

纤维素酶调控预处理对 MFC 膜包装性能的影响

牛袁袁, 张正健, 高萌, 张启莲

(天津科技大学 中国轻工业食品包装材料与技术重点实验室, 天津 300222)

摘要: **目的** 提高纤维素酶预处理效率, 改善微纤化纤维素 (MFC) 薄膜的性能。 **方法** 以漂白桉木硫酸盐浆为原料, 通过分别添加阳离子聚合物聚二甲基二烯丙基氯化铵 (PDADMAC) 和聚丙烯酰胺 (CPAM) 来调控纤维素酶的酶活性 (Cx 酶活性), 并对比分析阳离子种类和添加量对 MFC 薄膜拉伸性能、透氧性能、透光性能的影响。 **结果** 高电荷量、低分子量的 PDADMAC 对酶活性的提升作用较大, 提高了酶的预处理效率; 高分子量、高电荷量的 CPAM 虽然降低了酶活性, 但在一定程度上有效控制了酶在无序形区的过度水解, 有利于薄膜力学性能、阻隔性能的提高。 **结论** 添加阳离子聚合物能够提高纤维素酶的 Cx 酶活性, 进而提高纤维素酶对漂白桉木硫酸盐浆的预处理效率, 最终获得性能优良的 MFC 薄膜产品。

关键词: 纤维素酶; 调控; 阳离子聚合物; MFC 薄膜

中图分类号: TB484.3 文献标识码: A 文章编号: 1001-3563(2020)09-0109-08

DOI: 10.19554/j.cnki.1001-3563.2020.09.016

Effect of Cellulase-regulated Pretreatment on Packaging Performance of MFC Film

NIU Yuan-yuan, ZHANG Zheng-jian, GAO Meng, ZHANG Qi-lian

(Key Laboratory of Food Packaging Materials and Technology in China Light Industry, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300222, China)

ABSTRACT: The work aims to improve the pretreatment efficiency of cellulase and the performance of microfibrillated cellulose (MFC) film. With bleached eucalyptus sulfate pulp as raw material, the activity of cellulase (Cx activity) was regulated by respectively adding cationic polymers polydimethyl diallyl ammonium chloride (PDADMAC) and polyacrylamide (CPAM). The effects of cationic types and dosage on the tensile strength, oxygen permeability and light transmittance of MFC film were compared and analyzed. PDADMAC with high charge amount and low molecular weight had a greater effect on the improvement of enzyme activity, which improved the pretreatment efficiency of the enzyme. Although CPAM with high molecular weight and high charge amount reduced the enzyme activity, to a certain extent, it effectively controlled the excessive hydrolysis of the enzyme in the amorphous region, which was beneficial to the enhancement of the mechanical properties and barrier properties of the film. The cationic polymers added can improve the Cx activity of cellulase, and thus improve the pretreatment efficiency of cellulase on bleached eucalyptus sulfate pulp, and finally obtain MFC film products with excellent performance.

KEY WORDS: cellulase; regulation; cationic polymer; MFC film

收稿日期: 2019-09-10

基金项目: 天津市自然科学基金 (18JCQNJC76800); 天津市教委科研计划 (2018KJ096, 2018KJ095); 天津市企业科技特派员项目 (19JCTPJC55200)

作者简介: 牛袁袁 (1994—), 女, 天津科技大学硕士生, 主攻功能性绿色包装材料。

通信作者: 张正健 (1981—), 男, 天津科技大学副教授, 主要研究方向为功能性绿色包装材料。

微纤化纤维素 (Microfibrillated Cellulose, MFC) 是一种直径为 1~100 nm、长度在几微米到十几微米范围内、长径比约为 100~150 的纤维素产品^[1], 呈高润胀型胶体状态。20 世纪 80 年代, Herrick^[2]和 Turbak^[3]等首次证明通过机械法可以制备出微纤化纤维素。MFC 具有可修饰性、可生物降解、绿色环保、可原料再生、回收利用容易等特点^[4-6], 被广泛应用于复合材料、生物材料、涂层涂料、食品医疗、化妆品以及包装和印刷等领域^[7-9]。纤维素酶预处理纤维制备 MFC 的过程是较为环保的, 酶预处理能够使纤维润胀并促进纤维的切断, 从而造成细小纤维和纤维碎片的产生, 在均质化处理过程中可减少均质机的堵塞, 降低后续处理过程中的能量消耗。Vasconcellos 等^[10]研究发现, 添加 Mn^{2+} 离子能够提高内切纤维素酶的活性、热稳定性和吸附效率, 减少无效吸附, 酶作用效率提高了 34%。邓雪燕^[11]基于提高内切酶活性, 抑制外切酶活性的目的, 通过改变 $CaCl_2$ 的含量控制还原糖的产生量, 进而纳米纤维素的产率提高。纤维素和纤维素酶均带有负电荷, 由于静电排斥作用, 使得纤维素酶在纤维素纤维上的吸附减少。Hubbe 等^[12]发现阳离子聚丙烯酰胺具有正电荷, 作为有效的助留剂已被应用于造纸领域, 可基于桥接/修补改善纤维素酶在纤维素纤维上的吸附性能。文中针对纤维素酶, 拟通过添加阳离子聚合物, 调控预处理作用, 从而制备不同性质的 MFC 薄膜; 然后对所制备膜的力学、透光和阻隔等方面的性能进行深入探究, 以揭示阳离子聚合物在调控纤维素酶预处理方面的作用及对 MFC 薄膜包装性能的影响。

1 实验

1.1 材料

主要材料: 漂白桉木硫酸盐浆, 化学浆, 江苏芬欧汇川纸业有限公司; 纤维素酶, R 酶, 诺维信 (中国) 生物技术有限公司; 聚二甲基二烯丙基氯化铵 (I), KN-1001, 中山市科南精细化工有限公司; 聚二甲基二烯丙基氯化铵 (II), PF-30, 杭州绿兴环保材料有限公司; 聚丙烯酰胺 (I), 阳离子, 天津市浩宇助剂有限公司; 聚丙烯酰胺 (II), 阳离子, 天津市浩宇助剂有限公司。

1.2 仪器设备

实验仪器: 瓦利打浆机, T2505, 日本 KUMAGAI RIKI KOGYO 公司; PFI 磨浆机, P40110.E000, 奥地利 PTI 公司; 电动搅拌器, S312900, 上海市申胜生物技术有限公司; 高压均质机, AH-1000 ATS, 加拿大 Engineering Limited 公司; 鼓风干燥箱, DHG-9203A, 上海一恒科学仪器有限公司; 透光率/雾度测定仪, WGT-S, 济南百戈实验仪器有限公司; 扫描电镜,

JSM-IT300LV, 日本日立公司; 气体透过仪, GDP-C, 德国布鲁格公司; PFI 磨浆机, P40110.E000, 奥地利 PTI 公司。

1.3 方法

1.3.1 酶活性测定

Cx 酶活性反映内切葡萄糖苷酶活性, 指在一定温度和 pH 值时, 1 mL 酶液在 1 min 内水解质量分数为 1% 的羧甲基纤维素钠 (CMC) 溶液产生 1 μ g 葡萄糖所需要的酶用量, 代表 1 个内切酶活性单位。Cx 酶活性的测定方法: 以 1.5 mL 的质量分数为 1% CMC 溶液为底物, 加入 0.5 mL 稀释一定倍数的酶液于比色管中, 将其放入温度为 50 $^{\circ}$ C 的水浴锅内反应 30 min, 取出后立即加入 3 mL 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 终止反应; 沸水浴显色 5 min, 取出后立即冷却, 然后加入蒸馏水定容至 25 mL, 利用紫外分光光度计于 530 nm 的波长条件下测定吸光度。通过实验测得 530 nm 处的吸光度值, 查对葡萄糖标准曲线, 可以确定反应中葡萄糖的产量, 确定出酶的活力。

1.3.2 酶调控预处理制备 MFC

为了提高纤维素酶的吸附性能和作用效率, 通过改变外部条件 (如阳离子聚合物的种类和浓度) 调控其对纤维的吸附性能, 从而达到提高纤维素酶作用效率的目的。通过添加阳离子聚合物的种类和浓度调控纤维素酶活性示意图 1。

漂白桉木硫酸盐浆经蒸馏水浸泡一定时间后, 通过瓦利前打浆处理、阳离子调控纤维素酶预处理、PFI 后打浆处理、高压均质处理, 最终制得 MFC, 具体操作流程见图 2。

将绝干漂白的桉木硫酸盐纸浆放入瓦利打浆机中进行疏解和打浆处理, 至打浆度为 30 $^{\circ}$ SR。称取纸浆, 加入一定量 pH 值为 4.8 的缓冲溶液, 然后加入一定量的阳离子聚合物和稀释的纤维素酶溶液并搅拌均匀, 配置出质量分数为 10% 的浆料。将混合好的浆料倒入塑料密封袋中, 放入 50 $^{\circ}$ C 水浴锅中保温 16 h。将浆料置于 80 $^{\circ}$ C 下灭活 30 min, 随后对纸浆洗涤抽滤, 最后将抽滤后的浆料与去离子水配成质量分数为 10% 的浆料保存备用^[13-14]。利用 PFI 磨浆机对纸浆进行后续打浆处理, 配成质量分数为 1% 的浆料, 并超声分散 10 min, 随后采用高压均质机对其进行机械处理, 最终制得 MFC, 放在冰箱中冷藏备用。阳离子聚合物的分子量、分子结构见表 1。

1.3.3 MFC 薄膜的性能测试

采用有机玻璃板 (20 cm \times 20 cm) 浇铸成膜, 成膜温度为 45 $^{\circ}$ C, 薄膜厚度为 (38 \pm 3) μ m。首先称取绝干质量为 2 g 的 MFC 超声 30 min, 并加入 0.300 g 丙三醇; 将 MFC 和丙三醇混合均匀后, 再超声分散

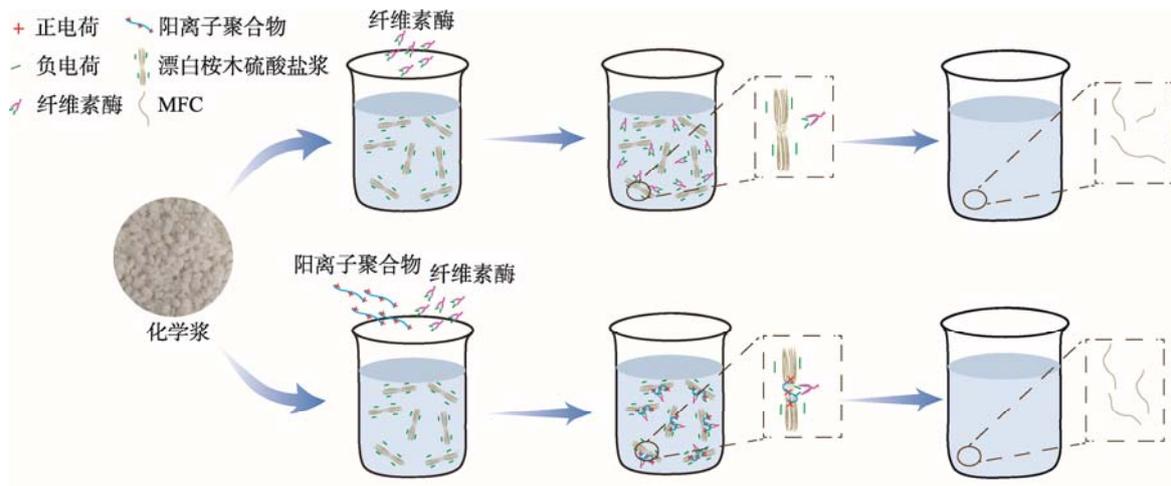


图 1 添加阳离子聚合物调控纤维素酶活性的示意

Fig.1 Schematic diagram of cationic polymers added to regulate cellulase activity

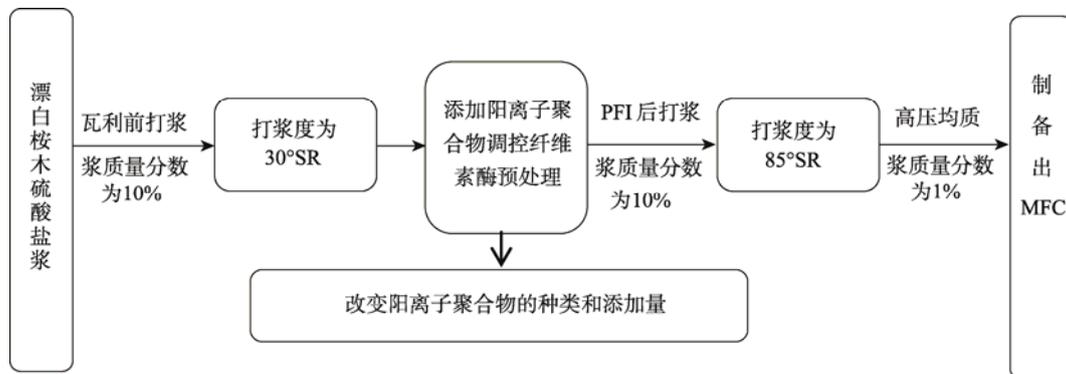


图 2 MFC 的制备过程

Fig.2 MFC preparation process

表 1 阳离子聚合物的分子量、分子结构

Tab.1 Molecular weight, molecular structure of cationic polymers

阳离子聚合物	分子量/ku	分子结构
PDADMAC (I)	40~60	
PDADMAC (II)	3~5	
CPAM (I)	2000~3000	
CPAM (II)	200~400	

20 min；之后将其缓慢倒入有机玻璃板上，置于温度为 45 °C 的恒温恒湿箱中，彻底干燥后取下 MFC 薄膜，用于后续性能测试。

根据 GB/T 1038—2000^[15]，使用万能材料试验机对 MFC 薄膜的力学性能进行测试；将样品裁剪成长宽为 15 cm×1 cm 的试样，用标准厚度仪进行测量，求得平均值即 MFC 薄膜的厚度。采用紫外分光光度计对不同波长下 MFC 薄膜的透光率进行测试；根据 GB/T 2410—2008^[16]，选取表面平整、无划痕和灰尘的薄膜，将其裁剪成 50 mm×50 mm 的方片，利用

WGT-S 透光率与雾度检测仪对薄膜的透光率与雾度进行测试。根据 GB/T 1038—2000^[17]，利用 GDP-C 气体透过仪，在温度为 23 °C、相对湿度为 50% 的条件下，对薄膜材料的氧气透过性进行测试。

2 结果与分析

2.1 阳离子聚合物的添加对酶活性的影响

不同种类阳离子聚合物添加量对纤维素酶 C_x 酶活性的影响见图 3。由图 3 可知，C_x 酶活性随着

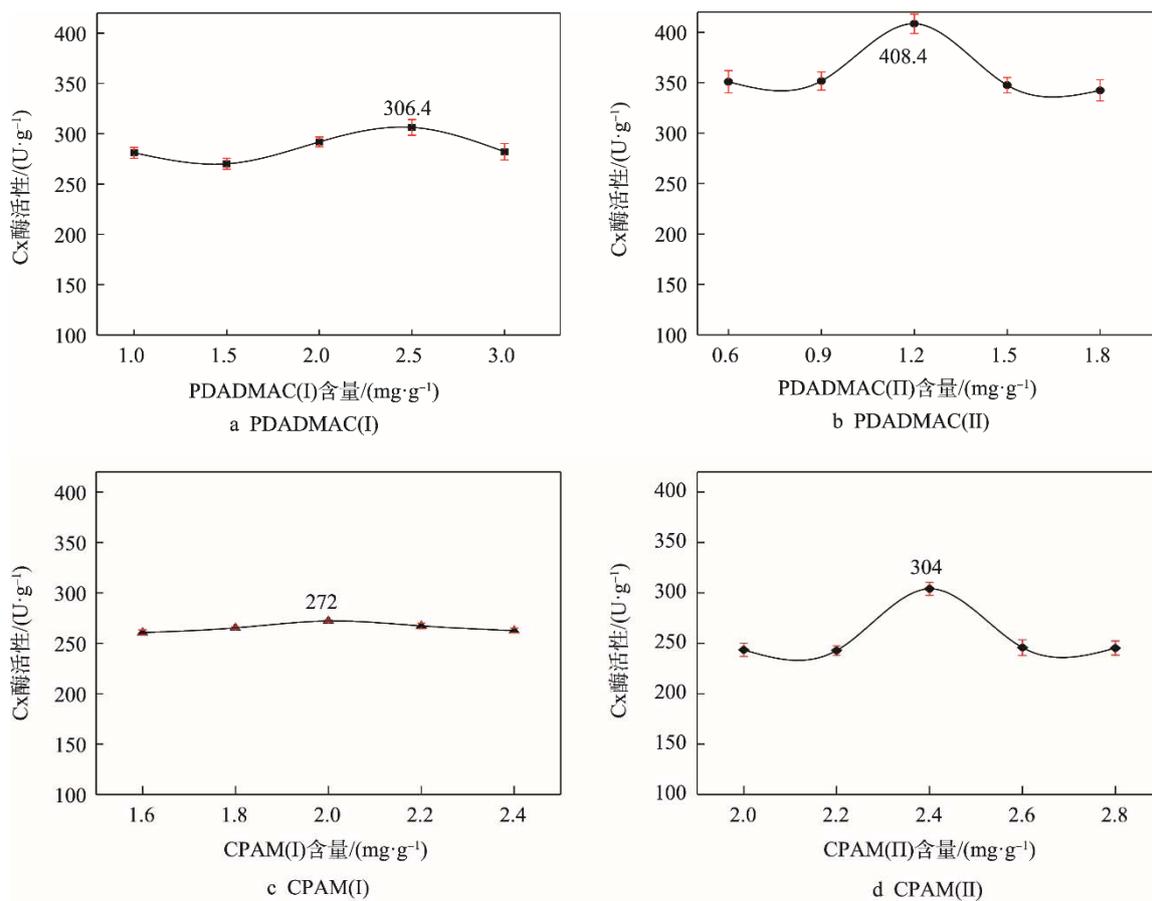


图3 不同种类阳离子聚合物添加量对纤维素酶 Cx 酶活性的影响

Fig.3 Effects of dosage of different kinds of cationic polymers on the Cx activity of cellulase

PDADMAC (I) , PDADMAC (II) , CPAM (I) , CPAM (II) 等 4 种阳离子聚合物的增加都大致呈现出先增加后减小的趋势。对 PDADMAC 阳离子而言,低分子量、高电荷量的 PDADMAC (II) 有利于 Cx 酶活性的增加;高分子量、低电荷 PDADMAC (I) 使得 Cx 酶活性有所降低。对 CPAM 阳离子而言,由于其自身所带电荷密度过小,因此使得 Cx 酶活性有所下降。这是由于阳离子聚合物的加入使得自身带负电荷的纤维素酶通过阳离子聚合物的静电吸附作用,更好地与带负电荷的纤维素底物接触,从而使酶活性提高。虽然在一定范围内,PDADMAC 分子量的增加对酶活性有促进作用,但分子量过大时,会使 Cx 酶活性下降^[18];由于 CPAM 的电荷量较小,不能与纤维素酶分子形成有效的静电吸附,且分子量越大,越不利于提高其在 CMC 表面的吸附。

2.2 阳离子聚合物的添加对 MFC 薄膜性能的影响

2.2.1 MFC 薄膜的力学性能

添加阳离子聚合物 PDADMAC(I),PDADMAC (II) , CPAM (I) , CPAM (II) 后对 MFC 薄膜拉

伸强度的影响见图 4。图 4 中的插图表示对应阳离子添加量对断裂伸长率的影响。由图 4 可知,MFC 薄膜的拉伸强度随着阳离子聚合物 PDADMAC (I) , PDADMAC (II) , CPAM (II) 的趋势变化相似,当 PDADMAC (I) 添加量为 360 mg/kg 时,薄膜的拉伸强度为 31.35 MPa,比空白样增加了 4.64%;当 PDADMAC (II) 添加量为 200 mg/kg 时,MFC 薄膜的拉伸强度为 23.35 MPa,与空白样相比,拉伸强度明显下降,降幅约为 22.06%;当 CPAM (II) 添加量为 300 mg/kg 时,薄膜拉伸强度为 26.24 MPa,相比于空白样降低了 12.42%。此外,随着阳离子聚合物 CPAM (I) 的添加,MFC 薄膜的拉伸强度呈现出先上升后下降的趋势,当 CPAM (I) 添加量为 250 mg/kg 时,拉伸强度达到最大,相对于空白样增加了 35.94%左右。由 PDADMAC (II) 调控的酶活性高,纤维水解过度,强度降低;由 CPAM (I) 调控的酶活性低,减小了纤维素酶对纤维的过度水解,MFC 薄膜的拉伸强度相对较好。

由图 4 可知,断裂伸长率随着阳离子聚合物的增加呈现出先上升后下降的趋势。高分子量、高电荷量的 CPAM (I) 的添加使得 MFC 薄膜拉伸强

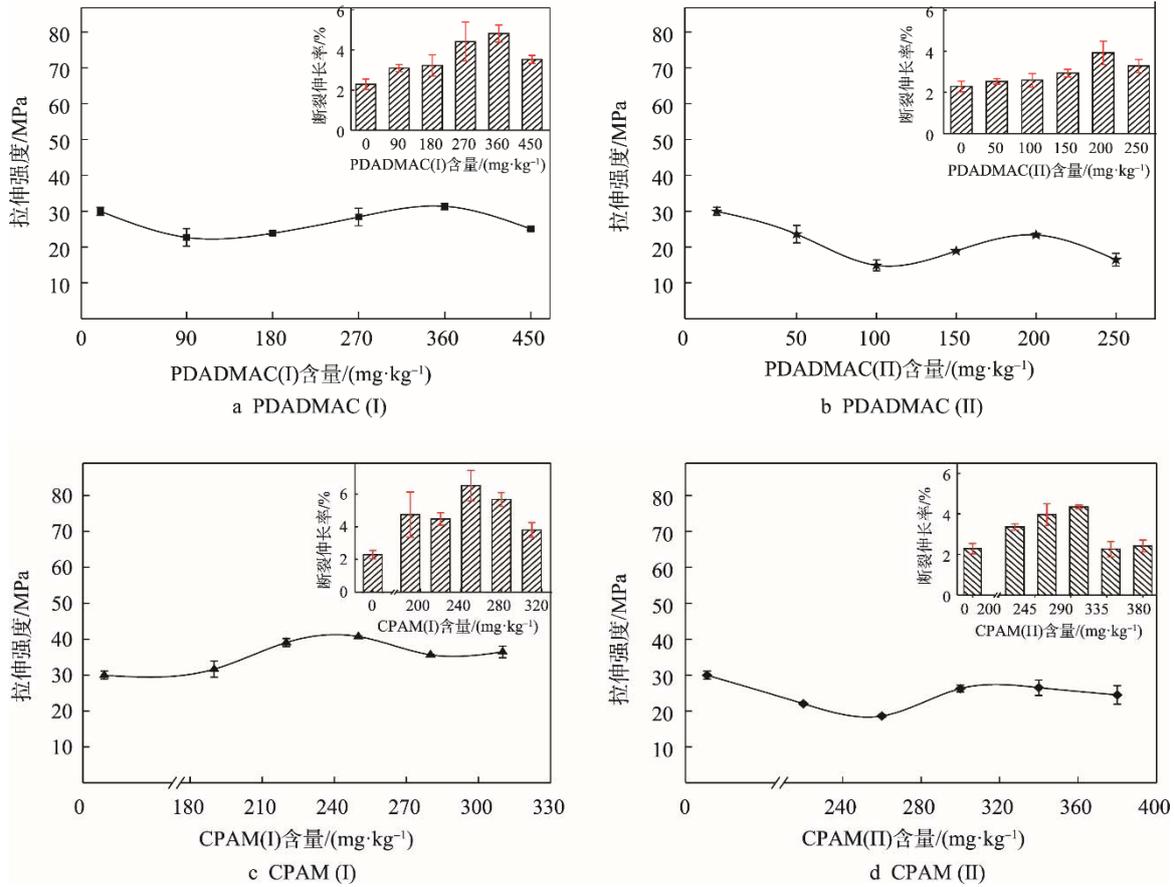


图 4 不同种类阳离子聚合物添加量对 MFC 薄膜拉伸强度和断裂伸长率的影响

Fig.4 Effects of dosage of different kinds of cationic polymers on tensile strength and elongation at break of MFC film

度、断裂伸长率大幅度增加，这是因为最初阳离子聚合物的加入有利于 MFC 悬浮液的牵连，增强纤维间的结合力，形成致密的网络结构。随着阳离子聚合物的继续增加，阳离子聚合物开始辅助纤维素酶水解纤维，因此 MFC 薄膜的断裂伸长率与空白样相比明显提高，这在一定程度上可明显增加 MFC 薄膜的韧性。

2.2.2 MFC 薄膜的光学性能

添加阳离子聚合物 PDADMAC (I) , PDADMAC (II) , CPAM (I) , CPAM (II) 后对不同波长下 MFC 薄膜透光率的影响见图 5 ; 添加阳离子聚合物 PDADMAC (I) , PDADMAC (II) , CPAM (I) , CPAM (II) 后对 MFC 薄膜透光率和雾度的影响见图 6。

由图 5—6 可以看出，MFC 薄膜的透光率随着波长变大而增加；雾度与透光率呈现相反状态，MFC 薄膜的透光率越大，雾度相对较小。最初加入阳离子聚合物时，阳离子促进了纤维间的结合，有利于形成致密的网络结构；随着阳离子聚合物的继续增加，一部分阳离子聚合物用于纤维素酶对纤维的水解，剩余的阳离子聚合物则分布在纤维间，因此阳离子周围出

现纤维团聚，进而使透光率降低，雾度增大。由于 CPAM (I) 的分子量大，使得制备的 MFC 悬浮液易发生絮凝，进而影响了薄膜的透光性能。

2.2.3 MFC 薄膜的阻隔性能

添加阳离子聚合物 PDADMAC (I) , PDADMAC (II) , CPAM (I) , CPAM (II) 后对 MFC 薄膜透氧系数的影响见图 7。总体上，与空白样相比，添加 4 种阳离子聚合物制备 MFC 薄膜的透氧系数都显著增加，因此阻隔性能减弱。这是由于阳离子聚合物的加入使得纤维素分子间引入了各种阳离子基团，使酶对纤维素的处理更加充分，纤维和阳离子聚合物相对连接面积变大，因此增加了薄膜的透气性，使得阻隔性能降低。

2.3 MFC 薄膜的微观结构

添加不同阳离子聚合物前后的 MFC 薄膜的表面扫描电镜结果见图 8 , 放大倍数分别为 1000 倍和 3000 倍。分析扫描电镜结果得出，经纤维素酶处理后，纤维分丝、劈裂，可看到表面呈现棒状的纤维形态，且纤维表面包覆层发生部分剥离脱落，纤维间存在明显的交织。

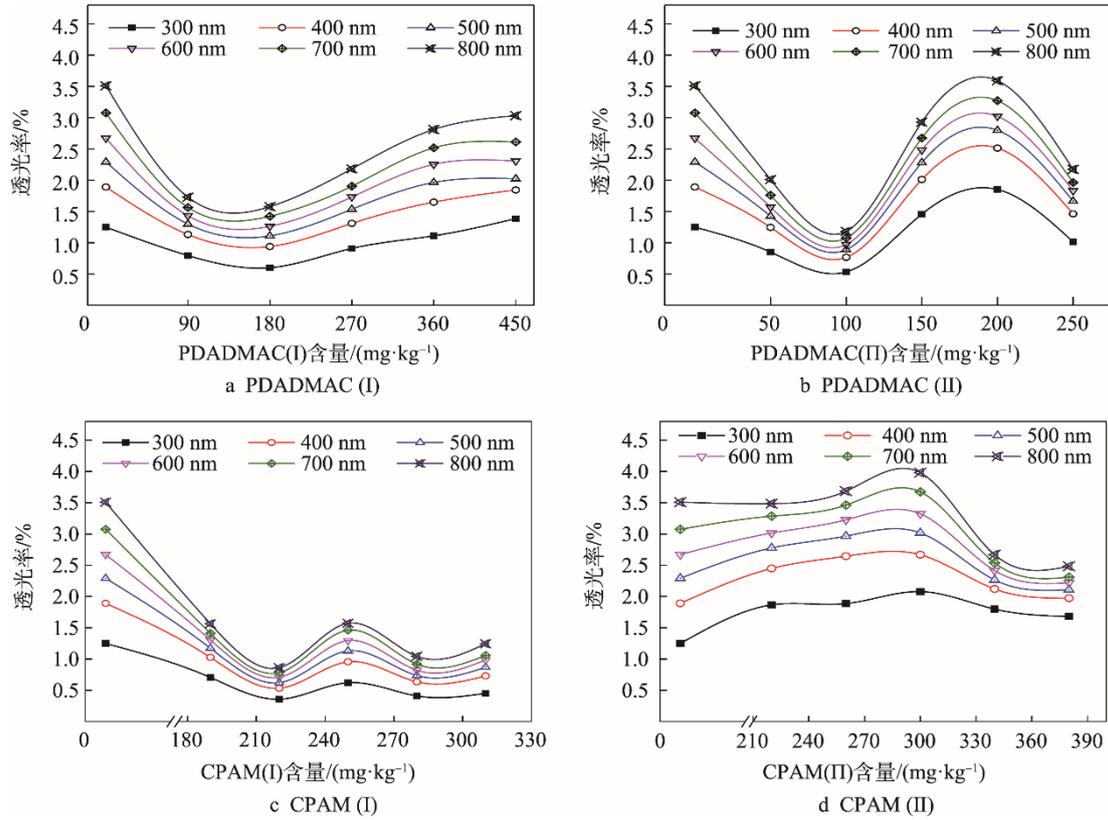


图5 不同种类阳离子聚合物添加量对MFC薄膜透光率的影响

Fig.5 Effects of dosage of different kinds of cationic polymers on the light transmittance of MFC film

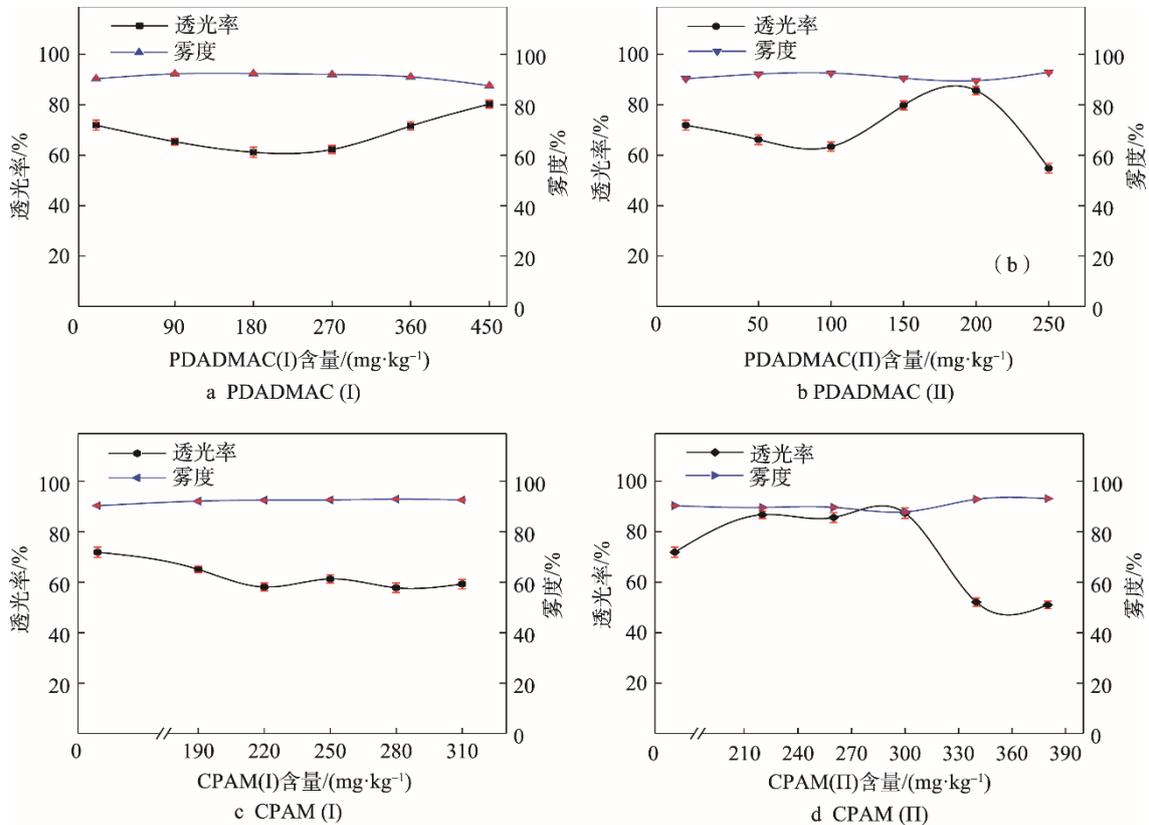


图6 不同种类阳离子聚合物添加量对MFC薄膜透光率和雾度的影响

Fig.6 Effects of dosage of different kinds of cationic polymers on the transmittance and haze of MFC film

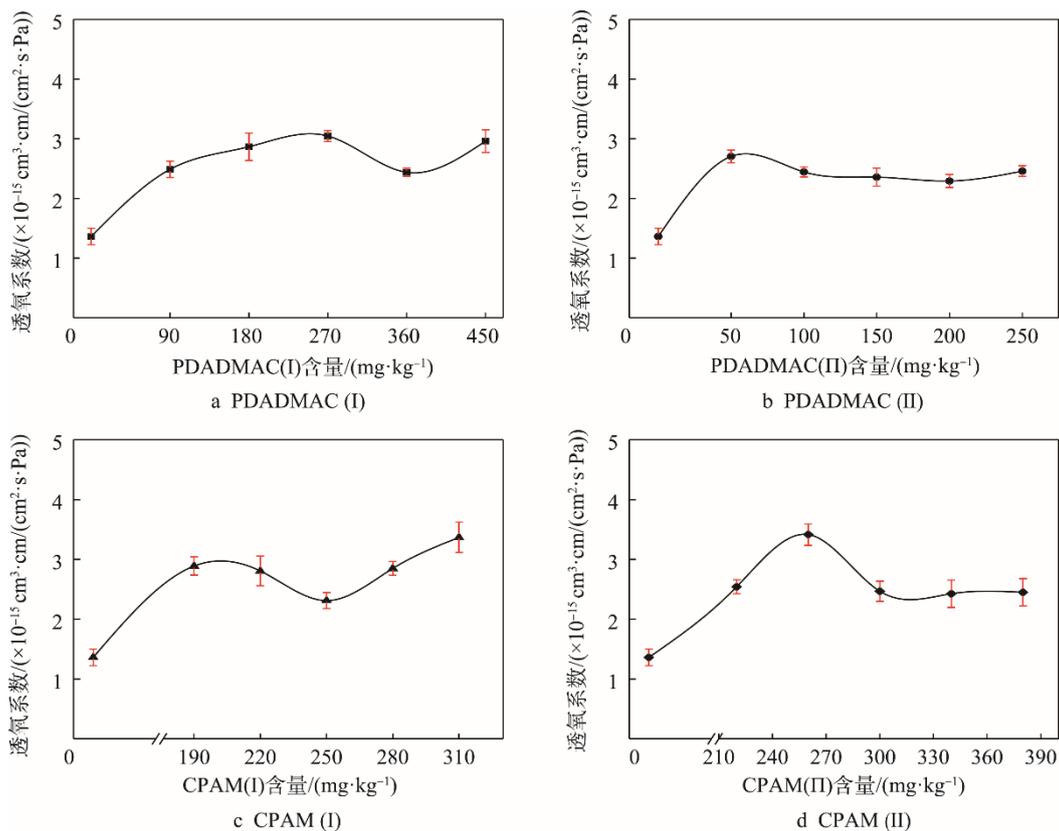


图 7 不同种类阳离子聚合物添加量对 MFC 薄膜透氧系数的影响

Fig.7 Effects of dosage of different kinds of cationic polymers on the oxygen permeability coefficient of MFC film

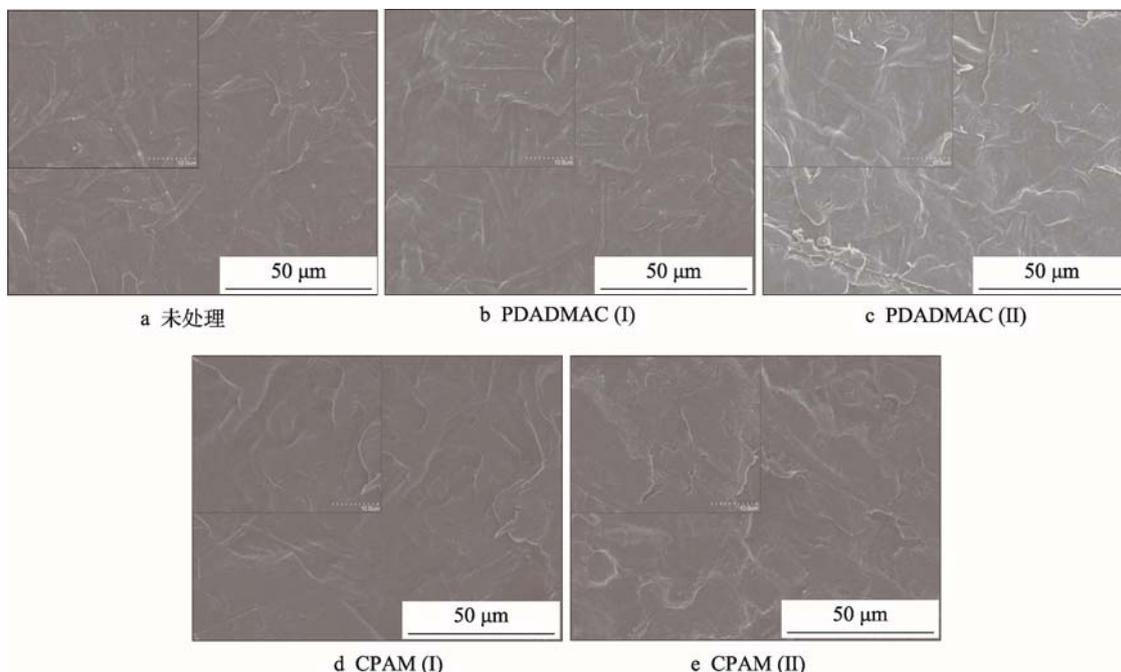


图 8 添加不同阳离子聚合物前后的 MFC 薄膜的扫描电镜结果

Fig.8 SEM images of MFC film with or without different kinds of cationic polymers

3 结语

通过比较 PDADMAC (I) , PDADMAC (II) ,

CPAM (I) , CPAM (II) 等 4 种阳离子聚合物对纤维素酶的酶活性影响,发现 PDADMAC (II) 能显著提高 CX 酶活性,其最佳添加量为 1.2 mg/g,酶活性最高为 408.4 U/g.

对 PDADMAC 而言,与低分子量、高电荷量的 PDADMAC (II) 相比,添加高分子量、低电荷量的 PDADMAC (I) 制备 MFC 薄膜的拉伸强度增大了 34.24%,断裂伸长率增大了 0.897%,透氧系数增加了 $0.146 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})$,透光性能降低了 16.45%;当添加量约为 360 mg/kg 时,PDADMAC(II) 对酶活性的提升作用较大;对 CPAM 而言,与低分子量、低电荷量的 CPAM (II) 相比,添加高分子量、高电荷量的 CPAM (I) 制备 MFC 薄膜的拉伸强度增加了 14.49 MPa,断裂伸长率增大了 2.175%,透氧系数减小了 6.32%,且阻隔性能优良,透光率降低了 29.86%;当添加量为 250 mg/kg 时,CPAM (I) 虽然降低了酶活性,但在一定程度上有效控制了酶在无定形区的过度水解,有利于薄膜力学性能、阻隔性能的提高。综上,添加高分子量的阳离子聚合物制备 MFC 薄膜的拉伸强度、断裂伸长率等性能虽然较好,但透光性能较低。此外,阳离子聚合物的高电荷量有利于制备阻隔性能较好的薄膜。

参考文献:

- [1] SVAGAN A J, SAMIR M A, BERGLUND L A, et al. Biomimetic Polysaccharide Nanocomposites of High Cellulose Content and High Toughness[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(8): 2556—2563.
- [2] HERRICK F W, CASEBIER R L, HAMILTON J K, et al. Microfibrillated Cellulose: Morphology and Accessibility[J]. *Journal of Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposium*, 1983, 37(9): 797—813.
- [3] TURBAK A F, SNYDER F W, SANDBERG K R, et al. Microfibrillated Cellulose, a New Cellulose Product: Properties, Uses and Commercial Potential[J]. *Journal of Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposium*, 1983, 37(9): 815—827.
- [4] LAVOINE N, DESLOGES I, BRAS J, et al. Microfibrillated Cellulose Coatings as New Release Systems for Active Packaging[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 103(103C): 528—537.
- [5] QIU K Y, NETRAVALI A N. Fabrication and Characterization of Biodegradable Composites Based on Microfibrillated Cellulose and Polyvinyl Alcohol[J]. *Composites Science & Technology*, 2012, 72(13): 1588—1594.
- [6] SONIA A, DASAN K P. Celluloses Microfibers (Cmf)/Poly (Ethylene-Co-Vinyl Acetate) (Eva) Composites for Food Packaging Applications: a Study Based on Barrier and Biodegradation Behavior[J]. *Journal of Food Engineering*, 2013, 118(1): 78—89.
- [7] COZZOLINO C A, NILSSON F, IOTTI M, et al. Exploiting the Nano-sized Features of Microfibrillated Cellulose (MFC) for the Development of Controlled-release Packaging[J]. *Colloids & Surfaces B-Biointerfaces*, 2013, 110(10): 208—216.
- [8] SIR I, PLACKETT D. Microfibrillated Cellulose and New Nanocomposite Materials: a Review[J]. *Cellulose*, 2010, 17(3): 459—494.
- [9] 周素坤, 毛健贞, 许凤. 微纤化纤维素的制备及应用[J]. *化学进展*, 2014, 26(10): 1752—1762.
ZHOU Su-kun, MAO Jian-zhen, XU Feng. Preparation and Application of Microfibrized Cellulose[J]. *Chemical Progress*, 2014, 26(10): 1752—1762.
- [10] VASCONCELLOS V M, TARDOIOLI P W, GIORDANO R L, et al. Addition of Metal Ions to a (Hemi) Cellulolytic Enzymatic Cocktail Produced In-house Improves Its Activity, Thermostability, and Efficiency in the Saccharification of Pretreated Sugar-cane Bagasse[J]. *New Biotechnology*, 2016, 33(3): 331—337.
- [11] 邓雪燕. 酶解法制备纳米纤维素及其还原糖含量控制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014: 35—60.
DENG Xue-yan. Control of Nanocellulose and Reducing Sugar Content by Enzymatic Hydrolysis[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014: 35—60.
- [12] HUBBE M A, SUNDBERG A, MOCCHIUTTI P, et al. Dissolved and Colloidal Substances (DCS) and the Charge Demand of Papermaking Process Waters and Suspensions[J]. *BioResources*, 2012, 7(4): 135—137.
- [13] LIU J, HU H R. Treatment of Nbkp with Cellulase to Reduce the Refining Energy Consumption in Production of Grease Proof Paper[J]. *Advanced Materials Research*, 2011, 236/237/238(8): 1379—1384.
- [14] 刘俊, 胡惠仁, 王斌斌. P-RCAPMP 酶促打浆的研究[J]. *中国造纸*, 2011, 30(3): 1—5.
LIU Jun, HU Hui-ren, WANG Bin-bin. Pulping by P-RCAPMP[J]. *China Paper Industry*, 2011, 30(3): 1—5.
- [15] GB/T 1040.3—2006, 塑料拉伸性能的测定 第 3 部分: 薄膜和薄片的试验条件[S].
GB/T 1040.3—2006, Plastics-determination of Tensile Properties Part 3: Test Conditions for Thin Films and Thin Sections[S].
- [16] GB/T 2410—2008, 透明塑料透光率和雾度的测定[S].
GB/T 2410—2008, Determination of Light Transmittance and Fog of Transparent Plastics[S].
- [17] GB/T 1038—2000, 塑料薄膜和薄片气体透过性试验方法 压差法[S].
GB/T 1038—2000, Test Method for Gas Permeability of Plastic Film and Thin Film Differential Pressure Method[S].
- [18] 席琳乔, 吴书奇, 马春晖. 非离子表面活性剂 PEG 对棉秆木质纤维素酶解的影响[J]. *农业工程学报*, 2012, 28(23): 176—183.
XI Lin-qiao, WU Shu-qi, MA Chun-hui. Effects of PEG, a Nonionic Surfactant, on Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Cotton Stalk[J]. *Journal of Agricultural Engineering*, 2012, 28(23): 176—183.