

## 解糖热解纤维素菌 F32 降解未预处理秸秆 及产纤维素酶特性分析

英瑜<sup>1,2</sup> 孟冬冬<sup>1,2</sup> 李福利<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院青岛生物能源与过程研究所 山东 青岛 266101)

(2. 中国科学院大学 北京 100049)

**摘要:**【目的】明确极端嗜热厌氧木质纤维素降解菌解糖热解纤维素菌 F32 代谢特征, 并分析其产酶特性。【方法】使用细胞计数法绘制菌株的生长曲线, 使用离子色谱及气相色谱进行产物和残糖量分析, 以 DNS 法及对硝基苯酚法检测菌株胞外蛋白的酶活性。【结果】解糖热解纤维素菌 F32 在以葡萄糖、微晶纤维素和未经预处理小麦秸秆为碳源时生长状况优于解糖热解纤维素菌 DSM 8903。在以葡萄糖为碳源进行培养时, 与菌株 DSM 8903 相比, 菌株 F32 具有产乳酸较多, 而产氢气较少的特点。在以微晶纤维素和未经预处理小麦秸秆为碳源进行培养时, 与菌株 DSM 8903 相比, 菌株 F32 胞外蛋白具有较高的内切纤维素酶活性和木聚糖酶活性。【结论】解糖热解纤维素菌 F32 表现出较强的木质纤维素降解能力, 其与 DSM 8903 的产物组成及胞外蛋白的酶活性具有明显差异。

**关键词:** 木质纤维素, 纤维素酶, 解糖热解纤维素菌, 未预处理秸秆

## Degradation of unpretreated wheat straw by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* F32 and its enzyme characteristics

YING Yu<sup>1,2</sup> MENG Dong-Dong<sup>1,2</sup> LI Fu-Li<sup>1\*</sup>

(1. Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266101, China)

(2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** [Objective] This study is aimed to characterize fermentation and enzyme characteristics of an extremely thermophilic anaerobic lignocellulolytic bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* F32. [Methods] Cell growth was monitored by cell counting. Acetate, lactate and residual reducing sugars were measured by using an ion chromatography system. H<sub>2</sub> was detected by gas chromatography. DNS method and p-nitrophenyl method were used to measure the enzyme activities of the secreted proteins of *C. saccharolyticus* F32 and DSM 8903. [Results] In contrast to *C. saccharolyticus* DSM 8903, strain F32 grew better on cellulose (Avicel PH-101), even on unpretreated wheat straw. Compared to *C. saccharolyticus* DSM 8903, strain F32 produced more lactate as the end product, thereby decreasing the hydrogen yield when glucose was used as carbon

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2011CB707404)

\*通讯作者: Tel: 86-532-80662655; ✉: lifl@qibebt.ac.cn

收稿日期: 2013-03-18; 接受日期: 2013-05-31; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

source. The secretome of strain F32 showed higher endoglucanase and xylanase activities. **[Conclusion]** In comparison with *C. saccharolyticus* DSM 8903, *C. saccharolyticus* F32 could degrade lignocellulosic biomass more efficiently. There were significant difference in the products, cellulase and hemicellulase systems between *C. saccharolyticus* F32 and *C. saccharolyticus* DSM 8903.

**Keywords:** Lignocellulosic biomass, Cellulase, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, Unpretreated wheat straw

由于石油、天然气等石化资源的大量消耗和逐步枯竭及其燃烧所带来的环境污染等问题日益严重,开发可持续利用的新能源已成为人类社会面临的紧迫任务。木质纤维素是地球上含量最丰富的可再生生物质资源,以秸秆等木质纤维素材料生产生物燃料已受到越来越多的关注<sup>[1]</sup>。在木质纤维素材料转化为生物燃料的过程中,首先需要将其转化为发酵微生物可利用的单糖,在此过程中,选择使用具有优良性状的纤维素酶,是纤维素资源能否高效利用的关键。自然界中存在大量具有纤维素降解能力的微生物,这些微生物既是我们获得纤维素酶的重要来源,也为构建合适的木质纤维素同步糖化发酵系统提供了有力保障<sup>[2-3]</sup>。

目前报道的能够降解和利用纤维素的微生物包括细菌、真菌、放线菌等,产生纤维素酶的真菌有齐整小核菌(*Sclerotium rolfii*),黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)以及木霉属(*Trichoderma*)、曲霉属(*Aspergillus*)、裂褶菌属(*Schizophyllum*)和青霉属(*Penicillium*)等种属中的一些真菌。产生纤维素酶的细菌有梭菌属(*Clostridium*)、纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)、杆菌属(*Bacillus*)、高温单胞菌属(*Thermomonospora*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、拟杆菌属(*Bacteriodes*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、醋弧菌属(*Acetovibrio*)、小双孢菌属(*Microbispora*)和链霉菌属(*Streptomyces*)等。许多纤维素酶产生菌,尤其是一些厌氧菌,如热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)和溶纤维拟杆菌(*Bacteroides cellulosolvens*)分泌的纤维素酶具有较高的比活力,但存在产量较低的缺陷<sup>[4-8]</sup>。因此,筛选产酶量高,酶的性质优良,酶系组成合理的产纤维素酶菌株,以满足生物炼制工业需求是目前的

研究热点之一。同时,耐高温纤维素降解菌来源的纤维素酶因具有活性高,热稳定性好,使用过程中不易被污染等优势而受到广泛关注。

极端嗜热厌氧菌 *Caldicellulosiruptor* 属的菌株属于纤维素降解菌,具有游离作用的纤维素酶系,无纤维小体结构。Blumer-Schuetz 等通过比较基因组研究表明 *Caldicellulosiruptor* 属的菌株具有一定的遗传和生理多样性<sup>[9]</sup>,可利用底物范围广,降解木质纤维素能力强,在发酵过程中无碳代谢抑制作用,因而具有很好的应用前景<sup>[10-12]</sup>。

本文对实验室筛选所得的极端嗜热厌氧纤维素降解菌解糖热解纤维素菌 F32 (*Caldicellulosiruptor saccharolyticus* F32)与模式菌株解糖热解纤维素菌 DSM 8903 进行了分别以葡萄糖、微晶纤维素及未经预处理小麦秸秆为碳源时的生长及产物比较分析,并分析其产木质纤维酶特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

解糖热解纤维素菌 F32 为本实验室筛选所得,保存于中国普通微生物保藏管理中心(北京,CGMCC 1.5183),解糖热解纤维素菌 DSM 8903,购自德国微生物菌种保藏中心。

### 1.2 培养基组成

GS-2 基础培养基<sup>[13]</sup>: 1.5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.9 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2.1 g 尿素, 1.0 g 半胱氨酸, 10.0 g MOPS, 6.0 g 酵母提取物, 2.9 g 二水合柠檬酸三钠,溶于 1 L 去离子水,调节 pH 为 7。使用前以过滤除菌方式,按照 1:100 的比例加入无机盐溶液( $\text{MgCl}_2$  100 g/L,  $\text{CaCl}_2$  15 g/L,  $\text{FeSO}_4$  0.125 g/L)。

按照 0.5% (质量体积比)比例将葡萄糖、微晶纤维素及未经预处理小麦秸秆分别加入 GS-2 基础培养基中。

### 1.3 菌株的生长及产物分析

**1.3.1 菌体生长监测:** 菌种按 1% 比例接种至 150 mL 培养基中, 于 70 °C 进行静置厌氧培养。使用相差显微镜(Olympus BX51, Japan)进行细胞计数, 绘制菌株的生长曲线。

**1.3.2 菌株发酵产物及残糖分析:** 取 0.5 mL 发酵液于 4 °C、12 000×g 离心 5 min, 取上清置于-20 °C 保存, 至细胞生长至平台期取样结束后, 进行产物及残糖量分析。

使用离子色谱分析系统 ICS-3000 (Dionex, Sunnyvale, CA)检测发酵液中的糖含量。分析柱为 4 mm×250 mm Dionex Carbopac PA-10, 检测器为电化学检测器。

使用离子色谱分析系统 ICS-5000 (Dionex)测定发酵液中乙酸和乳酸的含量。分析柱为 4 mm×250 mm Dionex IonPacAS11-HC, 检测器为电导检测器。

使用气相色谱仪(SP-6890, 鲁南瑞虹化工仪器有限公司)检测氢气的产量。检测器为热导检测器(TCD)。

### 1.4 菌株产纤维素酶特性分析

**1.4.1 粗酶液制备方法:** GS-2 基础培养基中按照 0.5% (质量体积比)比例分别加入微晶纤维素 Avicel PH-101、未经预处理小麦秸秆为碳源, 于 70 °C 静置培养解糖热解纤维素菌 F32 和 DSM 8903。每隔 6 h 取 5 mL 发酵液, 4 °C、12 000×g 离心 10 min, 所得上清经 0.22 μm 滤膜过滤后, 使用截留分子量为 10 kD 的超滤管进行超滤浓缩至 0.5 mL。

**1.4.2 蛋白定量方法:** 参照 Bradford 蛋白定量试剂盒说明书中操作步骤, 进行粗酶液的蛋白定量<sup>[14]</sup>。

**1.4.3 酶活测定方法:** 滤纸酶活、内切纤维素酶活、木聚糖酶活的测定均使用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定还原糖的生成量<sup>[15]</sup>。检测滤纸酶活时, 150 μL 反应体系中加入 5 mg Whatman No.1 滤纸作为底物, 检测内切纤维素酶活时以 1% (质量体积比)羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为底物, 检测木聚糖酶活时以 1% (质量体积比)木聚糖为底物。

取适当稀释的酶溶液加入 PC 缓冲液 (50 mmol/L Phosphate, 12 mmol/L Citrate, pH 7.0) 中, 于 70 °C 放置 30 min 后, 加入 200 μL DNS 溶

液, 煮沸 5 min, 冷却后加入 650 μL 水并混匀, 取 200 μL 加入酶标板中, 测其在 540 nm 的光吸收值。以葡萄糖或木糖为标准品绘制标准曲线, 根据标准曲线计算所得还原糖的量。一个酶活单位定义为每分钟水解底物产生 1 μmol 还原糖所需的酶量。

外切纤维素酶活的测定, 以 1 mmol/L p-Nitrophenyl-β-D-cellobioside (pNPC)溶液为底物测定外切纤维素酶活, 其中 pNPC 溶液中加入 1 mmol/L D-glucono-1,5-σ-lactone 以抑制 β-葡萄糖苷酶活性。

取经适当稀释的酶溶液加入 PC 缓冲液中, 70 °C 反应 30 min 后加入 450 μL 饱和硼酸钠溶液并混匀, 取 200 μL 加入酶标板中, 测其在 405 nm 的光吸收值。以 Tris-HCl (50 mmol/L, pH 9.0)溶液稀释 1 g/L 的对硝基苯酚标准样品, 使其终浓度为 0-20 mg/L, 取 200 μL 加入酶标板中, 测其在 405 nm 的吸收值以绘制标准曲线, 根据标准曲线计算酶解反应所得对硝基苯酚的量。一个酶活单位定义为每分钟水解底物产生 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量。比酶活力定义为酶活与对应蛋白量的比值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 以葡萄糖为碳源菌体生长及产物分析

以葡萄糖为碳源, 比较解糖热解纤维素菌 F32 与 DSM 8903 的生长情况(图 1A), 并检测发酵过程中糖的含量变化及产物乙酸、乳酸、氢气的量(图 1B)。结果表明两株菌在以葡萄糖为碳源的培养基中生长时, 进入指数生长期的时间接近, 但解糖热解纤维素菌 F32 的细胞数目多于 DSM 8903。

产物及葡萄糖残留检测结果表明, 解糖热解纤维素菌 F32 与 DSM 8903 在产物组成上具有明显差异。培养至 42 h, 解糖热解纤维素菌 F32 发酵液中的葡萄糖就几乎已经被耗尽, 而此时 DSM 8903 发酵液中的剩余葡萄糖含量为 3 g/L。达到稳定期时, DSM 8903 发酵液中的剩余葡萄糖含量仍为 1.5 g/L。培养至 50 h 左右时, 解糖热解纤维素菌 F32 产生 16 mmol/L 氢气、9.5 mmol/L 乙酸和 42.2 mmol/L 乳酸; 而 DSM 8903 产生 19.6 mmol/L 氢气、6.5 mmol/L 乙酸, 但其产生的乳酸仅为

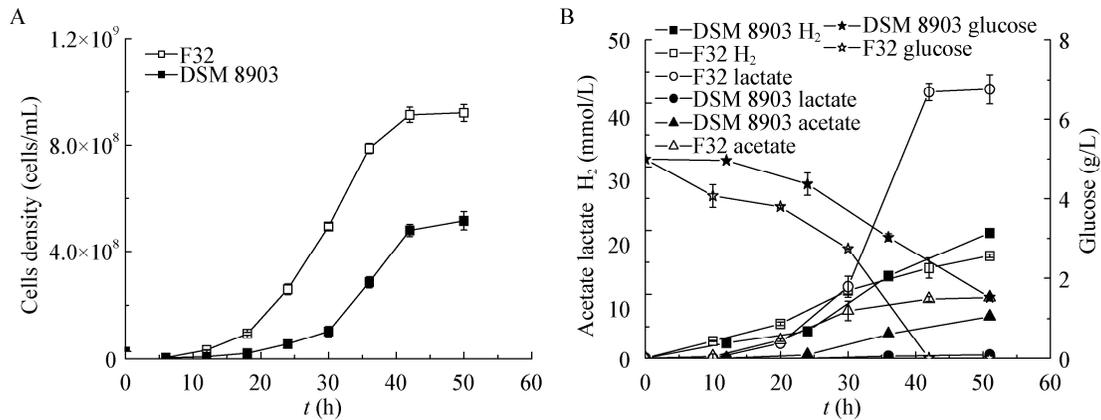


图1 解糖热解纤维素菌 F32 及 DSM 8903 以葡萄糖为碳源的生长及产物分析

Figure 1 Growth and products analysis of *C. saccharolyticus* F32 and *C. saccharolyticus* DSM 8903 grown with glucose

0.53 mmol/L, 远低于解糖热解纤维素菌 F32 产生的乳酸量。

解糖热解纤维素菌 F32 在利用葡萄糖为碳源生长时具有产乳酸多但产氢少的特点, 在很多微生物中, 乳酸的产生主要可以将代谢过程中产生的过多 NADH 转化为 NAD<sup>+</sup>。目前认为引发乳酸产生的原因主要是较高的糖浓度<sup>[16]</sup>和氢气压力的升高<sup>[17]</sup>, 但 Willquist 等的研究也表明, 代谢过程中的氧化还原电势及高能化合物焦磷酸盐和 ATP 对调节代谢途径转向乳酸的产生也起到重要作用。在细胞生长至稳定期后, 伴随 ATP 水平的升高, 乳酸脱氢酶对 NADH 的亲性和增加, 会导致乳酸的大量产生<sup>[11]</sup>。在菌株的代谢途径中, 乳酸和氢气

的产生均伴随 NADH 的氧化, 较多的乳酸产生会降低菌株的产氢量。

## 2.2 以微晶纤维素为碳源菌体生长及纤维素酶活性分析

以微晶纤维素 Avicel PH-101 为碳源, 比较解糖热解纤维素菌 F32 与 DSM 8903 的生长情况(图 2A), 并检测发酵过程中乙酸、乳酸和氢气的产量(图 2B)。结果表明在以 Avicel PH-101 为碳源的培养基中培养时, 两株菌几乎同时进入指数生长期, 在培养至 50 h, 解糖热解纤维素菌 F32 细胞数目可达  $1.3 \times 10^8$ , 而 DSM 8903 的细胞数目约为  $7.8 \times 10^7$ 。

产物分析结果表明, 在细胞生长至 42 h 后, 解糖热解纤维素菌 F32 可产生 5.6 mmol/L 氢气,

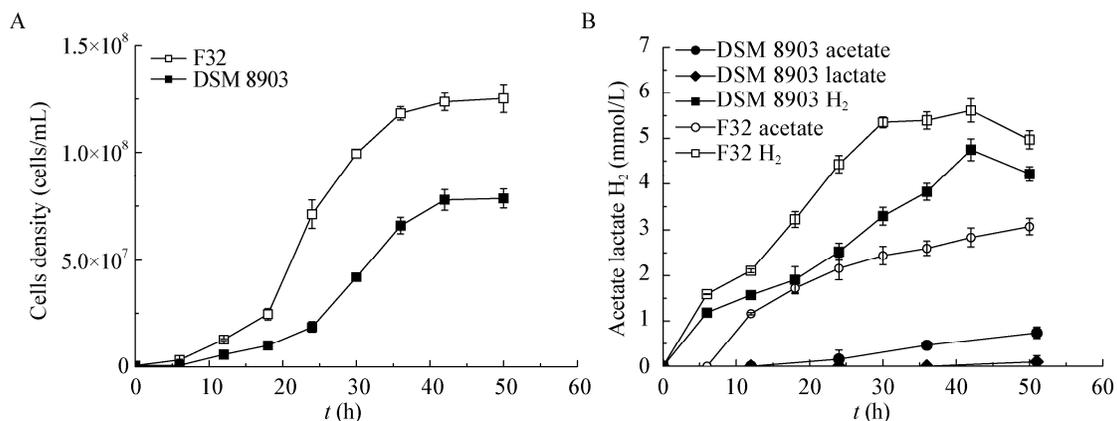


图2 解糖热解纤维素菌 F32 及 DSM 8903 以微晶纤维素 Avicel PH-101 为碳源的生长及产物分析

Figure 2 Growth and products analysis of *C. saccharolyticus* F32 and *C. saccharolyticus* DSM 8903 grown with Avicel PH-101

3.1 mmol/L 乙酸, 没有检测到乳酸; 而 DSM 8903 能产生 4.2 mmol/L 氢气、0.74 mmol/L 乙酸和 0.16 mmol/L 乳酸。解糖热解纤维素菌 F32 与 DSM 8903 在利用微晶纤维素为碳源时的产物组成具有明显差异。

以微晶纤维素 Avicel PH-101 为碳源培养解糖热解纤维素菌 F32 和 DSM 8903, 制备其胞外蛋白作为粗酶液并进行酶活性分析。结果如图 3 所示。在培养至 48 h, 解糖热解纤维素菌 F32 的胞外蛋白具有的滤纸酶活性为 0.31 FPA, 是 DSM 8903 在培养至 48 h 胞外蛋白滤纸酶活性的 3 倍(0.1 FPA)。培养至 36 h, 解糖热解纤维素菌 F32 的胞外蛋白的内切纤维素酶活性为 0.57 U/mg, 是 DSM 8903 培养至

60 h 胞外蛋白内切纤维素酶活性的 1.6 倍(0.35 U/mg)。而这两株菌在培养至 60 h 的胞外蛋白外切纤维素酶活性比较接近, 分别为 0.035 U/mg 和 0.036 U/mg。

### 2.3 以未经预处理小麦秸秆为碳源的菌体生长及胞外纤维素酶活性分析

以未经预处理小麦秸秆为碳源, 比较解糖热解纤维素菌 F32 与 DSM 8903 的生长情况(图 4A)和乙酸、乳酸及氢气的产量(图 4B)。结果表明这两株菌进入指数生长期的时间接近, 在培养至 50 h, 解糖热解纤维素菌 F32 细胞数目可达  $8.3 \times 10^7$ , 而 DSM 8903 的细胞数目约为  $2.5 \times 10^7$ 。产物分析结果表明, 在细胞生长至稳定期后, 解糖热解纤维素菌 F32 可

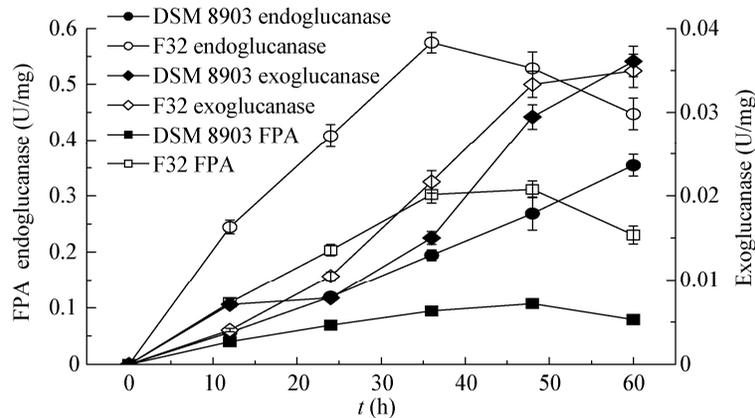


图 3 Avicel PH-101 诱导的解糖热解纤维素菌 F32 与 DSM 8903 胞外纤维素酶活性分析

Figure 3 Enzyme activity of *C. saccharolyticus* F32 and *C. saccharolyticus* DSM 8903 secretome induced by Avicel PH-101

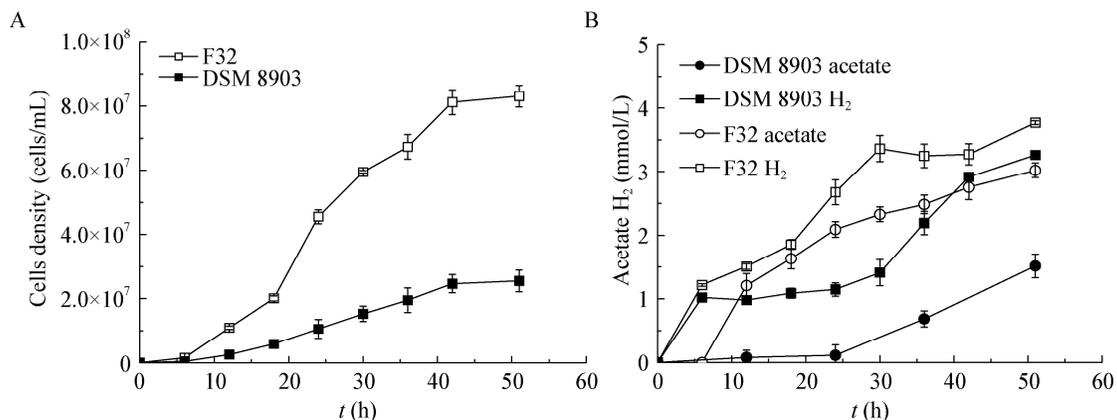


图 4 解糖热解纤维素菌 F32 及 DSM 8903 以未经预处理小麦秸秆为碳源的生长及产物分析

Figure 4 Growth and products analysis of *C. saccharolyticus* F32 and *C. saccharolyticus* DSM 8903 with unpretreated wheat straw used as carbon source

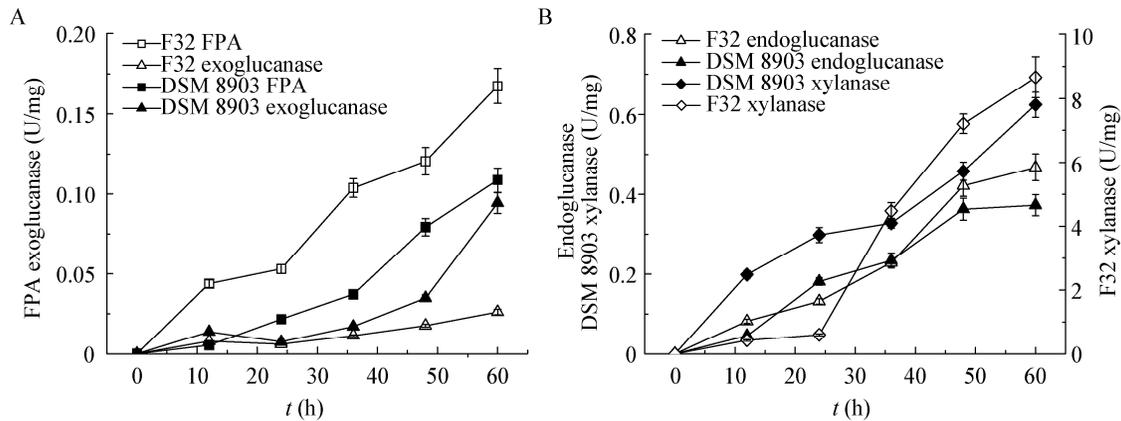


图5 未经预处理小麦秸秆诱导的解糖热解纤维素菌 F32 与 DSM 8903 胞外蛋白酶活性分析

Figure 5 Enzyme activity analysis of *C. saccharolyticus* F32 and *C. saccharolyticus* DSM 8903 secretome induced by untreated wheat straw

产生 3.8 mmol/L 氢气, 3 mmol/L 乙酸; 而 DSM 8903 能产生 3.3 mmol/L 氢气、1.5 mmol/L 乙酸。同时, 在这两株菌的发酵液中均没有检测到乳酸组分。发酵结束时, 解糖热解纤维素菌 F32 产生乙酸的量约为 DSM 8903 的 2 倍。

以未经预处理小麦秸秆为碳源培养解糖热解纤维素菌 F32 和 DSM 8903, 制备其胞外蛋白并进行酶活性分析。结果表明, 培养至 60 h, 未经预处理小麦秸秆诱导的解糖热解纤维素菌 F32 胞外蛋白的滤纸酶活性可达 0.17 FPA, 高于 DSM 8903 胞外蛋白的滤纸酶活性(0.1 FPA); 而其外切纤维素酶活性低于 DSM 8903 胞外蛋白的外切纤维素酶活性, 分别为 0.04 U/mg 和 0.09 U/mg (图 5A); 解糖热解纤维素菌 F32 胞外蛋白的内切纤维素酶活性与木聚糖酶活性分别为 0.47 U/mg 和 8.7 U/mg, 而此时 DSM 8903 胞外蛋白内切纤维素酶活性与木聚糖酶活性分别为 0.37 U/mg 和 0.63 U/mg, 表明这两株菌胞外蛋白木聚糖酶活差异较明显(图 5B)。

### 3 结论

通过对解糖热解纤维素菌 F32 和 DSM 8903 利用葡萄糖、微晶纤维素及未经预处理小麦秸秆的生长及代谢产物分析, 表明在利用葡萄糖为碳源生长时, 菌株 F32 具有产乳酸较多, 而产氢气较少的特

点。与 DSM 8903 相比, 菌株 F32 表现出较强的木质纤维素降解能力, 能有效利用未经预处理的小麦秸秆。通过比较分析微晶纤维素、未经预处理小麦秸秆诱导的菌株 F32 和 DSM 8903 胞外蛋白的木质纤维素酶活性, 进一步证明解糖热解纤维素菌 F32 具有降解效率较高的内切纤维素酶系和半纤维素酶系, 是优良的产高温纤维酶菌株。本研究为菌株 F32 的产酶特性、木质纤维素降解机制的深入研究奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Agency USEP. Biomass conversion: emerging technologies, feedstocks, and products[R]. 2007, EPA/600/R-607/144, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- [2] Yang B, Dai ZY, Ding SY, et al. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass[J]. Biofuels, 2011, 2(4): 421-450.
- [3] 孙君社, 苏东海, 刘莉. 秸秆生产物乙醇预处理关键技术[J]. 化学进展, 2007(19): 1122-1128.
- [4] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. Microbial Cellulose Utilization, 2002, 66(3): 506-577.
- [5] Maki M, Leung KT, Qin WS. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass[J]. International Journal of Biological Sciences, 2009, 5(5): 500-516.
- [6] Morag E, Halevy I, Bayer EA, et al. Isolation and

- properties of a major cellobiohydrolase from the cellulosome of *Clostridium thermocellum*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(13): 4155-4162.
- [7] Lorena AD, Teresa MC, Alejandro SH, et al. Cloning and expression of a novel, moderately thermostable xylanase-encoding gene (Cflxyn11A) from *Cellulomonas flavigena*[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 5539-5545.
- [8] Warner CD, Hoy JA, Shilling C, et al. Tertiary structure and characterization of a glycoside hydrolase family 44 endoglucanase from *Clostridium acetobutylicum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(1): 338-346.
- [9] Blumer-Schuette SE, Ozdemir I, Mistry D, et al. Complete genome sequences for the anaerobic, extremely thermophilic plant biomass-degrading bacteria *Caldicellulosiruptor hydrothermalis*, *Caldicellulosiruptor kristjanssonii*, *Caldicellulosiruptor kronotskyensis*, *Caldicellulosiruptor owensensis*, and *Caldicellulosiruptor lactoaceticus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(6): 1483-1484.
- [10] De Vrije T, Bakker RR, Budde MA, et al. Efficient hydrogen production from the lignocellulosic energy crop *Miscanthus* by the extreme thermophilic bacteria *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga neapolitana*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2009, 2(1): 12-37.
- [11] Willquist K, Claassen PA, van Niel EW, et al. Evaluation of the influence of CO<sub>2</sub> on hydrogen production by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2009, 34: 4718-4726.
- [12] Panagiotopoulos IA, Bakker RR, Budde MA, et al. Fermentative hydrogen production from pretreated biomass: a comparative study[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100: 6331-6338.
- [13] Johnson EA, Madia A, Demain AL. Chemically defined minimal medium for growth of the anaerobic cellulolytic thermophile *Clostridium thermocellum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981, 41(4): 1060-1062.
- [14] Brandford MA. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [15] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426-428.
- [16] de Vrije T, Mars AE, Budde MA, et al. Glycolytic pathway and hydrogen yield studies of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74: 1358-1367.
- [17] van Niel EW, Claassen PA, Stams AJ. Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 81(3): 255-262.