

脉冲电场制备磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  海藻酸盐微球的工艺研究\*

刘 萍,薛伟明,石 梅,向 卓

(西北大学化工学院,陕西西安,710069)

**摘 要** 以  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粉末作为磁性材料,以海藻酸钠、壳聚糖作为微胶囊制备材料,以大肠杆菌为细胞模型,以  $\text{CaCl}_2$  为交联剂,采用脉冲电场微球成型工艺制备载细胞磁性微胶囊。以微球粒径为检测指标,正交设计考察显著影响因素及影响规律。采用振动磁强计测定微囊的饱和磁化强度。实验结果表明,海藻酸钠溶液浓度是影响载磁微球粒径的显著因素。在  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  浓度为 1 mg/mL、海藻酸钠浓度为 10 mg/mL 金属锐孔孔径为 450  $\mu\text{m}$ 、流速 4 mL/h、 $\text{CaCl}_2$  浓度为 20 mg/mL 的工艺条件下,制备了球形度均匀、分散性好、具有强磁响应性、平均粒径 132.2  $\mu\text{m}$  的超顺磁性微球,制备工艺对被封装细胞的生长代谢活性无影响。 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  包封率为 93%~96%。脉冲电场工艺可实现磁性载细胞微球的高效简便制备。

**关键词** 磁性微球,海藻酸钠, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,脉冲电场

当前发酵工业关注的重点问题是消除产物对细胞生长代谢的抑制作用,保护发酵过程中的细胞活性,简化发酵产物的分离操作并降低分离过程能耗,解决因染菌引起的倒罐损失等问题<sup>[1~3]</sup>。针对这些问题,人们采用固定化细胞技术,采用适当的载体材料和方法负载细胞,在一定程度上可以保护细胞免受发酵过程的机械搅拌剪切损伤、增加细胞浓度和发酵强度、为实现细胞与产物分离提供便利<sup>[4]</sup>。已有的细胞固定化技术包括吸附、共价交联、凝胶包埋<sup>[5]</sup>等,但是,以发酵生产为应用为背景时,这些技术存在的主要问题是:(1)固定化载体尺寸过大(通常>3mm),难以在发酵容器中稳定悬浮,载体与培养环境的物质交换边界层更新速度慢,固定化细胞与培养环境之间的物质交换路径长、阻力大;(2)采用吸附、包埋等工艺制备的固定化细胞,细胞包封率低且易脱落,而共价交联技术也存在细胞损伤和细胞载量低问题;(3)发酵系统中的产物分离不能实现连续化操作。

本课题组以生物相容性优良的自然多糖海藻酸盐、壳聚糖为载体材料,采用脉冲电场微球制备工艺,制备微尺度固定化细胞载体。工艺特色为:(1)载体尺寸在微米级范围,传质路径短、比表面积大,在确保载体在发酵系统中稳定悬浮的基础上,维持载体内细胞与培养环境之间的良好传质状态;(2)载体在生理条件下制备(中性、常温、常压),无需添加任何有机溶剂,能最大限度维持被封装的细胞活性;(3)与乳

法、吸附法、共价交联法等工艺相比,本工艺简便高效、细胞包封率和活性高、无细胞泄漏、无残留溶剂毒害等特点;(4)微球表面具有的选择性半透膜使微球内部成为相对稳定的培养微环境,外界小分子营养物质通过膜孔扩散进入微球,同时细胞代谢产品在浓度梯度推动下向外界主体溶液扩散,可减轻发酵产物对细胞生长与代谢活性的抑制,有助于提高发酵转化率;(5)本工艺制备的微球载体具有多孔网络微观结构,有助于细胞在微球内高密度生长。

为了实现发酵过程中代谢产物与固定化细胞的在线、快速和连续化分离操作,以纳米  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粉体为磁性材料,设计了一种磁性的载细胞海藻酸盐-壳聚糖微球。通过向发酵设备通入电磁场,使磁性微球携带细胞定向移动并附着在容器器壁上,排出发酵物料后,取消电磁场,在  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粉体超顺磁性作用下,微球重新良好悬浮于新鲜培养液中,进行二次发酵。

载细胞磁性微球用于细胞固定化培养需满足以下几个条件:(1)强的磁响应性,以保证载细胞磁性微球对外磁场反应的灵敏性;(2)小的微球粒径,以保证较大的比表面积及较好的悬浮性能,同时,小粒径微球可避免细胞团内的细胞因养分不足而凋亡的问题;(3)较窄的粒径分布范围以保证载细胞磁性微球在外磁场下的移动速度均一,分离效率高。为此本文以微球粒径为指标对制备工艺进行优化,制备出形态好、粒径小、粒径分布窄且具有合适磁响应性能的微球。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料和试剂

海藻酸钠(化学纯,西安精细化工厂);无水

第一作者:硕士研究生(薛伟明教授为通讯作者)。

\*国家自然科学基金资助项目(50373046);陕西省教育厅专项科研计划资助项目(07JK386),西北大学研究生创新基金资助项目(07YZZ23)

收稿日期:2007-10-31,改回日期:2007-12-18

CaCl<sub>2</sub>(分析纯,天津市科密欧化学试剂开发中心); Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(分析纯,上海化学试剂采购供应站试剂厂); 大肠杆菌(陕西微生物研究所); 酵母粉(广州雷得生物技术有限公司); 胰蛋白胨(英国 OXOID 公司); NaCl(分析纯,成都市金山化工试剂厂); 琼脂(英国 OXOID 公司); NaOH(分析纯,天津市化学试剂三厂); HCl(分析纯,西安化学试剂厂); 还原铁粉(优级纯,浙江金鹏化工股份有限公司)。

## 1.2 仪器

脉冲电场液滴制备仪(自制), WZ-50C2 型注射泵(浙江大学医学仪器有限公司), XDS-1B 实验室倒置生物显微镜(重庆光电仪器总公司), BCM 生物洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司), 2D-85 气浴恒温摇床(杭州国华电器有限公司), 5415D-Eppendorf 离心机(北京博益伟业仪器有限公司), 101A-3 型电热鼓风干燥箱(上海实验仪器厂有限公司), FA2004 型电子天平(上海精科天平仪器厂), VSM 155 型振动样品磁强计(美国 ADE 公司), Coulter 激光粒度仪(DLSA 440SX 美国 Beckman-Coulter), 精密移液枪(20~200 μL)(芬兰 Proline pipette), LS-B35L 立式压力蒸汽灭菌锅(江阴滨江医疗设备厂), 722 型可见光光栅分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),

## 1.3 方法

### 1.3.1 磁性载细胞微球的制备

将悬浮培养至对数生长期的大肠杆菌溶液浓度调节至 10<sup>6</sup> 个/L, 移取 2.0 mL 并经 1 800 r/min、8 min 离心, 收集菌体沉淀, 与 10 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 粉末一起加入到 10 mL、15 mg/mL 海藻酸钠溶液中并混合均匀, 将此原料液盛于注射器中。将微球制备仪的正、负电极分别固定在注射器金属锐孔和 20 mg/mL-CaCl<sub>2</sub> 溶液中的金属导电环上, 在脉冲电场作用下, 混悬液滴入 100 mL CaCl<sub>2</sub> 溶液中凝胶 20 min, 得到粒径 200~300 μm 的凝胶珠。使胶珠与 5 mg/mL 壳聚糖溶液成膜反应 10 min, 形成磁性的载细胞海藻酸钙-壳聚糖微球。实验均在无菌条件下操作。

### 1.3.2 微球形态观测

移取磁性载细胞微球, 分散于去离子水中, 在倒置显微镜下观察微球完整性、球形度、光洁度、细胞与磁性 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 负载状态等, 并测定粒径结构参数。

### 1.3.3 大肠杆菌培养基配制

液体培养基: 酵母粉 3.0 g, 胰蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 蒸馏水 1 000 mL。完全溶解后用 1%

NaOH 调节 pH=7.2~7.4, 121℃ 灭菌 30 min。

固体培养基: 酵母粉 3.0 g, 胰蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL。完全溶解后用 1% NaOH 调 pH 值到 7.2~7.4, 于 121℃ 灭菌 30 min。

### 1.3.4 磁性固定化细胞的培养

无菌条件下, 将磁性载大肠杆菌微球接入装有 100 mL 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 37℃、200 r/min 恒温摇床培养, 隔时取样并在倒置显微镜下观察微球形态和细胞生长状态。

### 1.3.5 包封率测定

细胞包封率测定: 准确移取 1.3.1 中混合均匀的原料液 50 μL, 用无菌蒸馏水稀释至 5 mL。移取稀释液 10 μL, 涂布于平板培养基上。37℃ 培养 24 h, 对平板菌落计数后, 换算成原料液中大肠杆菌数量 M<sub>0</sub>。移取凝胶液 0.2 mL, 涂布于平板培养基上。37℃ 培养 24 h, 对平板菌落计数后, 换算成凝胶液中大肠杆菌数量 M。应用式 1 计算大肠杆菌在微球中的包封率 η<sub>i</sub>。

$$\eta_i / \% = \frac{M_0 - M}{M_0} \times 100 \quad (1)$$

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 包封率测定<sup>[6,7]</sup>: 准确计量 1.3.1 所述混合均匀的原料液中 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 的加入量 M<sub>0</sub>, 当注射器中原料液全部滴入凝胶浴中后, 采用 80 目不锈钢筛网滤出微球, 移取充分搅拌均匀的滤液 5.0 mL 并加入 5.0 mL、2 mol/L HCl 中, 使滤液中 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 微粒充分溶解, 转移 50 mL 容量瓶中, 加入 10% 盐酸羟胺 1 mL, 1 mol/L NaAc 5 mL 及 0.15% 邻二氮杂菲 2 mL, 摇匀用蒸馏水稀释到刻度, 静置 10 min 后, 在分光光度计上于 510 nm 测定溶液的吸光度, 换算成 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 质量数 M。仿照式 1 原则计算包封率 η<sub>p</sub>。

标准溶液的配制: 称取 0.200 g 还原铁粉, 精确至 0.001 g, 放入 100 mL 烧杯中, 加 10 mL 浓盐酸(ρ=1.19 g/mL)。缓慢加热至完全溶解, 冷却, 定量转移至 1 000 mL 容量瓶中, 稀释至刻度并摇匀。

移取 25.0 mL 上述标准溶液定容至 500 mL 容量瓶中。1 mL 该标准溶液含有 10 μg 的铁。

标准曲线绘制: 准确吸取 10 μg/mL 铁标准液 0.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL, 加入到 50 mL 容量瓶中, 再分别依次加入 10% 盐酸羟胺 1 mL, 1 mol/L NaAc 5 mL 及 0.15% 邻二氮杂菲 2 mL, 摇匀, 用蒸馏水稀释到刻度, 静置 10 min 后在分光光度计上于 510 nm 测定溶液的吸光度, 后以含铁量(μg)为横坐

标,吸光度为纵坐标绘制出标准曲线。

### 1.3.6 微球的磁特性和磁含量测定

取 0.0290 g 冷冻干燥后的载磁微球,放入 VSM-155 型振动样品磁强计中,在外加磁场为  $-10 \sim 10 \text{ koe}$  时,记录磁球的比饱和和磁化强度  $\sigma$  ( $\text{emu/g}$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 磁性载细胞海藻酸盐-壳聚糖微球形态

图 1、图 2 结果显示,磁性载细胞微球球形良好,粒径均匀。图 3 表明,磁性海藻酸钙微球的粒径分布呈正态分布,平均粒径  $132.3 \mu\text{m}$ 。磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的黑色颗粒均匀分散在微球中,封装率达到  $93\% \sim 96\%$ ,为微球在外磁场作用下具有足够强的磁响应性提供了保障。与培养前相比,经过 48 h 培养的载磁微球中,大肠杆菌生长密度显著增大,同时,微球及微球膜形态保持完好,表明微球中的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  对被封装细胞生长代谢活性无影响。作为细胞培养的微反应器,海藻酸盐-壳聚糖微球具有良好的生物相容性和机械稳定性。

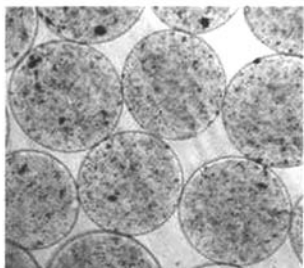


图 1 载细胞磁性海藻酸盐微球

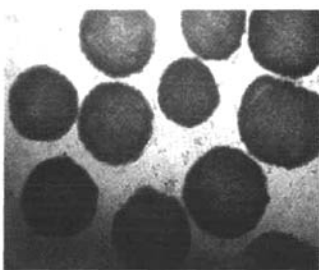


图 2 载大肠杆菌磁性海藻酸盐微球培养 48 h

海藻酸盐、壳聚糖分属阴、阳离子聚电解质,海藻酸盐分子链上的游离羧基与壳聚糖分子链上的游离伯氨基在静电力作用下,通过聚电解质络合反应快速形成微球膜,能有效保持被封装细胞的活性与功能。同时,通过控制反应条件可以调节膜的传质系数,使之作为生物微反应器能适应不同反应与分离的需求。

### 2.2 微球的磁特性和磁含量

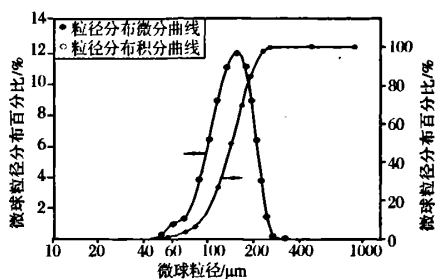


图 3 磁性海藻酸盐微球粒径分布曲线

由图 4 可见,当外加磁场开始增加的时候,磁性海藻酸钙微球样品的磁化强度迅速提高;当外加磁场强度增加到一定程度后,磁性海藻酸钙微球样品的磁化强度增长速率逐渐放慢直至饱和磁化强度( $\sigma$  为  $9.5315 \text{ emu/g}$ )。当外加磁场强度下降时,磁性海藻酸钙微球样品的磁化强度也随之下降,当外加磁场为 0 时,磁性海藻酸钙微球的磁化强度降低为 0,没有矫顽力与剩磁现象,即磁性海藻酸钙微球样品呈超顺磁性<sup>[8,9]</sup>。这一性能在保证载细胞磁性微球在一定的磁场强度环境下实现细胞与发酵产物的在线分离,操作成本与设备成本较低,同时,当外加磁场消失后,微球的超顺磁性特性又能使之在反应器中良好分散,保证二次发酵的良好状态。

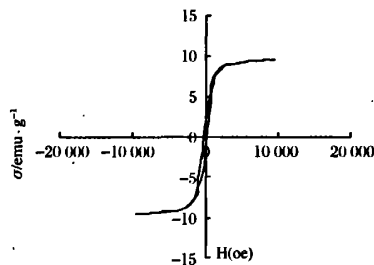


图 4 磁性海藻酸盐微球磁化曲线

### 2.3 显著影响因素分析

对表 1 设计的正交实验进行极差分析和方差分析,结果表明,在载磁海藻酸钙微球制备工艺中,海藻酸钠浓度影响最显著( $F_{\text{Na}} > F_{\text{Fe}}$ ),其次为泵速,铁含量、锐孔孔径、氯化钙浓度对载磁微球的影响并不显著。然而铁含量对微球比重影响较大,故将铁含量、海藻酸钠浓度和泵速对微球粒径的影响进行进一步讨论。

### 2.4 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 含量对海藻酸钙微球粒径的影响

图 5 结果表明,当海藻酸钠浓度  $15 \text{ mg/mL}$ 、 $\text{CaCl}_2$  浓度  $20 \text{ mg/mL}$ 、原料液推进速度  $5 \text{ mL/h}$ 、原料液锐孔通道内径  $450 \mu\text{m}$  时,微球粒径随原料液中  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  含量的增加而增大,但增大程度不显著;与此

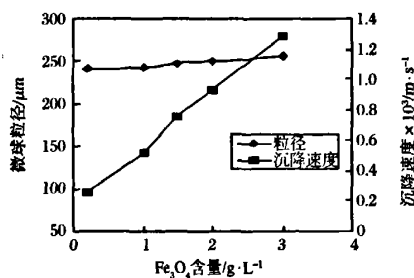


图5  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  含量对微球粒径及微球沉降速度的影响  
同时,与微球质量相关的微球沉降速率却随  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  含量的增加而显著增大。

微球在分散介质中的沉降速度满足 stokes 定律<sup>[10]</sup>:

$$V = \frac{2r^2(\rho_1 - \rho_2)g}{9\eta} \quad (2)$$

表1  $\text{L}_3(18)$ 微球制备正交试验

	铁含量 /mg·mL <sup>-1</sup>	海藻酸钠浓度 /mg·mL <sup>-1</sup>	锐孔孔径 /μm	CaCl <sub>2</sub> 浓度 /mg·mL <sup>-1</sup>	泵速 /mL·h <sup>-1</sup>	粒径 /μm
1	1.0	10	450	10	3	198.4
2	1.0	12	500	15	4	234.0
3	1.0	15	600	20	5	304.5
4	1.5	10	450	15	4	210.7
5	1.5	12	500	20	5	222.4
6	1.5	15	600	10	3	226.2
7	2.0	10	500	10	5	220.2
8	2.0	12	600	15	3	244.8
9	2.0	15	450	20	4	252.8
10	1.0	10	600	20	4	118.2
11	1.0	12	450	10	5	253.2
12	1.0	15	500	15	3	240.3
13	1.5	10	500	20	3	194.4
14	1.5	12	600	10	4	192.0
15	1.5	15	450	15	5	168.8
16	2.0	10	600	15	5	194.9
17	2.0	12	450	20	3	251.2
18	2.0	15	500	10	4	303.8
均值1	224.767	189.467	239.183	238.967	232.550	
均值2	225.750	232.933	235.850	232.917	218.583	
均值3	244.617	272.733	220.100	223.917	244.000	
极差	19.850	83.266	19.083	15.050	25.417	
偏差平方和	1493.632	1493.632	1493.632	1493.632	1493.632	
自由度	2	2	2	2	2	
F比	0.695	9.678	0.584	0.321	0.914	
F临界值	6.940	6.940	6.940	6.940	6.940	
显著性	3	1	4	5	2	

## 2.5 海藻酸钠浓度对载磁微球粒径的影响

图6结果表明,海藻酸钠浓度过低时不能形成完整的海藻酸钙微球,随着海藻酸钠浓度的升高,原料液的密度增加,原料液的表面张力指数性增大<sup>[11]</sup>,表面张力与液滴粒径关系为<sup>[9]</sup>:

$$\gamma = (V\rho g/r)f \quad (3)$$

式中:  $\gamma$  为液体表面张力, kg/s<sup>2</sup>;  $V$  为液滴体积, mm<sup>3</sup>;  $\rho$  为液体密度, g/cm<sup>3</sup>;  $r$  为锐孔半径,

式中,  $V$  为微球沉降速度, m/s;  $r$  为微球半径, m;  $\rho_1$ 、 $\rho_2$  分别为微球和分散介质的密度, kg/m<sup>3</sup>;  $g$  为重力加速度, m/s<sup>2</sup>;  $\eta$  为分散介质的粘度, Pa·s。

由于  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  比重较大(5.17),微球中  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  含量的过度增加会导致微球质量显著增大,加快微球沉降过程,使载磁微球在发酵容器中不能良好悬浮,影响营养底物与代谢产物的良好传质和细胞生长状态;另一方面,增大的质量和粒径会减慢微球在外磁场中的移动速度,不利于微球与发酵体系的在线分离。因此,在保证微球具有足够磁响应性的前提下,铁盐添加量并非越多越好。在制备磁性微球时,原料液中  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  含量以 1~3 mg/mL 为宜。

$\mu\text{m}$ ;  $g$  为重力加速度, m/s<sup>2</sup>;  $f$  为校正因子。由式(3)可知,表面张力的增大必然导致液滴体积的增大,从而固化后的微球粒径增大。

## 2.6 泵速对载磁微球粒径的影响

图6结果显示,在海藻酸钠浓度为 10 mg/mL、 $\text{CaCl}_2$  浓度为 20 mg/mL、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  质量浓度为 2.0 mg/mL、金属锐孔孔径 450  $\mu\text{m}$  的条件下,随着泵速的增加,微球的粒径也随之增加。在外加电场力不变

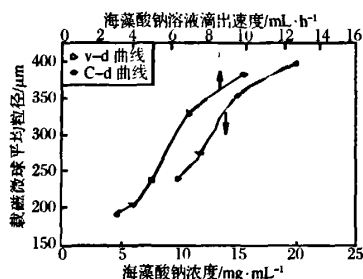


图6 海藻酸钠浓度、溶液滴出速度对微球粒径的影响

的情况下,随着泵速的增加,推动力增加,将使金属锐孔处生长的液滴在单位时间内的质量和体积增大,形成的微球粒径随之增大。虽然泵速的增加导致微球粒径的增加,却能够缩短微球制备工艺的时间,提高了工作时效和工作效率。综合考虑泵速对微球粒径影响显著程度和工作时间2方面的因素,选择合适的泵速范围:3~10 mL/h。

### 3 结论

本文针对细胞发酵生产中面临的发酵产物对细胞生长代谢的抑制问题,以具有选择性透过膜的微胶囊作为细胞生长、生产的微反应器,通过负载磁性材料,实现微反应器和发酵产物的在线分离和发酵生产的连续化操作,考察微胶囊形态,优化制备工艺条件。结果表明,制备的工艺条件中影响微球粒径的显著性顺序依次为海藻酸钠浓度、泵速、铁含量、锐孔孔径、氯化钙浓度。综合考察得出优化的工艺条件为  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  浓度为 1 mg/mL、海藻酸钠浓度 10 mg/mL、金属锐孔孔径 45  $\mu\text{m}$ 、泵速 4 mL/h、 $\text{CaCl}_2$  浓度 20 mg/mL。

## Technology Study on Preparation of Magnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4$ Alginate Microcapsules by Pulsed Electric Field Technique

Liu Ping, Xue Weiming, Shi Mei, Xiang Zhuo

(College of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China)

**ABSTRACT** Taking  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  as a magnetic material, sodium alginate and chitosan as a microcapsule preparation materials, the *E. coli* as cell model and calcium as the cross-linking agent, magnetic microcapsules containing cells were prepared by Pulsed Electric Field process. Choosing particle size of microsphere as detecting target, the obvious influencing factors were inspected by orthogonal design. The saturation magnetization of the microcapsules was determined by VSM (Vibrating Sample Magnetometer). The results showed that the concentration of sodium alginate solution was the significant factor impacting on the particle size of magnetic microspheres. In the process condition of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  concentration 1 g/L, sodium alginate concentration 10 mg/mL, metal-orifice diameter 45  $\mu\text{m}$ , pump speed 4 mL/h,  $\text{CaCl}_2$  concentration 20 mg/mL, the super paramagnetic microspheres were prepared with uniform degree of sphericity, good dispensability and strong magnetic response. The average particle size was 132.2  $\mu\text{m}$ . Pulsed Electric Field process was simple, convenient and feasible, it had no negative effect on the growth and metabolism of cells. The encapsulation efficiency of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  was 93%~96%.

**Key words** magnetic microspheres, sodium alginate,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , pulsed electric field

脉冲电场工艺简单、可行,制备出的载细胞磁性微球粒径分布窄,球形度良好。整个体系在实现细胞的高效包封的同时,微胶囊膜的选择透过特性也为细胞生长代谢提供适宜的条件。磁性粒子的包封对细胞的生长无显著影响,是载细胞微球磁响应分离的物质基础,可望在发酵业中实现发酵产物与细胞的高效、节能分离。

### 参考文献

- 1 Willaert R, Nedovic V. Primary beer fermentation by immobilized yeast—a review on flavour formation and control strategies. [J] Chem Technol Biotechnol, 2006, (81): 1 353~67
- 2 Atkinson B, Mavittuna F. Immobilized Cell Systems, Biochem. Eng & Biotech [J]. Handbook, 1991, (2): 768
- 3 崔建涛, 李建新, 王育红, 等. 细胞固定化技术的研究进展 [J]. 农产品加工, 2007, (1): 24~26
- 4 Cheethamp S J, Blunt K W. Physical studies on cell immobilization using calcium alginate cells [J]. Biotechnol Bioeng, 1979, (21): 2 155
- 5 Champagne C P. Lactorococcus lactis release from calcium alginate beads [J]. Appl Environ Microbiol, 1992, (58): 1 429
- 6 姜 健. 分光光度法测定自来水中的铁含量 [J]. 辽宁化工, 2005, 34(4): 183~184
- 7 张 渡, 高玉清. 火电厂用工业硫酸试验方法. 中华人民共和国电力行业标准, DL 424—91
- 8 李 玲, 向 航. 功能材料与纳米技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003
- 9 田民波. 磁性材料 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2001. 25~60
- 10 Cundall P A, Lstrack O D. A discrete numerical model for granular assemblies [J]. Geotechnique, 1979, (29): 47~65
- 11 薛伟明, 于炜婷, 刘袖洞, 等. 静电液滴法制备 10  $\mu\text{m}$  粒径的蛋白质药物微球载体 [J]. 科学通报, 2005, 50 (22): 2 463~2 468