

聚偏氟乙烯微滤膜过滤纯生啤酒性能与滤菌效果研究

董 伦, 陆 茵*

(宁波大学海洋学院食品科学与工程系, 浙江宁波 315211)

摘 要:研究了指孔状结构和网状结构的亲水性聚偏氟乙烯(PVDF)微滤膜的滤菌性能与膜结构、膜孔径的关系,探讨了生啤酒过滤过程中膜结构、清洗方式对除菌效果和膜过滤通量的影响规律,通过 SEM 和接触角测定仪表征了微滤膜的结构和亲水性。结果表明:膜的结构对滤菌效果影响不大;0.22 μm 数量级的 PVDF 微滤膜的滤菌效果达到啤酒生产要求;清水清洗和碱、清水、酸、清水连续清洗两种清洗方式对网状结构的 PVDF 膜影响不大,其平衡过滤通量保持在 22.2~22.4L/($\text{m}^2 \cdot \text{h}$),但碱、清水、酸、清水连续清洗方式更有利于指孔状结构 PVDF 膜性能的恢复,平衡通量约为 40.8L/($\text{m}^2 \cdot \text{h}$),而同样条件下清水清洗的平衡通量为 35.0L/($\text{m}^2 \cdot \text{h}$)。实验数据表明用亲水性的 PVDF 微滤膜过滤生啤除菌,仅采用清水清洗膜在操作上是可行的。

关键词:亲水性 PVDF 膜,生啤,除菌,性能

Study on the performance of PVDF membranes and its degerming effect for application of draft beer filtration

DONG Lun, LU Yin*

(School of Marine Sciences, Food Science & Engineering Department, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Hydrophilic Poly(vinylidene fluoride) (PVDF) microfiltration membranes with finger-like structure and reticular structure were used to filter bacteria. The relationship between the structure and pore size of PVDF membranes and its degerming effect was studied. The influence of membrane structure and clean manner on the degerming effect and filtration flux during draft beer filtration was also investigated. Scanning electron microscope (SEM) and water contact angle measurer were used to characterize the membrane structure and its hydrophilicity. The results showed that the degerming effect could meet the requirement of draft beer when the pore size grade of PVDF membrane was about 0.22 μm for both finger-like structure and reticular structure membranes. There were no significant differences between base-water-acid-water cleaning manner and the water cleaning manner on the recovery of the filtration flux of reticular structure membranes. The draft beer flux for both of the cleaning ways was stable to 22.2 ~ 22.4L/($\text{m}^2 \cdot \text{h}$) around. The base-water-acid-water cleaning method was beneficial to the performance of finger-like membranes where the draft beer flux was stable to 40.8L/($\text{m}^2 \cdot \text{h}$). Compared to the base-water-acid-water cleaning way, the draft beer flux was stable to 35.0L/($\text{m}^2 \cdot \text{h}$) when the water cleaning method was used. The results indicated that the water cleaning method was available for draft beer filtration degerming when hydrophilic PVDF microfiltration membranes were used in performance.

Key words: hydrophilic PVDF membrane; draft beer; degerming; performance

中图分类号: TS261.4

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2014)19-0168-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2014.19.027

纯生啤酒又称生啤,是一种不经过巴氏灭菌或者高温瞬时消毒的无菌过滤、无菌灌装啤酒,含有丰富的氨基酸、碳水化合物、无机盐类、多种维生素及多种活性酶类,具有增进食欲、促进消化等功效,

属于啤酒中的高档品种。过滤除菌是生产的关键环节。膜分离技术利用筛分原理能较完整地保留食品中的各种营养成分^[1-2],应用于生啤除菌的生产中,生产的酒液更加清亮透明、泡持性更长久,敏感蛋白和冷混浊等指标均低于硅藻土过滤 30% 以上。但不可避免的膜污染严重影响过滤性能,文献报道的稳定平衡通量也仅在 10L/($\text{m}^2 \cdot \text{h}$) 左右^[3],限制了膜过滤技术在啤酒生产中的应用。

膜污染的产生主要是蛋白质、糖类等吸附在膜壁上堵塞过滤膜^[4-5],膜的清洗是个复杂的问题,现

收稿日期:2014-01-08

作者简介:董伦(1989-),男,在读硕士,主要从事微滤膜性能研究。

* 通讯作者:陆茵(1966-),女,博士,教授,主要从事膜分离技术研究。

基金项目:浙江省自然科学基金(LY12B06001);宁波市自然科学基金(2012A610170)。

行的化学清洗会对生啤酒的质量有一定影响,而更换一套新过滤膜费用过高,导致纯生啤酒的运行成本高^[6-9]。要降低膜污染关键是要改善膜材料的特性,研究认为亲水性的膜能有效减少膜污染,提高膜平衡通量^[10-13]。在此基础上,如能通过清水反冲洗的方法恢复膜通量,则对生啤生产的实际应用意义重大。

本文选用亲水性 PVDF 膜^[14]过滤生啤,研究了 PVDF 微滤膜过滤大肠杆菌菌悬液的滤菌性能与膜结构、膜孔径的关系,并考察了两种结构的微滤膜应用于生啤过滤的滤菌效果、膜通量变化以及不同清洗方式的清洗效果等,为进一步应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大肠杆菌 宁波大学海洋学院微生物实验室提供;菌种经活化扩大培养后配制成大肠杆菌菌悬液;生啤酒 取自宁波某啤酒厂;马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)、平板计数琼脂培养基(PCA) 海博生物技术有限公司;月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤(LST)、煌绿乳糖胆盐肉汤(BGLB) 杭州微生物试剂有限公司;氯化钠、异丙醇 分析纯,国药集团化学试剂有限公司;水 通过 ULUPURE 超纯水制造系统制备;实验用膜 两种不同结构的自制亲水性聚偏氟乙烯微滤平板膜,分别标记为网状结构的 PVDF-N 膜和指孔状结构的 PVDF-F 膜。

LDZX-50KBS 型立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂;HWS-128 型恒温恒湿培养箱 宁波江南仪器厂;QL-861 型漩涡混合器 海门其林贝尔仪器制造有限公司;SU-70 型扫描电子显微镜 日本日立公司;接触角/表面张力测定仪 Dropmetr A-100P;UPH-1-5T 型 ULUPURE 超纯水制造系统 成都超纯科技有限公司;泡点-流速法膜孔径分布测定仪 自制;过滤装置 自制,料液罐体积 8.8L,膜池有效过滤面积 10.2cm²。

1.2 实验方法

1.2.1 PVDF 膜孔径的测定 采用自制泡点-流速法^[15]孔径分布测定仪测定微滤膜的孔径分布。在干膜上截取圆形膜片,置于浸泡液中浸泡至半透明状态,取出并用滤纸吸干表面附着的液体后铺于检测器上,进行检测。浸泡液为异丙醇,压力源为氮气。

1.2.2 接触角测定 截取 2cm × 2cm 方形膜片,固定于载玻片上,放置在样品台上进行检测。记录水滴自滴到膜表面到完全消失时接触角的变化情况。

1.2.3 扫描电镜观察膜的结构 在干膜上截取具有代表性的膜样品,其上下表面分别用导电胶粘附于样品台上,截面经液氮冷冻淬断后将断面用导电胶粘附于样品台上,将样品真空镀金后放置于电镜平台上观察。

1.2.4 微生物计数 大肠杆菌计数:取待测样品,参照 GB 4789.3-2010 进行检测。生啤总菌落计数:取过滤前后生啤样品,参照 GB 4789.2-2010 进行检测。酵母菌计数:取过滤前后生啤样品,参照 GB 4789.15-2010 进行检测。

1.2.5 膜通量的变化测定 亲水性 PVDF-N 或者 PVDF-F 微滤膜放入膜池中整体经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min。采用自制的过滤装置(见图 1)测定 100kPa 过滤压力下的生啤过滤通量随过滤时间的变化情况,实验流程见图 2。其中新膜第一次过滤过程记为 C₀,过滤一段时间至膜通量衰减达到稳定值后,对滤膜进行清洗以恢复膜通量,清洗后的膜继续过滤生啤。膜清洗前四个循环采用清水浸泡清洗,后四个循环采用 0.05mol/L 的 NaOH 溶液、清水、0.05mol/L HCl 溶液、清水交替浸泡清洗。

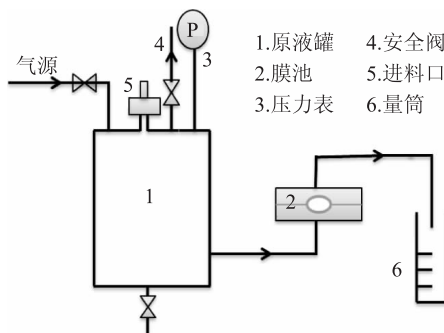


图 1 实验装置图

Fig.1 Schematic diagram of experimental equipment

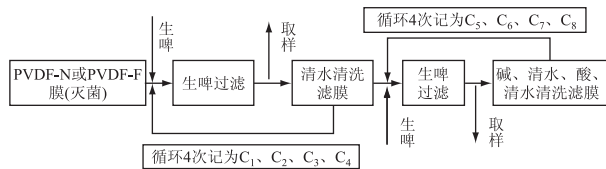


图 2 实验流程图

Fig.2 Experimental flowchart

2 结果与分析

2.1 膜滤菌效果与孔径之间的关系

用网状结构的 PVDF-N 膜和指孔状结构的 PVDF-F 膜两种结构、不同孔径的亲水性 PVDF 微滤膜过滤含有大肠杆菌的菌悬液,根据过滤前后液体中大肠杆菌浓度的变化确定亲水性微滤膜滤菌效果与孔径之间的关系。实验中每种孔径的微滤膜做两组平行过滤实验,每种滤过液取两个样进行平行检测,过滤前后大肠杆菌的浓度如表 1 所示。

从表 1 可以看出膜孔径在 0.22μm 数量级的两个膜(0.179~0.234μm, 0.199~0.252μm)过滤时,滤液的大肠杆菌浓度在 0~2cfu/mL 范围内。膜孔径在 0.45μm 数量级的两个膜(0.464~0.579μm, 0.424~0.652μm)过滤时,滤液的大肠杆菌浓度约为 14~20cfu/mL。

本实验采用大肠菌群平板计数法,然而 GB 2758-2005 中采用大肠菌群 MPN 计数法,为此对三个人为污染含大肠杆菌的自来水样分别进行大肠菌群平板计数法和大肠菌群 MPN 计数法的对比实验,实验结果见表 2。

从表 2 中可以看出大肠杆菌浓度在 0~10cfu/mL 范围时,对应的 MPN < 3,符合 GB 2758-2005 中大肠杆菌含量 ≤ 3MPN/100mL 的要求。大肠杆菌浓度在 15~20cfu/mL 范围时,MPN 为 6.1,不符合 GB 2758-

表1 不同种类 PVDF 微滤膜对大肠杆菌滤除效果

Table 1 Degerming effect of *E.coli* with different PVDF microfiltration membranes

膜种类	平行实验号	孔径(μm)	菌悬液浓度(cfu/mL)	滤液菌浓度(cfu/mL)	截留率(%)	
PVDF-N 微滤膜	1	0.179~0.234	3.5×10^3	1	2	99.96
	2			2	0	99.97
	1	0.464~0.579	3.5×10^3	14	16	99.57
	2			19	15	99.51
PVDF-F 微滤膜	1	0.199~0.252	2.4×10^3	1	0	99.95
	2			1	2	99.93
	1	0.424~0.652	2.4×10^3	15	17	99.85
	2			20	18	99.82

表3 过滤前后生啤微生物检测结果

Table 3 Microbial test before and after draft beer filtration

膜种类	膜孔径(μm)	菌种	滤前生啤菌浓度(cfu/mL)		滤后生啤菌浓度(cfu/mL)	
PVDF-N 微滤膜	0.179~0.234	总菌落	32	29	0	0
		酵母菌	4	2	0	0
		大肠杆菌	11	9	0	0
PVDF-F 微滤膜	0.199~0.252	总菌落	36	38	0	0
		酵母菌	7	8	0	0
		大肠杆菌	14	16	0	0

2005 中大肠杆菌含量的要求。

表2 大肠杆菌平板计数法与 MPN 计数法对照

Table 2 Contrast of *E.coli* test with plate count and MPN count method

编号	菌浓度(cfu/mL)		阳性管数			MPN/100mL
	平板1	平板2	0.1	0.01	0.001	
1	2	3	0	0	0	<3
2	8	10	0	0	0	<3
3	15	20	0	1	1	6.1

2.2 生啤过滤效果和过滤通量研究

根据上述实验结果,选用孔径 $0.179\sim 0.234\mu\text{m}$ 的网状结构 PVDF-N 膜和孔径 $0.199\sim 0.252\mu\text{m}$ 的指孔状结构 PVDF-F 膜进行生啤过滤实验,测定过滤前后啤酒的菌含量,并研究过滤过程中膜通量变化情况。生啤取自某啤酒厂灌装前的清酒罐,装在未经消毒的塑料桶中运回实验室。过滤后的啤酒收集在预先经高温蒸汽消毒过的不锈钢罐中,过滤完毕后分别从塑料桶和不锈钢罐中对过滤前后的啤酒各取两个平行样检测总菌落、大肠杆菌和酵母菌。表3为生啤过滤前后啤酒中总菌落、大肠杆菌、酵母菌的测定结果,数据表明过滤后生啤中没检测到微生物,采用该孔径的微滤膜进行滤菌过滤,符合 GB 2758-2005 中对生啤大肠杆菌含量 $\leq 3\text{MPN}/100\text{mL}$ 的要求。

图3为亲水性 PVDF 微滤膜过滤啤酒时过滤通量随时间的变化曲线。从图中可以看出,随着过滤的进行,过滤通量衰减至稳定的平衡通量,其中清水清洗和碱、清水、酸、清水交替清洗两种清洗方式对 PVDF-N 膜的过滤性能影响不大,最终稳定平衡通量约在 $22.2\sim 22.4\text{L}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$ 。同样条件下,两种清洗方式对 PVDF-F 膜的过滤性能有一定的影响,清水清洗

后 PVDF-F 膜的稳定平衡通量为 $35.0\text{L}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$;碱、清水、酸、清水交替清洗后 PVDF-F 膜的稳定平衡通量为 $40.8\text{L}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$ 。

实验表明采用两种结构的亲水性微滤膜过滤啤酒时的稳定平衡通量均大于文献中记载的生产中 $10\text{L}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$ 左右^[3]的稳定平衡通量,其中指孔状结构的 PVDF-F 微滤膜用碱、清水、酸、清水交替清洗具有更高的稳定平衡通量,但即使采用清水进行清洗,其稳定平衡通量也达到 $35.0\text{L}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$ 。说明用指孔状结构的 PVDF-F 微滤膜过滤生啤除菌,仅采用清水清洗膜在生产上是可行的。

2.3 聚偏氟乙烯过滤膜性能分析

图4为过滤前后网状结构的 PVDF-N 和指孔状结构的 PVDF-F 两种微滤膜的 SEM 图像,(a)和(a')表示过滤前、后膜的上游面,(b)和(b')表示过滤前、后膜的下游面,(j)和(j')表示过滤前、后膜的截面。从各个面的 SEM 图像来看,生啤过滤后网状结构 PVDF-N 微滤膜的上游面被一些物质所覆盖,污染严重,膜下游面基本没变化;指孔状结构 PVDF-N 微滤膜上游面覆盖物质较少,依然可以见到膜孔,下游侧变化不明显,表明指孔状结构 PVDF-F 微滤膜抗污染性能较好。这与前述实验中指孔状结构的 PVDF-F 膜稳定平衡通量为 $35.0\text{L}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$,而网状结构的 PVDF-N 膜稳定平衡通量为 $22.2\text{L}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$ 的实验结果相吻合,说明在对生啤这种含有丰富营养成分的液体过滤时,指孔状结构的 PVDF-F 膜具有更好的抗污染性和更高的稳定平衡通量。

图5所示为水滴自接触 PVDF 微滤膜表面到完全消失时的接触角变化曲线。结果表明两种结构的微滤膜均具有良好的亲水性,水滴在120s内完全融入膜中。可见正是由于滤膜具有良好的亲水性能,在生啤过滤中表现出了较好的抗污染能力,其稳定

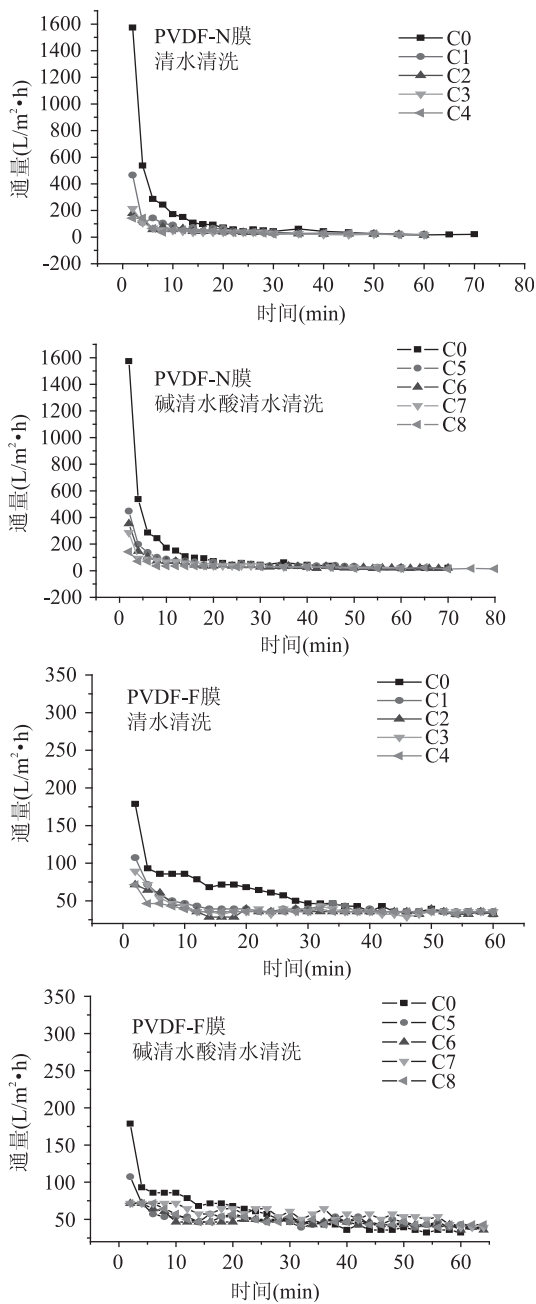


图3 亲水性PVDF膜过滤啤酒通量随时间变化曲线

Fig.3 Time dependent draft beer flux filter with hydrophilic PVDF membranes

平衡通量较之一般工业生产过程中有一定的提高。

3 结论

3.1 当微滤膜孔径在 $0.22\mu m$ 数量级或以下时,能够有效除去生啤中的微生物,达到啤酒生产要求。

3.2 指孔状结构的PVDF-F微滤膜用碱、清水、酸、清水交替清洗具有更高的稳定平衡通量,但即使采用清水进行清洗,其稳定平衡通量也达到 $35.0L/(m^2 \cdot h)$ 。说明用指孔状结构的PVDF-F微滤膜过滤生啤除菌,仅采用清水清洗膜在生产上是可行的。

3.3 从SEM图像可以看出,生啤过滤后网状结构PVDF-N微滤膜上游面被一些物质所覆盖,污染严重,而指孔状结构PVDF-F膜上游面覆盖物质较少,依然可以见到膜孔,说明指孔状结构PVDF-F膜具

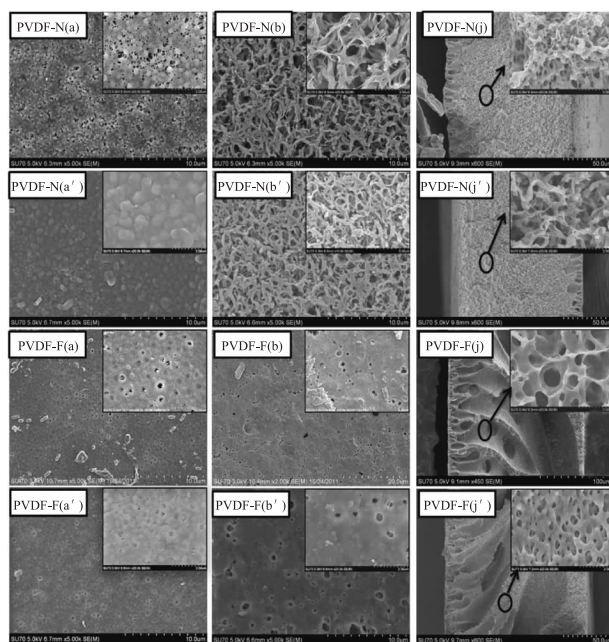


图4 PVDF-N和PVDF-F膜过滤生啤前后的SEM显微照片

Fig.4 SEM photographs of PVDF-N and PVDF-F membranes before and after draft beer filtration

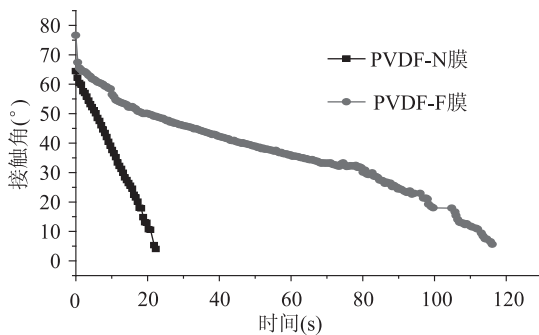


图5 亲水性PVDF微滤膜接触角测定

Fig.5 Contact angle of hydrophilic PVDF microfiltration membranes

有更好的抗污染性。

参考文献

- [1] 刘胜国,旭敏.膜分离技术在食品工业清洁生产中的应用[J].现代食品科技,2007,23(6):95-97.
- [2] 寿洪志,谢光发,凌志勇,等.膜分离技术在酿酒业中的应用探讨[J].中国酿造,2007(3):58-60.
- [3] Yazdanshenas M, Soltanieh M, TabatabaeiNejad S A R, et al. Cross-flow microfiltration of rough non-alcoholic beer and diluted malt extract with tubular ceramic membranes; Investigation of fouling mechanisms[J]. Journal of Membrane Science, 2010, 362(1):306-316.
- [4] 周广田,李宁,任金艳.纯生啤酒的特点和生产管理的重点[J].酿酒科技,2007(5):118-121.
- [5] 崔云前,王成忠.改善纯生啤酒膜过滤系统堵塞的主要措施[J].中国酿造,2006(4):64-67.
- [6] Fillaudeau L, Carrere H. Yeast cells, beer composition and

(下转第176页)

分类鉴定,在形态结构和分子水平上都进行了研究,所得结果一致并可相互印证,可见对内生真菌分类研究,采用综合性手段的必要性和可靠性。

参考文献

- [1] 黄自来. 中国食用菌百科[M]. 北京: 中国农业出版社, 1993: 56-59.
- [2] 王海坤, 李涛, 赵丹丹, 等. 两株滇产广义美味牛肝菌的分离培养及其分子鉴定[J]. 云南植物研究, 2007, 29(5): 559-562.
- [3] McLaughlin DJ. Environmental control of fruit body development in *Boletus rubellus* in axenic culture[J]. *Mycologia*, 1970, 62: 307-331.
- [4] Pantidou M, Watling R. Fruit-bodies of *Boletus amarellus* in pure-culture[J]. Notes from the Royal Botanic Garden, 1973, 32: 439-443.
- [5] Yamanaka K, Namba K, Tajiri A. Fruit body formation of *Boletus reticulatus* in pure culture[J]. *Mycoscience*, 2000, 41: 189-191.
- [6] Ohta A, Fujiwara N. Fruit - body production of an ectomycorrhizal fungus in genus *Boletus* in pure culture[J]. *Mycoscience*, 2003, 44: 295-300.
- [7] 黄年来. 中国大型真菌原色图谱[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [8] 吴晓刚. 牛肝菌的分离培养及磷酸盐转运蛋白基因的克隆[D]. 昆明: 云南大学, 2012.
- [9] 朱萍, 郭永红, 丁晓雯, 等. 四种鲜牛肝菌成分分析[J]. 中国食用菌, 2006, 25(4): 44-45.
- [10] 江洁, 李学伟, 金怀刚. 美味牛肝菌菌丝体与子实体蛋白质营养价值的评价[J]. 食品科学, 2013, 34(3): 253-255.
- [11] 沈杰. 远东疣柄牛肝菌的化学成分[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2003.
- [12] 刘佳, 殷忠, 高敏, 等. 野生牛肝菌化学成分分析及遗传毒性研究[J]. 微量元素与健康研究, 2007, 24(3): 3-4.
- [13] 李志洲. 美味牛肝菌多糖的抗氧化性[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(4): 49-51.
- [14] 李娜. 泰山美味牛肝菌多糖提取纯化及功能研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2008.
- [15] 唐薇, 鲁新成. 美味牛肝菌多糖的生物活性及其抗 S-180 肿瘤的效应[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 1999, 24(4): 478-481.
- [16] Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves[C]// Andrews J H, Hirano S S eds. Microbial ecology of leaves. New York: Springer-Verlag, 1991: 179-197.
- [17] Strobel G, Stierle A, Stierle D. *Taxomyces andreanae*: a proposed new taxon for a bulbilliferous by phomycete associated with pacific yew (*Taxus brevifolia*) [J]. *Mycotaxon*, 1993, 38(3): 214.
- [18] 黄忠京, 杨瑞云, 白丽娟, 等. 南海红树林内生真菌 ZSU-H26 生物碱类代谢产物的研究[J]. 化学研究与应用, 2009, 21(11): 1566-1570.
- [19] Harper J K, Ford E J, Strobel G A, et al. Pestacin: a 1, 3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities[J]. *Tetrahedron*, 2003, 59: 2471-2476.
- [20] 刘琼波, 苏开美, 白永顺, 等. 美味牛肝菌的菌种分离培养实验初探[J]. 食用菌, 2007(4): 25-26.
- [21] 曾大兴. 适于 RAPD 分析的真菌 DNA 提取方法[J]. 生物技术, 2003, 13(2): 2.
- [22] 江树勋, 邵碧英, 陈文炳, 等. 15 种常见食(药)用菌的 3 种总 DNA 提取方法比较研究[J]. 食品科学, 2004, 25(5): 37.
- [23] White TJ, Bruns TD, Lee SB, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[A]. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications [M]. New York: Academic Press, 1990: 315-321.
- [24] 中国科学院微生物研究所《常见与常用真菌》编写组. 常见与常用真菌[M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- mean pore diameter impacts on fouling and retention during cross-flow filtration of beer with ceramic membranes[J]. *Journal of Membrane Science*, 2002, 196: 39-57.
- [7] Otaki M, Takizawa S, Ohgaki S. Control and modeling of membrane fouling due to microorganism growth by UV pretreatment[J]. *Water science and technology*, 1998, 38(4): 405-412.
- [8] 耿锋, 戴海平. PVDF 微滤膜清洗研究[J]. 工业安全与环保, 2008, 34(6): 5-7.
- [9] 张博丰, 马世虎. 超/微滤膜的膜污染与膜清洗研究[J]. 供水技术, 2009(3): 13-16.
- [10] Singh N, Husson S M, Zdyrko B, et al. Surface modification of microporous PVDF membranes by ATRP[J]. *Journal of membrane science*, 2005, 262(1): 81-90.
- [11] Meng J Q, Chen C L, Huang L P, et al. Surface modification of PVDF membrane via AGET ATRP directly from the membrane surface [J]. *Applied Surface Science*, 2011, 257(14): 6282-6290.
- [12] Yuan J, Meng J, Kang Y, et al. Facile surface glycosylation of PVDF microporous membrane via direct surface-initiated AGET ATRP and improvement of antifouling property and biocompatibility[J]. *Applied Surface Science*, 2012, 258(7): 2856-2863.
- [13] 宋水均, 韩玉, 黄啸, 等. 聚偏氟乙烯微滤膜性能及结构[J]. 水处理技术, 2012, 38(1): 32-40.
- [14] 陆茵, 宋水均, 韩玉, 等. 聚偏氟乙烯膜或者聚氯乙烯膜表面改性方法: 中国, ZL 2011 1 0419682.6[P]. 2013-09-25.
- [15] Shao P, Huang R Y M, Feng X, et al. Gas-liquid displacement method for estimating membrane pore-size distributions[J]. *AIChE journal*, 2004, 50(3): 557-565.

(上接第 171 页)