

响应曲面法对玉米秸秆稀酸水解 还原糖条件的优化

魏 炜,孙舶洋,潘 俊,谭帅晨

(沈阳建筑大学市政与环境工程学院,辽宁 沈阳 110168)

摘 要 目的 研究玉米秸秆纤维素在稀酸水解过程中各个因素对还原糖产率的影响,并对玉米秸秆纤维素稀酸水解条件进行优化。方法 针对我国辽宁沈阳地区的农作物种植与能源需求现状,利用响应曲面设计试验方法(RSM),选择酸投加量、搅拌温度、水解时间作为试验因子,建立3因素3水平响应曲面回归模型进行分析,将还原糖产率作为响应值并进行曲面分析。结果 3个影响因子对还原糖产率均具有显著影响($P < 0.05$)。所得回归方程 R^2 值为 0.9021, $P < 0.05$, 足够精度值为 5.962, 说明模型高度显著,可以在设计范围内对响应值进行预测。模型预测最佳水解条件为温度 58.21 $^{\circ}\text{C}$, 水解时间 2.86 h, 稀酸投加量 112.55 mL。利用最佳水解条件进行验证试验,溶液总体积为 165 mL, 经过试验验证:玉米秸秆稀酸水解的还原糖产率为 60.45%, 此时,水解液中还原糖质量浓度为 0.015 g/mL。结论 搅拌温度与水解时间两因素对还原糖产率影响较为明显,该模型可以较好地预测出玉米秸秆纤维素稀酸水解的最佳反应条件与还原糖产率。

关键词 玉米秸秆;纤维素稀酸水解;响应曲面法;还原糖

中图分类号 TU391

文献标志码 A

Optimization of Corn Straw Cellulose Dilute Acid Hydrolytic into Reducing Sugar by Response Surface Methodology

WEI Wei, SUN Boyang, PAN Jun, TAN Shuaichen

(School of Municipal and Environmental Engineering, Shenyang Jianzhu University, Shenyang, China, 110168)

Abstract: The effects of various factors on the yield of reducing sugar in the process of dilute acid hydrolysis of corn stover cellulose were studied, and the hydrolysis conditions of stalk cellulose were optimized. In response to the current situation of crop planting and energy demand in Shenyang, Liaoning province, the response surface method (RSM) was utilized to design experiment.

收稿日期:2019-03-22

基金项目:国家自然科学基金项目(41072190)

作者简介:魏炜(1960—),男,教授,主要从事环境污染控制与修复、污水处理方面研究。

Acid dosage, stirring temperature and hydrolysis time were selected as experimental factors. A 3-factor 3 level response surface regression model was established and reducing sugar yield was used as response value. 3 impact factors had a significant effect on the yield of reducing sugar ($P < 0.05$), the regression equation R^2 value was 0.9021, $P < 0.05$, and the sufficient precision value was 5.962, indicating that the response value can be predicted within the design range by model. The optimum hydrolysis conditions for the model were as follows: temperatures 58.21 °C, hydrolysis time 2.86 h, dilute acid dosage 112.55 mL. The best hydrolysis conditions were used to design the verification experiment. In the verification experiment, the total volume of the solution was 165 mL, the yield of reducing sugar is 60.45%, and the concentration of reducing sugar in the hydrolysate is 0.015g/mL. Stirring temperature and hydrolysis time have a clear influence on the yield of reducing sugar. This model can predict the optimal reaction conditions and the reducing sugar yield for corn stover dilute acid hydrolysis of cellulose.

Key words: corn stover; cellulose dilute acid hydrolysis; response surface method; reducing sugar

我国是农业大国,具有丰富的秸秆资源,每年农作物秸秆总量约为 8.42 亿吨^[1].我国东北玉米是主要的农作物,随之玉米秸秆成为了东北地区的主要农作物垃圾.传统的焚烧方式处理玉米秸秆会产生颗粒烟尘对空气造成二次污染^[2].我国东北地区是老工业基地,对于燃料的需求较大,将玉米秸秆水解成还原糖发酵生物质制燃料具有广阔的应用领域.农作物秸秆的水解主要有浓酸水解、稀酸水解、酶水解 3 种方法^[3-5].酶水解的成本高,且酶的活性受限的条件较为苛刻,不适于进行大批量工业生产^[6].浓酸水解中对于设备的耐腐蚀性要求高,稍有不慎会造成设备的损坏或人员的受伤,不适于工业生产^[7].稀酸水解可以直接将秸秆中的纤维素水解成还原性单糖,且对设备耐久性没有特别要求,且反应条件没有酶水解复杂苛刻,具有很好的经济性与工业生产价值^[8].玉米秸秆纤维素的稀酸水解过程中受到多种因素的影响.而主要的影响因子有温度、稀酸投加量、水解时间、底物含量等.国内现有的纤维素稀酸水解研究多为单因素研究,没有考虑到多种因子相互影响作用的问题.响应曲面法(RSM)是一种多因素优化方法,能够通过三维图像直观地看出各个因素的最佳取值范围,在培养基筛选和优化方面应用较多,但在优化纤维素稀酸水解过程中应用较少^[9-11].笔者以

沈阳市浑南地区的玉米秸秆为原料,对玉米秸秆稀酸水解还原糖的过程进行研究,优化最佳的反应条件范围.并通过生成的模型方程和三维曲面图分析所有因变量的各自与相互间影响还原糖的水解程度.

1 试验设计及结果

1.1 试验仪器与药品

材料与药品:烘干的玉米秸秆;自配质量分数为 1.2% 的稀硫酸;BaCl₂ 溶液,按照稀硫酸投加量进行匹配;自配物质的量浓度为 1 mol/L 的氢氧化钠中和液;DNS 显色剂^[12].

试验仪器:恒温烘干箱,恒温磁力搅拌器,粉碎机,计量天平,漏斗,滤纸,250 mL 三角烧瓶,250 mL 烧杯,胶头滴管,100 mL、200 mL量筒.

水解液还原糖的测定方法:二硝基水杨酸法(DNS 法).

1.2 试验方法

1.2.1 玉米秸秆

(1)玉米秸秆的预处理

试验用的玉米秸秆取自辽宁省沈阳市浑南农村地区,首先将秸秆截断成长 10 cm,在恒温烘干箱中 80 °C 烘干 12 h,再将烘干的干燥秸秆截成 2 cm 小段放入粉碎机粉碎 5 min,得到粉碎的秸秆颗粒.

(2) 秸秆颗粒的水解方法

将粉碎后的秸秆颗粒用计量天平称取 4 g 于 250 mL 烧杯中,并加入 1.2% 质量分数的稀硫酸溶液,加水补齐至 200 mL,防止因液体过少恒温搅拌时挥发干烧. 再将烧杯放置于恒温磁力搅拌器上,根据不同温度和水解时间进行搅拌. 搅拌后冷却至室温沉淀.

(3) 秸秆水解液的 SO_4^{2-} 预处理

将冷却至室温的秸秆水解液静置 1 h,待秸秆颗粒完全沉淀至底部后抽取上清液置于 250 mL 三角烧瓶中,然后将底层水解液和秸秆颗粒的固液混合物也过滤至三角烧瓶中,再加入 50 mL BaCl_2 溶液,以去除溶液中的硫酸根离子,钡离子盐为重盐,加入的溶液需要现用现配, BaCl_2 的质量浓度计算式为

$$m = \frac{v \times 1.2\%}{98} \times 172, \tag{1}$$

$$c = \frac{m}{50}. \tag{2}$$

式中: m 为理论求得应加入的 BaCl_2 质量, g; v 为水解过程中加入的稀硫酸体积, mL; c 为计算求得加入的 BaCl_2 溶液质量浓度.

将 50 mL 的 BaCl_2 溶液加入三角烧瓶后震荡混匀,并静置 1 h 待钡离子与硫酸根离子完全沉淀至底部,再次抽取上清液置于 250 mL 烧杯中,然后将底层的 BaSO_4 沉淀和水解液的固液混合物也过滤至三角烧瓶中,再量取烧杯中水解液的总体积.

(4) 秸秆水解液的 pH 预处理

水解液的 pH 值大小对于 DNS 法测量还原糖质量浓度的准确度有较大的影响. 当溶液的 pH 为 6.5 ~ 7.5 时测量最为准确.

将除去 SO_4^{2-} 的水解液抽取一定体积,并向该体积的溶液中缓慢滴加 1 mol/L 的 NaOH 溶液将其 pH 值调整至 7.0 左右,并再次量取中和后的溶液体积.

(5) 还原糖质量浓度测定与秸秆水解率的计算

取中和后的溶液 1 mL 至 25 mL 比色管

中并稀释至 20 mL,将稀释后的溶液用 DNS 法测量其还原糖质量浓度. 称取的 4 g 秸秆的还原糖水解率的计算式为

$$\omega = \frac{r \times 20 \times k \times \frac{s}{q}}{1\,000 \times 4}. \tag{3}$$

式中: ω 为秸秆水解率; r 为 DNS 法测得的稀释 20 倍的还原糖质量浓度, mg/mL; k 为已除去 SO_4^{2-} 的水解液总体积, mL; q 为抽取待调节 pH 值的水解液体积, mL; s 为已调节 pH 值至 7 左右的水解液体积, mL.

1.2.2 响应曲面试验设计

设计 3 个因素的响应曲面试验方案,采用 Box-Behnken-Design, BBD 试验,试验的 3 个因变量因素分别为搅拌温度 A 、水解时间 B 、稀酸投加量 C . 并探究其在玉米秸秆酸水解过程中对于还原糖产率的影响^[13-15]. BBD 试验因素与水平如表 1 所示.

表 1 BBD 试验因素与水平

Table 1 Box-Behnken design experimental factor and level table

水平	因素		
	$A/^{\circ}\text{C}$	B/h	C/mL
-1	30	1	50
0	55	2	100
1	80	3	150

BBD 试验中试验次数 N 的计算式为

$$N = 2k(k - 1) + C_0. \tag{4}$$

式中: k 为影响因子个数; C_0 为中心点个数.

在表 1 的 3 因素试验设计中,中心点数量有 5 个,试验组数总共 17 组. 表 2 为按照 BBD 试验的试验结果及预测值试验因素水平,将其录入软件,获取还原糖水解率预测值和真实值. 并通过使用 Design-Expert version 8.0.6 软件先对试验所得的结果进行回归分析,利用决定系数的大小关系来评价回归方程的拟合情况^[16]. 回归方程的显著性水平和各项因子的影响通过方差分析来进行检验. 最终做出等高线图,并由等高线图来分析各个因素对还原糖水解率的影响和各个因素

之间的相互影响. 最终在等高线图中找出最佳的水解条件范围以及响应值, 预测出最佳试验方案并进行试验验证.

表2 BBD 试验结果及预测值试验因素水平
Table 2 BBD experimental design results and predicted values

试验 编号	A/℃	B/h	C/mL	还原糖水解率	
				真实值	预测值
1	55	2	100	0.630 000	0.676 000
2	80	1	100	0.332 304	0.347 207
3	55	1	50	0.310 845	0.362 308
4	30	1	100	0.280 000	0.322 066
5	55	1	150	0.342 380	0.233 945
6	80	2	150	0.380 000	0.473 530
7	55	2	100	0.670 000	0.676 000
8	80	2	50	0.389 180	0.322 812
9	30	2	50	0.516 722	0.423 191
10	55	2	100	0.700 000	0.676 000
11	55	3	50	0.360 000	0.468 434
12	55	2	100	0.650 000	0.676 000
13	30	2	150	0.247 845	0.314 212
14	55	3	150	0.690 000	0.638 536
15	80	3	100	0.648 960	0.606 893
16	30	3	100	0.588 000	0.573 096
17	55	2	100	0.730 000	0.67 6000

1.3 回归方程结果分析

模型的回归方程:
$$y_i = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

($i = 1, 2, \dots, k; j = 1, 2, \dots, k; i \neq j$) . (5)

利用 Design-Expertversion 8. 0. 6 软件, 对所得结果进行多元回归拟合, 除去影响较小的项, 得到调整后的回归方程:

还原糖水解率=0.676+0.014 734 625×A + 0.127 678 875×B + 0.010 434 75×C + 0.002 164×AB + 0.064 924 25×AC + 0.074 616 25×BC - 0.128 026 75×A² - 0.085 657 25×B² - 0.164 536 5×C². (6)

2 结果与分析

2.1 回归方程方差分析

对回归方程进行方差分析, 确定各因子

影响及显著性水平. 回归系数的显著与否通过 P 值的大小来进行检验, 试验选择的因变量之间的相关程度大小的显著性越高 P 值越小^[17-18]. 在 3 因素试验中, 选择 $P < 0. 05$ 作为确定每个影响因子或两个影响因子之间对整个回归模型的显著性大小的评价标准.

整个模型的 F 值为 4. 87, F 值越大说明处理之间效果越发明显, P 值为 0. 024 5, 小于 0. 05, 说明该模型的是显著的. 其中 B 的 P 值同样低于 0. 05. 而 C 与 A 的 P 值均在 0. 6 至 0. 8, 说明水解时间为显著性的影响因子, 而温度与稀酸投加量两因素并不显著. 因此, 可以得出搅拌温度与稀酸投加量的增加并不利于还原糖产率的提高, 而水解时间的增加能够有效提升水解还原糖的产率, 效果呈线性提升. 笔者进一步分析每个二次项的 P 值大小, 可得出结论: 搅拌温度与水解时间两因素对于水解还原糖产率的提升有显著的积极作用, 而稀酸投加量因素对其影响并不显著. 模型拟合度的好坏也是重要的环节, 若 F 值在 5% 水平以上 ($P < 0. 05$), 则说明模型显著且合适, 同时还可以对模型中各个因变量对响应值的影响进行准确的解释与分析^[19-20]. 试验模型的 F 值大小为 4. 78, P 值大小为 0. 024 5 且小于标准值, 说明试验模型是显著且合适的. 水解还原糖产率受选择的影响因子的变化情况可以通过该模型进行研究.

模型的拟合度好坏通过方程的决定系数 R^2 来进行评判(见表 3). R^2 的取值为 0 ~ 1, 拟合度越高的方程其 R^2 值大小越接近于 1. 试验的回归方程的 R^2 值大小为 0. 902 1. 该模型的调整 R^2 值为 0. 884 8, 与 R^2 值相差并不大, 说明该模型的显著性很高. 同时, 通过预测 R^2 值来进行评价. 试验回归模型的预测 R^2 值为 0. 892 8, 与调整 R^2 值仅相差 0. 008. 说明该模型对于数据的预测能力是较为准确的.

表3 决定系数 R^2 值

Table 3 Coefficient R^2 value

R^2 值	调整 R^2 值	预测 R^2 值	足够精度值
0.902 1	0.884 8	0.892 9	5.962

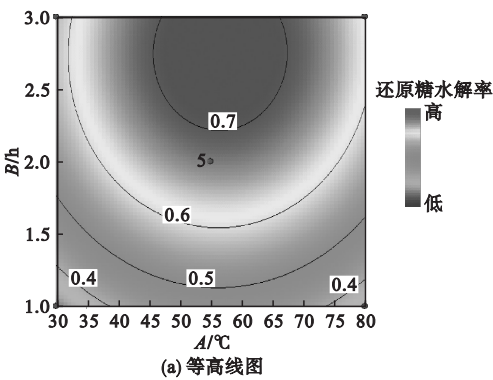


图1 水解时间与搅拌温度对还原糖水解率影响

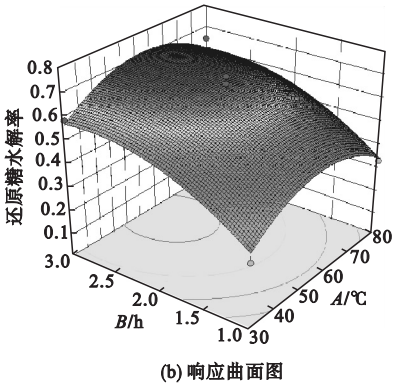
Fig. 1 Effect of hydrolysis time and stirring temperature on hydrolysis rate of reducing sugar

从图1可知,当搅拌温度低于45℃或高于65℃时,还原糖的水解率偏低并且受到温度的变化影响较小,在45~65℃为最佳搅拌温度;在整个图中还可以看出还原糖的水解率随着水解时间的增大而逐渐升高,在前期的1~1.6 h内有明显的增高趋势,且水解率增高的速率在短时间内很快.在1.6 h后水解率变化速度开始减慢但仍在增加.这是由于在前期玉米秸秆的粉碎预处理使得秸秆的比表面积增大能够充分与稀酸进行水解反应,并且秸秆中的主要成分为纤维素与半纤维素,纤维素由葡萄糖构成但化学键排布紧密在短时间内难以水解,而半纤维素主要由

2.2 还原糖产率的响应曲面分析

2.2.1 搅拌温度和水解时间的影响

图1为水解时间与搅拌温度对还原糖水



(b) 响应曲面图

阿拉伯糖、木糖、果糖和少量葡萄糖构成化学键排布较为松散,在短期内易于水解,所以在反应的前1.6 h还原糖的水解来源内主要来源于半纤维素且还原糖水解率提升速度较快.而在1.6 h后秸秆颗粒中的半纤维素已基本全部水解成还原糖,此时还原糖的主要来源多为纤维素中的葡萄糖,由于纤维素难以水解造成后期水解率提升速度较慢.可以看出当搅拌温度处于45~65℃,水解时间处于2.1~3 h时可以获得较高的还原糖.

2.2.2 搅拌温度和稀酸投加量的影响

图2为稀酸投加量与搅拌温度对还原糖水

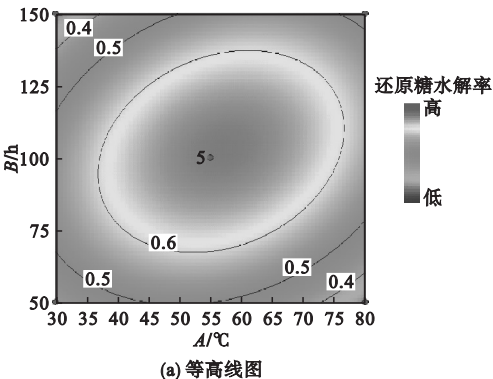
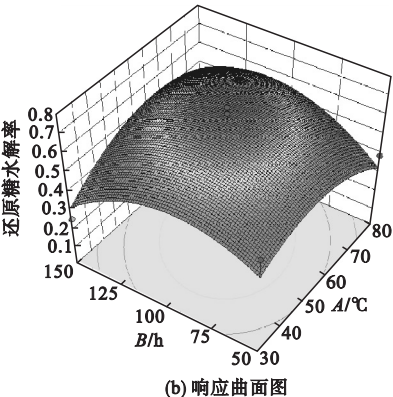


图2 稀酸投加量与搅拌温度对还原糖水解率影响

Fig. 2 Effect of acid addition and temperature on the hydrolysis rate of reducing sugar



(b) 响应曲面图

从图2可以看出,在温度与稀酸投加量的两个因素的共同作用下对于还原糖的产率的提升并没有明显的影响,温度因素在大区域内对于还原糖水解率并没有明显提升,稀酸对于提升还原糖水解率的最佳投加量为90~130 mL.

2.2.3 稀酸投加量和水解时间的影响

图3为稀酸投加量与水解时间对还原糖水解率影响的等高线图与响应曲面图.从图3可知,还原糖水解率随着水解时间的增加

而逐渐增大,在1.6 h前增大速度较快,在1.6 h后期增大速度开始减慢,而水解率的变化受稀酸投加量的影响较为明显,在稀酸投加量处于90~130 mL时为水解率最高,当稀酸投加量多出130 mL时水解率反而开始降低,这说明虽然稀酸可以将玉米秸秆中的纤维素与半纤维素水解成各类还原糖,但水解环境的酸碱度对其有重要影响,若加入的稀酸量过多会导致水解环境的pH值过低,反而对纤维素半纤维素的水解有抑制作用.

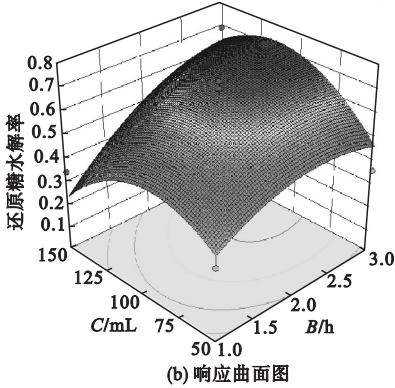
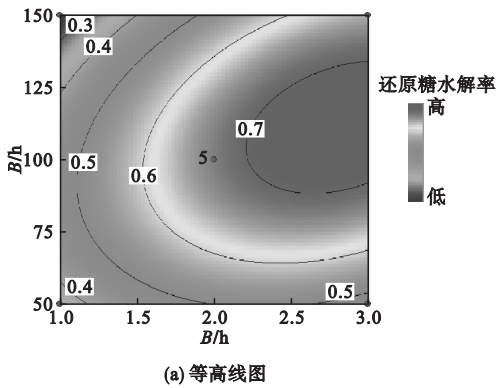


图3 稀酸投加量与水解时间对还原糖水解率影响

Fig. 3 Effect of acid addition and reaction time on the hydrolysis rate of reducing sugar

2.3 最佳水解条件及验证试验

通过 Design-Expert 分析结果可知,模型预测的还原糖产率为 64.49%,所对应的最佳水解条件为温度 58.21 ℃,水解时间 2.86 h,稀酸投加量 112.55 mL. 利用最佳水解条件进行验证试验,溶液总体积为 165 mL,经过试验验证:玉米秸秆稀酸水解的还原糖产率为 60.45%,此时,水解液中还原糖质量浓度为 0.015 g/mL,与模型预测值相差不大,而且 3 个最佳条件都处于响应曲面的最佳范围内,预测最佳条件与最佳响应范围如表 4 所示. 模型预测结果说明回归方程能比较真实地反映各影响因子对还原糖产率的影响,试验值与预测值拟合度较好,该模型是显著有效的. 因此,利用 BBD 试验建立的响应曲面模型能够找到秸秆纤维素稀酸水解的最佳反应条件.

表 4 预测最佳条件与最佳响应范围

Table 4 Predictive table of best condition and best response range

模型预测结果	A/℃	B/h	C/mL
最佳响应范围	45~65	2.1~3	90~130
预测最佳条件	58.21	2.86	112.55

3 结 论

- (1)利用 BBD 试验方法,进行响应曲面试验,得到显著有效的回归模型. 所得回归方程 R^2 值为 0.902 1, $P < 0.05$, 足够精度值为 5.962,说明模型高度显著,可以在设计范围内对响应值进行预测.
- (2)利用此模型预测出稀酸水解玉米秸秆纤维素的还原糖产率为 64.49%,所对应的最佳水解条件为搅拌温度 58.21 ℃,水解时间 2.86 h,稀酸投加量 112.55 mL. 利用最

佳水解条件进行验证试验,溶液总体积为165 mL,经过试验验证:玉米秸秆稀酸水解的还原糖产率为60.45%,此时,水解液中还原糖质量浓度为0.015 g/mL.

(3)对还原糖产率影响较为明显的为搅拌温度与水解时间两因素.该模型能比较真实地反映各因素对还原糖产率的影响.

参考文献

- [1] 陈小翠,张增强,吴浩豪,等.微波辅助餐饮废物酸法水解条件研究[J].环境科学研究,2009,22(2):254-260.
(CHEN Xiaocui, ZHANG Zengqiang, WU Haohao, et al. Microwave-assisted acid hydrolysis of kitchen waste to Monosaccharide [J]. Research of environmental sciences, 2009, 22(2): 254-260.)
- [2] OBEROI H S, VADLANI P V. Enhanced ethanol production from kinnow mandarin (citrus reticulata) waste via a statistically optimized simultaneous saccharification and fermentation process [J]. Bioresource technology, 2011, 102(2): 1593-1601.
- [3] 张伟,林燕,刘妍,等.利用秸秆制备燃料乙醇的关键技术研究进展[J].化工进展,2011,30(11):2417-2423,2432.
(ZHANG Wei, LIN Yan, LIU Yan, et al. Research progress in the crucial techniques of fuel ethanol production from stalks [J]. Chemical industry and engineering progress, 2011, 30(11): 2417-2423, 2432.)
- [4] DIASAA, FREITASGS, MARQUESGSM, et al. Enzymatic saccharification of biologically pretreated wheat straw with white-rot fungi [J]. Bioresource technology, 2010, 62(11): 3256-3262.
- [5] TILMAN D, SOCOLOW R, FOLEY J A, et al. Beneficial biofuels: the food, energy, and environment trilemma [J]. Science, 2009, 325(5938): 270-271.
- [6] SEARCHINGER T, HEIMLICH R, et al. Use of US croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change [J]. Science, 2008, 319(5867): 1238-1240.
- [7] WANG M, WU M, HUO H. Life cycle energy and greenhouse gas emission impacts of different corn ethanol plant types [J]. Environmental research letters, 2007, 2(2): 024001.
- [8] TURON X, ROJASO J, DEINHAMMER R S. Enzymatic kinetics of cellulose hydrolysis: A QCM-D study [J]. Langmuir, 2008, 24(8): 3380-3387.
- [9] LIN Y, TANAKA S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2006, 69(6): 627-642.
- [10] SUN Y, CHENG J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review [J]. Cheminform, 2003, 83(1): 1-11.
- [11] 金强,张红漫,严立石,等.生物质半纤维素稀酸水解反应[J].化学进展,2010,22(4): 654-662.
(JIN Qiang, ZHANG Hongman, YAN Lishi, et al. Dilute acid hydrolysis reaction of biomass hemicellulose [J]. Progress in chemistry, 2010, 22(4): 654-662.)
- [12] EZEJI T, QURESHI N, BLASCHEK H P. Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on clostridium beijerinckii growth and butanol fermentation [J]. Biotechnology bioengineering, 2007, 97(6): 1460-1469.
- [13] MAGHSOODI V, RAZAVI J, YAGHMAEI S. Solid state fermentation for production of chitosan by *Aspergillus niger* [J]. International journal engineering transactions B: applications, 2009, 22(1): 1-6.
- [14] DHILLON G S, KAUR S, BRAR S K, et al. Green synthesis approach: extraction of chitosan from fungus mycelia [J]. Critical reviews biotechnology, 2013, 33(4): 379-403.
- [15] 窦畅,徐晴,宋萍,等.米根霉利用木糖与葡萄糖的代谢差异[J].微生物学报,2011,51(4): 468-473.
(DOU Chang, XU Qing, SONG Ping, et al. Metabolism of *Rhizopus oryzae* with xylose or glucose as carbon resource [J]. Acta microbiologica Sinica, 2011, 51(4): 468-473.)
- [16] TAI C, LI S, XU Q, et al. Chitosan production from hemicellulose hydrolysate of corn straw: impact of degradation products on *Rhizopus oryzae* growth and chitosan fermentation [J]. Letters in applied microbiology, 2010, 51(3): 278-284.
- [17] CHATTERJEE S, CHATTERJEE S, CHATTERJEE B P, et al. Enhancement of growth and chitosan production by *Rhizopus oryzae* in whey medium by plant growth hormones [J]. International journal biological macromolecules, 2008, 42(2): 120-126.
- [18] YAN L, ZHANG H, CHEN J, et al. Dilute sulfuric acid cycle spray flow-through pretreatment of corn stover for enhancement of sugar recovery [J]. Bioresource technology, 2009, 100(5): 1803-1808.
- [19] SIKKEMA J, DE BONT J. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons [J]. Microbiol rev, 1995, 59(2): 201-222.
- [20] ZALDIVAR J, MARTINEZ A, INGRAM L O. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* [J]. Biotechnology bioengineering, 1999, 65(1): 24-33.
(责任编辑:徐玉梅 英文审校:唐玉兰)