高原湖泊佩枯措湖周土壤中一株产蓝色素放线菌色素性质研究

孙秀丽[1] 曹舰艇[2,3,4] 罗大庆[2,3,4] 张新军[2,3,4]

（1.西藏农牧学院 食品科学学院；2.西藏农牧学院 高原生态研究所；3.西藏高原森林生态教育部重点实验室；4.西藏林芝高山森林生态系统国家野外科学观测研究站，西藏林芝 860000）

摘要 本研究旨在对从佩枯措中分离的一株放线菌产生色素的性质进行分析，开发出可供人类利用的天然色素来源。采用高氏 I 号培养基固态和液态发酵法提取产生的色素，从色素溶解性、最大吸收波长、色阶、稳定性四个方面对色素性质进行分析。结果说明，该色素易溶于极性大的溶剂，不溶或微溶于极性小的溶剂；该色素最大吸收波长为 593 nm，色阶为 78；该色素在酸性条件呈红色，碱性条件呈蓝色；pH 对色素稳定性影响较大，温度、金属离子及光照条件对该色素稳定性影响较小。

关键词 色素性质，放线菌，蓝色素，佩枯措

中图分类号：Q939.99 **文献标识码**：A **文章编号**：2096-4781（2019）06-0650-08

DOI: 10.19707/j.cnki.jpa.2019.06.008

Study on the Pigment Properties of a Blue Pigment Actinomycete

SUN Xiuli[1], CAO Jianting[2,3,4], LUO Daqing[2,3,4], ZHANG Xinjun[2,3,4]

(*1. Food Science College, Tibet Agriculture & Animal Husbandry University; 2. Res. Institute of Plateau Ecology, Tibet Agriculture & Animal Husbandry University; 3. Key Laboratory of Forest Ecology of Tibet plateau, Ministry of Education; 4. National Key Station of Field Scientific Observation & Experiment of Alpine Forest Ecology System in Nyingchi Tibet，Nyingchi Tibet, 860000, China*)

Abstract: The aim of this study was to analyze the properties of pigments produced by an actinomycete isolated from Peiku Co and to develop a source of natural pigments that can be used by humans. The pigments were extracted by solid state and liquid fermentation methods using Gao's No. 1 medium, and the pigment properties were analyzed from four aspects: pigment solubility, maximum absorption wavelength, color scale and stability. The results showed that the pigment was easily soluble in a solvent with high polarity, but was insoluble or slightly soluble in a solvent with a small polarity; the maximum absorption wavelength of the pigment was 593 nm, and the color gradation was 78; the pigment was red under acidic conditions and blue under alkaline conditions.; pH had a great influence on pigment stability, and temperature, metal ions and lighting conditions had little effect on the stability of the pigment.

Key words: Pigment properties, actinomycetes, blue pigment, Peiku Co

收稿日期：2019-05-05

作者简介：孙秀丽（1997-），女，汉族，河北唐山，在读研究生，主要从事土壤微生物方面的研究。

通讯作者：张新军（1973-），男，汉族，山东济宁，副教授，硕士。研究方向：微生物生态及微生物次生代谢。

基金项目：西藏自治区科学技术厅项目（XZ2018ZRG-18）；西藏自治区重大科技专项（课题）——西藏佩枯措地区综合资源科学考察（Z2016C01G01/03）；西藏农牧学院研究生创新计划项目（YJS2018-15）；西藏特色农牧资源研发协同创新中心—高原生态。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

色素被广泛应用于食品、药品以及化妆品等行业[1-3]，如今使用较多的基本是合成色素，然而陆续发现合成色素具有慢性毒性及致癌性等，天然色素取代合成色素是未来的主流。天然色素可在植物、动物及微生物中产生，但因受产地、气候、季节等因素影响，且生长缓慢，提取色素费用昂贵，因此动植物色素不易大规模生产。而微生物是一个巨大的生物资源和基因资源库，种类繁多、生长繁殖快，可较大幅度提高产率，易实行大规模生产[4]，细菌、真菌和放线菌均可产出色素[5-7]，因此，利用微生物生产天然色素将会成为主流。

但微生物产生的色素并不一定能直接应用于生产，很多色素性质极其不稳定，在生产及应用中很容易受到光照、pH、温度及金属离子等的影响，使其原来的性质发生改变，难以应用[8, 9]。色素的性质直接决定了其在应用过程中的难易程度，因此，了解色素的性质，对于大规模发酵生产该色素及色素的进一步推广应用极其重要。

西藏独特的气候条件造就了独特的微生物类群[10]，本实验室从西藏高原湖泊佩枯措湖周土壤中分离了一株产蓝色素的放线菌菌株 P160，经初步鉴定该菌株为链霉菌属，命名为 *Streptomyces* sp. P160[11]。本试验将从色素溶解情况、光谱吸收特征、抑菌活性、稳定性方面对该菌株产生的色素性质进行初步分析。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

佩枯措位于西藏自治区日喀则市，雅鲁藏布江上游，珠穆朗玛峰保护核心区，聂拉木县与吉隆县交界处，处于喜马拉雅山与冈底斯山之间，喜马拉雅北坡高原宽骨湖盆区西部，是珠峰保护区最大的内陆湖泊。地理坐标为 85°35'E，28°50'N，面积约 300 km^2，湖面海拔 4 590 m，属藏南内流水系的湖泊。受东西和南北向两组构造的控制，为典型的构造湖。该区域属高原半干旱气候区，夏季降水集中，干湿季分明，日照较充足。植被多为灌木和草本，盖度较大，没有乔木。主要植被为一年生或多年生草本，植被高度一般不超过 1 m，灌木盖度一般小于 30%，临近水边的灌木较高。土壤养分贫瘠，含较多石砾。

1.2 试验材料

1.2.1 目标菌株

试验前期，从佩枯措湖周土壤中分离的菌株中发现一株能产生蓝色素的放线菌菌株 P160，经划线纯化后于-80℃冰箱冷冻保存。

1.2.2 培养基

高氏 I 号培养基：可溶性淀粉 20 g，KNO_3 1 g，K_2HPO_4 0.5 g，$MgSO_4$ 0.5 g，$FeSO_4$·7H2O 0.01 g，NaCl 0.5 g，琼脂 18 g，去离子水 1 000 mL（每 300 mL 培养基中加 3%重铬酸钾 0.5 mL）。

高氏 I 号液体培养基：可溶性淀粉 20 g，$KNO_3$1g，K_2HPO_4 0.5 g，$MgSO_4$ 0.5 g，$FeSO_4·7H_2O$ 0.01 g，NaCl 0.5 g，去离子水 1 000 mL。

1.2.3 试验药品

pH 9.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液、HCl、NaOH、NaCl、$MgCl_2$、$CaSO_4$ 及 $CuSO_4$。

1.2.4 试验仪器

离心机（TGLL-18K，德国艾本德股份公司）、岛津紫外可见光光度计（UV-2450，北京京科瑞达科技有限公司）、超低温冰箱（MDF-U32V(N)，日本三洋电机）、超净工作台（SW-CJ-ZJ，上海博迅医疗生物仪器股份有限公司）、水浴锅（XMTD-6000，北京长风仪器仪表公司）

1.3 试验方法

1.3.1 色素提取

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

液体发酵法[12]：将纯化的菌株 P 160 接入高氏 I 号液体培养基，28℃、135 r/min 培养 5 d，将以上发酵液 pH 调至 12，4℃，以转速 4 000 r/min 离心 10 min，取上清液，将 pH 调至 1～2，再 4℃以转速 4 000 r/min 离心 10 min，弃上清液，沉淀物真空冷冻干燥，得蓝色素粗提物，该品为紫红色粉末。

平板培养法：采用平板划线法将纯化的菌株 P160 接入高氏 I 号固体平板上，倒置于培养箱中 28℃培养，至平板完全变成蓝色为止，然后用乙醇将平板中的色素溶出，得色素平板粗提物。

1.3.2 色素的溶解性

取 0.005 g 色素粗提物色素分别溶于 10 mL 水、NaOH 溶液、HCl 溶液、甲醇、甲醛、二甲基亚砜、乙醇、丙三醇、四氯化碳、苯、苯胺、二氯乙烷、乙酸乙酯、1,2-二氯乙烷、苯甲醛溶液及二甲苯中，观察是否能溶解及在不同溶剂中溶解的难易程度。

1.3.3 最大吸收波长及色素色阶的测定

取色素粗提物 pH 9.0 Tris-HCl 缓冲溶液中，比例为 1∶100 搅拌至充分溶解，以 pH 9.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液作为空白对照，在分光光度计上进行全波长光谱扫描（190～1 000 nm），记录其最大吸收波长、最大吸收峰值及 590 nm 处吸收值，以确定该色素粗提物的最大吸收波长及该色素的最大吸收峰。以下试验在未说明情况下，素色吸光值均在波长为 590 nm 处测得。

1.3.4 pH 对色素稳定性的影响

取上述色素溶液若干份，分别将 pH 调至 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 及 14，观察色素溶液在不同 pH 下的颜色，在分光光度计上进行全波长光谱扫描（190～1 000 nm），测定其吸光值[13]，重复 3 次，观察在不同 pH 条件下色素溶液的吸光值变化，并计算色素残存率。

1.3.5 温度对色素稳定性的影响

取上述色素溶液若干份，分别置于 20、30、40、50、60、70 及 80℃的恒温水浴锅中加热，观察色素溶液在不同温度下的颜色，在分光光度计上进行全波长光谱扫描（190～1 000 nm），测定其吸光值，重复 3 次，观察在不同温度条件下色素溶液的吸光值变化，并计算色素残存率。

1.3.6 金属离子对色素稳定性的影响

取上述色素溶液若干份，分别加入 0.1 mol/L Na^+、Mg^{2+}、Ca^{2+}及 Cu^{2+}各 5 mL，摇匀后观察加入不同金属离子后色素溶液的颜色变化情况，在分光光度计上进行全波长光谱扫描（190～1 000 nm），测定其吸光值，重复 3 次，观察不同金属离子对色素溶液吸光值的影响，并计算色素残存率。

1.3.7 光照条件对色素稳定性的影响

取上述色素溶液若干份放置于黑暗中、室外阳光下及黑暗中，分别于 2 h、4 h、6 h、8 h 在分光光度计上进行全波长光谱扫描（190～1 000 nm），测定其吸光值，重复 3 次，观察不同光照条件对色素溶液吸光值的影响，并计算色素残存率。

1.4 数据分析及处理

色阶计算公式 $E_{1\,cm}^{1\,\%}\lambda_{max}=A*\alpha$[14]，其中，α 为色素稀释倍数，A 为实测吸光度值。

色素残存率 $=\frac{A_t}{A_0}\times 100\%$[15]，其中：$A_t$为某状态下色素吸光值；$A_0$为色素溶液的初始吸光值。

采用 Excel 2010 进行数据基本处理。

2 结果分析

2.1 色素溶解性

本次试验中，共选取了 16 种溶剂进行色素溶解性试验，溶解情况见表 1。结果表明，该色素粗提物能较容易地溶解在甲醇、乙醇、HCl 溶液和 NaOH 溶液中，在甲醛、水、二甲基亚砜、苯甲醛溶液、乙酸乙酯、二甲苯及 1,2-二氯乙烷中能溶解

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

部分色素粗提物，但是在丙三醇、四氯化碳、苯、苯胺、二氯乙烷中却不能溶解。除 NaOH 溶液中，该色素呈蓝色，其他色素溶液颜色均为红色。

根据该色素溶解情况，推测该色素易溶于极性大的溶剂，不溶或微溶于极性小的溶剂。

表 1 色素粗提物溶解情况

Tab. 1 Dissolution of crude pigment extract

溶剂	溶解情况	溶液颜色
NaOH 溶液	易溶	蓝色
甲醇	易溶	红色，无明显色差
乙醇	易溶	红色，无明显色差
HCl 溶液	易溶	红色，无明显色差
甲醛	可溶	红色，无明显色差
水	可溶	红色，无明显色差
二甲基亚砜	可溶	红色，无明显色差
苯甲醛溶液	可溶	红色，无明显色差
二甲苯	可溶	红色，无明显色差
1,2-二氯乙烷	可溶	红色，无明显色差
乙酸乙酯	不溶	颜色不变
丙三醇	不溶	颜色不变
四氯化碳	不溶	颜色不变
苯	不溶	颜色不变
苯胺	不溶	颜色不变
二氯乙烷	不溶	颜色不变

注：“易溶”指加入色素粗提物后经过简单搅拌很快能全部溶解，“可溶”指加入色素粗提物后需经过长时间搅拌或者加热搅拌才能溶解，且不一定全部溶解“不溶”指加入色素粗提物后，经过搅拌或加热无法产生溶解现象。

2.2 色素最大吸收波长及色素色阶

图 1 为色素粗提物在 pH9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中的紫外吸收光谱图，如图所示，发现该色素在 392 nm 处有最大吸收峰，最大吸收峰值为 1.726。

根据公式$E_{1\,\mathrm{cm}}^{1\,\%}\lambda\max=A*\alpha$ 计算该色素色阶，其中该色素在 590 nm 下测得色素吸光值为 0.78，该色素色阶为 78。

2.3 色素的稳定性

色素的稳定性，直接决定该色素是否适合在较大范围进行推广和应用。

2.3.1 pH 对色素稳定性的影响

（1）色素颜色随 pH 变化情况

试验发现，该色素在 pH 1～pH 6 之间颜色为红色，且随着 pH 增加，红色逐渐加深；在 pH 为 7 时，颜色变为紫红色，随着 pH 进一步增加，色素颜色由紫色逐步向蓝紫色过渡，最终变为蓝色。

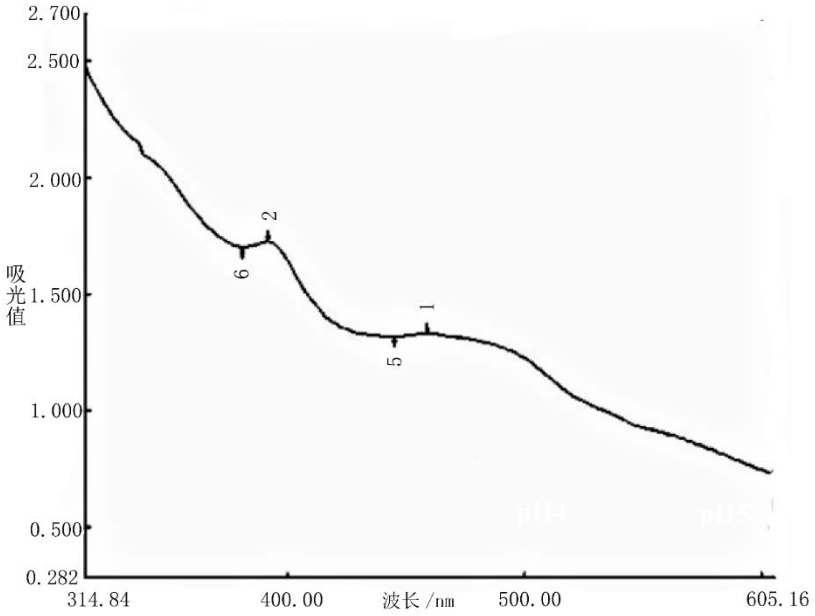

图 1 色素粗提物紫外吸收光谱图

Fig. 1 Ultraviolet absorption spectrum of crude pigment extract

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

（2）色素吸光度值随 pH 变化情况

由 2.2 知，该色素在 392 nm 处会出现最大吸收峰，吸光值为 1.726，且在 50 nm 范围内出现另一对峰谷，随着波长的增加，吸光值呈缓慢递减的趋势。总体上，随波长的增加，吸光度值呈降低趋势。

由图 2 和表 2 可知，pH 1～pH 8 与 pH 9～pH 14 紫外吸收光谱谷峰值差异较大。pH 1～pH 8 时，在 390 nm 左右先出现低谷值，吸光值位于 0.2～0.45 之间；紧接着在 400 nm 左右出现一个峰值，吸光度位于 0.3～0.55；随着波长增加，直到 600 nm 左右，出现一个新的谷值，吸光值仅处于 0～0.1 之间；随着波长的进一步增加，吸光值在小范围内上下波动。pH 1～pH 8 时，色素残存率较低，介于 0.04～0.23 之间。pH 9～pH 14 时，在 400 nm 左右先出现低谷值，吸光值位于 0.3～0.4 之间；然后在 590 nm 左右出现峰值（不同于 pH 1～pH 8 在 400 nm 左右出现峰值），吸光度位于 0.6～0.7（pH 1～pH 8 在 0.3～0.55）；随着波长的增加，直到 900 nm 左右（pH 1～8 在 600 nm 左右），出现一个新的谷值，吸光值仅处于 0～0.05 之间；随着波长的进一步增加，吸光值在小范围内上下波动。pH 9～pH 14 时，色素残存率较高，介于 0.74～0.87 之间。

色素在 pH 1～pH 14 的条件下，均对色素溶液的吸光值有影响，相比较而言，中性和酸性条件下，色素溶液的吸光值变化较碱性溶液剧烈，表明该色素在碱性溶液中稳定性较酸性溶液强。

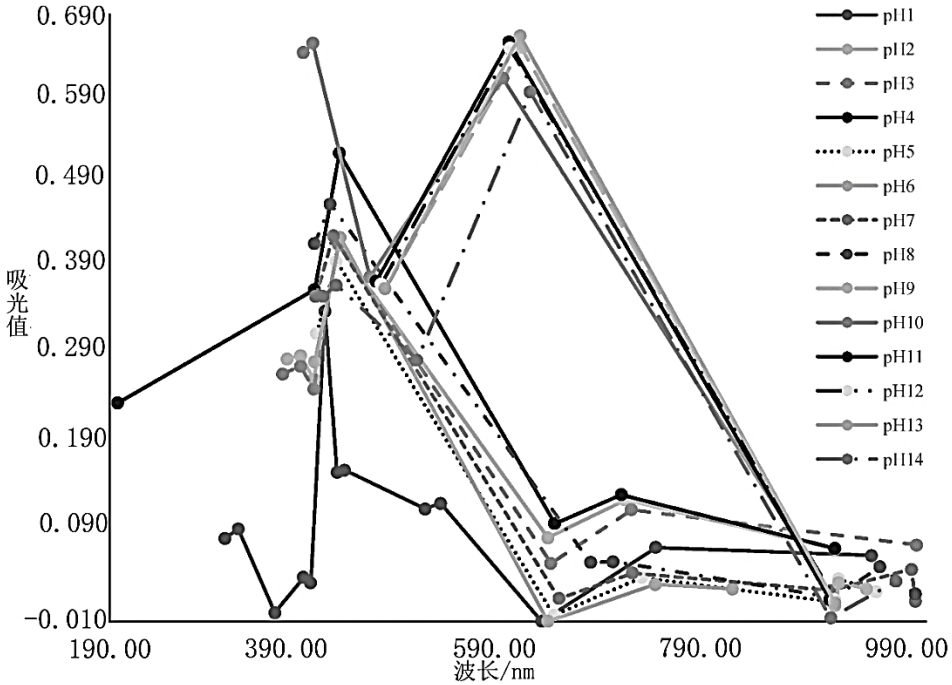

图 2 pH 1～pH 14 色素紫外吸收峰谷图

Fig. 2 Ultraviolet absorption peak map of pH 1～pH 14 pigment

表 2 pH 1～pH 14 条件下色素吸光值及色素残存率

Tab. 2 Absorbance of pigment and residual rate of pigment under pH 1～pH 14

pH	pH1	pH2	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9	pH10	pH11	pH12	pH13	pH14
吸光度值	0.03	0.14	0.12	0.18	0.09	0.06	0.11	0.18	0.66	0.59	0.64	0.65	0.68	0.58
色素残存率	4%	18%	15%	23%	12%	8%	14%	23%	85%	76%	82%	83%	87%	74%

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3.2 温度对色素稳定性的影响

由图 3 和表 3 可知，温度在一定程度上影响色素的吸光值，但整体上，增加或降低温度，对色素吸光值影响不大，色素残存率较高。图 3 中，从上往下数第二条线表示常温下（15℃～20℃）色素的吸光值情况，除 60℃外，其他温度下色素吸光值均在峰谷值附近低于常温情况，但随温度变化没有明显规律，热稳定性较好，能较长时间保持在常温下，这和郭瑞军等[16]的研究结果一致。

表 3 不同温度下色素吸光值及色素残存率

Tab. 3 Pigent absorbance and pigment residual rate at different temperatures

温度	20	30	40	50	60	70	80
吸光度值	0.82	0.58	0.56	0.6	0.61	0.59	0.62
色素残存率	135%	95%	92%	99%	100%	97%	102%

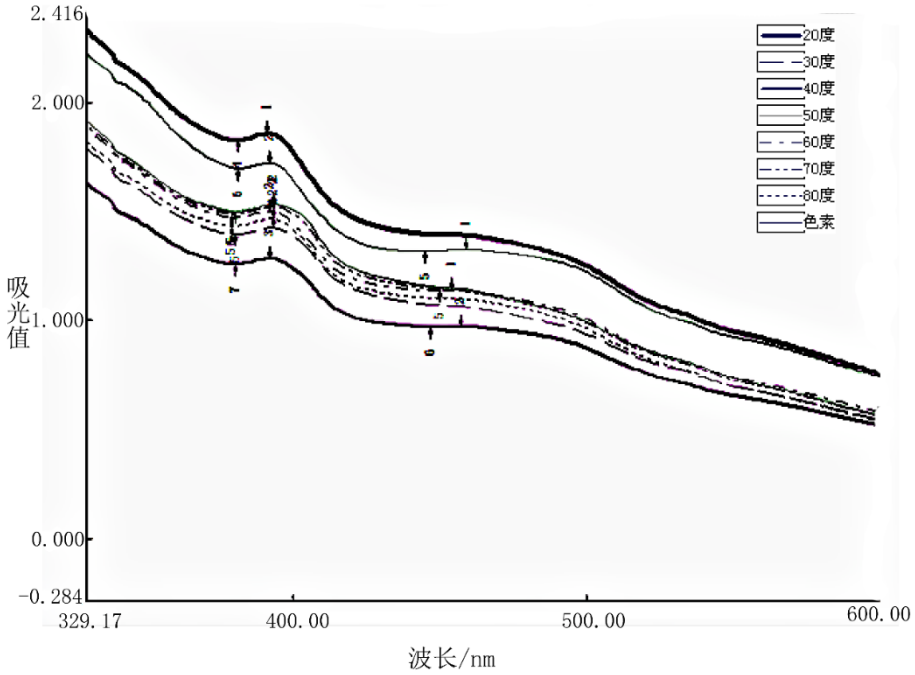

图 3 不同温度下色素吸光值变化情况

Fig. 3 Changes in pigment absorbance at different temperatures

2.3.3 金属离子对色素稳定性的影响

本次试验选择了钙离子、钠离子、镁离子和铜离子进行金属离子对色素稳定性的影响研究。由图 4 和表 4 可知，金属离子均在一定程度上影响色素溶液的吸光度。在较大的波长范围内，铜离子增加了色素溶液的吸光度，钙离子、钠离子和镁离子降低了色素溶液的吸光度，其中，铜离子对色素溶液的吸光值影响最大，镁离子对色素溶液的吸光值影响最小。相比 pH 对色素溶液吸光值峰谷变化的影响，金属离子对色素溶液吸光值无明显峰谷变化，仅在一定程度上平行增加或减小。

2.3.4 光照条件对色素稳定性影响

三种光照条件对色素溶液进行光照条件影响试验说明，无光照、太阳光照射及紫外光照射均对色素溶液吸光值有影响，但影响较小，且在试验时间的范围内，随着处理时间的延长，色素溶液吸光值整体呈现逐渐变小的趋势。黑暗处理 2 h 时，色素残存率为 82%，8 h 后色素残存率为 78%。太阳

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

光照射 2 h 时，色素残存率为 78%，8 h 后色素残存率为 74%。紫外光照射 2 h 时，色素残存率为 79%，8 h 后色素残存率为 77%（见表 5-7）。这三种光照条件下，紫外光对色素溶液影响较小。

表 4 色素在不同金属离子下吸光值及色素残存率

Tab. 4 Absorbance of pigments under different metal ions and residual rate of pigment

温度	钙离子	钠离子	镁离子	铜离子
吸光度值	0.85	0.72	1.23	1.05
色素残存率	109%	92%	158%	135%

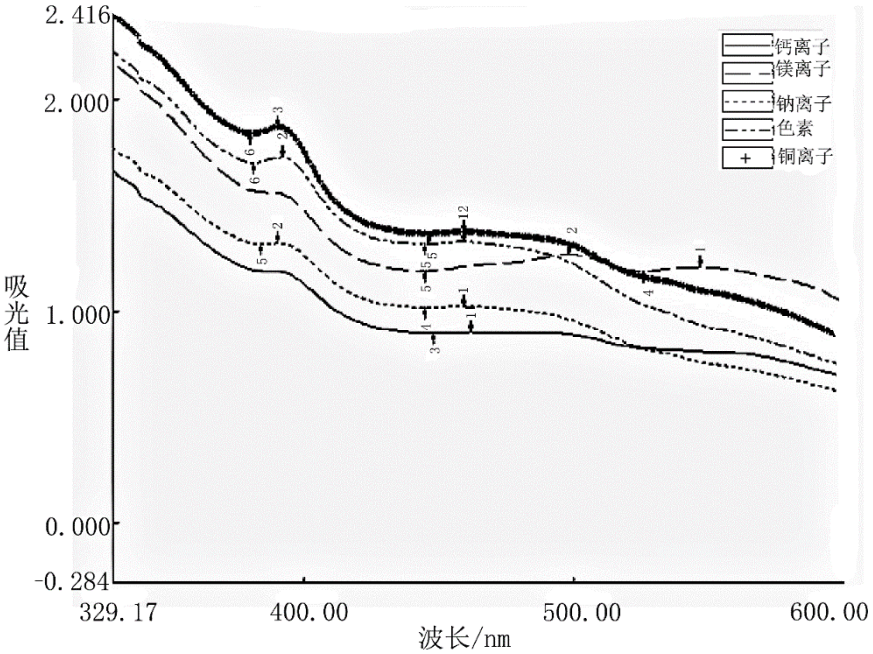

图 4 不同金属离子对色素吸光值影响

Fig. 4 Effect of different metal ions on the absorbance of pigment

表 5 黑暗处理对色素溶液吸光度影响

Tab. 5 Effect of dark treatment on the absorbance of pigment solution

加入量	2 h	4 h	6 h	8 h
吸光度	0.64	0.63	0.62	0.61
残存率	82%	81%	79%	78%

表 6 太阳光对色素溶液吸光度影响

Tab. 6 Effect of sunlight on the absorbance of pigment solution

加入量	2 h	4 h	6 h	8 h
吸光度	0.61	0.59	0.52	0.58
残存率	78%	76%	67%	74%

表 7 紫外光对色素溶液吸光度影响

Tab. 7 Effect of ultraviolet light on the absorbance of pigment solution

加入量	2 h	4 h	6 h	8 h
吸光度	0.62	0.61	0.60	0.60
残存率	79%	78%	77%	77%

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 结论

（1）该色素能较容易地溶解在甲醇、乙醇、HCl 溶液和 NaOH 溶液中，能溶于甲醛、水、二甲基亚砜中，不溶于丙三醇、四氯化碳、苯、苯胺等中。推测该色素易溶于极性大的溶剂，不溶或微溶于极性小的溶剂；

（2）该色素溶液的最大吸收波长为 593 nm，色阶为 78；

（3）该色素在酸性环境下呈红色，且随着 pH 增加，红色逐渐加深；在碱性环境下呈蓝色，且随着 pH 进一步增加，色素颜色由紫色逐步向蓝紫色过渡，最终变为蓝色；

（4）温度对色素溶液吸光值无明显峰谷变化，仅在一定程度上平行增加或减小，但整体上，增加或降低温度对色素吸光值影响不大，且随温度变化没有明显规律；

（5）金属离子对色素溶液吸光值无明显峰谷变化，仅在一定程度上平行增加或减小。在较大的波长范围内，铜离子增加了色素溶液的吸光度，钙离子、钠离子和镁离子降低了色素溶液的吸光度，其中，铜离子对色素溶液的吸光值影响最大，镁离子对色素溶液的吸光值影响最小。

（6）无光照、太阳光照射及紫外光照射均对色素稳定性有影响，紫外光对其影响最小。

参考文献：

[1] 张沙艳, 胡春霞. 毛发中黑色素的提取和利用[J]. 辽宁师专学报: 自然科学版, 2003, 5(3): 95-96.

[2] MELO P S, JUSTO G Z, DE AZEVEDO M B M, et al. Violacein and its β-cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cell[J]. Toxicology, 2003, 186(3): 217-225.

[3] Leon, L. L. Antileishmanial activity of the violacein extracted from Chromobacterium Violaceum[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001, 48(3): 449-450.

[4] 杨双春, 李春雨, 潘一. 食品工业中微生物色素的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2014(1): 114-117.

[5] 徐静. 产黑色素海洋放线菌的分离、鉴定和产色素条件优化[J]. 微生物学通报, 2012, 39(12): 1711-1719.

[6] Bell A A, Wheeler M H. Biosynthesis and Functions of Fungal Melanins[J]. Annual Review of Phytopathology, 1986, 24(1): 411-451.

[7] 倪丽娜. 一株高产黑色素细菌的分离及鉴定[J]. 微生物学通报, 2004, 31(1): 55-59.

[8] 韩亚蓉, 雨田. 菌株 HT R-08 色素的理化性质的初步研究. 现代生物医学进展, 2008; 8(8): 1071-1074.

[9] 李平, 闫培生. 一株新的海洋放线菌所产红色素理化性质研究及其 16SrDNA 分析鉴定. 食品科技, 2013; 38(8): 271-275.

[10] Zhang X, He H, Ma R, et al. Madurastatin B3, a rare aziridine derivative from actinomycete Nocardiopsis sp. LS150010 with potent anti-tuberculosis activity[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2017: 589-594.

[11] 曹舰艇, 杨红, 罗大庆, 等. 佩枯措土壤、水体微生物的分离及抗病原菌活性研究[J]. 高原农业, 2018, 2(06): 612-617.

[12] 张和春. 天蓝色链霉菌产蓝色素的摇瓶发酵优化[J]. 食品与发酵, 1999, 25(5) : 23-27.

[13] 牛世全, 韩彩虹, 胡蛟龙, 等. 一株产蓝色素放线菌的分离、鉴定及其色素稳定性初步研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(1): 134-138.

[14] 孙平. 食品添加剂[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2004: 99-100.

[15] 夏楚杰, 徐琪 ,吕江潮, 等. 血耳色素的稳定性研究[J]. 中国食品添加剂, 2017(01): 128-134.

[16] 郭瑞军, 张明科, 徐全乐, 等. 一株产棕色素放线菌的分离鉴定及其色素性质[J]. 西北农业学报, 2013, 22(7): 181-186.

审稿人：刘振东

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net