

秸秆水解物乙醇发酵菌群功能强化

路 鹏^{1,2}, 江 滔^{1,4}, 任丽梅¹, 李国学¹, 沈世华³, 陈丽君^{1,5}

- (1. 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100094; 2. 北京市环境卫生设计科学研究所, 北京 100028;
3 中国科学院北京植物所, 北京 100093; 4. 乐山师范学院化学与生物系, 四川 乐山 614011;
5. Department of Agricultural and Environmental Sciences, Ohio State University, Columbus 43210, USA)

摘要:在人工筛选得到的 4 株野生乙醇发酵酵母菌株基础上, 加入康宁木霉, 运用正交实验方法研究了菌群对乙醇发酵的影响。结果表明转速、转速 × 温度交互作用对菌群生物量形成具有极显著影响; *Saccharomyces kluyveri* 菌及其与 *Cryptococcus flavescens* 菌之间的相互作用对生物量形成具有显著影响; *Saccharomyces kluyveri* 菌株对乙醇形成具有显著影响, 是乙醇发酵过程中的关键菌, 其他因子对乙醇生成量影响不大; 菌群直接发酵秸秆水解物, 能获得 12.19 g/L 的乙醇。

关键词:复合菌种; 乙醇发酵; 正交实验

中图分类号: TQ92

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2008)11-0044-04

Construction and function testing of an new ethanol fermentative microbial system using corn stalk hydrolysate

LU Peng^{1,2}, JIANG Tao^{1,4}, REN Li-Mei¹, LI Guo-xue¹, SHEN Shi-hua³, CHEN Li-jun^{1,5}

- (1. College of Resources and Environment, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. Beijing Environmental Sanitation Engineering Research Institute 100028, China; 3. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; 4. Department of Chemistry and Biology, Le Shan Teachers College, Leshan 614011, China; 5. Department of Agricultural and Environmental Sciences, Ohio State University, Columbus 43210, USA)

Abstract: The influences of mixed microbes during the ethanol fermentation process by the orthogonal experiment are reported, in which four kinds of yeast strains collected from orchard soil and one cellulose hydrolyzing microbe, *Trichoderma konigii* are used as raw materials. The results show that: ① rotate speed, interaction between rotate speed and temperature have notable influence on biomass. The selected microbial strain *Saccharomyces kluyveri* and its interaction with *Cryptococcus flavescens* have prominent influence on biomass; ② *S. kluyveri* stain has remarkable positive influence on ethanol yields. The other factors have no remarkable influence on ethanol yields. *S. kluyveri* strain is the key microbial strain during the ethanol fermentation process. ③ 12.19 g/L of ethanol can be acquired during the fermentation of corn stalk hydrolysates by combinatorial microbes.

Key words: mixed microbial system; ethanol fermentation; orthogonal experiment

多菌种混合培养可加强底物转化和代谢产物生成, 扩大所利用的底物范围^[1-2]。多菌种混合还能够提高微生物酶的产量与活性, 有效促进难降解有机物的降解^[3]。在生物质能源转化过程中, 同时糖化发酵法 (SSF) 发酵是实现纤维素生物乙醇转化的重要手段, 利用木霉、曲霉等与发酵酵母结合, 能够提高对纤维素的降解能力, 并且明显提高酒精度^[4]。有相互促进作用的微生物所构建菌群可以促进发酵进行, 提高对复杂底物的利用能力。笔者在筛选得到 4 个乙醇发酵野菌株的基础上^[5], 以秸秆水解物

为底物进行菌群的发酵功能研究, 对发酵效果和产物进行了定量分析。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

发酵菌采集自果园土壤样品, 通过秸秆水解物培养初筛后, 再经木糖限制性培养纯化得到 4 个菌株。经微生物研究所鉴定 [鉴定编号: (2008) 微检字第 063 号], 这 4 株菌分别为: *Trichosporon aquatile*, *Saccharomyces kluyveri*, *Rhodotorula mucilaginosa*,

收稿日期: 2008-08-06

基金项目: 国家科技支撑项目 (2006BAD07A01); 国家科技支撑项目 (2006BAD10B05-02)

作者简介: 路鹏 (1969-), 男, 博士; 李国学 (1963-), 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为固体废弃物资源化与再利用, 通讯联系人, 010-62733498, ligx@cau.edu.cn。

Cryptococcus flavescens, 4个菌株可在以木糖为唯一碳源的培养基上生长。康宁木霉 *Trichoderma konigii* Oudem 购自中国农业微生物菌种保藏中心 ACCC, 编号 30167。

培养基组成(质量分数,下同):1号为葡萄糖1%,蛋白胨1%,酵母浸粉0.5%,pH自然;2号、3号分别含葡萄糖为3%、5%,其他组成如1号;4号斜面培养基为在1号基础上添加2%琼脂粉;5号木糖培养基含木糖2.0%,蛋白胨0.5%,酵母粉0.5%,琼脂1.5%,pH=5.0。

秸秆水解物是玉米秸秆干粉用1%稀硫酸在120℃水解60min,制备成有10%固含物的固液混合物。

1.2 测定方法

pH使用日本产HORIBA-212型酸度计。采用比浊法对微生物生长量进行测定。还原糖浓度采用DNS法。将发酵液离心,上清液用0.2 μm孔径的过滤膜过滤,滤液用气质联机测定。

1.3 实验步骤

对筛选得到的4个菌株进行预培养,观察并记录生长与pH动态。将试管斜面上保存的菌种,接入三角瓶,28℃、140 r/min转速、摇床培养24h进行活化。将活化菌种的菌悬液按照0.5%的体积比加入50 mL三角瓶中,置于设定温度与转速的摇床进行培养。实验根据预培养结果,采用L16(2⁵)正交表,培养基葡萄糖浓度为3%,表头设计如表1所示。

表1 正交实验表头设计

水平	因素						
	A	B	C	D	E	F	G
	转速	温度	菌种	菌种	菌种	菌种	菌种
I	90	29℃	接种	不接种	不接种	不接种	不接种
II	140	35℃	不接种	接种	接种	接种	接种

注:因素C菌种处理与其余菌种相反。

各因素指代的菌种分别是:C代表 *Trichoderma konigii* Oudem (康宁木霉), D代表 *Trichosporon aquatile*; E代表 *Saccharomyces kluyveri*, F代表 *Rhodotorula mucilaginosa*, G代表 *Cryptococcus flavescens*。

取培养24h的发酵悬浊液10 mL,置于预称重的10 mL离心管离心,将沉淀的细胞置烘箱90℃烘干称重,计算菌体干重。上清液用0.2 μm孔径的微孔滤膜过滤,滤液稀释适当倍数取样0.5 mL,加入等体积内标物正丙醇,采用气相色谱仪分析发酵液

(24 h)中乙醇含量。

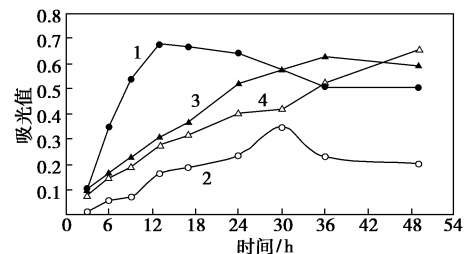
以发酵液中乙醇浓度为指标对正交实验结果进行分析,对产生较大影响的菌种互作进行混合培养与单独培养的比较实验,最终确定最优发酵菌种组合。

以最优菌种组合在最佳发酵条件下,对秸秆水解物进行发酵,对发酵液(24 h)样品处理后,进行气质联机分析,测定代谢产物的种类与浓度。

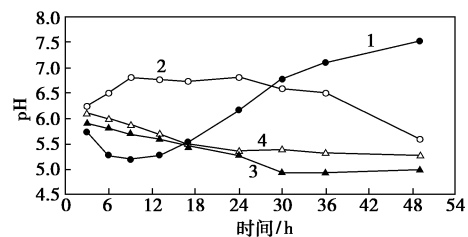
2 结果与分析

2.1 菌株单独培养时生长特性

通过菌株单独培养发现,各菌株生长特性明显不同。将4个菌株分别用酵母培养基(1号)培养观察其生长动态,发现在同样的培养条件下, *Saccharomyces kluyveri* 酵母生长迅速,其余各菌株相对而言生长缓慢。同时该菌株在培养过程中明显出现pH下降现象,培养9h pH达到5.2。 *Trichosporon aquatile* 与 *Cryptococcus flavescens* 菌株生长速度次之, *Rhodotorula mucilaginosa* 生长最慢。并且 *Trichosporon aquatile* 菌株在生长过程中产生碱性物质(图1)。 *Saccharomyces kluyveri* 菌株对于水解物中的糠醛具有较强的抗性^[5]。



(a)吸光值



(b)pH

1— *Saccharomyces kluyveri*; 2— *Trichosporon aquatile*;
3— *Cryptococcus flavescens*; 4— *Rhodotorula mucilaginosa*

图1 各菌株单独培养时的生长曲线和pH动态

2.2 菌株正交实验结果

2.2.1 以生物量、葡萄糖消耗和乙醇产生量为指标对影响因子进行评价排序

正交实验结果(表2)指出,在生物量形成上,按照影响程度由高到低的顺序依次为:转速、转速×温度(交互作用,以下简称互作)、温度、E×G(菌株间

交互)、E 菌株。转速以及转速 × 温度交互作用对生物量的形成有极显著影响,因素 E 以及 E × G 交互对生物量的形成具有显著影响,其中交互影响要高于因素 E 对生物量的贡献;温度、因素 G 及 D × G 交互对生物量的形成有一定影响,D × G 交互的影响高于因素 G 影响。

表 2 正交实验结果

项目	生物量			残糖			乙醇		
	I	II	F	I	II	F	I	II	F
A	25.9	50.5	107.8 ^①	86.2	61.9	1.0	8.6	10.2	0.8
B	40.9	35.5	5.3 ^③	92.9	55.2	2.3	8.1	10.8	2.3
A × B	31.5	44.9	32.1 ^①	85.6	62.5	0.9	9.4	9.4	0
C	40.3	36.1	3.2	71.6	76.6	0	9.4	9.4	0
误差	36.7	39.7	1.5	55.3	92.8	2.3	10.5	8.3	1.5
D	37.4	39.0	0.4	73.5	74.6	0	8.5	10.3	1.0
E × G	34.0	42.4	12.4 ^②	102.1	46.0	5.1 ^③	8.8	10.0	0.5
E	34.8	41.6	8.2 ^②	138.6	9.5	27.2 ^①	5.8	13.0	16.6 ^①
D × G	35.2	41.1	6.2 ^③	85.7	62.4	0.9	8.4	10.5	1.5
F	37.5	38.9	0.3	92.2	56.0	2.1	8.1	10.7	2.2
C × G	36.1	40.3	3.1	85.2	63.0	0.8	9.3	9.5	0
D × F	38.3	38.1	0	72.4	75.7	0	9.3	9.5	0
误差	36.3	40.1	2.7	56.0	92.1	2.1	10.9	8.0	2.7
D × E	39.0	37.4	0.5	72.8	75.3	0	8.2	10.6	1.8
G	35.4	41.0	5.6 ^②	102.0	46.1	5.1 ^②	8.5	10.3	1.0

注:①表示有极显著影响;②表示有显著影响;③表示有一定影响。 $F(1,5)_{0.01} = 16.3, F(1,5)_{0.05} = 6.61, F(1,5)_{0.1} = 4.06; F(1,7)_{0.01} = 12.2, F(1,7)_{0.05} = 5.59, F(1,7)_{0.1} = 3.59; F(1,8)_{0.01} = 11.3, F(1,8)_{0.05} = 5.32, F(1,8)_{0.1} = 3.46。$

在葡萄糖消耗上,按照影响程度由高到低顺序依次为:因素 E, E × G 交互,因素 G。其他因子对葡萄糖消耗无明显影响。因素 E 具有极显著影响, E × G 交互和因素 G 具有一定影响。发酵进行 24 h 时测定结果显示 E × G 交互作用对葡萄糖消耗影响有一定影响,其影响程度高于因素 G。

在乙醇产量(发酵 24 h)上,因素 E 具有极显著的影响,其余因素无明显影响。各因子之间不存在明显的互作关系,最优方案为 $A_2B_2C_1D_2E_2F_2G_1$ 。

2.2.2 因子间交互作用分析

在生物量形成上,转速 × 温度、E × G 存在着明显的交互作用,转速 × 温度交互作用仅对生物量产生影响,不再做进一步的分析。

E 与 G 因素所代表的菌株同时存在形成的生物量小于各自单独存在,暗示着菌种间存在着拮抗作用^[6]。菌株 D × G 之间交互作用对生物量的形成虽有一定影响,但影响不显著($F_{0.1} < F_{D \times G} < F_{0.05}$,见表 3)。

表 3 菌株交互作用(E × G)对生物量及葡萄糖消耗的影响
mg/mL

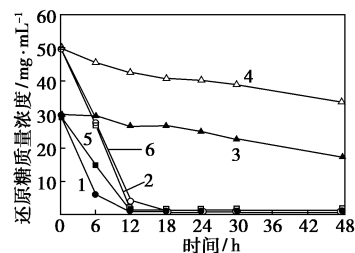
		G ₁	G ₂
生物量	E ₁	13.9	20.9
	E ₂	21.5	20.1
葡萄糖消耗	E ₁	63.8	49.6
	E ₂	3.2	4.1

菌株 E × G 之间的交互作用不仅对生物量的形成发生影响,而且对葡萄糖的转化有抑制作用。经过正交实验结果分析, E × G 交互的影响(均方值 196.7)大于因素 G 的影响(均方值 194.9)。两菌株同时存在的条件下发酵液中剩余糖浓度提高。这表明两菌种同时存在降低了葡萄糖的利用效率。

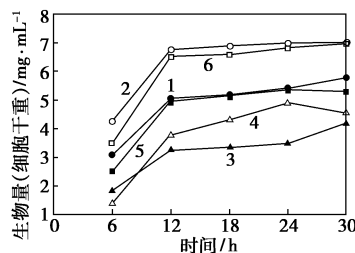
考虑因子之间交互影响,以获取生物量为指标的最佳方案为 $A_2B_1C_1D_2E_2F_2G_1$ 。以葡萄糖利用为指标 $A_2B_2C_1D_1E_2F_2G_1$,以获取最高乙醇浓度为指标的最优方案为 $A_2B_2C_1D_2E_2F_2G_1$ 。从 3 种不同选择角度得到的最优方案均为不含 G 因素代表的菌种。

2.3 Saccharomyces kluyveri 与 Cryptococcus flavescens 混合培养实验

通过正交实验发现因素 E、G 所代表的菌种间存在着拮抗作用,为了进一步确定 E(*Saccharomyces kluyveri*)与 G(*Cryptococcus flavescens*)因素之间拮抗作用对乙醇发酵的影响,对两菌株进行单独培养与 1:1 混合培养的比较实验。培养基分别采用 3% 和 5% 葡萄糖质量分数以比较两种初始糖浓度条件下的菌种交互作用。接种量均为 1/50(体积比),培养条件 140 r/min、30℃。对生长过程中的浊度、糖浓度



(a)糖利用



(b)生物量

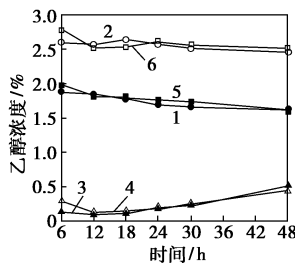
1—E 3%; 2—E 5%; 3—G 3%; 4—G 5%; 5—混合 3%; 6—混合 5%(3%、5%表示初始糖质量分数)

图 2 菌种混合对糖利用和生物量的影响

以及乙醇产量进行测定。

如图2(a), 无论在3%还是在5%的初始糖质量分数下, E代表的菌种均具有较高的葡萄糖转化利用能力。而G代表的菌种对糖的转化能力较弱。两菌种混合培养, 与G代表的菌种单独培养相比, 在发酵前期(培养12h以内), 对糖的转化降低。在5%糖条件下, 差异不太明显, 在3%糖时发酵前期(6h)造成了明显的糖利用能力的下降。

两菌株混合培养与E因素代表菌株单独培养对于浊度的影响不大, 见图2(b)。只在前期(6h以前)及后期(30h以后)略有影响。但是对生物量的增加存在明显不利影响。不论是在3%还是5%初始糖质量分数条件下培养, 混合菌种的生物量均比E因子代表菌株单独培养生物量低。在初始糖浓度较高条件下, 这种作用更为明显。



1—E 3%; 2—E 5%; 3—G 3%; 4—G 5%; 5—混合 3%;
6—混合 5% (3%、5%表示初始糖浓度)

图3 菌种混合对乙醇产生量的影响

从图3可以看到, 菌种混合对乙醇产量影响与E因子代表菌株单独培养相比, 引起的乙醇质量分数差异不超过0.2%, G因子代表菌株单独培养时乙醇产生量极低, 不超过0.6%, 同时发酵缓慢, 在培养12h, 有乙醇产量低谷出现。因此在组合菌种中舍弃 *Cryptococcus flavescens* 菌株(G因素), 对乙醇发酵影响不大。

2.4 发酵产物的分析结果

采用最佳培养方案 $A_2B_2C_1D_2E_2F_2G_1$, 利用菌种组合对酸水解混合物(秸秆质量分数10%)进行直接发酵, 取24h发酵液样进行气质联仪分析。质谱结果通过NIST数据库检索, 发酵代谢产物主要为乙醇、丙酸、异丁烷、2-甲基-1-丁烯、甲酰胺、糠基乙醇和甘油。

采用内标法定量分析判定, 乙醇在发酵液中的质量浓度为12.19 g/L, 甘油的质量浓度为0.47 g/L。除乙醇与甘油这两种主要发酵产物外, 糠基乙醇占代谢物总量的6.94%, 其含量占第三位的代谢产物。其余各杂质总和占发酵液化合物总量的1.5%。

3 讨论

以提高生物量为优选指标的最佳培养方案为 $A_2B_1C_1D_2E_2F_2G_1$, 即摇床转速140 r/min、培养温度29℃, 加入除G代表的菌株外的4个菌株; 以葡萄糖转化利用率(剩余葡萄糖浓度低)为优选指标的最优方案为 $A_2B_2C_1D_1E_2F_2G_1$; 以获取乙醇优选指标的最优方案为 $A_2B_2C_1D_2E_2F_2G_1$ 。前一方案与后2个方案的差异突出体现在培养温度上。温度升高促进葡萄糖消耗和乙醇的生成, 但不利于生物量形成。因此35℃的培养温度为乙醇发酵最优培养温度。在后2个方案中, 是否添加D因素代表菌, 对葡萄糖消耗影响不显著; 对乙醇的生成有正向作用, 效果同样不显著。因此菌群中菌种的数量可以进一步减少。

在培养过程中因素之间的互作对微生物生长和发酵的影响要高于单一因素的影响。发酵过程中转速、转速×温度交互作用对生物量形成具有极显著影响。*Saccharomyces kluyveri* 与 *Cryptococcus flavescens* 菌种互作对生物量形成具有显著影响。*Saccharomyces kluyveri* 菌株对乙醇形成具有显著影响, 其他因子对乙醇生成量影响不大。因此 *Saccharomyces kluyveri* 菌株是乙醇发酵过程中的关键菌。

糠基乙醇是由秸秆水解物中的糠醛转化而来, 发酵微生物将糠醛还原为糠基乙醇, 有效降低了糠醛的生物毒性^[7]。该产物的检出证实菌群对糠醛这种发酵抑制物具有抵抗能力。

在实验中, 应进一步对单菌株发酵代谢产物与混合发酵代谢产物的差异进行比较研究, 以判定发酵的效果并寻找其中的规律。

4 结语

该菌群在最佳培养条件下 ($A_2B_2C_1D_2E_2F_2G_1$) 对于较低浓度的纤维素原料水解物(10%固液比的固液混合物), 不需要脱毒过程, 发酵能够正常进行, 能够有效缩短纤维素发酵乙醇的工艺流程。同时菌群的发酵温度较高, 在微好氧条件进行, 有利于组合中纤维素分解真菌功能发挥, 避免了杂菌的污染, 具有潜在的应用性。代谢产物分析发现, 该菌群发酵的主要产物是乙醇, 在发酵液中的质量浓度为12.19 g/L, 其他代谢产物含量较低, 利于后续的乙醇分离提取工艺。

(崔宗均教授与郭鹏博士在实验分析方面提供了大力帮助, 特此致谢)

(下转第49页)

硝氮)质量浓度 $< 1 \text{ mg/L}$, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ (硝氮)质量浓度 $< 1 \text{ mg/L}$, TP(总磷)质量浓度 $3.5 \sim 16.5 \text{ mg/L}$, 水温 $13 \sim 26 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7.0 \sim 8.0$ 。

1.2 污泥接种

向含 AOB 活性污泥的 SBR 中,接入常温城市污水条件下培养的 Anammox 菌颗粒污泥 70 g (湿重)。A-O 生物除磷活性污泥取自水质科学与水环境恢复工程北京市重点实验室 A-O 生物除磷系统的二沉池排泥,本实验接种量为 1 L 。

1.3 测定项目与方法

定时检测 SBR 反应器内处理液的 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 、TN、COD、TP 等的浓度,在线监测 DO、ORP、pH 和水温等参数。水样分析项目中的指标均按中国国家环保局和美国环境总署发布的标准方法测定。

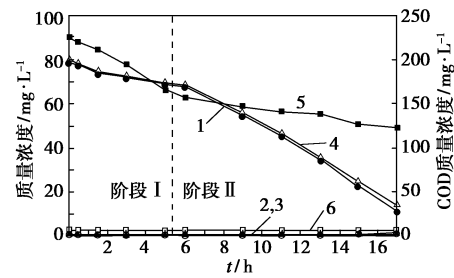
定期从反应器中取水样约 30 mL ,静沉 5 min 后,取上清液约 15 mL ,用中速滤纸过滤,待测。

2 结果与分析

2.1 接种 Anammox 菌后 SBR 运行效能

反应器中接种 Anammox 颗粒污泥后,将曝气量控制在 8 L/h (DO 质量浓度为 $0.08 \sim 0.30 \text{ mg/L}$),水温为 $14.7 \sim 24.7 \text{ }^\circ\text{C}$,处理水先采用 A-O 生物除磷二级出水(COD $50 \sim 60 \text{ mg/L}$, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 质量浓度 $50 \sim 90 \text{ mg/L}$, P 质量浓度 $< 0.5 \text{ mg/L}$,反应器稳定运行 30 d 后,直接用于处理 1.1 中的城市生活污水,图 1 为一典型周期内主要指标($\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 、TN、COD 和 TP)浓度的变化情况。

根据反应器对氮素和 COD 的去除特征,以 5.5 h 为分界,可将该反应过程分为 2 个阶段。阶段 I 中 COD 降解速率大于阶段 II,而阶段 II 中 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 和 TN 的去除速率较小。由此可见 SBR 反应器



1—氨氮;2—亚硝酸盐氮;3—硝酸盐氮;4—总氮;
5—COD;6—总磷

图 1 SBR 反应器典型运行周期内
主要指标浓度变化情况

处理生活污水时,当有机物的降解达到一定程度后,去除速率迅速降低,氮素化合物才开始被快速去除。

SBR 系统处理生活污水时, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 和 TN 的浓度变化以及去除速率均存在明显的相关性,二者线性相关系数 $R^2 = 0.9998$ 。原因在于 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 在 SBR 反应过程中均没有明显的积累现象。这是由于 Anammox 反应将 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 以电子受体的形式代谢利用,同时产生部分 $\text{NO}_3^- - \text{N}$,而产生的 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 在有机物存在的条件下可能被异养反硝化,致使 SBR 反应器中 TN 的主要存在形式为 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 。实验出水 TN 质量浓度为 6.046 mg/L ,对于 TN 的去除率达到 92.4% ,但对于 COD 和 P 的去除率分别只有 43.6% 和 0.1% 。分析其原因,主要是由于 SBR 系统中的优势菌种为 AOB 和 Anammox 菌,这两类氨氧化菌均为自养菌,对 COD 和 P 的去除能力都有限。

上述典型运行周期中的 DO、ORP 以及 pH 等参数变化规律如图 2 所示。结合周期内上述各污染物指标浓度的变化情况分析,上述条件参数的变化同样在 5.5 h 附近分为 2 个阶段。

(上接第 47 页)

参考文献

- [1] Aziza M, Amraneb A. Commensalism during submerged mixed culture of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* on glutamate and lactate[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41: 2452 - 2457.
- [2] 薛锋,余越慧,梅博文,等.提高稠油采收率的微生物菌种实验研究[J]. *江汉石油学院学报*, 2001, 23: 121 - 122.
- [3] 吴超飞,谢波,任源,等.硝基苯好氧降解的共基质及生物协同作用[J]. *中国环境科学*, 2000, 20(3): 241 - 244.
- [4] Yang Yanhong, Zheng Yimin, Wang Buochu, et al. Research on solid-state fermentation on rice chaff with a microbial consortium[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2004, 34: 1 - 6.
- [5] Lu peng, Chen Li-jun, Li Guo-xue, et al. Influence of furfural concentration on growth and ethanol yield of *Saccharomyces kluyveri*[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19: 1528 - 1532.
- [6] Ronald M, Atlas R B. *Microbial Ecology*[M]. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, 1987.
- [7] Helle S, Cameron D, Lam J, et al. Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xylose fermentation by a genetically engineered strain of *S. cerevisiae*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33(6): 786 - 792. ■