南农业大学学报, 1999, 33(2): 178—182.
BIAN P, GU Yun-hong, HUO Yu-ping, et al. Biological effect of ion beam and its application[J]. *Acta agriculturae universitatis Henanensis*, 1999, 33(2): 178—182. (in Chinese)
- [7] 华耀祖. 超滤技术及运用[M]. 北京:化学工业出版社, 2004.