

在线推定和控制葡萄糖浓度改善谷氨酸发酵性能

曹艳* 丁健 段作营 刘立明 史仲平

(江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要: 谷氨酸发酵过程一般需要定时、人工分批式地添加葡萄糖。该流加操作方式会引起发酵罐内葡萄糖浓度的剧烈波动,不利于高效、稳定的谷氨酸生产。谷氨酸发酵具有显著的非增殖耦联特征,产酸期葡萄糖耗量与氨水耗量存在非常明显的关联性。通过在线计量氨水耗量推定糖耗以及葡萄糖浓度,可比较准确地将谷氨酸发酵产酸期的糖浓度控制在预先设定的水平。当糖浓度控制在 5 g/L~10 g/L 的低水平时,最终谷氨酸浓度可以达到 80 g/L 的较高水平,高糖浓度下的渗透压效应有望得到缓解,有利于发酵生产的稳定。

关键词: 谷氨酸发酵,流加操作,葡萄糖浓度,在线控制

On-line Glucose Concentration Prediction and Control for Improving Glutamate Fermentation Performance

CAO Yan* DING Jian DUAN Zuo-Ying LIU Li-Ming SHI Zhong-Ping

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: In industrial glutamate fermentation, intermitted feeding glucose with the help of off-line glucose measurement is generally necessary. This kind of feeding strategy could cause large variations in glucose concentration so that it is not favorable for the achievement of efficient and stable glutamate fermentation. Glutamate fermentation is characterized with typical non-growth association behavior, and during glutamate production phase glucose consumption is closely correlated with ammonia consumption. In this study, glucose concentration was controlled at various pre-determined levels by predicting glucose consumption amount and thus its concentration with the aid of on-line monitoring ammonia consumption. When glucose concentration was controlled around a lower level of 5 g/L~10 g/L, the final glutamate concentration could reach a relatively higher level of 80 g/L. In this way, the huge osmotic stress change due to the large glucose concentration variation with the intermitted feeding method could be avoided and the glutamate fermentation performance enhancement be expected.

Keywords: Glutamate fermentation, Fed-batch operation, Glucose concentration, On-line control

谷氨酸是世界上产量最大的氨基酸,也是调味品工业、特别是味精工业的主体。目前我国谷氨酸

总产量已接近 160 万吨,约占全球总量的 75%。在谷氨酸发酵过程中,一般都要流加葡萄糖,因此葡

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA020301-11); 国家 973 计划项目(No. 2007CB714303)资助

* 通讯作者: ✉ caoyan_115@163.com

收稿日期: 2009-03-16; 接受日期: 2009-05-12

葡萄糖浓度成为生产中重要的生化指标。贾宗剑等^[1]采用酶电极系统对发酵过程中的葡萄糖浓度进行在线测量,但该系统检测设备昂贵、操作维护复杂,在实际工业生产中难以普遍应用。工业生产中一般均采用生物传感仪^[2]或还原糖快速测定仪^[3],定时人工取样、离线测量糖浓度,并依据测定结果实施间歇式的补料。间歇式补料容易引起糖浓度的剧烈变化,造成罐内环境,如渗透压等的不稳定,从而对菌体代谢活性及最终发酵生产带来负面影响。谷氨酸发酵属于非生长耦联型发酵,在产酸期,添加氨水既为合成谷氨酸提供氮源,又可调节发酵液的pH。理论上,合成1 mol 谷氨酸需要消耗1 mol 葡萄糖和1 mol 氨水,因此,糖耗与氨耗之间必然存在着相关性。无论是实验室还是工业规模,在线计量氨水耗量相对容易。只要发酵没有太多的杂酸(乳酸、乙酸等)生成,糖耗与氨耗之间的关系和氨耗就可以被用来推定糖耗,进而在线控制糖浓度。该方法简单实用,可省去直接检测发酵罐中糖浓度的繁琐操作,有望缓解发酵过程中糖浓度的剧烈变化和实现谷氨酸发酵的稳产高产。为此,本研究首先确定了谷氨酸发酵产酸期糖耗与氨耗之间的相关性。通过在线计量氨水耗量,对葡萄糖浓度实施在线推定和控制,进而构建了一个谷氨酸发酵葡萄糖浓度实时在线控制系统。

1 材料与方 法

1.1 菌株

谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium Glutamicum* S₉₁₁₄, 本实验室保藏菌株。

1.2 培养基

种子培养基(g/L): 葡萄糖 25, K₂HPO₄ 1.5, MgSO₄ 0.6, 尿素 2.5(单独灭菌加入), FeSO₄ 0.005, MnSO₄ 0.005, pH 7.0~7.2。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 140, K₂HPO₄ 1.5, FeSO₄ 0.002, MnSO₄ 0.002, MgSO₄ 0.4, 尿素 5.5(单独灭菌加入), 玉米浆 5, 硫胺素 5.0×10⁻⁵, 生物素 3.0×10⁻⁶。

流加培养基: 50% (V/V)糖溶液。

1.3 分析方法

1.3.1 菌体浓度: 分光光度法: 用分光光度计(UV-2100, 尤尼柯上海有限公司)在 620 nm 下测其吸光度 OD₆₂₀。

1.3.2 谷氨酸、葡萄糖和乳酸浓度的测定: 生物传感仪(SBA-40C)测定: 山东省科学院生物研究所产。

1.3.3 谷氨酸脱氢酶活性测定: 谷氨酸脱氢酶是催化中间代谢产物α-酮戊二酸生成最终产物谷氨酸的关键酶,其活性与发酵性能直接相关。谷氨酸脱氢酶以 NADPH 为辅酶催化α-酮戊二酸生成谷氨酸,可导致反应液在 340 nm 处的吸光值(OD₃₄₀)下降,并据此来测定谷氨酸脱氢酶的活性: α-酮戊二酸 + NH₄⁺ + NADPH ↔ 谷氨酸 + NADP^[4]。将采集的发酵液,在 8000 r/min 离心 10 min 收集菌体。用 pH 7.5、50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液于 4°C 下振荡洗涤菌体、再在冰浴下超声波破碎 10 min,最后在 4°C、10000 r/min 离心 20 min 得到粗蛋白(上清液)。取 3 mL 37°C 下的混合测定液(含 α-酮戊二酸 13.3 mmol/L, NH₄Cl 15 mmol/L, NADPH 1.67 mmol/L)于石英比色皿中,加入 200 μL 粗蛋白开始反应,记录 1 min 内 OD₃₄₀ 的变化值。酶活(U)单位定义: 37°C、pH 7.5 的反应条件下,每分钟生成 1 μmol NADP 所需的粗蛋白,以 NADPH μmol/min 表示。比活力计算公式为:

$$\text{比活(U/mg)} = 60 \times \Delta OD_{340} \times V_t / (\Delta t \times e \times V_s \times d \times C)$$

ΔOD₃₄₀: 吸光度变化; V_t: 反应体系总体积(mL); Δt: 反应时间(s); e: 摩尔吸光系数, 6.22 mL/(mol·cm); V_s: 酶液体积(mL); d: 石英比色杯光程(cm); C: 蛋白质浓度(mg/mL)。

1.3.4 细胞粗蛋白含量的测定: 将 1.3.3 中制取的粗蛋白液经适当稀释后,以牛血清蛋白作为标准蛋白,采用 Bradford 法进行测定,具体测定方法见文献[5]。

1.3.5 摄氧速率(Oxygen uptake rate, OUR)和二氧化碳生成速率(Carbon dioxide evolution rate, CER):

$$OUR = \frac{Fin}{0.0224V} \left(n_{O_2,in} - \frac{n_{O_2,out} \times n_{N_2,in}}{1 - n_{O_2,out} - n_{CO_2,out}} \right)$$

$$CER = \frac{Fin}{0.0224V} \left(\frac{n_{CO_2,out} \times n_{N_2,in}}{1 - n_{O_2,out} - n_{CO_2,out}} - n_{CO_2,in} \right)$$

Fin: 空气流量(m³); V: 发酵液体积(m³); n_{N₂,in}: 进气(空气)中 N₂ 的体积分数; n_{O₂,out}: 尾气中 O₂ 的体积分数; n_{O₂,in}: 进气中 O₂ 的体积分数; n_{CO₂,out}: 尾气中 CO₂ 的体积分数; n_{CO₂,in}: 进气中 CO₂ 的体积分数。

1.4 发酵和培养条件

种子培养条件: 将保藏菌种经有糖斜面活化后, 用生理盐水洗出分装于种子瓶中, 在 32°C、200 r/min 条件下培养 8 h, 镜检细胞正常无杂菌。

罐发酵条件: 实验在 10 L 发酵罐(镇江东方生物工程设备有限公司生产 GUJS-10 型机械搅拌罐)中进行, 初始装液量 5 L, 接种量 8% (V/V), 自动流加 25% (W/W)的氨水将 pH 控制在 7.2~7.3, 通风量约 1.0 vvm, 发酵周期 34 h。整个过程分为长菌期(0~10 h)、产酸前期(10 h~26 h)和产酸后期(26 h~34 h)。在长菌期, 温度为 32°C, 由于高溶氧对菌体生长不利, 所以将溶氧控制在 10%左右; 产酸前期, 温度升至 34°C, 将溶氧提高到 20%~30%; 产酸后期, 升温至 36°C, 并将溶氧逐步调整到 15%~20%^[6]。溶氧通过手动调节搅拌转速控制。利用工控机、尾气分析仪(LKM2000A, 韩国 LOKAS 产)和电子天平(JA1102, 上海海康公司), 并借助 RS232 通信接口和多通道数据采集卡(PCL-812PG, 台湾研华公司产)在线记录包括溶氧、pH、OUR、CER、氨耗和糖耗等的所有发酵数据。从产酸初期(10 h~12 h)开始启动自我编写的葡萄糖在线推定和流加控制程序(Microsoft Visual Basic version 6.0)。每隔 10 min, 工控机通过多通道数据采集卡的 D/A 转换器、以定速的方式启动蠕动泵(BT00-50M, 保定兰格公司产)补糖一次, 当实测补糖量与推定补糖量相等时, 蠕动泵停止。通过此控制方式将葡萄糖浓度维持在相对恒定的水平。

1.5 葡萄糖理论流加量的计算和葡萄糖浓度的在线推定

假定发酵过程中体积变化可以忽略(流加高浓度糖溶液加采样所造成的体积损失), 发酵第 k 时刻到第 $k+1$ 时刻的葡萄糖物料平衡式可表示为:

$$S(k+1)V = S(k)V + S_F L(k) - G(k) \quad (1)$$

这里: V 为发酵液体积(L), $S(k)$ 、 $S(k+1)$ 分别为第 k 时刻、第 $k+1$ 时刻的葡萄糖浓度(g/L), S_F 为流加葡萄糖溶液的浓度(g/L), $L(k)$ 、 $G(k)$ 分别为第 k 时刻到第 $k+1$ 时刻葡萄糖的实际流加量(L)和消耗量(g)。其中 $G(k)$ 可通过在线计量氨耗和已经确定的糖耗与氨耗之间的关系求得。假定第 $k+1$ 时刻的葡萄糖浓度 $S(k+1)$ 要达到设定浓度 \bar{S} , 即 $S(k+1) = \bar{S}$, 带入公式(1)即可求出该时间间隔内葡萄糖溶液的理论流加量 $\bar{L}(k)$ 。

$$\bar{L}(k) = \frac{[\bar{S} - S(k)]V + G(k)}{S_F} \quad (2)$$

第 $k+1$ 时刻的葡萄糖浓度 $S(k+1)$ 可根据公式(3)递推式地在线推定。

$$S(k+1) = S(k) + \frac{S_F L(k)}{V} - \frac{G(k)}{V}, \text{ 其中 } S(0) \text{ 给定。} \quad (3)$$

2 结果与讨论

2.1 谷氨酸发酵产酸期耗糖与耗氨的定量关系

谷氨酸发酵属于非生长耦联型发酵, 在产酸期, 理论上合成 1 mol 谷氨酸需要消耗 1 mol 葡萄糖和 1 mol 氨水。糖耗与氨耗之间的定量关系是实现葡萄糖浓度在线控制的基础。为此, 通过多次实验, 我们发现, 产酸期糖耗与氨耗之间存在明确的线性关系, 结果如图 1 所示, 即 $G(k) = 5.82 \times r_{\text{NH}_3}(k)$, $r_{\text{NH}_3}(k)$ 为第 k 到第 $k+1$ 时间间隔的氨耗量。理论上, 为合成谷氨酸, 糖和氨的耗量比为 10.6(质量比)。但实际上, 每合成 1 mol 游离态的谷氨酸, 还需要另外添加 1 mol 的氨水, 以调节 pH、形成谷氨酸盐。此时, 糖和氨的耗量比就变成 5.3, 这与实际的糖氨耗量比系数(5.82)还是比较接近的。

2.2 谷氨酸发酵葡萄糖浓度实时在线预测和控制系统的性能

在产酸期, 利用耗糖与耗氨的定量关系和在线计量的耗氨量将葡萄糖浓度控制在不同设定水平(100 g/L, 20 g/L, 10 g/L, 5 g/L)的结果如图 2a 所示。

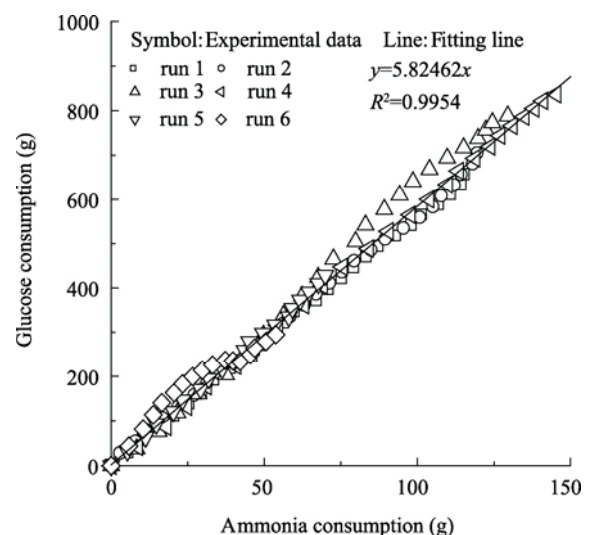


图 1 耗氨与耗糖的关系

Fig. 1 The relationship between the consumption amounts of ammonia and glucose

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

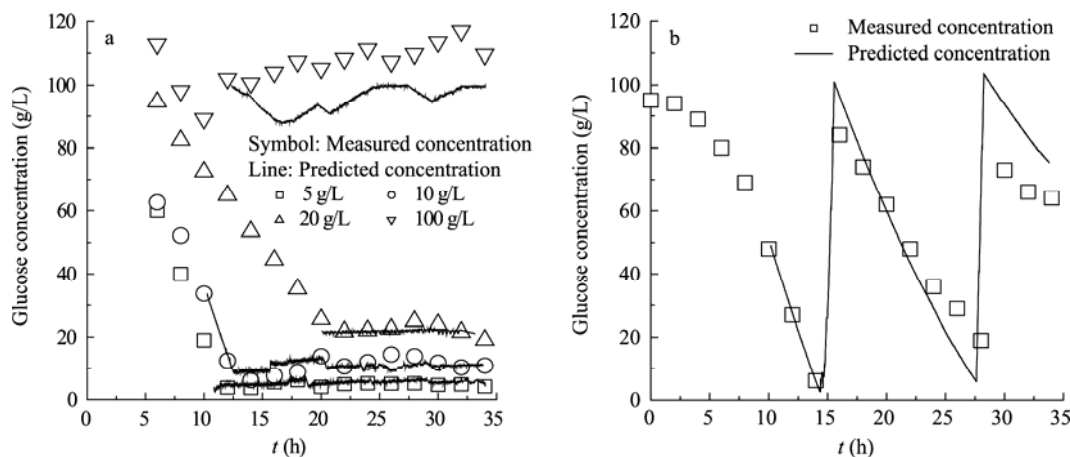


图2 葡萄糖浓度的实测值和在线推定值比较

Fig. 2 The comparison of measured and on-line predicted glucose concentrations

注: a: 定值控制方式; b: 间歇补料方式.

Note: a: Constant control manner (at different levels); b: Intermitted feeding manner.

另外, 利用该系统也可以对间歇补料中的葡萄糖浓度变化进行在线监测, 此时, 葡萄糖浓度的在线推定值和实测值如图 2b 所示。从该图可知, 实测葡萄糖浓度与推定葡萄糖浓度基本吻合, 说明通过在线计量氨耗并利用预先确定的糖耗-氨耗关系自动流加葡萄糖, 在线预测和控制糖浓度是可行的。

2.3 不同葡萄糖控制浓度对发酵性能和谷氨酸脱氢酶(GDH)活性的影响

虽然谷氨酸产生菌能够生长于 10% 以上高浓度的葡萄糖培养基中^[7], 但 Kim 等^[8]发现如果培养基中底物浓度过高就会抑制菌体生长。盐和糖(浓度)通常被认为是影响发酵液渗透压的主要因素。葡萄糖浓度过高会导致高渗透压, 进而对发酵性能产生影响。表 1 总结了间歇分批补料和将葡萄糖浓度定值控制在 100 g/L、10 g/L 和 5 g/L 时的发酵性能。

实验结果表明: 糖浓度控制在 5 g/L~10 g/L 的较低水平时, 最终谷氨酸浓度高、可以达到 80 g/L 左右; 而将糖浓度控制在 100 g/L 的高水平时, 最终

谷氨酸浓度只能达到 40 g/L 左右的低水平; 间歇分批流加时的最终谷氨酸浓度也只有 68 g/L, 比低糖控制水平下的最终浓度低 15%。出现这种现象, 可能是因为葡萄糖浓度高时, 渗透压比较高, 葡萄糖利用酶系活性降低^[9], 代谢途径中的关键酶受到抑制使代谢途径改变生成其他物质^[10,11]。谷氨酸脱氢酶是谷氨酸生物合成过程中的关键酶, 能够催化 α -酮戊二酸转变为谷氨酸, 它是连接碳、氮代谢的重要酶, 因此, 谷氨酸脱氢酶活性的高低是谷氨酸生产的关键。表 1 还列出了发酵 12 h 和 32 h 的谷氨酸脱氢酶的活性数据, 以及产酸期(10 h~12 h 至 34 h)内的糖酸转化率数据。可以看出, 高葡萄糖浓度对谷氨酸脱氢酶活性有抑制作用、特别是在发酵产酸初期。同时, 葡萄糖浓度过高或剧烈波动也将严重影响糖酸转化率。最后, 谷氨酸棒杆菌是耗氧菌, 摄氧速率(Oxygen uptake rate) OUR 可以反映菌体的代谢活性。图 3 是不同糖浓度控制条件下的 OUR 变化曲线。可以看出, 当控制葡萄糖浓度在 100 g/L 时,

表 1 间歇补料和将糖浓度控制在 100 g/L、10 g/L 和 5 g/L 时的发酵性能及谷氨酸脱氢酶(GDH)活性
Table 1 Fermentation performance and GDH activity when using intermitted feed and continuous feed by controlling glucose concentration at different levels

控制模式 Control mode	葡萄糖浓度水平 Glucose concentration (g/L)	最终谷氨酸浓度 Glutamate concentration (g/L)	糖酸转化率 Conversion ratio (%)	谷氨酸脱氢酶(GDH)活性 GDH activity (U/mg-raw protein)	
				12 h	32 h
连续流加、控制 糖浓度于定值 Constant glucose conc. control	5.0	78.0	50.0	0.42	0.16
	10.0	78.7	55.6	-	-
	100.0	37.6	34.1	0.18	0.13
间歇流加 Intermitted feed	10.0~80.0	68.0	41.7	0.23	0.16

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

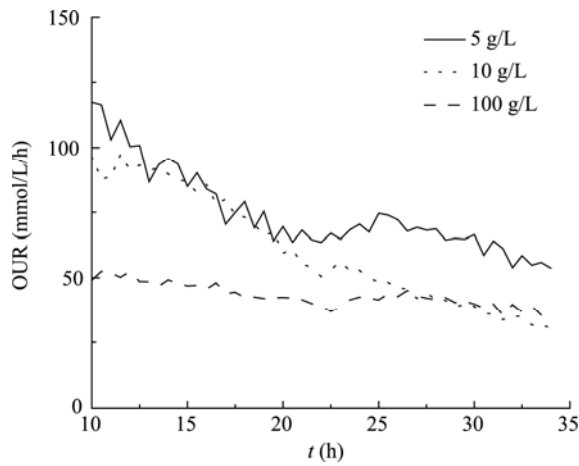


图3 不同糖控制水平下的 OUR

Fig. 3 The OUR at different glucose control levels

OUR 明显低于低糖控制水平下的相应值、特别是产酸初期。为了维持菌体代谢活性于较高水平, 也应该尽量把糖控制于较低浓度。

2.4 葡萄糖自动流加系统的改进

发酵过程具有强烈的时变特征, 每一批次发酵的特征、包括糖氨耗之间的关系也不尽完全相同。本葡萄糖在线预测和控制系统在预设的葡萄糖控制浓度很低(5 g/L)时有时会发生错误: 即糖的在线推定浓度虽然在 5 g/L 左右, 但实际浓度已经降到了 0(葡萄糖耗尽)。这时, 溶氧和 pH 持续急剧地上升, 氨水也不再添加, 发酵无法继续进行下去。但是, 此时如果人为地添加一定量的葡萄糖, 溶氧和 pH 就会下降、发酵也会继续进行(图 4)。葡萄糖频繁的耗尽匮乏会严重影响细胞代谢活性和发酵生产, 出现这种情况时最终谷氨酸浓度最多只能达到 60 g/L。如果控制系统能够对 pH、溶氧(Dissolved oxygen, DO)的急剧上升等进行识别和判断^[12], 并根据识别结果及时地调整(加大)糖-氨耗之间的比例系数, 就可以恢复糖浓度的正确在线推定, 并解决底物出现匮乏、发酵无法正常进行的问题。最终形成一个完全自适应发酵控制系统, 进一步提高控制性能。

3 结论

1) 通过在线计量氨水耗量并根据已知的糖-氨耗关系, 可以比较准确地预测谷氨酸发酵产酸期的葡萄糖浓度, 并可将其稳定控制于预先设定的水平。

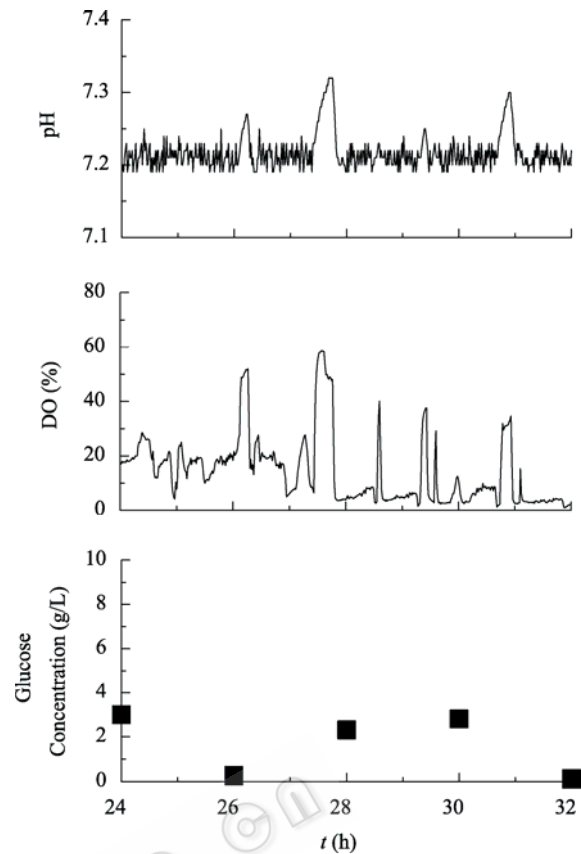


图4 葡萄糖耗尽时 pH 和 DO 的变化

Fig. 4 The changes of pH and DO when glucose is exhausted

2) 控制葡萄糖浓度于较低水平(5 g/L~10 g/L), 可以缓解高糖渗透压的负面影响、提高谷氨酸脱氢酶和细胞的代谢活性、有利于谷氨酸发酵性能的提高和稳定。

参考文献

- [1] 贾宗剑, 张先恩. 基于酶电极系统的葡萄糖浓度在线控制. 生物工程学报, 1996, 12(3): 355-358.
- [2] 冯德荣, 尚雪芹, 周万里, 等. 适用于发酵生产过程的 SBA-40 L-谷氨酸-葡萄糖双功能分析仪的研制. 食品与发酵工业, 1993, 4: 33-37.
- [3] 史建国, 马耀宏, 张利群, 等. 还原糖快速测定技术在谷氨酸发酵过程中的应用. 食品与发酵工业, 2003, 29(11): 107-108.
- [4] 王 燕, 宋 香, 杨平平, 等. 谷氨酸生产菌 S₉₁₁₄ 中的谷氨酸脱氢酶的研究. 生物工程学报, 2003, 19(6): 725-729.
- [5] 赵亚华. 生物化学实验技术教程. 广州: 华南理工大学出版社, 2000, pp.40-41.

- [6] 于信令. 味精工艺手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1995, pp.187-195.
- [7] 张克旭. 氨基酸工艺学. 北京: 轻工业出版社, 1992, pp.75-76.
- [8] Kim P, Kim JH, Oh DK. Improvement in cell yield of *Methylobacterium* sp. by reducing the inhibition of medium components for poly- β -hydroxybutyrate production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2003, **19**(4): 357-361.
- [9] Gourdon P, Raheirmandimby M, Dominguez H, *et al.* Osmotic stress, glucose transport capacity and consequences for glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, 2003, **104**: 77-85.
- [10] Gourdon P, Lindley ND. Metabolic analysis of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolic Engineering*, 1999, **1**: 224-231.
- [11] Hasegawa T, Hashimoto KI, Kawasaki H, *et al.* Changes in enzyme activities at the pyruvate node in glutamate-overproducing *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, **105**(1): 12-19.
- [12] Suzuki H, Kishimoto M, Kamoshita Y. On-line control of feeding of medium components to attain high cell density. *Bioprocess Engineering*, 2000, **22**: 433-440.

(上接 p.1525)

征 稿 简 则

3.4 摘要写作注意事项

3.4.1 英文摘要:

1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免好多长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.4.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ(日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。凡被录用的稿件将及时发出录用通知, 对不录用的稿件, 一般在收稿 1 个月之内通过 E-mail 说明原因, 打印稿不退。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊网址上传电子版修改稿, 待编辑部复审后将给作者发送稿件录用通知单, 请作者将修改稿纸稿和签字盖章后的承诺书一并寄回编辑部, 按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊及单行本。

6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部 (100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>

<http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>