

精炼对山葡萄籽油品质的影响

王艳丹, 杨晶, 侯威宇, 王雪, 吕慧威

(吉林师范大学博达学院, 吉林四平 136000)

摘要:以酸热法提取得到的山葡萄籽原油为原料,研究了山葡萄籽油精炼前后的品质变化。测定山葡萄籽油精炼前后感官品质和理化指标、 V_E 含量、氧化稳定性、微量元素含量、脂肪酸组成及含量的变化。结果表明:精炼山葡萄籽油较原油在感官品质与理化指标上都有很大提升,氧化稳定性提高,酸值(KOH)由 (16.85 ± 0.016) mg/g 降至 (0.21 ± 0.013) mg/g;精炼对山葡萄籽油中微量元素含量影响不大,但 V_E 含量明显减少,从 (66.18 ± 0.21) mg/100 g 降至 (43.65 ± 0.16) mg/100 g;脂肪酸组成变化不大,反式脂肪酸含量由 (0.07 ± 0.003) % 增加至 (0.31 ± 0.004) %。

关键词:山葡萄籽油;精炼;酸值;氧化稳定性; V_E ;脂肪酸;反式脂肪酸

中图分类号:TS224.6;TQ646 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)12-0022-05

Effect of refining on quality of wild grape seed oil

WANG Yandan, YANG Jing, HOU Weiyu, WANG Xue, LÜ Huiwei

(Boda College, Jilin Normal University, Siping 136000, Jilin, China)

Abstract: The crude wild grape seed oil extracted by the acid-thermal method was used as raw material to study the quality changes of wild grape seed oil before and after refining. The changes of sensory quality and physicochemical indexes, V_E content, oxidation stability, trace elements content and composition and content of fatty acids of wild grape seed oil before and after refining were determined. The results showed that the refined wild grape seed oil had a great improvement in sensory quality and physicochemical indexes, and the oxidation stability was improved. The acid value decreased from (16.85 ± 0.016) mgKOH/g to (0.21 ± 0.013) mgKOH/g. The refining had little effect on the trace elements content in wild grape seed oil, but the V_E content decreased significantly from (66.18 ± 0.21) mg/100 g to (43.65 ± 0.16) mg/100 g. Fatty acid composition changed little, but *trans* fatty acid content increased from (0.07 ± 0.003) % to (0.31 ± 0.004) %.

Key words: wild grape seed oil; refining; acid value; oxidation stability; V_E ; fatty acid; *trans* fatty acid

我国有大面积人工栽培的山葡萄,每年山葡萄的产量高达十几万吨,主要用于葡萄酒酿造。山葡萄籽是酿酒过程中产生的副产物,含有多种营养成分及生物活性物质,含油量为14%~22%^[1]。山葡萄籽油中不饱和脂肪酸含量达90%^[2],主要成分亚油酸含量高达75%~83%^[3],是目前已知的亚油酸含量最

高的植物油之一。亚油酸是人体必需脂肪酸,具有抗衰老、增强免疫力、清除人体血清胆固醇、调节动植物神经、治疗和预防心血管疾病等作用^[4-6]。此外,山葡萄籽油中还含有植物甾醇^[7]、白藜芦醇^[8]、原花青素、 V_E 和各种矿物质微量元素等^[9-10]。因此,山葡萄籽油具有较高的开发利用价值。

山葡萄籽原油含有大量杂质,理化性质不稳定,需通过精炼脱除有害物质才能食用,但精炼过程也会造成油中部分营养成分的损失。由于受添加的NaOH溶液、温度等条件影响,不饱和脂肪酸易从顺式异构化为反式脂肪酸^[11],长期食用含较多反式脂肪酸的食物对人体有诸多危害^[12]。国外对油脂中反式脂肪酸含量做了限量标准^[13-14];国内也提出限

收稿日期:2018-04-02;修回日期:2018-09-21

基金项目:吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20171057KJ)

作者简介:王艳丹(1988),女,硕士研究生,研究方向为微生物油脂发酵、油脂及植物蛋白工程(E-mail)18840859327@163.com。

通信作者:吕慧威,工程师(E-mail)48982933@qq.com。

售富含反式脂肪酸的零食和饮料的方案^[15]。因此,研究精炼过程中山葡萄籽油品质的变化,对山葡萄籽油产业的健康发展有着重要的意义。

本文以山葡萄籽原油为原料,研究精炼过程对其感官品质、理化指标、氧化稳定性、 V_E 含量、微量元素含量、脂肪酸组成及含量的影响,以期如山葡萄籽油类富含多不饱和脂肪酸油脂的精炼提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

山葡萄籽:购自吉林四平市名居葡萄酒庄园有限公司。脂肪酸标准样品:购自美国Sigma公司。正己烷、冰乙酸、甲醇、无水乙醇、正戊醇等:色谱纯;柠檬酸、活性炭、硅藻土、95%乙醇、碘化钾、石油醚(60~90℃)、硫代硫酸钠、氢氧化钾等:分析纯。

PL203电子精密天平,RE-3000型旋转蒸发器,0703681S循环水式多用真空泵,DHG-9140A型恒温鼓风干燥箱,KQ-250DB型数控超声波清洗器,GC9790型气相色谱仪,浙江大学N2000色谱工作站。

1.2 实验方法

1.2.1 山葡萄籽油的提取

将山葡萄籽洗净、105℃烘至恒重,粉碎过80目筛,按料液比1:6加入4 mol/L盐酸,置于75℃水浴处理1 h;冷却至室温后,加入盐酸2倍体积的石油醚,充分振荡1 h后,8 000 r/min,4℃离心5 min,取石油醚层,剩余部分加入等体积的石油醚再次萃取、离心,取石油醚层合并;然后加入与合并石油醚等体积、0.1%的NaCl溶液,混匀、离心,取石油醚层,无水 Na_2SO_4 干燥、过滤,真空旋转蒸发除去石油醚,油脂于105℃烘至恒重,得山葡萄籽原油。

1.2.2 山葡萄籽油的精炼

1.2.2.1 酸法脱胶

取100 g山葡萄籽原油加热至70℃,按0.3%添加量加入50%柠檬酸溶液,混匀后加入5 g 70℃去离子水充分搅拌,并于70℃恒温水浴0.5 h,5 000 r/min离心10 min,常温脱水干燥,得脱胶油^[16]。

1.2.2.2 碱炼脱酸

山葡萄籽原油酸值(KOH)为(16.85±0.016) mg/g,通过计算,向脱胶油中加入12 g质量分数为18%的NaOH溶液,充分搅拌后缓慢升温至60℃碱炼脱酸20 min,碱炼过程不断搅拌至出现油、皂明显分离即可停止,4 000 r/min离心15 min,得到碱炼油^[17]。

1.2.2.3 水洗

将碱炼油加热至85℃,转入经加热的分液漏斗

中,按油质量15%加入微沸蒸馏水,于90℃条件下洗涤,重复3遍,待放出的废液测得为中性即可停止,得水洗油。

1.2.2.4 脱色

将水洗油在真空度0.09 MPa、温度105℃条件下脱水20 min;将脱水后的油温降至70℃,按油质量4%加入复合脱色剂(活性白土-活性炭,9:1)处理25 min,真空过滤得脱色油。

1.2.2.5 脱臭

将脱色油在真空度为0.098 kPa、温度为220℃条件下,真空脱臭3 h得到精炼油^[11]。

1.2.3 分析方法

1.2.3.1 山葡萄籽油感官品质和理化指标测定

色泽依据GB/T 22460—2008,透明度、气滋味依据GB/T 5525—2008,折光指数依据GB/T 5527—2010,酸值依据GB 5009.229—2016,过氧化值依据GB/T 5538—2005,碘值依据GB/T 5532—2008,皂化值依据GB/T 5534—2008,水分及挥发物依据GB 5009.236—2016, V_E 含量依据GB 5009.82—2016,微量元素采用原子吸收分光光度计法测定^[18]。

1.2.3.2 山葡萄籽油的氧化稳定性测定

采用Schaal烘箱法^[19]。将山葡萄籽油分别盛装于烧杯中,敞口置于63℃恒温干燥箱中加速氧化,以1 d为单位测定样品的过氧化值,20 d为1个周期。

1.2.3.3 山葡萄籽油脂肪酸组成分析

参照文献[20]将山葡萄籽精炼油甲酯化,参照文献[21]进行气质联用分析精炼油的脂肪酸组成及含量。脂肪酸通过对照标准样品进行定性,然后采用面积归一化法确定相对含量。

1.2.4 数据分析

每个实验点做3个平行,数据用“平均值±标准偏差”表示。采用Excel和Origin8.0软件对数据进行处理和分析。

2 结果与讨论

2.1 精炼山葡萄籽油的感官品质和理化指标

山葡萄籽油精炼前后的感官品质和理化指标如表1所示。

由表1可知,精炼山葡萄籽油的感官品质和理化指标均达到国家标准,与山葡萄籽原油相比,精炼山葡萄籽油水分及挥发物含量、酸值、过氧化值和皂化值明显降低,油脂品质较原油更好。碘值较高,表明精炼山葡萄籽油中含有大量的不饱和键,在加工、运输、储存及加热过程中,应注意采取相应措施,以防发生酸败现象。

表1 山葡萄籽油精炼前后的感官品质和理化指标

项目	GB/T 22478—2008	原油	精炼油
色泽	浅黄绿色/淡绿色	浅黄绿色	浅黄绿色
气味、滋味	气味、口感良好	无异味	气味、口感良好
透明度	澄清、透明	澄清、透明	澄清、透明
折光指数(n_{40})	1.467 ~ 1.477	1.483 ± 0.013	1.472 ± 0.015
水分及挥发物/%	≤0.10	0.182 ± 0.005	0.035 ± 0.003
酸值(KOH)/(mg/g)	≤3.0	16.85 ± 0.016	0.21 ± 0.013
过氧化值/(mmol/kg)	≤7.5	8.20 ± 0.021	3.12 ± 0.006
碘值(I)/(g/100 g)	128 ~ 150	135.24 ± 0.035	140.36 ± 0.023
皂化值(KOH)/(mg/g)	188 ~ 194	196.85 ± 0.158	190.15 ± 0.083

2.2 精炼过程对山葡萄籽油酸值的影响

实验中所用山葡萄籽原油采用酸热法提取,酸值(KOH)为(16.85 ± 0.016) mg/g,其中水分、游离脂肪酸、磷脂及色素等杂质未达到食用油国家标准,必须精炼才能食用。将山葡萄籽原油经脱胶、碱炼脱酸、水洗、脱色、脱臭5个阶段,测定各阶段油样的酸值,探讨精炼过程对山葡萄籽油酸值的影响,结果如图1所示。

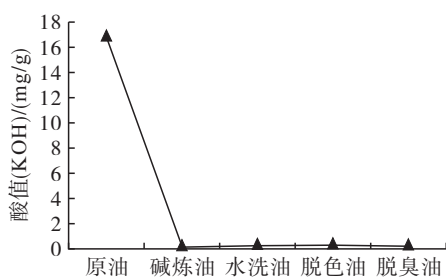
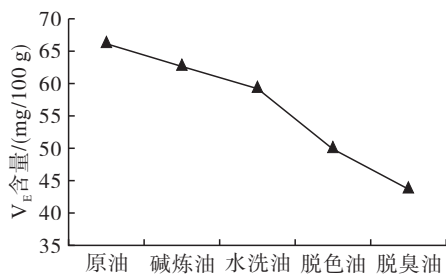


图1 精炼过程对山葡萄籽油酸值的影响

由图1可以知,碱炼脱酸过程酸值(KOH)大幅度降低,由初始的(16.85 ± 0.016) mg/g下降到(0.16 ± 0.010) mg/g,水洗、脱色阶段酸值变化幅度不明显,经脱臭处理后酸值(KOH)为(0.21 ± 0.013) mg/g,符合食用油国家标准。由此可知,碱炼脱酸是油脂精炼过程中降低酸值的主要阶段。

2.3 精炼过程对山葡萄籽油中 V_E 含量的影响

采用HPLC法测定山葡萄籽油精炼工艺过程中 V_E 含量及变化趋势,结果如图2所示。

图2 精炼过程对山葡萄籽油中 V_E 含量的影响

由图2可知,山葡萄籽原油中 V_E 含量为(66.18 ± 0.21) mg/100g,精炼过程山葡萄籽油中的

V_E 含量不断下降,碱炼脱酸、水洗两个阶段对 V_E 含量的影响较小,经脱色后 V_E 含量降至(49.91 ± 0.24) mg/100g,降低了24.6%,这是由于氧化及脱色剂的吸附作用导致的,而脱臭过程中由于高压蒸汽及高温条件再一次导致 V_E 大量损失,含量降至(43.65 ± 0.16) mg/100g,损失率达34.04%。

2.4 精炼对山葡萄籽油氧化稳定性的影响

精炼前后山葡萄籽油氧化稳定性的变化如图3所示。

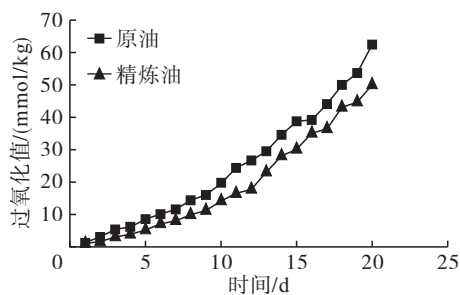


图3 精炼对山葡萄籽油氧化稳定性的影响

由图3可知,精炼山葡萄籽油氧化稳定性高于山葡萄籽原油,可见精炼过程对提高山葡萄籽油储藏稳定性有一定的意义。

2.5 精炼对山葡萄籽油中微量元素含量的影响

分别对山葡萄籽原油、精炼油中微量元素含量进行分析测定,结果见表2。

表2 精炼对山葡萄籽油中微量元素含量的影响

微量元素	含量的影响	
	精炼前	精炼后
钾	9.23 ± 0.013	8.85 ± 0.011
铁	0.63 ± 0.018	0.58 ± 0.024
铜	微量	微量
磷	0.97 ± 0.016	1.03 ± 0.018
钙	1.34 ± 0.020	1.42 ± 0.022
锌	0.05 ± 0.006	0.03 ± 0.002
镁	0.11 ± 0.018	0.13 ± 0.015
锰	微量	微量

由表2可知,山葡萄籽油中含有钾、钙、锌、铁、

镁、磷等多种微量元素,精炼前后各微量元素含量变化不显著。山葡萄籽油中人体必需的微量元素钾和钙的含量较高,尤其是钾元素含量可达 (9.23 ± 0.013) mg/100 g,在调节细胞渗透压和酸碱平衡上起重要作用;铁和磷的含量相对较低,分别为 (0.63 ± 0.018) mg/100 g 和 (0.97 ± 0.016) mg/100 g;而重金属元素如锰、铜的含量很低,几乎检测不到,表明山葡萄籽油具有较高的营养价值,可作为功能性油脂。

2.6 精炼对山葡萄籽油脂肪酸组成的影响

分别对精炼前后的山葡萄籽油脂肪酸组成进行分析测定,结果见表3。

表3 精炼对山葡萄籽油脂肪酸组成及含量的影响 %

脂肪酸	精炼前	精炼后
豆蔻酸	0.05 ± 0.003	0.05 ± 0.002
棕榈酸	8.63 ± 0.012	8.39 ± 0.022
棕榈油酸	0.07 ± 0.001	0.07 ± 0.001
硬脂酸	4.27 ± 0.002	4.51 ± 0.005
反油酸	0.01 ± 0.002	0.03 ± 0.001
油酸	13.34 ± 0.012	13.02 ± 0.008
反亚油酸	0.05 ± 0.005	0.24 ± 0.003
亚油酸	70.59 ± 0.053	70.29 ± 0.031
反亚麻酸	0.01 ± 0.006	0.04 ± 0.002
亚麻酸	0.39 ± 0.012	0.43 ± 0.022
花生四烯酸	0.13 ± 0.001	0.14 ± 0.001
总反式脂肪酸	0.07 ± 0.003	0.31 ± 0.004

由表3可知,精炼山葡萄籽油中各脂肪酸含量如棕榈酸、硬脂酸、油酸和亚油酸等与原油相比没有明显变化。可以认为精炼工艺对山葡萄籽油中脂肪酸组成几乎没有影响。然而,精炼对反式脂肪酸含量则有较大的影响,原油中反式脂肪酸含量只有 (0.07 ± 0.003) %,精炼后反式脂肪酸含量升高至 (0.31 ± 0.004) %。其中,主要成分反亚油酸由原油中的 (0.05 ± 0.005) %增加到 (0.24 ± 0.003) %,反油酸和反亚麻酸含量虽有所增加,但并不显著。

3 结论

(1)酸热法提取得到的山葡萄籽油经过精炼处理后,感官品质和各项理化指标均满足 GB/T 22478—2008 的要求,与山葡萄籽原油相比,精炼山葡萄籽油品质显著提高。

(2)精炼过程中,碱炼脱酸阶段对山葡萄籽油的酸值影响显著,酸值(KOH)由 (16.85 ± 0.016) mg/g 下降到 (0.16 ± 0.010) mg/g,脱色和脱臭对酸值影响不大,油脂酸值(KOH)最终为 (0.21 ± 0.013) mg/g,达到食用油国家标准;脱色和脱臭阶段使得山葡萄

籽油 V_E 含量损失严重,由原油中的 (66.18 ± 0.21) mg/100 g 降至 (43.65 ± 0.16) mg/100 g;精炼后的山葡萄籽油氧化稳定性较原油有所提高;山葡萄籽油中各种微量元素含量在精炼前后未发生显著变化。

(3)山葡萄籽油脂肪酸组成以亚油酸、油酸和棕榈酸为主,精炼后各脂肪酸含量没有显著的变化;反式脂肪酸含量由 (0.07 ± 0.003) % 增加至 (0.31 ± 0.004) %,但其含量仍小于1%,符合食用植物油国家标准。

参考文献:

- [1] PAEDO J E, RUBIO M, PARDO A, et al. Improving the quality of grape seed oil by maceration with grinded fresh grape seeds[J]. Eur J Lipid Sci Technol, 2011, 113(10): 1266 - 1272.
- [2] 李桂华,谢朝顺. 葡萄籽油甘油三酯组成及结构分析研究[J]. 粮食与油脂, 2009(10): 43 - 45.
- [3] CALABRESE G. Table grape nutritional value[J]. Bull L'OIV, 2003(1): 124 - 133.
- [4] 冯艳芸,李海萍. 葡萄籽油提取工艺条件优化[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(6): 94 - 96.
- [5] 迟明梅. 葡萄籽的功能与应用[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(20): 221 - 224.
- [6] 王媛,王定颖,岳田利. 超声波提取葡萄籽油的工艺优化及其抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2012, 33(10): 136 - 140.
- [7] 慰蕊仙. 精炼前后葡萄籽油的品质变化[J]. 中国油脂, 2015, 40(2): 13 - 15.
- [8] 魏贞伟,陈玉宏,王俊国. 压榨法生产葡萄籽油及精炼工艺实践[J]. 中国油脂, 2015, 40(2): 16 - 18.
- [9] SABIR A, UNVER A, KARA Z. The fatty acid and tocopherol constituents of the seed oil extracted from 21 grape varieties (*Vitis* spp.) [J]. J Sci Food Agric, 2012, 92: 1982 - 1987.
- [10] 姜贵全,牛佳牧,方桂珍. 吉林地区山葡萄籽中活性成分及脂肪酸组成的比较研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(23): 6096 - 6097.
- [11] 王向云,李桂华,纪俊敏,等. 化学和物理精炼工艺对葡萄籽油氧化劣变品质的影响[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(4): 86 - 91.
- [12] YILMAZ Y, TOLEDO R T. Health aspects of functional grape seed constituents[J]. Food Sci Technol, 2004, 15: 422 - 433.
- [13] 赖晓英,武德银,伍颺,等. 反式脂肪酸的危害及其检测方法[J]. 现代食品科技, 2007, 23(2): 73 - 76.
- [14] 袁向华,李琳,李冰,等. 食品工业专用油脂中反式酸的控制[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(5): 146 - 151.

(下转第30页)

续表 5

脂肪酸	%	
	水酶油	热熔油
未知酸	1.0	1.1
二十碳五烯酸(C20:5)	3.5	2.4
未知酸	0.3	0.5
未知酸	1.1	1.2
二十二碳六烯酸(C22:6)	4.2	3.2

3 结 论

(1) 采用风味蛋白酶酶解大鲢油和热熔法提取大鲢油的精制工艺为:0.2% 磷酸脱胶,加入 1.5% 质量分数为 6.67% 氢氧化钠溶液脱酸,4% 复合脱色剂脱色,2% 茶多酚-酵母复合液脱腥。水酶油浅黄色、腥味淡;热熔油橙红色、微腥。

(2) 水酶法提取大鲢油的品质优于热熔法制备的大鲢油。水酶油的水分及挥发物(0.07%)、不溶性杂质(0.03%)、酸值(KOH)(0.72 mg/g)、不皂化物(0.88 g/kg)、过氧化值(4.30 mmol/kg)符合我国水产行业精制鱼油的一级标准;热熔油的水分及挥发物(0.18%)、不溶性杂质(0.06%)、酸值(KOH)(1.01 mg/g)、不皂化物(1.62 g/kg)、过氧化值(5.53 mmol/kg)符合我国水产行业精制鱼油的二级标准。水酶法对不饱和脂肪酸保留高于热熔法。水酶油中不饱和脂肪酸含量 76.8%,EPA、DHA 总量为 7.7%;热熔油中不饱和脂肪酸含量 70.9%,EPA、DHA 总量为 5.6%。

参考文献:

- [1] 雒林通,万红玲,兰小平,等. 中国大鲢资源现状及保护遗传学研究进展[J]. 广东农业科学,2011,38(17):100-103.
- [2] 耿敬章,李新生,党娅,等. 中国大鲢营养成分和功能因子研究进展[J]. 氨基酸和生物资源,2013,35(2):9-12.
- [3] 陈德经,陈曦,方斌,等. 大鲢不同部位的抑菌效果研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(23):14109-14110.

(上接第 25 页)

- [15] 卢训,赵霖. 反式脂肪酸的危害及台湾快餐业烹调用油反式脂肪酸含量调查[J]. 中国食品学报,2010,10(4):33-37.
- [16] 赵芙蓉. 葡萄籽油的提取、精制及应用研究[D]. 乌鲁木齐:新疆大学,2013.
- [17] 李桂华,王向云,任国卫,等. 不同精炼脱酸方法对葡萄籽油中反式脂肪酸的影响研究[J]. 现代食品科技,2014,34(1):120-125.
- [18] 赵卫星,姜红波,温普红. 原子吸收分光光度法测定野蜂蜜中微量金属元素含量[J]. 化学与生物工程,2011,

- [4] 胡代花. 微碱条件生物酶法提取大鲢肝脏油脂及其脂肪酸组成分析[J]. 中国油脂,2017,42(4):113-117.
- [5] 张佳婵,薛玲,王昌涛. 大鲢尾部鱼油的酶法提取工艺[J]. 食品科学技术学报,2013,31(3):25-29.
- [6] DEEPIKA D, VEGNESHWARAN V R, JULIA P, et al. Investigation on oil extraction methods and its influence on omega-3 content from cultured salmon[J]. Food Process Technol, 2014, 5(12):401-414.
- [7] OLIVEIRA D A S B, LICODIEDOFF S, FURIGO A, et al. Enzymatic extraction of oil from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) by-products: a comparison with other extraction methods[J]. Int J Food Sci Technol, 2017, 52(3):699-705.
- [8] 王苗苗. 大鲢肌肉营养成分分析与尾脂油制备技术研究[D]. 湖南 张家界:吉首大学,2015.
- [9] IVANOV K, BUMBERGA D. Extraction of fish oil using green extraction methods: a short review[J]. Energy Procedia, 2017, 128:477-483.
- [10] 胡代花. 超声辅助提取大鲢肝脏油脂及其脂肪酸组成分析[J]. 中国油脂,2017,42(6):12-15.
- [11] CHIMSOOK T, WANNALANGKA W. Effect of microwave pretreatment on extraction yield and quality of catfish oil in northern Thailand[J]. MATEC Web Confer, 2015, 35(4):1-5.
- [12] 王苗苗,罗庆华,王海磊,等. 酶解法提取大鲢尾部油的工艺研究[J]. 中国油脂,2015,40(4):6-10.
- [13] 李文佳. 水酶法淡水鱼油提取及鱼油腥味成分分析研究[D]. 江苏 无锡:江南大学,2014.
- [14] 罗秦,孙强,叶欣,等. 粗大鲢油的精制及其脂肪酸组成分析[J]. 中国油脂,2014,39(7):5-8.
- [15] 李前山,苏媛媛. 贻贝酶解液用酵母发酵法脱腥效果最佳[J]. 监督与选择,2008(6):60-62.
- [16] 徐永霞,姜程程,刘滢,等. 带鱼脱腥工艺及脱腥前后的理化性质[J]. 食品与发酵工业,2013,39(12):68-72.

28(2):86-88.

- [19] 徐金瑞,邓翌凤,列丽坤. 几种抗氧化剂协同作用对葵花籽油稳定性的影响[J]. 中国油脂,2009,34(8):40-42.
- [20] WANG Y D, GONG Z W, ZHAO Z B, et al. Microbial lipid production from pectin-derived carbohydrates by oleaginous yeasts[J]. Process Biochem, 2015, 50(7):1097-1102.
- [21] 牛翠娇,史玉琴,宋涛,等. 气相色谱-质谱法测定食品中的反式脂肪酸[J]. 安徽农业科学,2011,39(6):3649-3651.