

# 小麦秸秆水解糖发酵制备 *L*-乳酸工艺优化

李兴江<sup>1</sup>, 杨为华<sup>2</sup>, 姜绍通<sup>1</sup>, 潘丽军<sup>1</sup>

(1. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009; 2. 安徽丰原集团, 安徽 蚌埠 233010)

**摘要:** 以秸秆水解液为原料发酵制备高光学纯度 *L*-乳酸将有效提升农业废弃物的利用价值。基于发酵过程中存在代谢抑制的现象, 通过正交试验与神经网络分析方法, 进行秸秆液糖质量浓度优化以及活性炭与大孔树脂对秸秆液抑制的脱除研究, 并结合菌株好氧特性进行摇瓶转速的优化。正交试验表明: 秸秆糖质量浓度、活性炭添加量、大孔树脂含量及摇瓶转速 4 个因素对米根霉发酵秸秆糖制备 *L*-乳酸均具有显著影响, 在正交试验组中最佳实验结果为 *L*-乳酸产量为 82.8 g/L。BP 神经网络预测秸秆糖质量浓度为 126 g/L、活性炭添加量为 2.48 g/L、大孔树脂含量为 1.6 g/L 及 500 mL 摇瓶转速为 234 r/min 时发酵最佳, 该条件下验证实验 *L*-乳酸产量为 86.9 g/L。通过正交试验及神经网络预测分析提高了米根霉发酵秸秆液制备 *L*-乳酸的产量。

**关键词:** 小麦秸秆水解液; 米根霉; *L*-乳酸; 正交设计; BP 神经网络

## Optimization of Fermentation Conditions for *L*-Lactic Acid Production from Wheat Straw Hydrolysate

LI Xing-jiang<sup>1</sup>, YANG Wei-hua<sup>2</sup>, JIANG Shao-tong<sup>1</sup>, PAN Li-jun<sup>1</sup>

(1. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;

2. Anhui Fengyuan Group, Bengbu 233010, China)

**Abstract:** In the present study, wheat straw hydrolysate was fermented in a 500 mL shaking flask to prepare high-optical purity *L*-lactic acid for effectively elevating the utilization value of the agricultural waste. Considering metabolic inhibition probably occurring during fermentation, the optimization of wheat straw hydrolysate concentration, amounts of added HN-Y13 type activated carbon and DM11 type macroporous resin as adsorbents to the fermentation inhibitors in wheat straw hydrolysate and shaking speed was carried out using orthogonal array design and back-propagation artificial neural network (BP-ANN). From the results of orthogonal array experiments, it was found that *L*-lactic acid production was remarkably influence by all the above four factors and reached up to 82.8 g/L under optimized conditions determined through range analysis. The optimal values of wheat straw hydrolysate concentration, amounts of added HN-Y13 type activated carbon and DM11 type macroporous resin and shaking speed were predicted with BP-ANN to be 126, 2.48 g/L and 1.6 g/L, and 234 r/min, respectively. The yield of *L*-lactic acid was 86.9 g/L under these conditions, much higher than before optimization.

**Key words:** wheat straw hydrolysate; *Rhizopus oryzae*; *L*-lactic acid; orthogonal array design; BP neural network  
中图分类号: TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2010)23-0169-05

我国每年浪费的农作物秸秆超过 7 亿 t, 若能利用生物发酵的方法将秸秆降解为水解糖, 并进一步转化成具有更高价值的 *L*-乳酸或其他产物, 其产业前景将非常广阔<sup>[1-3]</sup>。

*L*-乳酸广泛应用于食品、医药、饲料、化工等领域。*L*-乳酸的聚合物——聚 *L*-乳酸(PLA)是无毒高分子化合物, 具有生物相容性, 聚 *L*-乳酸是良好的绿色材料, 对消除“白色污染”具有极其重要的意义<sup>[4-6]</sup>。在众多的产乳酸微生物中, 米根霉由于具有产物光学纯度

高、营养消耗简单、产物易于分离等特点而成为生产高光学纯度 *L*-乳酸的理想菌株, 但是秸秆水解糖中大量抑制剂的存在使得菌株的生产能力远远低于淀粉糖的发酵, 利用米根霉发酵秸秆水解液制备 *L*-乳酸的产量距离工业放大仍有较大距离<sup>[7-9]</sup>。

BP 神经网络因具有良好的非线性映射而广泛应用于各种工艺及条件的模型分析中, 由于 BP 神经网络是基于生物神经元的相互作用而建立的方法, 当其应用于以大量细胞为活动主体的微生物发酵中时, 表现出较高的

收稿日期: 2010-09-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071636); 安徽省自然基金项目(090411010); 安徽省高校自然科学基金项目(KJ2010A262)

作者简介: 李兴江(1978—), 男, 讲师, 博士, 主要从事微生物发酵工程研究。E-mail: lixingjiang1978@hufut.edu.cn

适应能力与预测能力<sup>[10-11]</sup>。标准的BP网络模型由输入层、隐含层及输出层构成,各层次之间的神经元通过权重形成全互连接,采用误差反馈学习算法<sup>[12]</sup>。

本研究以农作物秸秆水解液为碳源发酵L-乳酸,通过对发酵工艺进行正交设计及神经网络分析研究,拟降低发酵抑制并最终实现秸秆水解液高产L-乳酸。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

菌株:米根霉(*Rhizopus oryzae* 抗抑制剂突变株)为本实验室保藏。

秸秆糖原料为安徽丰原生化集团国家发酵工程中心提供,采用160℃、25s瞬时碱爆制备获得,其中葡萄糖与木糖比例为3.5:1,总糖质量浓度采用旋转蒸发制备成90~150g/L。

DM11型大孔树脂 安徽三星树脂有限公司;HN-Y13型活性炭 唐山华能科技炭业有限公司。

Waters2000型高效液相色谱;756型分光光度计。

### 1.2 基本发酵培养基及培养

秸秆水解总糖90g/L、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8g/L、ZnSO<sub>4</sub> 0.44g/L、CaCO<sub>3</sub> 40g/L(用于中和菌体所产的酸,保持pH值中性,并采用分消后添加方式)。采用500mL规模的三角瓶装液150mL进行发酵。同时往发酵培养基中添加适量活性炭与大孔树脂用于吸附抑制剂,吸附剂灭菌前置入摇瓶内,培养期间保持在培养基内。培养温度为32℃。

### 1.3 发酵液中糖及苯类物质的检测

HPLC检测,色谱柱为ZORBAX Carbohydrate (4.6mm×150mm, 5μm),检测器为视差检测器,进样量为5μL,室温条件,流动相为75%乙腈,流速为1.000mL/min。

### 1.4 发酵液中糠醛检测

采用分光光度计检测<sup>[13]</sup>。

### 1.5 L-乳酸检测方法

HPCE检测,毛细管内径75μm,外径375μm,有效长度50cm,以500mmol/L H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>及0.5mmol/L CTAB为运行电解质,电压9kV,运行时间20min,柱温20℃,检测波长210nm。

### 1.6 正交试验设计

表1 发酵工艺正交试验因素水平

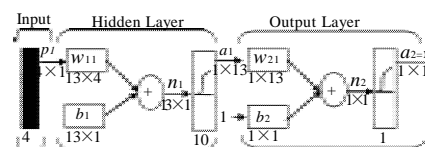
Table 1 Factors and levels in the orthogonal array design

水平	因素				E 空列
	A 秸秆糖质量 浓度/(g/L)	B 活性炭添 加量/(g/L)	C 树脂添加 量/(g/L)	D 摇瓶转 速/(r/min)	
1	90	0.8	0.5	150	1
2	110	1.6	1.0	180	2
3	130	2.4	1.5	210	3
4	150	3.2	2.0	240	4

以秸秆糖质量浓度、活性炭添加量、大孔树脂含量及摇瓶转速4个因素为自变量,分别编码为A、B、C、D,各个因素分别设置为1、2、3、4四个变量,设计的L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)正交试验因素水平见表1。

### 1.7 BP神经网络模型

在对正交试验分析的基础上,进行BP神经网络的建模与分析。试验模型的3层拓扑结构为4-13-1,输入层到隐含层的a<sub>1</sub>采用Tansig作为训练函数,隐含层到输出层的a<sub>2</sub>采用Purelin作为传递函数。输入对应秸秆糖质量浓度(g/L)、活性炭添加量(g/L)、树脂添加量(g/L)及生摇瓶转速(r/min),并进行归一化处理,输出Y对应为L-乳酸产量(g/L)。其中权值参数IW<sub>11</sub>是13×4矩阵,权值参数LW<sub>21</sub>是1×13矩阵,三层神经网络示意图见图1。



$$a_1 = \text{tansig}(IW_{11}P_1 + b_1); a_2 = \text{purelin}(LW_{21}a_1 + b_2)$$

图1 三层神经网络示意图

Fig.1 Schematic diagram of a three-layer neural network

## 2 结果与分析

### 2.1 基础实验

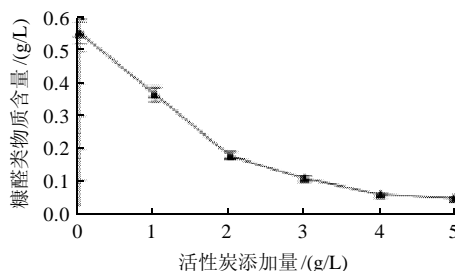


图2 活性炭添加量对糠醛吸附影响

Fig.2 Effect of activated carbon amount on adsorption of furfural

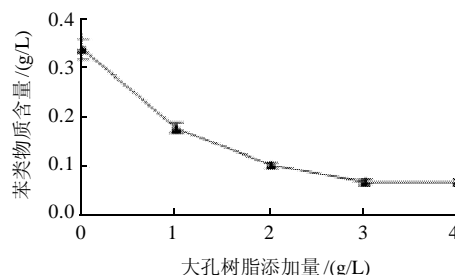


图3 大孔树脂添加量对苯类物质吸附影响

Fig.3 Effect of macroporous resin amount on adsorption of benzenes

在基本培养基的基础上,发现底物质量浓度过高明显产生抑制,进行的单因素试验条件的初步研究表明,添加一定活性炭与大孔树脂能够对水解液中的糠醛、苯类等抑制剂具有明显吸附作用,从而降低发酵的抑制。由图2可知,当活性炭添加量达到3g/L时,糠醛吸附率超过80%,效果明显。由图3可知,添加大孔树脂能够在一定程度上吸附苯类物质,但是过高的添加量效果并不理想。

## 2.2 正交试验结果分析

表2 正交试验发酵结果

Table 2 Orthogonal array design layout and experimental results

试验号	因素					L-乳酸产量 Y/(g/L)
	A	B	C	D	E	
1	1	1	1	1	1	46.1
2	1	2	2	2	2	53.6
3	1	3	3	3	3	68.4
4	1	4	4	4	4	63.5
5	2	1	2	3	4	69.8
6	2	2	1	4	3	70.5
7	2	3	4	1	2	72.6
8	2	4	3	2	1	75.7
9	3	1	3	4	2	81.1
10	3	2	4	3	1	82.5
11	3	3	1	2	4	76.4
12	3	4	2	1	3	73.9
13	4	1	4	2	3	55.4
14	4	2	3	1	4	53.9
15	4	3	2	4	1	64.9
16	4	4	1	3	2	55.5
$K_1$	57.900	63.100	62.125	61.625	67.300	
$K_2$	72.150	65.125	65.550	65.275	65.700	
$K_3$	78.475	70.575	69.775	69.050	67.050	
$K_4$	57.425	67.150	68.500	70.000	65.900	
R	21.050	7.475	7.650	8.375	1.600	

在抑制剂吸附研究基础上,结合菌体好氧特性。选取表1的四因素进行正交试验。由表2可知,正交试验最优组合为 $A_3B_2C_4D_3$ ,其产酸为82.5g/L,通过极差分析表明,最优试验设计是 $A_3B_3C_3D_4$ ,进一步实施验证实验,发现 $A_3B_3C_3D_4$ 条件下发酵产酸达82.8g/L,与 $A_3B_2C_4D_3$ 条件下的L-乳酸产量相近。

表3 正交试验方差分析

Table 3 Variance analysis for the results from the orthogonal array design

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F比值	$F_{0.05(3,3)}$ 临界值	显著性
A	1326.553	3	442.184	170.771	9.280	*
B	121.913	3	40.638	15.694	9.280	*
C	139.073	3	46.358	17.903	9.280	*
D	176.073	3	58.691	22.666	9.280	*
E	7.768	3	2.589	1.000		

注:\*,差异显著。

由表3方差结果分析可知,4个因素对产酸影响都显著。因此,开展进一步的神经网络仿真与模拟研究,以期精确预测最佳发酵条件并高产L-乳酸。

## 2.3 神经网络仿真与预测

在正交试验的基础上,对菌株的发酵工艺进行神经网络训练及仿真。按照图1的神经网络示意图,编写如下程序:

```
P0=[1,1,1,1;1,2,2,2;1,3,3,3;1,4,4,4;2,1,2,3;2,2,1,4;2,3,4,1;2,4,3,2;3,1,3,4;3,2,4,3;3,3,1,2;3,4,2,1;4,1,4,2;4,2,3,1;4,3,2,4;4,4,1,3];% 输入样本
```

```
P=P0'; % 输入样本的转置阵
```

```
T=[46.1 53.6 68.4 63.5 69.8 70.5 72.6 75.7 81.1 82.5 76.4 73.9 55.4 53.9 64.9 55.5]; % 输出样本
```

```
T_test=[46.1 53.6 68.4 63.5 69.8 70.5 72.6 75.7 81.1 82.5 76.4 73.9 55.4 53.9 64.9 55.5]; % 预测样本真实值
```

```
[Pn,minP,maxP,tn,minT,maxT]=premnmx(P,T); % 归一化处理
```

```
[S0,Q]=size(P); % 输入层神经元为4
```

```
S1=13; % 隐含层神经元为13
```

```
S2=1; % 输出层神经元为1
```

```
net=newff(minmax(P),[S1,S2],{'tansig','purelin'},'trainlm'); % 新建BP神经网络并训练
```

```
net.trainParam.epochs=1000; % bp最大训练次数为1000
```

```
net.trainParam.goal=0.1; % 训练目标为0.1
```

```
net.trainParam.mc =0.9; % 附加动量因子以避免造成局部极值
```

```
net.trainParam.show=10; % 每10步显示一次结果
```

```
net.trainParam.lr=0.01; % 网络学习速率为0.01
```

```
net.trainParam.lr_inc =1.01; % 速率递增因子1.01
```

```
[net,tr]=train(net,P,T); % 训练网络
```

```
input_test=[1,1,1,1;1,2,2,2;1,3,3,3;1,4,4,4;2,1,2,3;2,2,1,4;2,3,4,1;2,4,3,2;3,1,3,4;3,2,4,3;3,3,1,2;3,4,2,1;4,1,4,2;4,2,3,1;4,3,2,4;4,4,1,3]; % 预测样本
```

```
Out=sim(net,input_test'); % 预测样本仿真
```

```
Out=Out'; % 仿真值
```

```
error=abs(Out-T_test'); % 预测误差
```

```
w1=net.iw{1,1}; % 输入层到隐含层的权值
```

```
w2=net.lw{2,1}; % 隐含层到输出层的权值
```

```
theta1=net.b{1}; % 隐含层的阈值
```

```
theta2=net.b{2}; % 输出层的阈值
```

利用以上程序进行网络训练,其训练结果如下:

```
TRAINLM, Epoch 0/1000, MSE 4282.78/0.1, Gradient 3642.94/1e-010
```

```
TRAINLM, Epoch 10/1000, MSE 34.2004/0.1, Gradient 196.496/1e-010
```

TRAINLM, Epoch 20/1000, MSE 4.2621/0.1, Gradient 7.34127/1e-010

TRAINLM, Epoch 30/1000, MSE 3.39664/0.1, Gradient 3.27436/1e-010

TRAINLM, Epoch 40/1000, MSE 1.31104/0.1, Gradient 11.7193/1e-010

TRAINLM, Epoch 44/1000, MSE 0.092635/0.1, Gradient 32.7328/1e-010

TRAINLM, Performance goal met.

训练误差下降曲线见图 4:

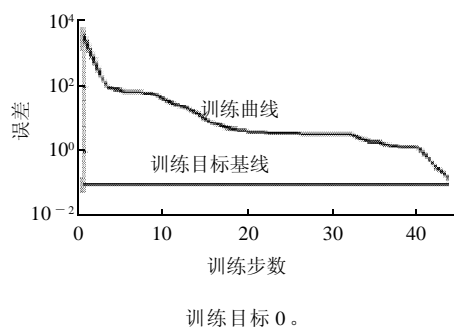


图 4 神经网络误差下降曲线

Fig.4 Error drop curve for the neural network

由图 4 的误差下降曲线及相应的训练结果分析可知, 网络训练稳定且较迅速, 训练至第 44 步时, 达到要求。对已存在的 1~16 组的试验条件进行仿真, 其结果见表 4。

表 4 试验结果及其神经网络仿真

Table 4 Experimental result and its neural network simulation

试验号	因素				L-乳酸产量/(g/L)		仿真误差值/(g/L)
	A	B	C	D	正交试验值	神经网络仿真值	
1	1	1	1	1	46.1	46.052	0.048081
2	1	2	2	2	53.6	53.771	0.17129
3	1	3	3	3	68.4	68.588	0.18783
4	1	4	4	4	63.5	63.267	0.23339
5	2	1	2	3	69.8	69.415	0.3847
6	2	2	1	4	70.5	70.493	0.0073268
7	2	3	4	1	72.6	72.594	0.0061338
8	2	4	3	2	75.7	75.665	0.03469
9	3	1	3	4	81.1	80.226	0.87405
10	3	2	4	3	82.5	81.868	0.63187
11	3	3	1	2	76.4	76.271	0.12915
12	3	4	2	1	73.9	73.921	0.021388
13	4	1	4	2	55.4	55.530	0.1303
14	4	2	3	1	53.9	53.849	0.051497
15	4	3	2	4	64.9	64.995	0.094842
16	4	4	1	3	55.5	55.550	0.049949

由表 4 的神经网络仿真结果与正交试验结果比较可以看出, 神经网络的仿真误差普遍较小, 具有更高的

仿真精度。

同时, 由训练输出可知, 输入层到隐含层的权值( $W_{11}$ )、隐含层到输出层的权值( $W_{21}$ )、隐含层的阈值( $b_1$ )及输出层的阈值( $b_2$ )分别为:

$W_{11}=[4.079, 0.26453, -2.8772, 5.2396; -0.48833, -2.7773, -7.2506, 4.7305; -2.6067, -5.3694, -1.2416, 1.8823; 5.7181, 5.3792, 7.9683, 5.3205; -3.664, 1.2181, -6.0325, 5.3109; 1.7089, 0.7168, -1.5915, 3.4716; 7.0217, 3.6985, -2.787, 8.3019; -0.069358, 0.15506, 1.9939, 2.6288; -1.8224, -1.0125, -1.8048, 1.1463; -0.62046, 4.3802, -1.1339, 1.5391; 1.7924, 6.7603, 5.5021, 0.59415; 2.1583, 0.68257, 1.1043, 0.71409; 2.7294, 2.1755, 0.26396, 2.9087]$

$W_{21}=[-9.5735, 7.6279, 4.3, 6.851, -13.407, 12.276, 7.8403, 5.9322, -1.684, 8.3296, 8.4501, 10.763, 13.67]$

$b_1=[-3.3402, -0.56794, 5.4582, 0.42737, 2.1024, -7.9307, -4.9651, 1.5866, -4.4519, -4.226, 5.8153, 5.5717, 3.1436]$

$b_2=[14.349]$

利用上述权值及阈值, 采用函数( $Y = \text{purelin}(W_{21} \cdot \text{tansig}(W_{11}P_1 + b_1) + b_2)$ )进行最佳条件的寻找及结果预测, 神经网络求得最佳条件为  $A=2.8$ ,  $B=3.1$ ,  $C=3.2$ ,  $D=3.8$ , 即底物秸秆糖质量浓度为 126g/L, 活性炭添加量为 2.48g/L, 大孔树脂添加量为 1.6g/L, 摇瓶转速为 234r/min 时, 此条件下的神经网络仿真预测产 L-乳酸值为 86.735g/L, 而验证实验表明该条件下产 L-乳酸为 86.9g/L, 预测误差为 0.165g/L。与正交试验的直观分析结果(82.5g/L)及极差分析结果(82.8g/L)相比, 分别高出 4.4g/L 与 4.1g/L, 神经网络分析表现出了对最佳条件较精确的预测能力, 并在一定程度上提高了产物的产量。

正交试验与神经网络分析均表明, 较适宜的底物碳源质量浓度能够生成较高质量浓度的 L-乳酸, 一旦底物质量浓度过高, 将可能产生底物抑制, 同时, 由于秸秆水解液中大量抑制剂的存在, 过高的糖质量浓度必然伴随着抑制剂的增加, 将对菌体的生长及产酸不利, 从而可能降低最终的发酵效果。活性炭与大孔树脂的添加能够通过吸附水解液中的抑制剂而达到促进发酵的效果, 尤其活性炭对糠醛类抑制剂的吸附明显, 能够显著缓解发酵的抑制<sup>[14]</sup>。但过量的活性碳则不利于发酵效率的提升, 可能由于活性炭在吸附抑制剂的过程中也吸附底物糖, 较低质量浓度的活性炭尽管也存在糖吸附, 随着发酵的进行, 溶液中糖的消耗能够及时促进活性炭中的糖释放, 而过高的活性炭显著吸附抑制剂, 同时也伴随相当量的糖的吸附, 一旦被吸附的糖不能及时析出或者析出速率低于发酵的耗糖速率, 则可能不利于菌体的总体发酵, 从而表现出产酸的降低。同样, 大孔树脂能够显著吸附苯类物质, 从而在一定程度上提升发酵效率。

米根霉是严格的好氧微生物, 摇瓶发酵过程中, 在一定的装液量条件下, 保持较高的转速能够显著提升溶液中的溶氧, 从而间接提升发酵产酸。

### 3 结 论

酸碱及汽爆处理能够有效降解小麦秸秆制备水解糖, 但是水解液中抑制剂的存在明显降低发酵效果<sup>[15]</sup>, 对水解液中糖进行单独分离后再发酵, 则分离成本过大。在本实验中, 吸附剂的使用与发酵过程保持同步, 即在发酵过程中通过活性炭及大孔树脂对秸秆水解液中的糠醛类、苯类抑制剂进行在线选择性吸附, 实现了菌株对秸秆糖液的高效转化与利用。同时本研究围绕主要工艺参数在正交试验调控基础上, 对实验结果进行BP神经网络的仿真与较优条件的预测, 结果显著提升发酵产酸。

#### 参考文献:

- [1] 韩鲁佳, 刘向阳, 胡金有. 中国农作物秸秆资源及其利用现状[J]. 农业工程学报, 2002, 18(3): 87-91.
- [2] 张亮, 伍小兵, 翟井振. 玉米秸秆发酵生产燃料乙醇的研究综述[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(11): 3365-3366.
- [3] 徐忠, 汪群慧, 姜兆华. 大豆秸秆酶水解及L-乳酸发酵[J]. 化工学报, 2004, 55(11): 1849-1852.
- [4] LEE S Y, HONG S H, LEE S H. Fermentative production of chemicals that can be used for polymer synthesis[J]. Macromolecular Bioscience, 2004, 40(4): 157-164.
- [5] CHOTANI G, DODGE T, HSU A, et al. The commercial production of chemicals using pathway engineering[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1543(2): 434-455.
- [6] BAI Dongmei, LI Shizhong, LIU Z, et al. Enhanced L-(+)-lactic acid production by an adapted strain of *Rhizopus oryzae* using corn cob hydrolysate[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008, 144(1): 79-85.
- [7] LIU Y, WEN Z, LIAO W, et al. Optimization of the process for the production of L-(+)-lactic acid from cull potato by *Rhizopus oryzae*[J]. Engineering in Life Sciences, 2005, 5(4): 343-349.
- [8] MAAS R H W, SPRINGER J, EGGINK G, et al. Xylose metabolism in the fungus *Rhizopus oryzae*: Effect of growth and respiration on L-(+)-lactic acid production[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2008, 35(6): 569-578.
- [9] YANG Yingge, FAN Yonghong, LI Wen, et al. Optimization of L-(+)-lactic acid production from xylose with *Rhizopus oryzae* mutant RLC41-6 breeding by low-energy ion implantation[J]. Plasma Science and Technology, 2007, 9(5): 638-643.
- [10] 周开利, 康耀红. 神经网络模型及其MATLAB仿真程序设计[M]. 北京: 清华大学出版社, 2005.
- [11] 王巧华, 任奕林, 文友先. 基于BP神经网络的鸡蛋新鲜度无损检测方法[J]. 农业机械学报, 2006, 37(1): 104-106.
- [12] 戚国强, 张长利, 魏晓莉, 等. 利用改进BP神经网络预测初产奶牛产奶量的方法[J]. 农业机械学报, 2007, 38(5): 137-138.
- [13] 许汉英, 赵晓君. 分光光度法测定白酒中的糠醛[J]. 应用化学, 1997, 14(3): 84-86.
- [14] 吴昊, 姚嘉曼, 刘宗敏, 等. 玉米籽皮稀酸水解液脱毒发酵制备丁二酸的可行性[J]. 农业工程学报, 2009, 25(2): 267-272.
- [15] 张厚瑞, 何成新, 曾健智, 等. 脱除木质纤维水解液中微生物生长抑制物的方法: 中国, 02133836.1[P]. 2003-05-07.