

响应面法优化复合型打瓜软枣猕猴桃格瓦斯饮料发酵条件

顾思彤, 姜爱丽*, 胡文忠, 周福慧, 陈晨, 刘程惠

(大连民族大学生命科学学院, 生物技术与资源利用教育部重点实验室, 辽宁大连 116600)

摘要:以打瓜和软枣猕猴桃为原料,选定植物乳杆菌接种量、发酵时间、糖化液与打瓜软枣猕猴桃汁比例以及果胶酶添加量为考察因素,感官评分为响应值,采用 Box-Behnken 响应面法进行工艺研发和优化。结果表明:其最佳工艺条件为:植物乳杆菌接种量为 2×10^7 CFU/mL, 发酵时间为 12 h, 糖化液与打瓜软枣猕猴桃汁比例为 0.97:1 (v/v), 果胶酶添加量为 15 mg/100 g, 在此条件下, 感官评分为 (94.0 ± 0.2) 分, 所制得的饮料成品颜色呈淡黄绿色, 风味纯正, 酸甜适中, 澄清无沉淀, 且具有打瓜和软枣猕猴桃的果香, 并且与发酵所产生的香味混合, 口感新鲜细腻, 余味清爽。

关键词:打瓜, 软枣猕猴桃, 格瓦斯饮料, 植物乳杆菌, 发酵条件, 响应面法

Optimization of Fermentation Conditions for a Complex Type of Seeding-watermelon Kiwi Fruit Kvass Beverage by Response Surface Method

GU Si-tong, JIANG Ai-li*, HU Wen-zhong, ZHOU Fu-hui, CHEN Chen, LIU Cheng-hui

(Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization, Ministry of Education, College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China)

Abstract: Taking seeding-melon and *Actinidia arguta* as raw materials, the inoculum amount of *Lactobacillus plantarum*, the fermentation time, the ratio of saccharification solution to the seeding-melon and *Actinidia arguta* juice and the amount of pectinase were taken as the investigation factors, and the sensory score was the response value, the process development and optimization were by Box-Behnken response surface method. The results showed that the optimum conditions were as follows: The inoculum of *Lactobacillus plantarum* was 2×10^7 CFU/mL, the fermentation time was 12 h, the ratio of saccharification solution to the seeding-melon and *Actinidia arguta* juice was 0.97:1 (v/v), and the amount of pectinase was 15 mg/100 g, under these conditions, the sensory scores was (94.0 ± 0.2) scores. The finish beverage had a light yellow-green color, pure flavor, moderate sweet and sour, clear and no precipitation, and had the fruity flavor of seeding-watermelon and kiwi fruit. And mixed with the flavor produced by fermentation, the taste was fresh and delicate, and the aftertaste was refreshing.

Key words: seeding-watermelon; *Actinidia arguta*; Kvass; *Lactobacillus plantarum*; fermentation conditions; response surface method

中图分类号:TS255.1

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2019)06-0211-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.06.035

引文格式:顾思彤, 姜爱丽, 胡文忠, 等. 响应面法优化复合型打瓜软枣猕猴桃格瓦斯饮料发酵条件[J]. 食品工业科技, 2019, 40(6):211-215.

软枣猕猴桃(*Actinidia arguta*)富含大量的营养成分,主要包括:叶绿素、 β 胡萝卜素、叶黄素和黄酮等^[1-2]。目前已有研究表明,软枣猕猴桃含有大量的天然多酚^[3-4],如咖啡酸、槲皮素^[5]等,具有抗氧化活性,可以清除自由基,防止细胞氧化损伤^[6],这意味着软枣猕猴桃既有营养价值又有药用价值^[7],因此深受消费者的青睐。

打瓜,又名籽瓜,外形与西瓜相似但相对略小,多籽,味淡。打瓜中富含维生素、糖分、酚类物质,以

及钙、磷、铁等微量元素^[8-9],还含有较多的不饱和脂肪酸^[10],适合患心脑血管疾病和高血压的病人食用。中医理论指出,打瓜味甘淡、性温,具有生津止渴、解暑清热、利尿等性质,常食用适量的打瓜可促进消化和新陈代谢^[11]。

格瓦斯是一种用麦芽或面包经酵母和乳酸发酵酿造的低度酒精饮料^[12]。其口感清爽,并富含维生素、有机酸、糖等^[13],不仅可以为人体提供所需的多种营养成分,还可改善人体肠胃消化吸收功能^[14]。

收稿日期:2018-06-13

作者简介:顾思彤(1995-),女,硕士研究生,研究方向:采后生物学与技术,E-mail:gusitong0478@163.com。

* 通讯作者:姜爱丽(1979-),女,博士,教授,研究方向:采后生物学与技术,E-mail:jal@dlnu.edu.cn。

随着社会的发展,近年来饮料的发展趋势由碳酸饮料转向植物功能性饮料^[15]。由于软枣猕猴桃是季节性水果,每年的收获季只有9、10两个月,且贮藏期较短^[16],不能满足人们常年的需求。打瓜目前主要的应用是取打瓜籽榨油等,只取瓜籽舍弃瓜瓢瓜肉,严重浪费资源。为了消除软枣猕猴桃季节性的影响,避免资源的浪费,本实验采用响应面法研究复合型打瓜软枣猕猴桃格瓦斯饮料的最佳工艺,所用原材料物美价廉,成品具有一定的生理功能,且风味独特,是一种同时具有经济效益和营养价值的植物功能性饮料,以期提供一种最佳的生产工艺。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

软枣猕猴桃 辽宁农业职业技术学院猕猴桃基地;打瓜 内蒙古自治区通辽市开鲁县;秋林无糖碳烤面包 哈尔滨秋林集团;安琪甜酒酒曲、糯米 市售;MRS 培养基 北京奥博星生物技术有限责任公司;果胶酶 活力 5×10^4 U/g,郑州华峰食品科技有限公司;植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 中国普通微生物菌种保藏管理中心。

AL204型电子天平 梅特勒-托利多有限公司;FKB型分层烤箱 佛山市祥兴;XF-12型盘发酵箱 邢台润联科技开发有限公司;FW135型中草药粉碎机 上海楚柏实验室设备有限公司;BJ11/YS-100型实验室恒温箱 武汉西化仪科技有限公司;PL203型精密电子天平 梅特勒-托利多仪器上海有限公司;Lambda-25型紫外可见分光光度计 美国PE公司;T25型匀浆机 德国IKA公司。

1.2 实验方法

1.2.1 格瓦斯饮料的制作方法

1.2.1.1 植物乳杆菌的活化与扩大培养 将保存的植物乳杆菌按2%接种量接入MRS培养基中,置于36℃电恒温培养箱培养24 h进行活化,然后转入乳酸菌扩大培养基中按5%接种量接入活化的植物乳杆菌,在36℃下进行扩大培养,待植物乳杆菌数量达到 10^7 CFU/mL时停止扩大培养。乳酸菌扩大培养基的配方组成为:西红柿80 g,胡萝卜80 g,泡好的黄豆30 g,白砂糖80 g,硫酸镁6 g,碳酸钙50 g,磷酸氢二钠5 g,水669 g。

1.2.1.2 面包屑的制备 烘烤前将秋林面包切成1 cm左右的面包片摆入烤盘中,每个烤盘摆放两层面包片,在120~130℃下烘烤0.5 h,当面包片颜色略微发黄时,将面包片翻面,用相同温度和时间烘烤,待面包片两面都成金黄色即可。冷却后用粉碎机将烘烤后的面包片粉碎,室温下密封保存备用。

1.2.1.3 浸泡液的制备 将粉碎好的面包屑放入浸泡容器中,以1:4(g/g)加入70~80℃的热水,浸泡2~3 h,在此过程中会观察到混合物会逐渐分层,其中下层沉淀物为面包屑,上层液体为浸泡液,将经四层纱布过滤分离得到的浸泡液放在发酵容器中暂存,重复上述浸泡过程2~3次。浸泡容器温度控制在37℃左右,经过浸泡过程后,浸泡液会呈面包的金黄色,并且会散发出面包的糊香味。

1.2.1.4 糖化液的制备 用上述浸泡液对糯米进行24 h浸泡,然后将4~5 cm厚泡透的糯米放入蒸锅中,蒸20 min,待糯米蒸熟后将糯米降温至30℃,用30℃的温水将安琪甜酒酒曲化开,边倒入降温后的糯米边搅拌,再将糯米表面抹平,并将糯米饭呈棋盘式挖出9个直径5 cm,3 cm深的酒窝以便于观察发酵状况,温度控制在30~32℃之间,放置48 h进行糖化;糯米糖化过程结束后经固液分离,即得到糖化液,放入5℃冷库中备用。

1.2.1.5 打瓜软枣猕猴桃混合汁的制备 软枣猕猴桃的挑选与清洗:选取新鲜、无病虫害和机械伤的软枣猕猴桃,进行清洗,并晾干表面水分备用;打瓜的挑选与清洗:选取无压痕、无虫蚀,味清香的打瓜洗净,去皮去籽,取瓜肉备用。

果汁的制备:各取等量处理好的打瓜和软枣猕猴桃放入榨汁机榨汁(注意榨汁时间,以防止时间过长将猕猴桃籽打碎,影响果汁颜色,一般以1~2 min为宜,转速为12000 r/min),所得汁液按照4:5的质量比加水调浆后,用四层纱布过滤掉果肉部分后,即可得到新鲜的打瓜软枣猕猴桃汁混合汁。

1.2.1.6 打瓜软枣猕猴桃格瓦斯饮料的制备 将糖化液和打瓜软枣猕猴桃混合汁按一定比例调配,在100℃下灭菌15 min后冷却,并接种一定量的上述含有 10^7 CFU/mL乳酸菌的乳酸菌扩大培养基,搅拌均匀后放入已消毒的不锈钢桶中,盖上盖子并用保鲜膜封紧,放入30℃培养箱中进行前发酵一定时间,筛选出最佳时间后转入5℃冷库中进行24 h的后发酵。在发酵后的打瓜软枣猕猴桃果汁中加入一定量的果胶酶,43℃下酶解5 h,用多层纱布过滤后,观察饮料呈澄清无沉淀后进行装瓶,在100℃水浴中灭菌15 min,冷却后即可得到复合型打瓜软枣猕猴桃格瓦斯饮料。

1.2.2 响应面优化工艺条件 根据预实验结果,实验中所选取的乳酸菌最佳发酵温度为37℃,选取对格瓦斯饮料品质影响较大的乳酸菌接种量、乳酸菌发酵时间、糖化液与软枣猕猴桃汁比例以及果胶酶添加量为自变量,感官评分为响应值,采用4因素3水平的Box-Behnken响应面优化复合型打瓜软枣猕猴桃格瓦斯饮料的生产工艺,试验方案设计见表1^[17]。

表1 响应面试验因素及水平设计表

Table 1 Response surface test factors and levels design table

因素	水平		
	-1	0	1
A 植物乳杆菌接种量 ($\times 10^7$ CFU/mL)	2	4	6
B 发酵时间(h)	8	10	12
C 糖化液与打瓜软枣 猕猴桃汁比例	0.5:1	1.0:1	1.5:1
D 果胶酶添加量 (mg/100 g)	5	10	15

1.2.3 指标的测定

表2 格瓦斯饮料感官评定标准

Table 2 Criteria for sensory evaluation of kvass beverages

项目	评分标准
色泽	富有诱人的果汁天然色泽(17~20分);有果汁天然色泽(13~16分);稍有果汁色泽,但不够明显(9~12分);果汁色调不协调,但不影响产品外观(5~8分);产品色泽混乱,或有使人不愉快的色泽(1~4分)
香气	富有浓烈的果汁清香(17~20分);有果汁清香,味感较柔和(13~16分);有果汁清香,但不够协调(9~12分);具有较淡的果汁香味,香味过淡(5~8分);完全不具有果汁香味,风味不正或有异味感(1~4分)
口感	酸甜比例很好,口感较好(41~50分);酸甜较适中,口感一般(31~40分);酸甜不协调,过酸或过甜(21~30分);口感较差(11~20分);口感很差,异味较明显(1~10分)
质地	透明度好,无沉淀(9~10分);透明度好(7~8分);较为透明,有少量沉淀(5~6分);有沉淀(3~4分);浑浊,有大量沉淀(1~2分)

1.2.3.1 感官评定方法 从样品的色泽、香气、口感和质地对复合打瓜软枣猕猴桃格瓦斯饮料品质做出评定,选20名经验丰富的评质人员(10男10女)对饮料的各项指标进行打分,具体打分标准见表2,平均值作为感官评定结果。

1.2.3.2 微生物测定 参照GB 4789.38—2012^[18]、GB 4789.3—2010^[19]、GB 4789.15—2010^[20]、GB 4789.31—2013^[21]中规定的方法对菌落总数、大肠菌群、霉菌和致病菌进行测定。

1.3 数据处理

利用Design-Expert 8.0.6软件对数据进行处理,按照软件设计结果共进行29组实验,每组实验重复3次。

2 结果与分析

2.1 Box-Bohnken 方案设计与结果

通过Design-Expert 8.0.6数据处理软件,输入数据设计响应曲面优化实验,分析结果见表3。

各因素经回归拟合后,解得回归方程为:

$$Y = 78.78 - 2.14A + 2.17B + 0.97C + 3.12D + 0.53AB - 0.32AC - 2.68AD - 0.85BC - 0.70BD - 1.62CD + 2.74A^2 + 1.59B^2 - 9.62C^2 + 1.90D^2 \quad \text{式(1)}$$

2.2 感官评定的优化分析

运用Design-Expert 数据处理软件对数据进行处理,取感官评分指标进行响应曲面优化,分析结果得表4。

由表4可知,该模型的 $p < 0.01$,呈极显著水平;失拟项 p 值为 $0.0615 > 0.05$,表明该模型失拟不显著,说明其他因素对模型的干扰程度低,该回归模型拟合度良好;该模型的信噪比为29.439,远大于4,则表明该模型适用于预测;决定系数 R^2 为0.9816,与 R_{Adj}^2 较相近,且均大于0.9,说明预测值与试验值有较好的相关性,该试验误差较小,因此可以用此模型分析和预测复合型打瓜软枣猕猴桃格瓦斯饮料的生产工艺。比较 F 值得大小可知影响复合型打瓜软枣猕猴桃格瓦斯饮料感官评分的因素顺序为:D(果胶酶添加量)>B(发酵时间)>A(植物乳杆菌接种量)>C(糖化液与打瓜软枣猕猴桃汁比例)。模型中A、B、D、AD、A²、B²、C²、D²均极显著($p < 0.01$),C、CD显著($p < 0.05$),AB、AC、BC、BD不显著。

根据Box-Bohnken 试验所得的多元回归方程作响应面图,在其他试验因素固定不变的情况下,交互

表3 Box-Bohnken 试验设计及结果

Table 3 Box-Bohnken design in terms of coded levels with response variable

实验号	A	B	C	D	Y 感官评分(分)
1	0	0	0	0	78.4
2	0	1	-1	0	73.0
3	0	1	0	1	87.3
4	0	0	-1	1	74.6
5	0	0	1	-1	70.3
6	-1	0	1	0	75.6
7	0	-1	0	1	82.8
8	0	0	-1	-1	66.0
9	1	0	1	0	69.9
10	1	-1	0	0	78.1
11	0	1	1	0	73.9
12	1	0	-1	0	68.4
13	-1	-1	0	0	85.0
14	0	1	0	-1	82.7
15	0	0	0	0	79.2
16	0	-1	-1	0	66.8
17	1	0	0	-1	81.9
18	-1	0	0	-1	78.5
19	-1	1	0	0	86.6
20	0	0	1	1	72.4
21	1	0	0	1	83.9
22	0	0	0	0	78.1
23	0	0	0	0	79.6
24	0	0	0	0	78.6
25	-1	0	-1	0	72.8
26	0	-1	1	0	71.1
27	-1	0	0	1	91.2
28	0	-1	0	-1	75.4
29	1	1	0	0	81.8

项对感官评分的影响可通过响应面进行分析^[22]。响应面越平缓,表明该因素对感官评分影响越小,反之表明感官评分对因素的改变越敏感^[23~24]。从图1c可以看出,植物乳杆菌接种量和果胶酶添加量的交互作用最明显,其他因素之间不明显,与上文方差分析所得结果一致。

表4 复合型打瓜软枣猕猴桃格瓦斯饮料的感官评分响应曲面优化分析结果

Table 4 Optimization of response surface analysis results of complex type of seeding-watermelon kiwifruit kvass beverage

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	p值	显著性
模型	1124.05	14	80.29	53.23	<0.0001	**
A	55.04	1	55.04	36.49	<0.0001	**
B	56.77	1	56.77	37.63	<0.0001	**
C	11.21	1	11.21	7.43	0.0164	*
D	116.56	1	116.56	77.27	<0.0001	**
AB	1.10	1	1.10	0.73	0.4070	
AC	0.42	1	0.42	0.28	0.6049	
AD	28.26	1	28.62	18.97	0.0007	**
BC	2.89	1	2.89	1.92	0.1880	
BD	1.96	1	1.96	1.30	0.2735	
CD	10.56	1	10.56	7.00	0.0192	*
A^2	48.67	1	48.67	32.26	<0.0001	**
B^2	16.38	1	16.38	10.86	0.0053	**
C^2	600.70	1	600.70	398.22	<0.0001	**
D^2	23.46	1	23.46	15.55	0.0015	**
残差	21.12	14	1.51			
失拟	19.63	10	1.96	5.28	0.0615	
误差	1.49	4	0.37			
总和	1145.17	28				

注: $R^2 = 0.9816$; $R_{\text{Adj}}^2 = 0.9631$; 信噪比 = 29.439; ** 代表差异极显著, $p < 0.01$; * 代表差异显著, $p < 0.05$ 。

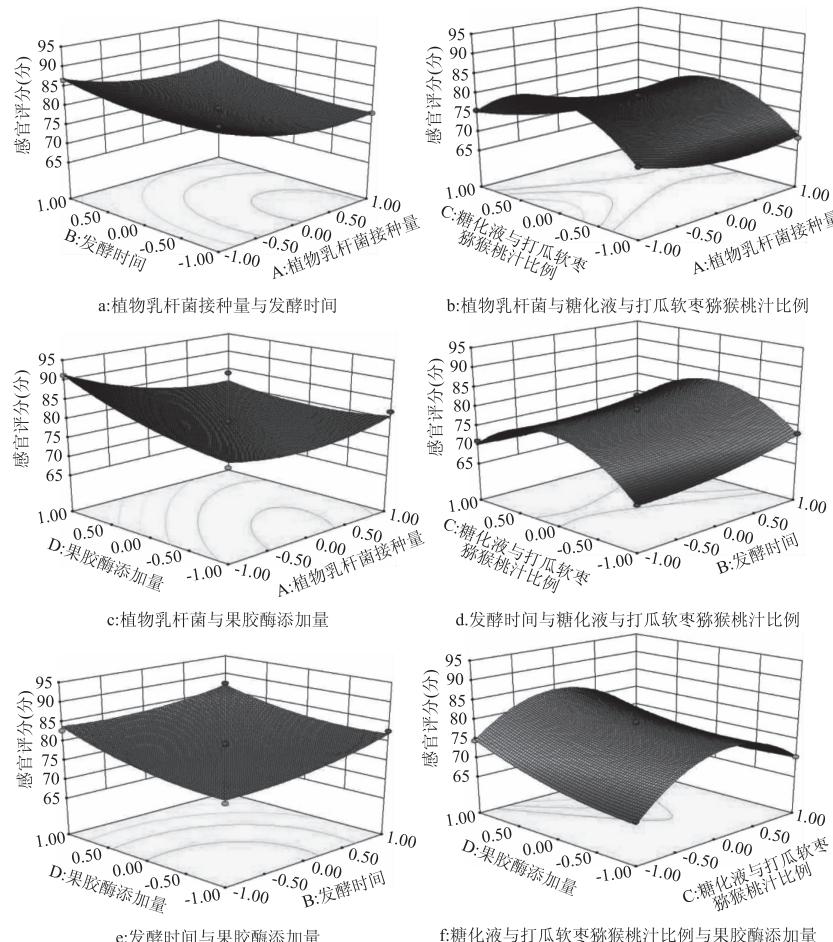


图1 以感官评分为指标的响应面图

Fig.1 Response surface plots showing the interactive effects of various factors on the sensory score

表5 微生物检测结果

Table 5 Microbial detection results

	菌落总数 (cfu/g, mL)	大肠菌群 (MPN/100 g, mL)	霉菌 (cfu/g, mL)	致病菌(沙门氏菌, 金葡菌, 志贺氏菌)
指标	100	≤3	-	不得检出
测定结果	<10	<3	0	未检出

注:-:标准中未表明霉菌数的范围值。

2.3 验证试验

利用 Design-Expert 8.0.6 软件优化程序对试验设计与结果数据进行优化,通过响应面分析可求得最佳工艺参数为:植物乳杆菌接种量 2×10^7 CFU/mL, 乳酸菌发酵时间 12 h, 糖化液与打瓜软枣猕猴桃汁比例 0.97:1, 果胶酶添加量 15 mg/100 g, 此配方所得的感官评分为 93.9268。在此工艺条件下,经试验验证,感官评分为 (94.0 ± 0.2) 分,复合型打瓜软枣猕猴桃格瓦斯饮料的色泽、香气、口感和质地均较好。

2.4 微生物检测结果

复合型打瓜软枣猕猴桃格瓦斯饮料中微生物检测结果见表 5,其中大肠菌群含量、菌落总数、霉菌含量均合格,各种致病菌均未检测出。

3 结论

本实验采用饮料发酵工艺,通过响应面优化法获得复合型打瓜软枣猕猴桃格瓦斯饮料的最佳配方工艺为:植物乳杆菌接种量为 2×10^7 CFU/ml, 乳酸菌发酵时间为 12 h, 糖化液与打瓜软枣猕猴桃汁比例为 0.97:1, 果胶酶添加量为 15 mg/100 g。本产品的微生物检测结果:大肠菌群含量、菌落总数、霉菌含量均合格,各种致病菌均未检测出。制得的饮料成品颜色呈淡黄绿色,风味纯正,酸甜适中,澄清无沉淀,且具有打瓜软枣猕猴桃汁的果香和发酵所产生的香味混为一体,口感新鲜而细腻,余味清爽。

参考文献

- [1] Nishiyama I, Fukuda T, Oota T. Genotypic differences in chlorophyll, lutein, and β -carotene contents in the fruits of *Actinidia* species [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(16):6403-6407.
- [2] 王菲, 李云峰, 刘长江. 软枣猕猴桃总黄酮体外抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2011, 32(17):168-171.
- [3] Krupa T, Latocha P, Liwinski A A. Changes of physicochemical quality, phenolics and vitamin C content in hardy kiwi fruit (*Actinidia arguta* and its hybrid) during storage [J]. Scientia Horticulturae, 2011, 130:410-417.
- [4] Latocha P, Krupa T, Wolosiak R, et al. Antioxidant activity and chemical difference in fruit of different *Actinidia* sp [J]. International Journal of Food Science and Nutrition, 2010, 61: 381-394.
- [5] Lim H W, Kang S J, Park M, et al. Antioxidative and nutric oxide production inhibitory activities of phenolic compounds [J]. Natural Product Science, 2006, 12(4):221-225.
- [6] Du Y, Guo H, Lou H. Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(5):1695-1701.
- [7] Wang Y H, Xu F X, Feng X Q, et al. Modulation of *Actinidia arguta* fruit ripening by three ethylene biosynthesis inhibition [J]. Food Chemistry, 2015, 173:405-413.
- [8] 张超, 邓星星, 马越, 等. 发酵菌种对打瓜酒风味的影响 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(18):241-245, 250.
- [9] 王鹤霖. 蓝莓籽瓜果酒酿造工艺优化及其抗氧化功能研究 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(19):232-236, 243.
- [10] 刘程惠, 胡文忠, 宋颖凡, 等. 超声波提取打瓜籽油工艺优化 [J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(12):223-229.
- [11] 张鑫, 高爱武, 黄娅娟, 等. 籽瓜汁复合乳酸发酵饮料的研制 [J]. 食品工业, 2011(8):34-36.
- [12] 姜国龙, 张军, 赵洪双. 蓝莓沙棘复合格瓦斯饮料发酵工艺的优化 [J]. 食品工业, 2015, 36(2):1-4.
- [13] 韩宗元, 李晓静, 康新, 等. 2 中树莓格瓦斯品质及香气成分分析 [J]. 食品工业, 2017, 38(2):283-288.
- [14] 田莹莹, 安家彦, 刘靖婧, 等. 谷物格瓦斯饮料发酵工艺的优化 [J]. 食品科技, 2015, 40(5):124-130.
- [15] 赵红艳, 冀晓莹, 高美丽. 植物功能性饮料的现状与发展趋势 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(15):390-396.
- [16] Lim S Y, Han S H, Kim J Y, et al. Inhibition of hardy kiwifruit (*Actinidia arguta*) ripening by 1-methylcyclopropene during cold storage and anticancer properties of the fruit extract [J]. Food Chemistry, 2016, 190:150-157.
- [17] 郭宏垚, 李冬, 雷雄, 等. 花椒多酚提取工艺响应面优化即动力学分析 [J]. 食品科学, 2018, 39(2):247-253.
- [18] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.38-2012 食品微生物学检验: 大肠菌群的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [19] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.2-2016 食品微生物学检验: 菌落总数测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [20] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.15-2016 食品微生物学检验: 霉菌和酵母计数 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [21] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.31-2013 食品微生物学检验: 沙门氏菌、志贺氏菌和致泻大肠埃希氏菌的肠杆菌科噬菌体诊断检验 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [22] 陈红梅, 谢翎. 响应面法优化半枝莲黄酮提取工艺及体外抗氧化性分析 [J]. 食品科学, 2016, 37(2):45-50.
- [23] 韩爱芝, 蒋卉, 贾清华, 等. 响应面试验优化黑果枸杞花色苷微胶囊制备工艺及其稳定性分析 [J]. 食品科学, 2016, 37(10):82-87.
- [24] 李佳桥, 余修亮, 曾林晖, 等. 响应面试验优化超声波辅助提取莲房原花青素工艺 [J]. 食品科学, 2016, 37(12): 40-45.