

丙酸杆菌代谢物摇瓶补料分批发酵条件研究

孙 帅¹, 常忠义¹, 唐学明², 高红亮¹, 王晓云¹, 金凤杰¹

(1 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062; 2 上海市农业科学院 生物技术研究所, 上海 201106)

【摘 要】 【目的】初步研究 1 株薛氏丙酸杆菌(*Propionibacterium. shermanii*)代谢物在摇瓶补料分批发酵中的最适碳源、氮源及其用量,旨在为丙酸杆菌工业化生产提供参考。【方法】在摇瓶分批发酵条件下,以丙酸杆菌对恶臭假单胞菌(*Pseudomonas. putida*)的抑菌活性为检测指标,以未补加碳氮源处理为对照,从发酵第 4~7 天,每隔 24 h 补加 1 次不同质量浓度的复合碳源($m(\text{乳酸钠}):m(\text{葡萄糖})=3:1$)、不同氮源(胰蛋白胨、酵母粉、牛肉膏),每天取样检测发酵液的抑菌活性,最后对获得最佳补料条件进行验证,在此基础上确定补料时间。【结果】从发酵第 4 天开始每隔 24 h 补加 1 次 3 g/L 复合碳源和 2 g/L 酵母粉时,丙酸杆菌代谢物对恶臭假单胞菌抑菌活性在第 8 d 最高,为 33.47 AU/mL,显著高于对照组 22.48 AU/mL($P<0.05$);每隔 24 h 补料 1 次与每隔 12 h 补料 1 次,对提高抑菌活性的影响不大。【结论】在分批发酵过程中每隔 24 h 补加 1 次 3 g/L 复合碳源、2 g/L 酵母粉,可以明显提高丙酸杆菌代谢物对恶臭假单胞菌的抑菌活性。

【关键词】 薛氏丙酸杆菌;摇瓶补料分批发酵;抑菌活性

【中图分类号】 Q93

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)07-0135-06

Study of *Propionibacterium* metabolites flask fed-batch fermentation

SUN Shuai¹, CHANG Zhong-yi¹, TANG Xue-ming²,
GAO Hong-liang¹, WANG Xiao-yun¹, JIN Feng-jie¹

(1 School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China;

2 Biotechnology Research Center of Shanghai Academy of Agriculture Science, Shanghai, 201106, China)

Abstract: 【Objective】 The preliminary study was conducted to identify the optimal carbon and nitrogen sources and their dosage for *Propionibacterium. shermanii* under shake flask fed-batch fermentation conditions to provide reference for its industrial production. 【Method】 Different mass concentrations of compound carbon source ($m(\text{lactate}):m(\text{glucose})=3:1$), various nitrogen sources (tryptone, yeast extract, beef extract) were added once every 24 h since the fourth day of the fermentation in shake flask fed-batch fermentation conditions, using the antibacterial activity of the metabolites of *Propionibacterium. shermanii* against *P. putida* as testing index, no additional carbon and nitrogen sources as CK. The antibacterial activity of fermentation broth was detected everyday. Finally the best feeding conditions and the feeding time were verified. 【Result】 The results showed that when 3 g/L compound carbon source and 2 g/L yeast extract were added every 24 h since the fourth day of the fermentation, the antibacterial activity of the metabolites of *Propionibacterium. shermanii* against *P. putida* reached its highest antibacterial activity 33.47 AU/mL on the eighth day, significantly higher than that of the control group, 22.48 AU/mL ($P<0.05$). But compared with feeding once every 24 h, feeding once every 12 h had little effect on the elevation of antibacterial activity. 【Conclusion】 In shake flask fed-batch fermentation conditions, feeding 3 g/L compound

* [收稿日期] 2010-12-10

[基金项目] 上海市农业遗传育种重点实验室开放基金项目(Shagb2009-02);国家自然科学基金项目(30700064)

[作者简介] 孙 帅(1986—),男,山东青岛人,硕士,主要从事食品微生物研究。E-mail:ssye2006@163.com

[通信作者] 高红亮(1973—),男,上海人,副教授,硕士生导师,主要从事食品及发酵研究。E-mail:hlgao@bio.ecnu.edu.cn

carbon source and 2 g/L yeast extract once every 24 h can significantly improve the antibacterial activity of the metabolites of *Propionibacterium. shermanii* against *P. pudia*.

Key words: *Propionibacterium. shermanii*; flask fed-batch fermentation; antibacterial activity

乳品丙酸杆菌能代谢产生对其同种或近源种具有特异性杀菌作用的蛋白质或多肽物质,这种物质被称为丙酸杆菌素,其是细菌素的一种^[1]。丙酸杆菌素具有广泛的抑菌作用,能抑制革兰氏阴性细菌、部分革兰氏阳性菌、霉菌和酵母的生长^[2],可以作为生物防腐剂添加到食品中。越来越多的研究表明,化学合成防腐剂对人体具有潜在的不安全影响^[3-4]。细菌素是一种多肽,进入人体的消化道后,可以被消化道内各种蛋白酶消化掉,符合现代绿色食品无毒无副作用的要求。目前,研究最清楚的细菌素是由乳酸菌产生的 Nisin^[5]。现在,全世界已有 50 多个国家和地区已批准将 Nisin 做为食品防腐添加剂。

目前,国内对丙酸杆菌的研究主要集中在菌种分离、鉴定及产酸、维生素等方面^[6-8],对其代谢物抑菌性质的研究报道较少,而对丙酸杆菌补料发酵的研究更少。补料分批发酵作为一种发酵控制手段,对发酵产物的获得具有重要意义。补料一般是在发酵进行至大量生成产物的阶段,因合成产物和维持细胞活动的需要,有选择地补充营养物质以促进发酵的进行。合适的补料工艺能够有效控制微生物的中间代谢,使之向着有利于产物积累的方向发展^[9]。

本试验在陈玉梅等^[10]研究丙酸杆菌发酵培养基和培养条件优化的基础上,对丙酸杆菌摇瓶分批发酵条件下补料时的碳氮源进行研究,分析补加碳氮源条件下丙酸杆菌代谢物对恶臭假单胞菌的抑菌效价,以期为其工业化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

薛氏丙酸杆菌(*Propionibacterium. shermanii*)由华东师范大学微生物学实验室保存;恶臭假单胞菌(*Pseudomonas. pudia*),为抑菌试验的敏感指示菌,由上海疾病控制防疫中心提供。

1.2 主要仪器

3-Star 台式 pH 仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司生产;紫外光栅分光光度计,上海第三分析仪器厂生产;Power wave xs 酶标检测,美国 BIO-TEK 公司生产。

1.3 培养基

丙酸杆菌培养采用 SLB 培养基,其配方为:胰

蛋白胨 10.0 g,酵母膏 10.0 g,乳酸钠 16.7 mL, K_2HPO_4 0.25 g, $MnSO_4$ 0.005 g 或其 0.1 mol/L 溶液 0.5 mL,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

恶臭假单胞菌培养采用 LB 液体培养基,其配方为:蛋白胨 20.0 g,牛肉膏 3.0 g,乳糖 5.0 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

1.4 试验方法

1.4.1 丙酸杆菌的培养及其代谢物的制备 参考文献[11]的方法,将丙酸杆菌按 100 mL/L 接种量接种于 SLB 培养基中,30 ℃ 静置培养,连续培养 8 d,每天定时取丙酸杆菌发酵液 20 mL,备用。将样品于 10 000 r/min 离心 20 min,取沉淀用于生物量测定,上清液在测定 pH 后先用灭菌的 100 g/L NaOH 调 pH 至 7.0,再用灭菌的 100 g/L 酒石酸调 pH 至 5.3,最后过滤除菌,置 4 ℃ 保藏。

1.4.2 恶臭假单胞菌的培养 恶臭假单胞菌的培养参考文献[11]的方法进行。

1.4.3 摇瓶补料方法 从发酵第 4~7 天,每隔 24 h 向装有发酵液的 250 mL 螺纹瓶中,分别加入 1 次 1, 2, 3, 4 和 5 g/L 葡萄糖-乳酸钠复合碳源($m(\text{乳酸钠}):m(\text{葡萄糖})=3:1$) 20 mL,分析比较丙酸杆菌代谢物对恶臭假单胞菌的抑菌活性,从而确定最佳碳源补加量。

在确定碳源补加量后,在发酵第 4,5,6,7 天补加碳源的同时,分别补加 2 g/L 胰蛋白胨、酵母粉和牛肉膏 20 mL,以未添加碳氮源作为对照组,从而确定最适补加氮源;之后,在同时补加碳源的基础上,在发酵第 4,5,6,7 天分别补加 1,2,3 和 4 g/L 最适氮源 20 mL,分析比较丙酸杆菌代谢物对恶臭假单胞菌的抑菌活性,进而确定最适氮源的补加量。

最后以确定最适碳源、氮源及其最适补加量进行验证试验,分别每隔 12 或 24 h 补加 1 次。在整个发酵过程中(1~8 d),每天定时取样测定发酵液对恶臭假单胞菌的抑菌活性,同时比较不同补加时间对丙酸杆菌抑菌活性的影响。

1.4.4 丙酸杆菌代谢物抑菌活性的测定 采用改良的系列稀释法^[12-13],测定丙酸杆菌代谢物抑菌活性(AU),其中将丙酸杆菌代谢物用 SLB 培养基以 2^N 倍逐步稀释,稀释度 $N=1\sim7$ 。

制备酶标板时在酶标板每孔中加 100 μL 不同

浓度的丙酸杆菌代谢物和 100 μL 稀释的指示菌液,以 100 μL SLB 培养基和 100 μL 指示菌液为对照,每个稀释度的样品做 3 个平行,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h 后于酶标仪上测定 $OD_{600\text{ nm}}$ 值。将读数为对照值一半时的代谢物稀释倍数的倒数作为 1 个抑菌活性单位(AU)。

1.4.5 还原糖含量的测定 还原糖含量的测定采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法^[14]。接种丙酸杆菌后每隔 24 h 取 1.0 mL 发酵液,稀释 10 倍后分别加入 1.0 mL 蒸馏水和 1.5 mL DNS,沸水浴加热 5 min 后立即用流动冷水冷却,然后加入 21.5 mL 蒸馏水,振荡混匀后用分光光度计测定 $OD_{520\text{ nm}}$ 值,最后根据葡萄糖标准曲线计算发酵液中的还原糖含量。

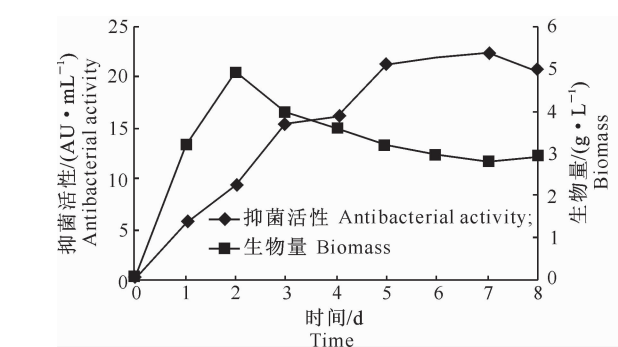


图 1 培养过程中丙酸杆菌代谢产物抑菌活性与生物量的变化

Fig. 1 Changes of the antibacterial activity and biomass of propionibacterium during the cultivation process

从图 1 和图 2 可以看出,发酵前 2 d 生物量迅速升高,2~4 d 生物量有所下降,于 4 d 后基本趋于稳定。还原糖、氨基氮含量在前 4 d 内消耗很快,限制了菌体的生长。在 0~7 d,发酵液抑菌活性整体呈现逐渐升高趋势,在发酵终点(7~8 d)略有下降。由此可见,丙酸杆菌菌体生长与其代谢物抑菌

1.4.6 生物量的测定 每个培养瓶取丙酸杆菌发酵液 20 mL,10 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,将沉淀用去离子水冲洗 3 次,105 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至质量恒定后称其质量。

1.4.7 氨基氮含量的测定 采用甲醛法,按照 GB/T 5009.39-2003 的方法测定。

2 结果与分析

2.1 丙酸杆菌的代谢曲线

陈玉梅等^[10] 确定了丙酸杆菌初始培养基碳源为乳酸钠和葡萄糖,其最适质量浓度分别为 15 和 5 g/L,由此对发酵进程进行分析,结果如图 1、图 2 所示。

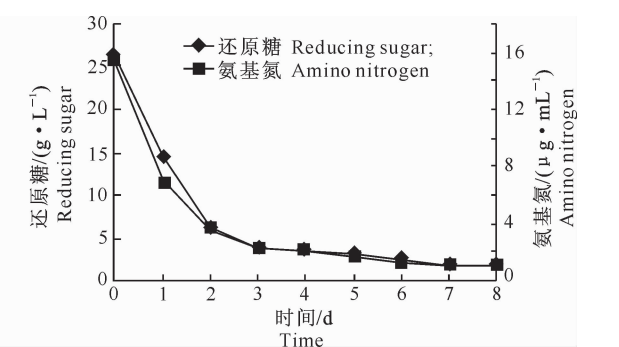


图 2 培养过程中丙酸杆菌发酵液中还原糖与氨基氮含量的变化

Fig. 2 Changes of the reducing sugar and amino nitrogen content of fermentation broth during the cultivation process

活性并不呈正相关关系,其代谢过程较为复杂。

2.2 补料液中最适碳源及其补加量的确定 保持培养基其他成分不变,在发酵第 4,5,6,7 天分别补加 1 次不同质量浓度的复合碳源,所得丙酸杆菌代谢物的抑菌活性如表 1 所示。

表 1 补加不同质量浓度复合碳源时丙酸杆菌代谢物的抑菌活性 AU/mL
Table 1 Antibacterial activity of propionibacterium metabolites with different mass concentrations of complex carbon added

时间/d Time	对照组 CK	复合碳源质量浓度/(g·L ⁻¹)				
		1	2	3	4	5
1	5.74±0.13 a	6.13±0.09 a	5.26±0.10 a	5.37±0.09 a	5.64±0.12 a	5.26±0.08 a
2	9.44±0.11 a	9.66±0.07 a	9.66±0.13 a	10.16±0.12 a	9.67±0.18 a	10.13±0.12 a
3	15.29±0.06 a	15.31±0.12 a	14.69±0.07 a	15.37±0.09 a	14.74±0.13 a	15.28±0.09 a
4	16.13±0.15 a	15.47±0.19 a	16.25±0.08 a	15.64±0.13 a	16.43±0.22 a	15.38±0.12 a
5	21.26±0.13 a	22.15±0.06 a	21.53±0.17 a	21.96±0.08 a	22.16±0.07 a	21.79±0.18 a
6	21.86±0.15 a	28.45±0.16 b	28.14±0.14 b	28.15±0.09 b	28.63±0.15 b	29.15±0.19 b
7	22.48±0.09 a	28.64±0.17 b	30.25±0.16 b	30.47±0.21 b	30.16±0.07 b	29.67±0.12 b
8	20.57±0.08 a	28.68±0.11 b	28.67±0.07 b	30.16±0.12 b	30.26±0.15 b	30.54±0.10 b

注:同行数据后标不同小写字母者表示差异显著(P<0.05)。
Note: Different superscript letters at the same line mean significant difference .

从表 1 可以看出,在补加不同质量浓度碳源后,试验组的抑菌活性从第 6 d 开始显著高于对照组 ($P<0.05$),补加 3,4 和 5 g/L 复合碳源时,丙酸杆菌代谢物最大抑菌活性分别为 30.47,30.26,30.54 AU/mL,三者之间差异不显著($P>0.05$)。

对照组和补加 3 g/L 复合碳源丙酸杆菌发酵液中还原糖、氨基氮含量的变化如图 3 所示。由图 3 可见,与未补加碳源物质的对照组相比,补加 3 g/L

复合碳源时发酵液中还原糖含量显著提高 ($P<0.05$),表明补加 3 g/L 复合碳源已足够菌体利用,所以选择补加 3 g/L 复合碳源。由图 3 可知,随着发酵时间的延长,氨基氮含量呈减小趋势,其中补加 3 g/L 复合碳源时,发酵第 9 天的氨基氮含量接近 0,可知发酵液中氮源几乎被完全消耗,表明在补加碳源的同时需要补加氮源。

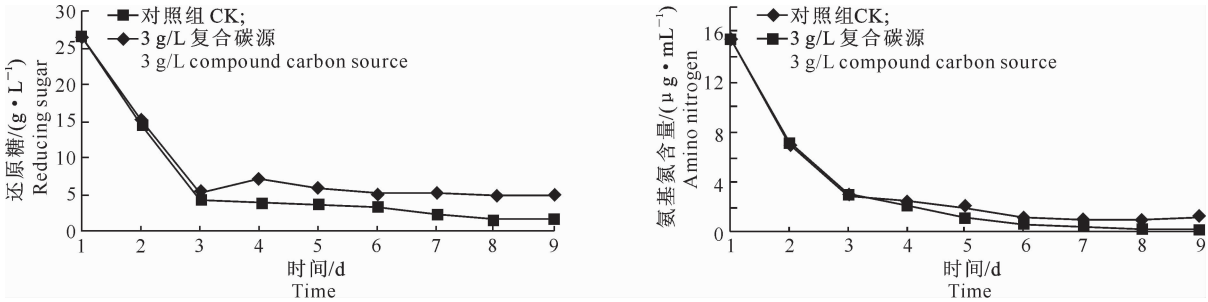


图 3 补加 3 g/L 复合碳源时丙酸杆菌发酵液中还原糖(A)与氨基氮(B)含量的变化
Fig. 3 Changes of the reducing sugar (A) and amino nitrogen (B) content of fermentation broth with 3 g/L compound carbon source added

2.3 补料液中最适氮源及其补加量的确定

在发酵第 4,5,6,7 天补加 3 g/L 复合碳源时,分别加入 2 g/L 胰蛋白胨、酵母粉和牛肉膏,考察其对丙酸杆菌代谢物抑菌活性的影响,结果见图 4。由图 4 可见,与对照组相比,随着发酵时间的延长,在补加不同氮源物质后,各试验组抑菌活性明显提高。其中,补加酵母粉的试验组在第 8 天抑菌活性

达到最高,为 33.47 AU/mL,显著高于对照组 (22.48 AU/mL) ($P<0.05$)。

在确定酵母粉为补料的最佳氮源后,在发酵第 4,5,6,7 天补加 3 g/L 复合碳源以及 1,2,3 和 4 g/L 酵母粉,通过比较抑菌活性以确定最适的酵母粉补加量,结果见图 5。

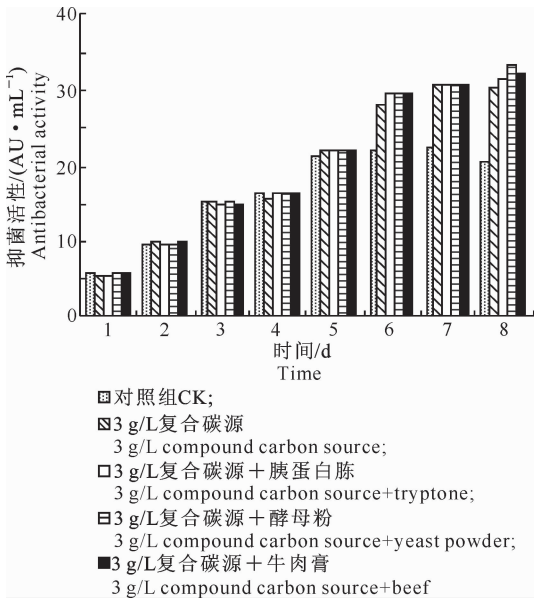


图 4 不同氮源对丙酸杆菌抑菌活性的影响
Fig. 4 Effect of different nitrogen sources on the antibacterial activity of propionibacterium

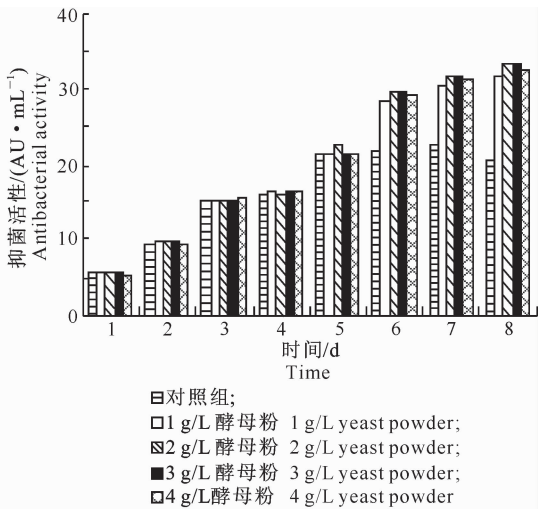


图 5 不同酵母粉补加量对丙酸杆菌抑菌活性的影响
Fig. 5 Effect of adding different amounts of yeast powder on the antibacterial activity of propionibacterium

由图 5 可见,与对照组相比,随着发酵的进行,各试验组抑菌活性均逐渐增强,于第 8 天达到最大。在发酵第 8 天时,补加 2 和 3 g/L 酵母粉试验组的抑菌活性均较高,分别为 33.47 和 33.42 AU/mL,且两者间无显著差异($P>0.05$);而补加 4 g/L 酵母粉时抑菌活性并未进一步提高,因此认为补加 2 g/L 酵母粉最为合适。

2.4 验证试验及补料时间的确定

优化后的补料液中碳、氮源及其最适添加量分别为 3 g/L 复合碳源($m(\text{乳酸钠}):m(\text{葡萄糖})=3:1$)和 2 g/L 酵母粉,对优化条件进行验证,结果见图 6。由图 6 可见,随着发酵时间的延长,各试验组抑菌活性均逐渐增强,其中添加 3 g/L 复合碳源和 2 g/L 酵母粉的试验组于发酵第 8 天抑菌活性最高。

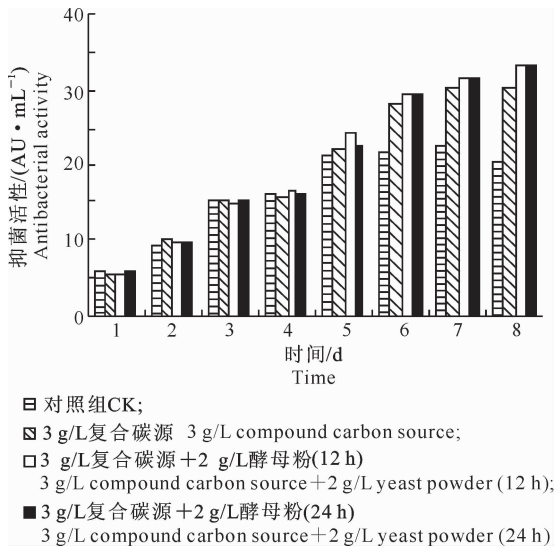


图 6 最适碳氮源条件下补料时间
对丙酸杆菌抑菌活性的影响

Fig. 6 Influence of feeding time on the antibacterial activity of propionibacterium in optimal carbon and nitrogen source conditions

由图 6 还可知,与对照组相比,添加 3 g/L 复合碳源和 2 g/L 酵母粉试验组在发酵后期(6~8 d)的抑菌活性均明显提高($P<0.05$);在发酵第 8 天,每隔 12 h 补加 1 次碳氮源试验组的抑菌活性(33.51 AU/mL)高于每隔 24 h 补加 1 次碳氮源的试验组(33.47 AU/mL),但两者之间差异并不显著($P>0.05$)。考虑到可操作性,确定最佳补料间隔时间为 24 h。

3 讨论与结论

本研究中,通过薛氏丙酸杆菌生长曲线可以看

出,丙酸杆菌菌体生长与其代谢物的抑菌活性并未呈正相关,且代谢过程较复杂。在发酵进入稳定期后,丙酸杆菌素开始大量合成,由于其是蛋白质,而此时发酵液中还原糖和氨基氮含量已经很低,限制了其高效合成。在国内,本试验首次通过对丙酸杆菌补料分批发酵条件的优化,提高了发酵产物中丙酸杆菌代谢物的抑菌活性,对丙酸杆菌的工业化应用具有指导意义。薛氏丙酸杆菌在含乳酸盐和葡萄糖的复合培养基上能更好地利用乳酸盐^[15],这与本试验结果一致。

综合本研究结果,可以得到以下结论:

1)在摇瓶补料分批发酵条件下,分别在发酵第 4,5,6,7 天补加 3 g/L 复合碳源($m(\text{乳酸钠}):m(\text{葡萄糖})=3:1$),可显著提高丙酸杆菌代谢物的抑菌活性($P<0.05$)。

2)在补加 3 g/L 复合碳源的同时补加 2 g/L 酵母粉,对提高丙酸杆菌代谢物抑菌活性最为有利,发酵第 8 天时抑菌活性最高可达 33.47 AU/mL。

3)24 h 间隔补料和 12 h 间隔补料对丙酸杆菌代谢物抑菌活性的影响无明显差异,综合考虑,认为每隔 24 h 补料 1 次为最适补料时间。

目前,国外已经使用丙酸杆菌代谢物作为抑菌物质代替化学防腐剂,商品名为 MicrogardTM^[16],但 MicrogardTM为丙酸杆菌代谢物的混合物,其中起抑菌活性的代谢物的性质还有待进一步研究。此外,还需通过进一步优化培养条件或改良菌种,来提高本试验所用丙酸杆菌代谢物的抑菌活性,使其最终达到工业化生产水平。

[参考文献]

[1] Clevel J, Cleveland J, Montville T J, et al. Bacteriocins: safe natural antimicrobials for food preservation [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 71(1): 1-20.

[2] Grinstead D A, Barefoot S F, Jensenin G, a heat-stable bacteriocin produced by *propionibacterium jensenii* P127 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(1): 215-220.

[3] Hannuksela M, Haahtela T. Hypersensitivity reactions to food additives [J]. Allergy, 1987, 42(8): 561-575.

[4] Juhlin L. Recurrent urticaria; clinical investigation of 330 patients [J]. British J Dermatol, 1981, 104(3): 369-381.

[5] Stiles M E. Biopreservation by lactic acid bacteria [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1996, 70: 331-345.

[6] 陈劲春,王立仁,李 一,等. 丙酸杆菌的分离与初步鉴定 [J]. 北京化工大学学报, 1999, 26(2): 8-10.

Chen J C, Wang L R, Li Y, et al. Isolation and primary characterization of propionibacteria for propionic acid fermentation [J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology,

1999,26(2):8-10. (in Chinese)

[7] 仪 宏,王丽丽,冯惠勇,等. 丙酸积累对薛氏丙酸杆菌生长及产酸的影响 [J]. 微生物学通报,2003,30(3):29-32.
Yi H,Wang L L,Feng H Y,et al. The Effects of propionic acid accumulation on the growth and acid-production of *Propionibacterium. shermanii* [J]. Microbiology, 2003, 30 (3): 29-32. (in Chinese)

[8] 刘 平,李晓峰,谭新敏. 利用大豆黄浆水发酵产生维生素的工艺研究 [J]. 陕西科技大学学报,2003,21(4):83-85.
Liu P,Li X F,Tan X M. Technical explore of producing vitamin B₁₂ by fermentating yellow plasm of soybean [J]. Journal of Shanxi University of Science& Technology,2003,21(4):83-85. (in Chinese)

[9] 蔡 谨. 补料发酵工艺的应用及其研究进展 [J]. 工业微生物, 2005,35(1):42-48.
Cai J. Application of fed-batch fermentation process and its re-search progresses [J]. Industrial Microbiology, 2005, 35 (1): 42-48. (in Chinese)

[10] 陈玉梅,高红亮,常忠义,等. 乳酸钠和葡萄糖对薛氏丙酸杆菌生长及代谢物抑菌的影响 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,35(2):178-183.
Chen Y M,Gao H L,Chang Z Y,et al. Effect of sodium lactate and glucose on the growth of *Propionibacterium shermanii* and the antibacterial activity of its metabolites [J]. Journal of Northwest A&F University:Nat Sci Ed,2007,35(2):178-183. (in Chinese)

[11] 冯 哈,荣绍丰,贾彩凤,等. 丙酸杆菌代谢物对恶臭假单胞菌抑制活性 [J]. 兰州大学学报:自然科学版,2008,44(2):58-62.
Feng H,Rong S F,Jia C F,et al. Antimicrobial activity of metabolites of *Propionibacterium freudenreichii* against *Pseudomonas. putida* [J]. Journal of Lanzhou Universty: Natural Sciences,2008,44(2):58-62. (in Chinese)

[12] Helge H,Therese F,Dag A B,et al. Bacteriocins of propionic acid bacteria [J]. EPD Science,2002,10:59-68.

[13] Holo H,Nilssen O,Nes I F. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* susp. cremoris; isolation and characterization of the protein and its gene [J]. Bacteriol,1991,173 (12):38792-3887.

[14] 刘坚真,陈国寿,李海波,等. 国家标准测定食品细菌总数培养基的改进研究 [J]. 微生物学通报,2001,28(2):63-67.
Liu J Z,Chen G T,Li H B,et al. An improved technique on nutional GB nutrient agar for counting bacteria rient agar for counting bacteria [J]. Microbiology, 2001, 28 (2): 63-67. (in Chinese)

[15] Egli T,Lendenmann U,Snozzi M. Kinetics of microbial growth with mixtures of carbon sources [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1993,63:289-298.

[16] Salih M A,Sandine W E,Ayres T A. Inhibitory effect of microgard on yoghurt and cottage cheese spoilage organism [J]. Dairy Sci,1990,73:887-889.

(上接第 134 页)

[9] Davies P A,Paton C. The Seawater Greenhouse in the United Arab Emirates: Thermal modelling and evaluation of design options [J]. Desalination,2005,17:1-9.

[10] Paton C,Davies P A. The seawater greenhouse cooling, fresh water and fresh produce from seawater [R]. Riyadh: King Saud University,2006.

[11] 晓 夫. 日本的植物工厂及其新技术 [J]. 生态经济,2004 (7):58-61.
Xiao F. Japan's plant factory and new technology [J]. Ecological Economy,2004(7):58-61. (in Chinese)

[12] 李 霞,解迎春,薛绪掌,等. 温室内密闭小环境降温除湿效果及蒸腾水循环利用 [J]. 农业工程学报,2010,26(8):254-259.
Li X,Xie Y G,Xue X Z,et al. Effects of cooling,dehumidification and transpiration water recycling of closed micro-environment in greenhouse [J]. Transactions of the CSAE,2010,26 (8):254-259. (in Chinese)

[13] 刘宇宁,陈 超,屈 璐,等. 玻璃窗在建筑节能中的作用及其特性分析 [J]. 建筑热能通风空调,2006,25(6):80-84.
Liu Y N,Chen C,Qu L,et al. Effect analysis of glazing on building energy saving and its performance [J]. Building Energy & Environment,2006,25(6):80-84. (in Chinese)

[14] 程国栋,张志强,李 锐. 西部地区生态环境建设的若干问题与政策建议 [J]. 地理科学,2000,20(6):503-510.
Cheng G D,Zhang Z Q,Li R. On some issues of the ecological construction of west China and proposals for policy [J]. Scientia Geographica Sinica,2000,20(6):503-510. (in Chinese)

[15] 羽生寿郎. 农业气象学 [M]. 东京:文永堂,1978:20-23.
Hanyu Juro. Agricultural meteorology [M]. Tokyo:Buneido, 1978:20-23. (in Chinese)