

多菌种发酵人参酒及皂苷转化的分析

孙广仁¹, 赵闻琪², 赵洪南¹, 王爽¹, 张启昌¹

(1. 北华大学林学院, 吉林 吉林 132013; 2. 吉林市产品质量检验院, 吉林 吉林 132013)

摘要: 采用甜酒曲、红曲以及蓝靛果酵母, 以正交试验法确定发酵工艺, 借助氢谱(¹H-NMR)、紫外(UV)及高效液相色谱(HPLC)等手段分析人参皂苷变化。结果表明: 蓝靛果酵母与甜酒曲对酒质影响显著, 3类菌的最佳配比为每100g糯米加入甜酒曲0.3g进行糖化, 然后于每100mL糖化液中加入红曲13g、人参根粉25g、蓝靛果酵母液7mL; 发酵前后, HPLC图中峰增加6个、消失3个, UV在280~320nm区域增加了11个吸收峰、¹H-NMR在9段化学位移内存在相对积分发生明显变化, 表明发酵人参酒的皂苷发生了转化。

关键词: 人参发酵酒; 甜酒曲; 红曲; 蓝靛果酵母; 皂苷转化

Multi-strain Fermentation and Ginsenoside Conversion Analysis of Ginseng Rice Wine

SUN Guang-ren¹, ZHAO Wen-qi², ZHAO Hong-nan¹, WANG Shuang¹, ZHANG Qi-chang¹

(1. Forestry College, Beihua University, Jilin 132013, China;

2. Institute of Testing on Product Quality in Jilin City, Jilin 132013, China)

Abstract: Ginseng rice wine was developed based on the saccharification of steamed glutinous rice by liqueur koji and then fermentation by both red koji and cultured yeast from honeyberries with the addition of ginseng root powder. In order to achieve maximum overall sensory score for taste, aroma, color and undesired odor, the amounts of liqueur koji, red koji and cultured yeast from honeyberries were optimized using orthogonal array design. Meanwhile, the ginsenosides in the wine and fermentation substrates for it as a control were analyzed using ¹H-NMR, UV and HPLC. The results indicated that cultured yeast from honeyberries and liqueur koji had a significant effect on the quality of the wine. The optimal fermentation conditions were achieved by adding 0.3 g/100 g liqueur koji to steamed glutinous rice for saccharification and then adding 25 g/100 mL ginseng root powder to saccharification liquid for fermentation by red koji and cultured yeast from honeyberries inoculated at 13 g/100 mL and 7 mL/100 mL, respectively. After the fermentation, six new peaks were observed and 3 original peaks were disappeared in HPLC. Totally 11 new absorption peaks were observed in the UV spectrum in the range of 280—320 nm. The integration of relative peak height in 9 chemical shift zones revealed obvious changes, suggesting the conversion of ginsenosides as a result of the fermentation.

Key words: fermented ginseng wine; liqueur koji; red koji; yeast juice of *Lonicera edulis*; ginsenoside conversion

中图分类号: TS262.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)23-0234-06

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)作为高档滋补品已有2000年的历史, 人参的主要活性成分是人参皂苷(ginsenoside), 现已分离50多种, 具有抗肿瘤、抗癌、抗炎、抗疲劳、抗氧化、提高免疫力等多种功效, 微生物对人参皂苷转化是人参开发研究的主要热点之一。人参皂苷的转化方法包括化学法、组织培养法、酶法、微生物发酵法等^[1-2]。转化人参皂苷的微生物有酵母菌、霉菌等^[3-4]。米酒是混合菌发酵, 其质量与风味的好坏取决于酒曲中微生物的群落组成及其各菌种之间的代谢

关系^[5]。红曲与甜酒曲是酿造米酒常用的微生物。目前关于红曲与甜酒曲是否具有转化人参皂苷的功能报道较少。红曲霉具有降血脂、降胆固醇的作用, 在我国作为膳食营养补充剂, 用于传统酒曲最早的有益真菌之一, 应用历史悠久^[6-9]。如果红曲与甜酒曲也具有转化人参皂苷的功能, 那么, 红曲、甜酒曲以及酵母的多菌种发酵人参酒将可能改变人参酒的保健功能。

目前, 多菌种发酵技术尤其是混合多菌种固定化发酵应用较为广泛^[10-12]。人参浸泡酒本身具有滋补强壮、

收稿日期: 2011-09-23

基金项目: 国家林业局“948”项目(2008-4-15); 国家大学生创新性实验计划项目(101020122)

作者简介: 孙广仁(1964—), 男, 教授, 博士研究生, 研究方向为微生物生态与利用。E-mail: sungr8189@163.com

益智安神功效,红曲、甜酒曲以及酵母的多菌种发酵人参酒不但可以保留原料中的营养成分,而且还可以通过多菌种的代谢作用得到许多微生物转化的有益物质,对人体健康有益^[13-14]。蓝靛果是与蓝莓齐名的具有保健功能的野果^[15-17],本实验是在研究蓝靛果酵母菌特性的基础上,采用红曲、甜酒曲辅以蓝靛果酵母进行人参酒的发酵,并进行人参皂苷的分析,为功能性人参酒的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蓝靛果鲜果,于2011年8月采自吉林省抚松县松江河镇;人参 吉林省白山市林海雪原酿酒有限公司。

亚硫酸(食品添加剂) 天津市致远化学试剂有限公司;甜酒曲 安琪酵母股份有限公司;红曲 古田县生华红曲有限公司。

1.2 仪器与设备

LC-6A 液相色谱仪 日本岛津公司;AVANCE II - 500 超导核磁共振波谱仪 德国 Bruker 公司;Cary5000 紫外-可见分光光度计 美国瓦里安公司;FDU-1100 冷冻干燥机 日本东京理化器械株式会社;DW-HL328 超低温冰箱 中科美菱低温科技有限责任公司;LH-T20 糖度计 杭州市陆恒生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 多菌种发酵人参酒

1.3.1.1 原料的处理

蓝靛果鲜果汁:取蓝靛果鲜果 10kg,打浆后过滤,分成两份,每份得蓝靛果果汁 4.6L,采用直接滴定法测定总酸质量浓度(以柠檬酸计)为 20.86g/L。一份置于灭菌的 1000mL 三角瓶中,用封口膜封瓶口,60℃杀菌 30min,4℃条件下保存;另一份同样置于灭菌的 1000mL 三角瓶中,于 4℃条件下保存,用于制备蓝靛果酵母液。

蓝靛果酵母液:取新鲜蓝靛果 200g 经简单破碎,加入亚硫酸(SO_2 质量浓度为 90mg/L),28℃培养 12h,以新鲜蓝靛果汁进行放大培养 3d,过滤得到蓝靛果酵母液。

人参粉:取干燥人参 12kg,粉碎后过 0.3mm 筛,得人参粉。

1.3.1.2 工艺流程

糯米→蒸饭→接种甜酒曲糖化→糖化液→加入人参粉(灭菌)→接种红曲→添加蓝靛果酵母液→调整糖度→主发酵→后发酵→冷藏取酒→过滤→离心→包装→冷藏保存

1.3.1.3 单因素试验

在多菌种发酵人参酒发酵过程中,甜酒曲用量(A)、红曲用量(B)与蓝靛果酵母液用量(C)是影响发酵酒质量的关键因素。

甜酒曲的用量直接影响糯米的糖化以及母酒精发酵,以每 100g 糯米添加 0.1~0.6g 甜酒曲进行糖化实验,以糖化液的糖质量分数为评价指标,确定甜酒曲适宜的加入量。糯米糖化后加入红曲,以糖化液为基料,以每 100mL 糖化液添加 6~16g 红曲,于 25℃发酵 9d,以总酸质量浓度与酒精体积分数为评价指标(红曲发酵评价指标公式),确定红曲适宜的加入量。蓝靛果酵母液的添加主要是改善发酵酒的风味,以每 100mL 糖化液添加 6~12mL 蓝靛果酵母液,于 25℃发酵 6d,以口感、香气、色泽及异味等感官为评价指标(表 1),确定其适宜的加入量。

$$X_i = \frac{\phi_i}{\phi_{\max}} \times 80 - \frac{\rho_i}{\rho_{\max}} \times 20$$

式中: X_i 为感官评分; ρ_i 为总酸质量浓度/(g/L); ϕ_i 为酒精体积分数/%; ϕ_{\max} 为酒精体积分数最大值/%; ρ_{\max} 为总酸质量浓度最大值/(g/L)。

表 1 人参发酵酒评分标准表

Table 1 Sensory evaluation standards of fermented ginseng wine

项目	分值	标准
口感	40	酒度适宜,酸味适中、细腻
香气	30	具有红曲酒醇香,略带蓝靛果的清香
色泽	20	清澈透明,红黄色
异味	10	评价酒体自身的异味

1.3.1.4 正交试验

在单因素试验结果基础上,确定甜酒曲用量、红曲用量以及蓝靛果酵母液用量的水平,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,见表 2。

表 2 发酵酒正交试验因素水平表

Table 2 Coded values and corresponding actual values of the factors tested in orthogonal array design

水平	因素		
	A 甜酒曲用量/ (g/100g)	B 红曲用量/ (g/100mL)	C 蓝靛果酵母液用量/ (mL/100mL)
1	0.2	13	6
2	0.3	14	7
3	0.4	15	8

1.3.2 人参皂苷的分析

1.3.2.1 样品的制备

发酵酒的制备:800mL 糯米糖化液与 200g 灭菌的人参粉混合,加入 50mL 质量分数为 10% 的红曲与 50mL 蓝靛果酵母液,再与亚硫酸(使发酵液 SO_2 质量浓度为 90mg/L)混合,加入 90mL 蓝靛果汁,加冷却后的灭菌水至糖质量分数为 22%,得发酵液,于 25℃培养 5d,过滤后,4℃保存 15d,过滤,重复 3 次。

对照液的制备：为了检验上述发酵酒过程中，人参皂苷是否发生转化，按发酵酒的制备工艺，不进入发酵阶段，直接冷冻保存，重复3次。

人参皂苷提取物的制备：分别取150mL发酵酒与对照液，60℃减压浓缩后，无菌水定容至50mL(消除发酵酒中酒精对提取的影响)，再以酒精调制酒精体积分数80%，4℃保存24h，常温下以6000r/min离心30min，60℃减压浓缩后，以正丁醇萃取，减压回收正丁醇，得到发酵酒与对照液的人参皂苷提取物。

1.3.2.2 色谱分析

色谱条件：色谱柱 Hypersil ODS 色谱柱(4.6mm × 150mm, 5 μm)；流动相：乙腈-水(体积比为63:37)；流速：1mL/min；柱箱温度：40℃；紫外检测器(检测波长为213nm)。

色谱分析：分别取0.50g提取物溶于超纯水中，定容至50mL，用0.4 μm滤膜过滤，进样20 μL，进行色谱分析，记录保留时间与峰面积。

1.3.2.3 光谱分析

¹H-NMR 光谱分析：分别取发酵酒与对照液人参皂苷提取物30mg，以少量氘代吡啶为溶剂溶解，转入核磁管内，加入余下的吡啶(0.5mL)，加载到NMR波谱仪上进行氢谱分析。

UV 分析：分别取发酵酒与对照液人参皂苷提取物50mg样品，溶于5mL蒸馏水中，测定紫外光谱，记录紫外吸收峰，重复3次。

1.3.3 发酵酒指标测定方法

总酸与酒精体积分数的测定分别按GB/T 15038—2006《葡萄酒、果酒通用分析方法》所规定的方法进行。

1.3.4 数据处理方法

采用SPSS17.0软件对单因素试验、正交试验所得的数据进行分析，并对发酵人参酒与对照液皂苷提取物的HPLC、¹H-NMR以及UV数据进行比较分析。采用N2000色谱工作站(Ver 3.30)、ORIGIN(V8.5)、MestReC等软件进行谱图的绘制。

2 结果与分析

2.1 人参多菌种发酵单因素试验

2.1.1 甜酒曲用量的选择

对100g糯米中分别加入0.2、0.3、0.4、0.5、0.6g甜酒曲的糯米进行糖化，结果如图1所示，甜酒曲用量在0.2~0.6g/100g之间，随着接种量的增加而增加。采用SPSS进行了方差分析，求出LSD_{0.05}与LSD_{0.01}，并进行了多重比较分析(表3)。结果表明，甜酒曲加入量在0.2~0.4g/100g区间差异极显著，而在0.4~0.5g/100g之间有差异，在0.5~0.6g/100g差异不明显。因此，确定甜酒曲用量为每100g糯米加入甜酒曲0.2~0.4g/100g。

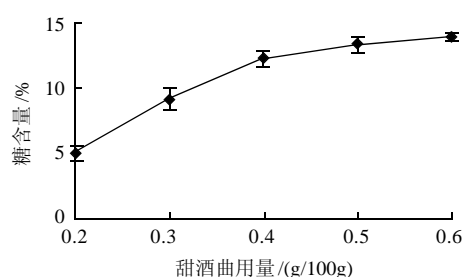


图1 甜酒曲用量对糖化效果的影响

Fig.1 Effect of liqueur koji on saccharification efficiency

表3 甜酒曲用量对糖化效果影响的方差分析

Table 3 Variance analysis for saccharification efficiency at various levels of liqueur koji

甜酒曲用量/(g/100g)	\bar{x}	$\bar{x}-4.6$	$\bar{x}-8.5$	$\bar{x}-11.4$	$\bar{x}-12.4$
0.6	13.0	8.4**	4.5**	1.6*	0.6
0.5	12.4	7.8**	3.9**	1.0	
0.4	11.4	6.8**	2.9**		
0.3	8.5	3.9**			
0.2	4.6				

注：LSD_{0.05} = 1.05, LSD_{0.01} = 1.61。

2.1.2 红曲用量的选择

甜酒曲以加入量为0.3g/100g加到糯米中完成糖化，100mL糖化液中再分别加红曲6、8、10、12、14、16g，于25℃发酵9d，测定总酸质量浓度与酒精体积分数，按建立的指标计算公式计算结果(图2)，并进行方差分析(表4)。结果表明，红曲加入量14g/100mL与6、8、10g/100mL相比具有极显著差异，总体来看，红曲加入量的适宜区间为10~14g/100mL，由于随着加入量的提高，酸度也在不断增加，所以在保证酒度的情况下下应尽可能少加红曲。

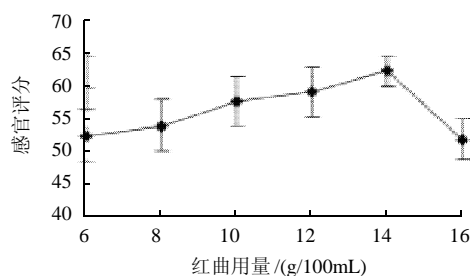


图2 红曲用量对糖化效果的影响

Fig.2 Effect of red koji on overall sensory score of fermented ginseng wine

表4 红曲用量对发酵酒质量影响的方差分析

Table 4 Variance analysis for overall sensory score of fermented ginseng wine at various levels of red koji

红曲用量/(g/100mL)	\bar{x}	$\bar{x}-52.1$	$\bar{x}-52.7$	$\bar{x}-54.2$	$\bar{x}-58.1$	$\bar{x}-59.5$
14	62.6	10.5**	9.9**	8.4**	4.5	3.1
12	59.5	7.4*	6.8*	5.3*	1.4	
10	58.1	6.0*	5.4*	3.9		
8	54.2	2.1	1.5			
6	52.7	0.6				
16	52.1					

注：LSD_{0.05} = 5.21, LSD_{0.01} = 7.85。

2.1.3 蓝靛果酵母液的用量选择

100g 糯米中加入 0.3g 甜酒曲, 100mL 糖化液中加入 14g 红曲, 然后于 100mL 糯米糖化液分别加入 2、4、6、8、10、12mL 蓝靛果酵母液, 以蓝靛果果汁补足 12mL, 再加水至 200mL, 于 25℃ 发酵 6d, 得到发酵酒按评分表(表 1)进行评定, 得到蓝靛果酵母液的用量试验结果(图 3), 并进行了方差分析(表 5)。结果表明, 每 100mL 糯米糖化液加入蓝靛果酵母液量为 6mL 与 8mL 时与 2、10、12mL 相比具有显著差异, 而在 6mL 与 8mL 之间差异却不显著, 确定蓝靛果酵母液的最佳体积分数范围为 6~8mL/100mL。

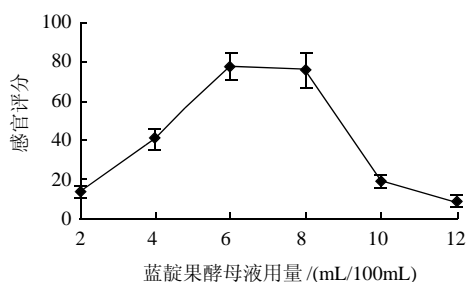


图 3 蓝靛果酵母液用量对发酵酒质量的影响

Fig.3 Effect of cultured yeast from honeyberries on overall sensory score of fermented ginseng wine

表 5 蓝靛果酵母液用量对发酵酒质量影响的方差分析

Table 5 Variance analysis for overall sensory score of fermented ginseng wine at various levels of cultured yeast from honeyberries

蓝靛果酵母液加入量/(mL/100mL)	\bar{x}	$\bar{x}-8.5$	$\bar{x}-13.1$	$\bar{x}-18.4$	$\bar{x}-40.8$	$\bar{x}-76.2$
6	77.3	68.8*	64.2*	58.9*	23.4	1.1
8	76.2	67.7*	63.1*	57.8*	22.3	
4	40.8	32.3	27.7	22.4		
10	18.4	9.9	5.3			
2	13.1	4.6				
12	8.5					

注: $LSD_{0.05}=51.5$, $LSD_{0.01}=73.0$ 。

2.2 人参酒多菌种发酵正交试验结果

根据正交试验的结果(表 6)进行直观分析, 表明影响酒质的因素优劣顺序为蓝靛果酵母液用量>甜酒曲用量>红曲用量; 方差分析结果(表 7)表明, 蓝靛果酵母液与甜酒曲影响显著, 红曲用量的影响不大, 极差分析比较理想的组合为 $C_2A_2B_2$, 考虑节约成本, 红曲可以尽可能小, 选择 B_1 , 得到最优组合为 $C_2A_2B_1$, 即每 100g 糯米加入甜酒曲 0.3g, 然后于 100mL 糖化液中加入红曲 13g、蓝靛果酵母液 7mL。因此, 最后的工艺优化条件为每 100g 糯米中加入甜酒曲 0.3g, 然后于 100mL 糖化液中加入红曲 13g、参粉 25g、蓝靛果酵母液 7mL。

表 6 发酵酒正交试验设计及结果

Table 6 Orthogonal array design matrix and results

试验号	A	B	C	空列	感官得分
1	1	1	1	1	52.4
2	2	1	2	2	79.5
3	3	1	3	3	57.9
4	2	2	1	3	69.3
5	3	2	2	1	70.2
6	1	2	3	2	65.8
7	3	3	1	2	54.2
8	1	3	2	3	69.5
9	2	3	3	1	71.7
K_1	187.70	189.80	175.90	194.30	
K_2	220.50	205.30	219.20	199.50	
K_3	182.30	195.40	195.40	196.70	
k_1	62.57	63.27	58.63	64.77	
k_2	73.50	68.43	73.07	66.50	
k_3	60.77	65.13	65.13	65.57	
R	12.73	5.17	14.43	1.73	

表 7 发酵酒正交试验结果方差分析

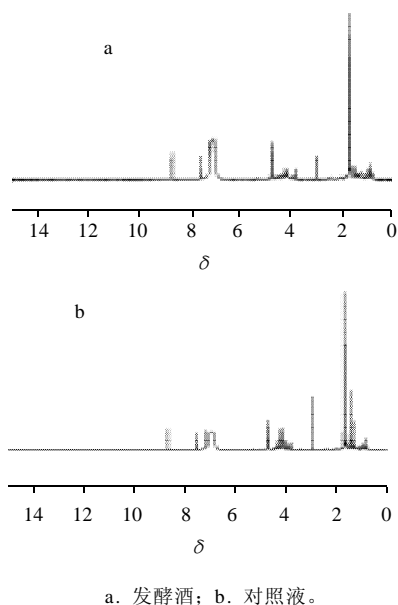
Table 7 ANOVA for orthogonal array design experiments

变异来源	离差平方和	自由度	方差	F
A	284.92	2	142.4578	63.09646**
B	41.07	2	20.53444	9.09498
C	313.51	2	156.7544	69.42864**
误差	4.52	2		

注: $F_{0.05}=19$, $F_{0.01}=99$ 。

2.3 参皂苷的检测结果

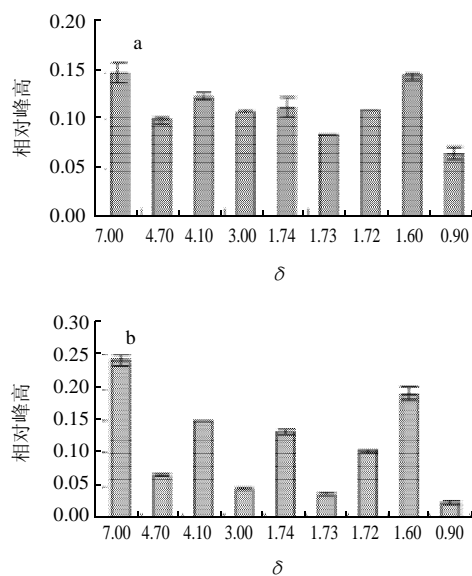
2.3.1 人参皂苷提取物的 1H -NMR 分析结果



a. 发酵酒; b. 对照液。

图 4 发酵酒与对照液人参皂苷提取物 1H -NMR 谱图

Fig.4 1H -NMR spectra of ginsenoside extracts from fermented ginseng wine and control solution

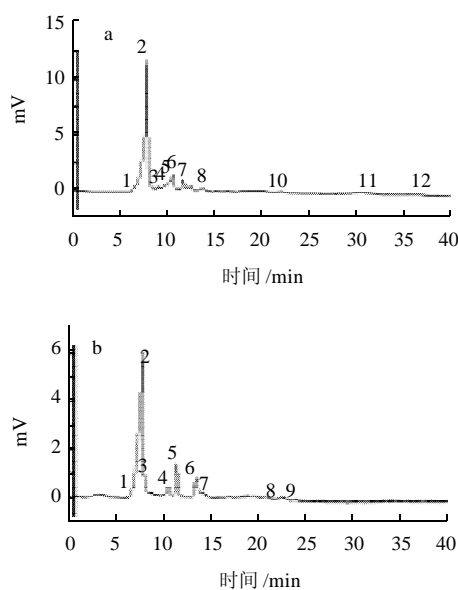


a. 发酵酒; b. 对照液。

图5 发酵酒与对照液人参皂苷提取物¹H-NMR分段积分Fig.5 Segmentation integration of ¹H-NMR peaks of ginsenoside extracts from fermented ginseng wine and control solution

发酵酒与对照液人参皂苷提取物的¹H-NMR分析结果(图4、5)表明,发酵酒与对照液人参皂苷提取物¹H-NMR在9段化学位移对应的吸收峰有明显变化,吸收峰有所不同,指示发酵酒发上了人参皂苷的转化。

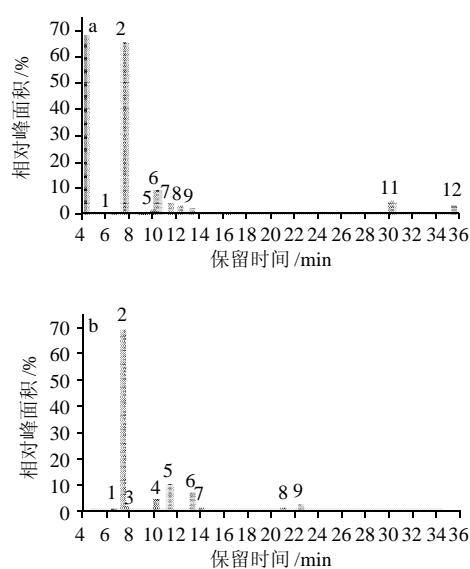
2.3.2 人参皂苷提取物的色谱分析结果



a. 发酵酒; b. 对照液。

图6 发酵酒与对照液人参皂苷提取物HPLC谱图

Fig.6 HPLC spectra of ginsenoside extracts from fermented ginseng wine and control solution



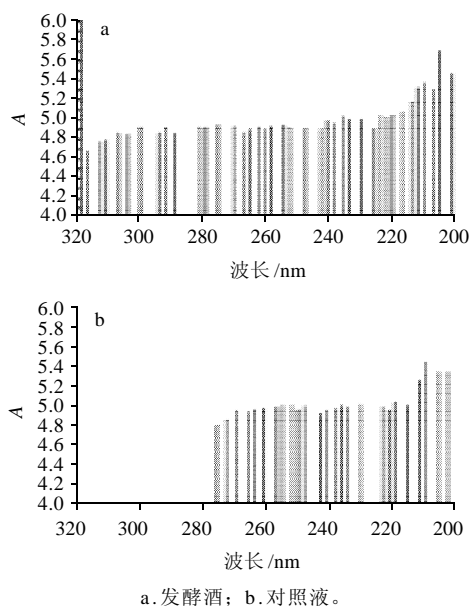
a. 发酵酒; b. 对照液。

图7 发酵酒与对照液人参皂苷提取物HPLC相对峰面积

Fig.7 HPLC relative peak area integration of ginsenoside extracts from fermented ginseng wine and control solution

对人参皂苷提取物进行HPLC分析(图6、7)结果表明,发酵酒中人参皂苷与对照液的人参皂苷提取物虽然色谱峰比较相似,但种类与含量却有明显变化,这与¹H-NMR的结果相互认证。由于发酵前后色谱峰消失3个,新增6个,说明部分皂苷成分及含量发生很大的变化。

2.3.3 人参皂苷提取物的UV分析结果



a. 发酵酒; b. 对照液。

图8 发酵酒与对照液人参皂苷提取物水溶液紫外吸收峰的分布

Fig.8 Distribution of UV adsorption peaks of ginsenoside extracts from fermented ginseng wine and control solution

对人参皂苷提取物进行UV分析(图8)表明,发酵后在波长280~320nm范围内,紫外吸收光谱明显发生变化,UV光谱在280~320nm区域增加了11个吸收峰,说明人参皂苷的结构发生了改变。

3 结 论

采用多菌种发酵人参酒不仅改进了人参酒的发酵工艺、使人参皂苷发生转化,而且还改善了人参酒的风味。根据¹H-NMR的相对峰强度的改变以及HPLC色谱峰面积的改变,说明多菌种发酵人参酒过程中,改变了人参中已有皂苷的相对含量;又依据¹H-NMR吸收峰化学位移的变化、HPLC色谱峰保留时间的改变以及UV的变化,推测发酵后的人参酒中人参皂苷发生了转化。

本研究中的HPLC条件尚没有达到色谱的最佳分离效果,同时缺少标准对照品,如能改用液质联用仪,优化色谱条件,将会得到更为理想的结果,而人参皂苷种类多达50余种,单独采用液质联用仪分析皂苷转化难度比较大;对实验得到的人参皂苷相对含量以及结构的变化能否改变人参发酵酒的功能,有待进一步建立药理模型进行验证;多菌种发酵人参酒的实验为进一步探索人参酒的功能提供新的线索,对多菌种发酵人参酒能否改善人参的保健功能的研究,将是一项极为有意义的研究课题。

参考文献:

- [1] 赵方允,陈自宏,虞泓,等.微生物转化人参皂苷研究进展[J].中国医药生物技术,2010,5(3):216-219.
- [2] PARK C S, YOON M H, NOH K H, et al. Biotransformation of ginsenosides by hydrolyzing the sugar moieties of ginsenosides using microbial glycosidases[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 87(1): 9-19.
- [3] 金艳,金香梅,尹成日.微生物转化人参皂苷Rb1为稀有皂苷F2[J].延边大学农学报,2011,33(2):112-116.
- [4] 李东霄,常景玲,张志宏.微生物转化人参皂苷Rc和Rd的研究[J].江苏农业科学,2010(4):22-25.
- [5] 刘婧亮,乔发东.国内外甜酒曲研究进展[J].中国酿造,2010(9):21-25.
- [6] 陈雪梅,陈巧珊,黎英.红曲霉在甜米酒酿造中的应用研究[J].食品工业科技,2011,32(1):21-25.
- [7] BECKER D J, GORDON R Y, HALBERT S C, et al. Red yeast rice for dyslipidemia in statin-intolerant patients[J]. Annals of Internal Medicine, 2009, 150(12): 830-840.
- [8] ROSELLE H, EKATAN A, TZENG J, et al. Symptomatic hepatitis associated with the use of herbal red yeast rice[J]. Annals of Internal Medicine, 2008, 149(7): 516-517.
- [9] 温学伟,马新,周立平,等.红曲抗氧化的研究进展[J].食品工业科技,2011,32(2):376-378.
- [10] 王克明.固定化多菌种发酵苦瓜酒的研究[J].中国酿造,2006(6):47-49.
- [11] 孙东伟,刘军牛,广杰.多菌种固态发酵酒糟生产菌体饲料蛋白的研究[J].中国饲料,2010(7):38-40.
- [12] 王克明.混合多菌种固定化发酵海带酒的研究[J].酿酒,2006,33(3):38-40.
- [13] 王燕桓,刘军,王继英,等.高效液相色谱法测定人参酒中人参单体皂苷的研究[J].食品与发酵工业,1997,23(5):52-55.
- [14] 高秀娥.发酵型人参酒加工工艺的研究[D].吉林:吉林农业大学,2007.
- [15] 孙广仁,张启昌,陈志敏,等.蓝锭果酵母发酵特性的研究[J].食品科学,2010,31(23):305-309.
- [16] 王振宇,杨玲.蓝锭果的研究利用现状及其发展前景[J].安徽科技学院学报,2009,23(3):18-20.
- [17] 岳晓霞,张根生,李大龙,等.复合型蓝锭果果酱的研制[J].食品科学,2008,29(10):723-725.