

# 响应面法优化芝麻粕发酵制备小肽的工艺研究

王飞<sup>1,2</sup>, 姜舒<sup>1</sup>, 杨蔚薇<sup>1</sup>, 罗杨海<sup>1</sup>, 彭楠<sup>1</sup>, 赵述森<sup>1</sup>, 胡咏梅<sup>1</sup>

(1. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070; 2. 湖北省普林标准技术服务有限公司, 武汉 430056)

**摘要:**为充分开发并有效利用芝麻粕,以小肽含量为指标,通过 Plackett - Burman 试验、最陡爬坡试验和响应面试验对米曲霉发酵芝麻粕制备小肽的工艺进行优化。结果表明,米曲霉发酵芝麻粕制备小肽的最佳工艺条件为芝麻粕与麸皮质量比 9:1、米曲霉接种量 0.01%、发酵温度 31.3℃、发酵时间 64.24 h、料水比 1:1.18,在此条件下发酵样品中的小肽含量可达 20.04%。通过米曲霉发酵芝麻粕,可得到富含小肽的产品。

**关键词:**芝麻粕;米曲霉;发酵;小肽;响应面法

中图分类号:TS229;TS201.3 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2024)04-0009-05

## Optimization of preparation of small peptides from sesame meal by response surface methodology

WANG Fei<sup>1,2</sup>, JIANG Shu<sup>1</sup>, YANG Weiwei<sup>1</sup>, LUO Yanghai<sup>1</sup>,  
PENG Nan<sup>1</sup>, ZHAO Shumiao<sup>1</sup>, HU Yongmei<sup>1</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;  
2. Hubei Pulyn Standards Technical Services Co., Ltd., Wuhan 430056, China)

**Abstract:** In order to fully develop and effectively use sesame meal, the preparation process of small peptide from sesame meal fermented by *Aspergillus oryzae* was optimized by Plackett - Burman experiment, steepest ascent experiment and response surface methodology, with the content of small peptides as the index. The results showed that the optimal conditions for the preparation of small peptides were obtained as follows: mass ratio of sesame meal to bran 9:1, inoculation amount of *Aspergillus oryzae* 0.01%, fermentation temperature 31.3℃, fermentation time 64.24 h, and ratio of material to water 1:1.18. Under these conditions, the content of small peptides in the fermented samples could be up to 20.04%. Products rich in small peptides can be obtained from sesame meal fermented by *Aspergillus oryzae*.

**Key words:** sesame meal; *Aspergillus oryzae*; fermentation; small peptides; response surface methodology

芝麻属胡麻科(Pedaliaceae)胡麻属(*Sesamum indicum* L.)植物,在我国具有悠久的栽培历史,是我国四大油料作物之一<sup>[1]</sup>。芝麻经提油后的副产

物芝麻粕<sup>[2]</sup>,其粗蛋白质含量在45%以上,还含有约5%粗脂肪、20%碳水化合物、1.5%钾、3%磷及其他矿物质元素<sup>[3-4]</sup>,是一种优质的饲用蛋白源。据估计,我国80%以上的芝麻用于制油,而随之产生的大量芝麻饼粕<sup>[5]</sup>大多被当作肥料或直接作为饲料使用,附加值较低,造成了很大的资源浪费。

蛋白质经蛋白酶酶解后产生小肽和氨基酸。研究证实,在生物体内蛋白质是以氨基酸或小肽的形式被吸收的<sup>[6-7]</sup>。动物对小肽的吸收快、不易饱和,因此以小肽的形式提供蛋白质源,利用率显著提高,

收稿日期:2022-12-15;修回日期:2023-12-07

基金项目:“科技助力经济2020”重点专项;湖北洪山实验室重大项目(2021hszd022);湖北省大学生创新创业训练计划项目(S202110504086)

作者简介:王飞(1987),男,助理工程师,主要从事发酵工艺与质量控制方面的研究工作(E-mail)396126027@qq.com。

通信作者:胡咏梅,副教授,硕士生导师,博士(E-mail)plum73@163.com。

同时可有效消除游离氨基酸间的吸收竞争<sup>[8]</sup>。可通过酶解法和微生物发酵法制备小肽<sup>[9]</sup>。酶解法生产的小肽多有苦味,适口性不好,且产品单一<sup>[10-11]</sup>。微生物发酵法可产生酒精、乳酸等风味物质,能直接掩盖苦味。研究发现,通过微生物发酵法制备的小肽产品的颜色、风味、适口性及营养均优于酶解法制备的产品<sup>[12]</sup>。与其他油料粕相比,国内外对芝麻粕利用的研究不多,且采用微生物发酵芝麻粕制备小肽的研究报道较少。

米曲霉(*Aspergillus oryzae*)是联合国粮农组织和世界卫生组织公认安全的食品级菌种,其生长迅速、使用方便、对营养环境要求低<sup>[13]</sup>。作为一种好气性益生真菌,米曲霉可产纤维素酶、糖化酶、植酸酶、蛋白酶和淀粉酶等复合酶,将原料降解成小肽、氨基酸和寡糖等<sup>[14]</sup>,提高产品的营养价值、保健功效和饲料消化率。国内外学者对米曲霉发酵开展了大量的研究:陈中等<sup>[15]</sup>采用米曲霉对大豆粕进行固态发酵,提高了小肽和游离氨基酸水平,同时产生了微生物蛋白,有效消除了大豆粕中抗营养因子及抗原蛋白;亢乐等<sup>[16]</sup>通过筛选构建了米曲霉 LBM 30007、LBM 30008 和米曲霉沪酿 3.042 的复合菌剂,蛋白酶和淀粉水解酶活力提高,使郟县豆瓣酿造中至关重要的酸性蛋白酶活力提高了 23.25%,鲜味氨基酸含量上升 11.33%;Balakrishnan 等<sup>[17]</sup>以花生粕为原料,通过米曲霉固态发酵生产  $\alpha$ -淀粉酶,运用响应面法进行优化和放大试验,使  $\alpha$ -淀粉酶产量增加了 11.4%。此外,米曲霉因具有较高的丝氨酸羧肽酶<sup>[18]</sup>和脯氨酸氨肽酶<sup>[19]</sup>活性,能够从蛋白多肽的 C 端或 N 端破坏影响苦味的疏水性氨基酸,从而具有一定的脱苦作用。

本研究以芝麻粕为原料,采用米曲霉进行固态发酵,通过 Plackett - Burman 试验、最陡爬坡试验探索发酵温度、发酵时间、料水比等对芝麻粕发酵制备小肽的影响,采用响应面试验优化制备工艺,以期对芝麻粕的深加工与综合利用提供技术思路。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

米曲霉 3.042,菌种保存于华中农业大学生命科学技术学院发酵工程室。芝麻粕,由湖北省普林标准技术服务有限公司;麸皮,安徽李林面粉有限公司。浓硫酸、硫酸钾、硫酸铜、三氯乙酸、氢氧化钠、

溴甲酚绿、甲基红、盐酸、七水硫酸镁、硼酸等,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

#### 1.1.2 仪器与设备

FE20 实验室 pH 计,THZ - 82A 恒温水浴摇床,中草药粉碎机,PL303 电子分析天平,高速冷冻离心机,Hlanon K9860 全自动凯氏定氮仪,FOSS DT208 型消化炉,303A - 5 电热恒温培养箱,HH - 6 恒温水浴锅。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 芝麻粕固态发酵工艺

取适量过 0.25 mm(60 目)筛的芝麻粕、一定量的麸皮、0.4% 的硫酸镁(以培养基质量计),按一定的料水比加入纯水,搅拌均匀,分装于三角瓶中,塞上棉塞并用报纸包好,于 121℃ 灭菌锅中灭菌 20 min。待冷却至室温后,加入一定量的米曲霉,放入一定温度的培养箱中培养一定时间。

#### 1.2.2 小肽含量的测定

参照 GB/T 22492—2008《大豆肽粉》附录 B 测定小肽含量。采用凯氏定氮法<sup>[20-21]</sup>测定酸溶蛋白质含量:称取 105℃ 烘干的样品 1.00 g 于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 150 g/L 的三氯乙酸溶液提取 1 h,10 min 摇动混匀 1 次,提取结束后于 8 000 r/min 离心 10 min,取 5 mL 上清液进行消化操作,冷却至常温后用全自动凯氏定氮仪分别测定系统空白值与样品蛋白质含量。采用甲醛滴定法<sup>[22]</sup>测定游离氨基酸含量:吸取 5 mL 上清液,进行适当稀释后用 0.05 mol/L NaOH 标准溶液滴定至 pH 为 8.2,记录此时消耗 NaOH 标准滴定溶液的体积。用移液管取 10.0 mL 甲醛溶液加入上述溶液中,搅拌均匀后继续滴加 NaOH 标准溶液至 pH 为 9.2,记录此时消耗的 NaOH 标准溶液的体积;用 5 mL 蒸馏水代替 5 mL 上清液,做试剂空白试验,其他操作同上,计算游离氨基酸含量。试样中的小肽含量为酸溶蛋白质含量与游离氨基酸含量的差值。

## 2 结果与amp;讨论

### 2.1 Plackett - Burman 试验

在前期试验基础上确定发酵时间、发酵温度、接种量、芝麻粕与麸皮质量比和料水比 5 个因素的水平,各取高(1)、低(-1)两个水平,另设 1 个虚拟变量,选用  $n = 12$  的试验设计,Plackett - Burman 试验设计及结果见表 1。对表 1 结果进行统计学分析,得到各因素的效应值、 $T$  值和  $p$  值,结果如表 2 所示。

表1 Plackett – Burman 试验设计及结果

试验号	接种量	发酵时间	料水比	发酵温度	芝麻粕与麸皮质量比	虚拟变量	小肽含量/%
1	1(0.03%)	1(60 h)	-1(1:0.8)	1(34℃)	1(7:3)	-1	17.08
2	-1(0.01%)	-1(24 h)	-1	1	1	1	5.32
3	1	1	1(1:1.2)	-1(28℃)	1	1	20.65
4	-1	-1	1	1	1	-1	7.59
5	-1	1	1	1	-1(9:1)	1	22.93
6	1	-1	-1	-1	1	1	9.72
7	1	-1	1	1	-1	1	9.24
8	1	-1	1	-1	-1	-1	13.56
9	-1	1	-1	-1	-1	1	20.76
10	-1	1	1	-1	1	-1	20.43
11	-1	-1	-1	-1	-1	-1	9.04
12	1	1	-1	1	-1	-1	18.22

表2 Plackett – Burman 试验因素效应分析

因素	效应值	<i>T</i>	<i>p</i>
接种量	0.401	0.48	0.65
发酵时间	10.934	13.11	0.00
料水比	2.378	2.85	0.04
发酵温度	-2.298	-2.75	0.04
芝麻粕与麸皮质量比	-2.161	-2.59	0.05
虚拟变量	0.453	0.54	0.61

由表2可知,发酵时间、料水比和发酵温度的*p*值都小于0.05,表明这3个因素对小肽含量有显著影响。其中,发酵时间的效应值为10.934,料水比的效应值为2.378,发酵温度的效应值为-2.298,说明发酵时间和料水比对小肽含量有正效应,发酵温度有负效应。因此,为提高小肽含量可提高料水比,延长发酵时间,降低发酵温度。

## 2.2 最陡爬坡试验

对由Plackett – Burman试验确定的主要因素设计最陡爬坡的路径,在不同的路径下进行试验,分析发酵样品中的小肽含量,以确定响应面试验的水平。固定接种量0.01%,芝麻粕与麸皮质量比9:1,以小肽含量为考察指标进行最陡爬坡试验。最陡爬坡试验设计及结果见表3。

表3 最陡爬坡试验设计及结果

发酵温度/℃	发酵时间/h	料水比	小肽含量/%
45	24	1:0.6	7.92
40	36	1:0.8	13.51
35	48	1:1.0	17.37
30	60	1:1.2	20.25
25	72	1:1.4	17.52

由表3可知,在发酵温度30℃、发酵时间60 h、料水比1:1.2条件下,小肽含量最高。因此,可将此

发酵条件设为Box – Behnken响应面试验的中心点。

## 2.3 响应面试验

根据最陡爬坡试验结果,以发酵温度(*A*)、发酵时间(*B*)、料水比(*C*)为考察因素,以小肽含量(*Y*)为响应值,设计*n* = 15的Box – Behnken响应面试验。Box – Behnken试验设计及结果如表4所示。

表4 Box – Behnken 试验设计及结果

试验号	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>Y</i> /%
1	0(30℃)	-1(48 h)	-1(1:1.0)	16.99
2	0	-1	1(1:1.4)	15.27
3	-1(25℃)	1(72 h)	0(1:1.2)	16.52
4	1(35℃)	0(60 h)	1	17.70
5	0	0	0	18.68
6	0	1	1	18.17
7	-1	-1	0	10.75
8	1	-1	0	16.67
9	0	0	0	21.28
10	1	0	-1	17.90
11	0	1	-1	18.68
12	1	1	0	18.55
13	0	0	0	20.79
14	-1	0	-1	14.69
15	-1	0	1	14.75

运用Design – Expert 8.0软件对表4试验结果进行回归拟合<sup>[23]</sup>,得到回归方程: $Y = -207.34172 + 8.17597A + 1.96763B + 3.14102C - 0.11288A^2 - 0.01254B^2 - 0.07299C^2 - 0.01624AB - 0.00320AC + 0.00630BC$ 。

Box – Behnken试验因素效应分析结果如表5所示。

表5 Box - Behnken 试验因素效应分析

方差来源	自由度	平方和	均方	F	p
模型	9	89.921 5	9.991 3	8.37	0.015
A	1	24.898 7	24.898 7	20.87	0.006
B	1	18.756 7	18.756 7	15.72	0.011
C	1	0.702 4	0.702 4	0.59	0.478
A <sup>2</sup>	1	29.404 5	29.404 5	24.65	0.004
B <sup>2</sup>	1	12.035 1	12.035 1	10.09	0.025
C <sup>2</sup>	1	5.022 9	5.022 9	4.21	0.095
AB	1	3.796 9	3.796 9	3.18	0.135
AC	1	0.016 1	0.016 1	0.01	0.912
BC	1	0.367 8	0.367 8	0.31	0.603
误差	5	5.965 4	1.193 1		
失拟项	3	2.122 0	0.707 3	0.37	0.788
纯误差	2	3.843 4	1.921 7		
合计	14	95.886 9			

由表5可知,模型的 $p$ 值为0.015,小于0.05,表明模型显著。失拟项 $p$ 值为0.788,大于0.05,说明失拟项不显著,模型比较稳定。同时,模型的决定系数( $R^2$ )为93.78%,表明拟合良好,该模型可用于米曲霉发酵芝麻粕制备小肽的工艺优化。 $A$ 、 $A^2$ 对小肽含量的影响极显著( $p < 0.01$ ), $B$ 、 $B^2$ 对小肽含量的影响显著( $p < 0.05$ )。各因素对小肽含量的影响大小顺序为 $A > B > C$ ,即发酵温度 > 发酵时间 > 料水比。

通过响应面试验优化,得到米曲霉发酵芝麻粕制备小肽的最优工艺条件为发酵温度 $31.3\text{ }^\circ\text{C}$ 、发酵时间 $64.24\text{ h}$ 、料水比 $1:1.18$ ,在此条件下小肽含量预测值为 $20.75\%$ 。在最优工艺条件下进行3批次验证试验,得到小肽含量平均值为 $20.04\%$ ,对实际值与预测值进行 $t$ 检验,得到的 $t$ 值为 $0.72$ ,大于 $0.05$ ,说明差异不显著,实际与模型预测的基本一致。

### 3 结论

本研究以小肽含量为指标,通过 Plackett - Burman 试验、最陡爬坡试验以及响应面试验对米曲霉发酵芝麻粕制备小肽的工艺条件进行优化,得到米曲霉发酵芝麻粕制备小肽的最优工艺条件为米曲霉接种量 $0.01\%$ 、芝麻粕与麸皮质量比 $9:1$ 、发酵温度 $31.3\text{ }^\circ\text{C}$ 、发酵时间 $64.24\text{ h}$ 、料水比 $1:1.18$ ,在此条件下发酵样品中的小肽含量可达 $20.04\%$ 。

### 参考文献:

- [1] 彭惠惠. 芝麻粕发酵条件优化及其小肽抗氧化活性研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2012.  
 [2] ELLEUCH M, BESBES S, ROISEUX O, et al. Quality

- characteristics of sesame seeds and by-products[J]. Food Chem, 2007, 103(2): 641-650.  
 [3] OLUDE O, GEORGE F, ALEGBELEYE W. Utilization of autoclaved and fermented sesame (*Sesamum indicum* L.) seed meal in diets for Til - aqua natural male tilapia[J]. Anim Nutr, 2016, 2(4): 339-344.  
 [4] 王瑞元. 我国芝麻产业的发展[J]. 中国油脂, 2016, 41(2): 1-2.  
 [5] 王振斌,王玺,林晓明,等. 响应面法优化芝麻饼粕蛋白的制备条件[J]. 食品工业科技,2014,35(5):167-171.  
 [6] 高嵩,邹奇志,谭树华. 小肽营养及在养猪生产中的应用[J]. 猪业科学, 2017, 34(3): 118-120.  
 [7] ZHAO X, ZHANG Y, HE W, et al. Effects of small peptide supplementation on growth performance, intestinal barrier of laying hens during the brooding and growing periods[J/OL]. Front Immunol, 2022, 13: 925256 [2022-12-15]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.925256>.  
 [8] 彭惠惠,李吕木,钱坤,等. 发酵芝麻粕中芝麻小肽的分离纯化及其体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 66-69.  
 [9] 李响,刘畅,吴非. 微生物发酵法制备大豆 ACE 抑制肽菌种的筛选[J]. 食品科学, 2013, 34(1): 185-188.  
 [10] 李全丰,程茂基,王彩玲,等. 固态生料发酵棉籽蛋白制备小肽研究[J]. 饲料工业, 2011, 32(6): 34-37.  
 [11] AN G, WEI M, WANG Z, et al. Effects of enzymolysis method on the preparation of peptides from wheat flour [J/OL]. Food Biosci, 2022, 49: 101956 [2022-12-15]. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101956>.  
 [12] 孙东伟,刘军. 小肽营养及生产工艺的研究进展[J]. 江苏调味副食品, 2010, 27(1): 6-9.  
 [13] 梁琪妹,黄光云,黄香,等. 米曲霉对构树青贮发酵品质的影响[J]. 饲料研究, 2022, 45(12): 100-104.  
 [14] 周斌,王静,周其洋,等. 米曲霉基因组与酶系表达研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(6): 293-299.  
 [15] 陈中平,周安国,王之盛,等. 米曲霉发酵豆粕营养特性的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2011, 47(9): 40-44.  
 [16] 亢乐,张丽杰,徐岩. 优质米曲霉筛选及复合菌剂构建提升郟县豆瓣蚕豆制品品质[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(22): 18-25.  
 [17] BALAKRISHNAN M, JEEVARATHINAM G, KUMAR S K S, et al. Optimization and scale-up of  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation of edible oil cakes[J/OL]. BMC Biotechnol, 2021, 21(1): 33 [2022-12-15]. <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00686-7>.

(下转第27页)

- [55] 李佳婷, 王敏. 鹰嘴豆与豌豆复合粉对面团特性及馒头品质的影响[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(5): 68-72.
- [56] PADALINO L, MASTROMATTEO M, LECCE L, et al. Optimization and characterization of gluten-free spaghetti enriched with chickpea flour[J]. Int J Food Sci Nutr, 2015, 66(2): 148-158.
- [57] GÓMEZ M, OLIVETE B, ROSELL C M, et al. Studies on cake quality made of wheat-chickpea flour blends[J]. LWT - Food Sci Technol, 2008, 41(9): 1701-1709.
- [58] 王箬, 李梦琴, 林顺顺, 等. 鹰嘴豆全麦粉酥性饼干研制及品质分析表征[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(10): 3352-3358.
- [59] 王禹赫. 鹰嘴豆复合鱼肉香肠工艺优化及贮藏期品质特性分析[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2021.
- [60] 吴晓菊. 鹰嘴豆乳酸菌饮料的研制[J]. 新疆畜牧业, 2018, 33(12): 29-31.
- [61] 宋昊, 阙斐. 燕麦鹰嘴豆复合饮料配方优化及工艺研究[J]. 保鲜与加工, 2022, 22(5): 78-85.
- [62] 张宇, 汪立平, 李宇涛, 等. 鹰嘴豆豆奶稳定性研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2018, 49(4): 572-577.
- [63] 陈夏菁, 刘红玉, 黎雁泽, 等. 鹰嘴豆营养发酵乳生产工艺及产品特性研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(10): 184-188.
- [64] 傅樱花. 鹰嘴豆酸奶的发酵工艺优化[J]. 食品工业, 2012, 33(2): 58-60.
- [65] 范广琦, 曹家宝, 王俊彤, 等. 挤压膨化对鹰嘴豆-玉米黄粉混合物理化性质的影响[J]. 农产品加工, 2022(13): 34-37.
- [66] GUPTA S, LIU C, SATHE S K. Quality of a chickpea-based high protein snack[J]. J Food Sci, 2019, 84(6): 1621-1630.
- [67] NOORDRAVEN L E C, KIM H J, HOOGLAND H, et al. Potential of chickpea flours with different microstructures as multifunctional ingredient in an instant soup application[J/OL]. Foods, 2021, 10(11): 2622 [2022-11-21]. <https://doi.org/10.3390/foods10112622>.
- [68] KILINCCEKER O, KURT Ş. Effects of chickpea (*Cicer arietinum*) flour on quality of deep-fat fried chicken nuggets[J]. J Food Agric Environ, 2010, 8(2): 47-50.
- [69] AHMAD SOFI S, SINGH J, CHHIKARA N, et al. Quality characterization of gluten free noodles enriched with chickpea protein isolate[J/OL]. Food Biosci, 2020, 36: 100626 [2022-11-21]. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100626>.
- [70] MOKNI GHRIBI A, BEN AMIRA A, MAKLOUF GAFSI I, et al. Toward the enhancement of sensory profile of sausage "Merguez" with chickpea protein concentrate[J]. Meat Sci, 2018, 143: 74-80.
- [71] 栗俊广, 张旭玥, 陈宇豪, 等. 鹰嘴豆分离蛋白对猪肉肌原纤维蛋白乳化特性的影响[J]. 轻工学报, 2021, 36(6): 30-37.
- [72] 栗俊广, 陈宇豪, 王登顺, 等. 鹰嘴豆分离蛋白对减盐猪肉糜凝胶品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(1): 143-148.
- (上接第12页)
- [18] 陈丹. 米曲霉羧肽酶O在毕赤酵母中的表达鉴定及其脱苦效应的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.
- [19] 周其洋, 何文静, 童星, 等. 一种米曲霉ZA109及其应用: CN109706088B [P]. 2020-09-04.
- [20] 李慧娟, 孙云鹏, 丁鹏程, 等. 混合菌固态发酵豆粕制备大豆活性肽[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(11): 121-126.
- [21] 王君. 猴头菌发酵大豆多肽及其生理功能的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [22] 石慧, 梁运祥. 差量法测定发酵豆粕类饲料中肽氮含量的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2015(2): 58-60.
- [23] REDDY L V A, WEE Y J, YUN J S, et al. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches[J]. Bioresour Technol, 2008, 99(7): 2242-2249.