

响应面优化冰岛刺参内脏团抗氧化肽制备工艺及其组成分析

高云龙, 徐梦豪, 赵祥忠

Optimization of Preparation Process of Antioxidant Peptides in the Visceral Mass of *Cucumaria frondosa* by Response Surface Methodology and Its Composition Analysis

GAO Yunlong, XU Menghao, and ZHAO Xiangzhong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021050159>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

亚麻籽粕抗氧化肽制备工艺的响应面法优化

Optimization of preparation of antioxidant peptides from flaxseed meal by response surface methodology

食品工业科技. 2018, 39(3): 220-225

响应面法优化复合酶酶解制备可口革囊星虫胶原蛋白抗氧化肽工艺研究

Optimization of the Preparation of Collagen Antioxidant Peptides from *Phascolosoma esculenta* by Compound Enzymatic Hydrolysis by Response Surface Methodology

食品工业科技. 2021, 42(22): 230-239

响应面法优化酶解玉米谷蛋白制备抗氧化肽的研究

Optimization of enzymatic preparation of antioxidant peptides from corn glutelin by response surface methodology

食品工业科技. 2017(20): 105-109

低温连续相变萃取对蓝圆鱼蛋白结构的影响及其抗氧化肽制备工艺优化

Effect of Low-temperature Continuous Phase Transition on the Structure of *Decapterus maruadsi* Protein and Its Optimization of Preparation Process on Antioxidant Peptides

食品工业科技. 2019, 40(12): 199-205

海参体壁蛋白ACE抑制肽酶解工艺及产物分子量分布研究

Study on hydrolysis condition and molecular weight distribution of ACE inhibitory peptide derived from sea cucumber protein

食品工业科技. 2017(17): 163-167

不同品种芡实种仁蛋白质亚基组成及氨基酸分析

The subunit distributions and amino acids analysis of the proteins from different varieties of *Euryale ferox* seed kernels

食品工业科技. 2017(08): 98-102



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

高云龙, 徐梦豪, 赵祥忠. 响应面优化冰岛刺参内脏团抗氧化肽制备工艺及其组成分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(1): 235–243. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050159

GAO Yunlong, XU Menghao, ZHAO Xiangzhong. Optimization of Preparation Process of Antioxidant Peptides in the Visceral Mass of *Cucumaria frondosa* by Response Surface Methodology and Its Composition Analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(1): 235–243. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050159

响应面优化冰岛刺参内脏团抗氧化肽制备工艺及其组成分析

高云龙¹, 徐梦豪², 赵祥忠^{1,*}

(1. 齐鲁工业大学 (山东省科学院) 食品科学与工程学院, 山东济南 250353;

2. 山东中硕海洋科技有限公司, 山东日照 276800)

摘要: 以冰岛刺参内脏团蛋白为原料, 利用复合蛋白酶酶解制备抗氧化肽。在单因素实验基础上, 通过响应面法优化酶解工艺条件, 并分析其抗氧化活性、分子量分布和氨基酸组成。结果表明, 最佳工艺条件为底物质量分数 4.4%, 加酶量 4887 U/g, pH7.0, 酶解温度 56 ℃, 酶解时间 4.2 h, 在该条件下, 2 mg/mL 酶解产物的 DPPH 自由基清除率可达 89.18%±0.11%, 0.5 mg/mL 酶解产物的 ABTS 自由基清除率和 Fe²⁺ 螯合率分别为 68.11%±0.12%、72.59%±0.08%, 1.5 mg/mL 酶解产物的羟基自由基清除率和还原力分别为 71.86%±0.09%、0.7473±0.0105; 分子量分布和氨基酸分析表明, 冰岛刺参内脏团抗氧化肽中分子量低于 1000 Da 的肽占 94.26%, 富含酸性氨基酸和疏水性氨基酸, 具有较高的抗氧化活性和营养价值。该研究为冰岛刺参深加工产业的发展提供了技术参考。

关键词: 响应面法, 冰岛刺参内脏团, 抗氧化肽, 分子量分布, 氨基酸分析

中图分类号: TS254.9

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)01-0235-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050159



本文网刊:

Optimization of Preparation Process of Antioxidant Peptides in the Visceral Mass of *Cucumaria frondosa* by Response Surface Methodology and Its Composition Analysis

GAO Yunlong¹, XU Menghao², ZHAO Xiangzhong^{1,*}

(1. School of Food Science & Engineering, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Science), Jinan 250353, China;

2. Shandong Zhongshuo Marine Technology Co., Ltd., Rizhao 276800, China)

Abstract: Using the protein of *Cucumaria frondosa* visceral mass as raw material, antio-xidant peptides were prepared by enzymatic hydrolysis with complex protease. On the basis of single factor experiments, the enzymatic hydrolysis process conditions were optimized by response surface methodology, and its antioxidant activity, molecular weight distribution and amino acid composition were analyzed. The results showed that the optimum process conditions were substrate mass fraction 4.4%, enzyme dosage 4887 U/g, pH7.0, enzymolysis temperature 56 ℃ and enzymolysis time 4.2 h. Under these conditions, the DPPH radical scavenging rate of 2 mg/mL hydrolysate was 89.18%±0.11%, the ABTS free radical scavenging rate and Fe²⁺ chelating rate of 0.5 mg/mL hydrolysate were 68.11%±0.12% and 72.59%±0.08%, the hydroxyl radical scavenging rate and reducing power of 1.5 mg/mL hydrolysate were 71.86%±0.09% and 0.7473±0.0105; Molecular weight distribution and amino acid analysis showed that the antioxidant peptides in the visceral mass of *Cucumaria frondosa*, peptides with a molecular weight of less than 1000 Da accounted for 94.26%, they were rich in acidic and hydrophobic amino acids and had high antioxidant activity and nutritional value. This study provides a technical reference for the development of deep processing industry of *Cucumaria frondosa*.

Key words: response surface method; *Cucumaria frondosa* visceral mass; antioxidant peptides; molecular weight distribution; amino acid analysis

收稿日期: 2021-05-20

作者简介: 高云龙 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 海洋食品与生物技术, E-mail: 2509721349@qq.com。

* 通信作者: 赵祥忠 (1969-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 海洋食品与生物技术, E-mail: 13506416163@163.com。

冰岛刺参(*Cucumaria frondosa*)属棘皮动物门(Echinodermata)海参纲(Holothuroidea)枝手目(Dendrochirotida)瓜参科(Cucumariidae)海洋动物^[1],主要分布在冰岛、挪威及俄罗斯等国家附近海域^[2],其富含蛋白质、多糖、三萜糖苷、脂类等活性物质,具有抗癌、抗炎、降血糖、抗衰老和免疫调节等多种功能活性^[3-4]。冰岛刺参内脏团是冰岛刺参初级加工过程中的副产物,其蛋白质、氨基酸含量丰富,是优质的动物蛋白资源^[5-6],但由于缺乏深层次的研究和利用,冰岛刺参内脏团多被当作废弃物丢弃或售卖给饲料加工企业,不仅无法有效提高冰岛刺参的附加值,而且造成资源的严重浪费。

生物活性肽是一类对人体生命活动有益或具有生理作用的肽类化合物^[7]。相较于蛋白质,生物活性肽不仅易于消化吸收,还具有抗氧化、抗菌、降血压、免疫调节等多种生理功效^[8-11],已然成为近年来的研究热点。目前,关于以海洋生物制备抗氧化肽的研究较为广泛,制备方法主要有酶解法、微生物发酵法、化学合成法等,其中酶解法因其特异性强,工艺较为成熟而备受关注,如李娜等^[12]利用酶解法制备鳕鱼鱼鳔抗氧化肽,其具有良好的羟基自由基清除能力和亚铁离子螯合能力,显示出较强的抗氧化活性;李亚会等^[13]通过动物蛋白酶和风味蛋白酶联合水解远东拟沙丁鱼制备抗氧化肽,分离纯化得到氨基酸序列为 Arg-Phe-Asp 和 Phe-Ala-His-Asp-Asp-Pro 的两个多肽组分,其 ABTS 自由基清除率分别为 $81.22\% \pm 4.12\%$ 和 $76.35\% \pm 3.32\%$; SIERRA 等^[14]酶解红罗非鱼鳞片并研究其抗氧化活性,结果表明,分子量 3~10 kDa 的组分具有最强的抗氧化活性。但以冰岛刺参内脏团为原料,制备抗氧化肽的研究则鲜见报道,因此,利用冰岛刺参内脏团制备生物活性肽,不仅可以为资源的不合理利用提供解决方案,还能为冰岛刺参加工产业的发展提供新的方向。

本研究以冰岛刺参内脏团为原料,以 DPPH 自由基清除率为评价指标,采用复合蛋白酶酶解制备冰岛刺参内脏团抗氧化肽,通过单因素实验和响应面法优化冰岛刺参内脏团蛋白的酶解条件,并分析其抗氧化活性、分子质量分布和氨基酸组成,旨在为利用冰岛刺参内脏团生产抗氧化肽提供理论依据,并进一步促进冰岛刺参深加工产业的发展。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

冰岛刺参内脏团(含性腺、呼吸道、肠道等) 山东中硕海洋科技有限公司;复合蛋白酶(经预实验由胰蛋白酶、中性蛋白酶以及氨肽酶按 50:49.9:0.1 复配而成, 1.2×10^5 U/g) 北京索莱宝科技有限公司;过氧化氢(H_2O_2)、三氯乙酸(TCA)、硫酸亚铁($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)、氯化亚铁($FeCl_2$)、铁氰化钾($K_3[Fe(CN)_6]$)、氯化铁($FeCl_3$)、L-色氨酸、对二氨基苯甲醛 国药集团化学试剂有限公司;1,1-二苯

基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(ABTS) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司;1,10-菲啰啉、菲啰啉 美国 Sigma 公司;其他试剂 均为国产分析纯。

FA1004 型电子天平 上海上平仪器有限公司;HH 型数显恒温水浴锅 常州国宇仪器制造有限公司;TG16-WS 型台式高速离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;UV-9000 型紫外可见分光光度计 上海元析仪器有限公司;SCIENTZ-18N 型真空冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司;L-8900 型高速氨基酸分析仪 日本日立有限公司;e2695 型高效液相色谱仪 美国 waters 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 冰岛刺参内脏团基本成分的测定 水分按照国标 GB5009.3—2016 直接干燥法测定;粗蛋白按照国标 GB5009.5—2016 凯氏定氮法测定;脂肪按照国标 GB5009.6—2016 索氏抽提法测定;灰分按照国标 GB5009.4—2016 第一法测定;多糖含量参照罗春萍等^[15]描述的苯酚-硫酸法测定。

1.2.2 冰岛刺参内脏团蛋白提取 参照李云崧等^[16]的方法并略作修改。冰岛刺参内脏团冷冻干燥后,通过亚临界法脱除油脂,然后按料液比 1:40 g/mL 加入蒸馏水,调 pH 至 10.0(1.0 mol/L 的 NaOH 溶液调节),设置超声功率 50 W,温度 50 ℃,超声提取 30 min;冷却至室温,4 ℃,5000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液调 pH 至 3.0(1.0 mol/L 的 HCl 溶液调节),在同样条件下离心,沉淀水洗 3 次,加水复溶后调 pH 至中性(1.0 mol/L 的 NaOH 溶液调节),离心取上清液,在冷阱温度-55 ℃,真空度 1 Pa 的条件下,冷冻干燥 24 h 得到冰岛刺参内脏团蛋白粉。

1.2.3 冰岛刺参内脏团抗氧化肽的制备 参照包斐等^[17]的方法并略作修改。取适量冰岛刺参内脏团蛋白溶于蒸馏水中,配制成一定浓度的蛋白质溶液,调节酶反应条件,加入适量复合蛋白酶充分振荡后,置于恒温水浴锅中酶解,反应过程中维持相应 pH 条件,酶解结束后沸水浴灭酶 10 min,冷却,4000 r/min 离心 10 min,收集上清液,即为冰岛刺参内脏团酶解产物,在冷阱温度-55 ℃,真空度 1 Pa 条件下,冷冻干燥 24 h 得到冰岛刺参内脏团肽粉。

1.2.4 单因素实验 固定酶解条件:底物质量分数 1%、加酶量 3000 U/g、pH 7.0、酶解温度 50 ℃、酶解时间 2 h;分别对底物质量分数(1%、2%、3%、4%、5%、6%)、加酶量(1000、2000、3000、4000、5000、6000 U/g)、pH(5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)、酶解温度(35、40、45、50、55、60 ℃)、酶解时间(1、2、3、4、5、6 h) 5 个因素进行单因素实验,以 DPPH 自由基清除率为评价指标,研究各因素对 DPPH 自由基清除率的影响。

1.2.5 响应面试验设计 在单因素实验基础上,固定

酶解 pH7.0, 以 A(底物质量分数)、B(加酶量)、C(酶解温度)、D(酶解时间)为自变量, DPPH 自由基清除率为响应值进行优化, 试验因素与水平编码见表 1。

表 1 响应面试验因素与水平编码
Table 1 Factors and level coding of response surface experiment

水平	因素			
	A 底物质量分数(%)	B 加酶量(U/g)	C 酶解温度(℃)	D 酶解时间(h)
-1	3	4000	50	3
0	4	5000	55	4
1	5	6000	60	5

1.2.6 测定指标

1.2.6.1 DPPH 自由基清除率的测定 参照 ZHUANG 等^[18]的方法略作修改。将 DPPH 用 95% 乙醇配制成为 0.1 mmol/L 的溶液, 取 2 mL 浓度为 2 mg/mL 的样品溶液, 加入 2 mL DPPH 溶液, 暗处反应 30 min, 在 517 nm 处测定吸光值(A_1); 空白组用蒸馏水代替样品(A_0); 对照组用 95% 乙醇代替 DPPH 溶液(A_2), 每组测定重复 3 次。DPPH 自由基清除率计算公式如下:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left[1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right] \times 100$$

式中, A_1 为样品组吸光值; A_2 为对照组吸光值; A_0 为空白组吸光值。

1.2.6.2 ABTS 自由基清除率的测定 参照 SARA-BABDI 等^[19]的方法略作修改。向烧杯中加入 200 mL 浓度为 7 mmol/L 的 ABTS 溶液和 3.52 mL 浓度为 2.45 mmol/L 的过硫酸钾, 超声 5 min 混匀, 避光反应 12~16 h, 之后用 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH7.4)稀释使其在 734 nm 处的吸光值为 0.70 ± 0.02 , 即为 ABTS 溶液, 室温静置 30 min 即可使用。取 0.15 mL 浓度为 0.5 mg/mL 的样品溶液与 2.85 mL ABTS 溶液混合均匀, 避光反应 10 min, 在 734 nm 处测定样品的吸光值 A_1 。空白组用 0.15 mL 蒸馏水代替样品测定吸光值 A_0 , 每组测定重复 3 次。ABTS 自由基清除率计算公式如下:

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

式中, A_1 为样品组吸光值; A_0 为空白组吸光值。

1.2.6.3 羟基自由基清除率的测定 参照李斌等^[20]的方法略作修改。依次取 1 mL 0.75 mmol/L 的 1, 10-菲啰啉、2 mL 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH7.4)、1 mL 0.75 mmol/L 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 1 mL 浓度为 1.5 mg/mL 的样品溶液混匀, 最后加入 1 mL 0.01% (v/v) H_2O_2 溶液, 37 ℃ 水浴反应 1 h, 在 536 nm 处测定溶液的吸光值 A_1 ; 空白组用 1 mL 蒸馏水代替样品测定吸光值 A_2 ; 对照组用 2 mL 蒸馏水代替样品和 H_2O_2 测定吸光值 A_3 , 每组测定重复 3 次。羟

基自由基清除率计算公式如下:

$$\text{羟基自由基清除率}(\%) = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_2} \times 100$$

式中, A_1 为样品组吸光值; A_2 为空白组吸光值; A_3 为对照组吸光值。

1.2.6.4 Fe^{2+} 螯合能力的测定 参照 ZHENG 等^[21]的方法略作修改。取 1 mL 浓度为 0.5 mg/mL 的样品溶液与 2 mL 0.05 mmol/L 的 FeCl_2 溶液及 2 mL 0.05 mmol/L 的菲啰啉溶液混匀, 室温反应 15 min, 在 562 nm 处测定吸光值 A_1 。空白组用 1 mL 蒸馏水代替样品测定吸光值 A_0 , 每组测定重复 3 次。 Fe^{2+} 螯合率计算公式如下:

$$\text{Fe}^{2+} \text{ 螯合率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

式中, A_1 为样品组吸光值; A_0 为空白组吸光值。

1.2.6.5 还原力的测定 参照 YOU 等^[22]的方法略作修改。取 1 mL 浓度为 1.5 mg/mL 的样品溶液与 2.5 mL 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH6.6)及 2.5 mL 1% 的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液, 50 ℃ 水浴反应 20 min, 迅速冷却, 并加入 2.5 mL 10% 的 TCA 溶液, 3000 r/min 离心 10 min 后取上清液 2.5 mL, 加入 2.5 mL 的蒸馏水及 0.5 mL 0.1% 的 FeCl_3 溶液, 混匀, 室温反应 10 min, 在 700 nm 处测定吸光值, 用蒸馏水调零, 重复测定 3 次。

1.2.6.6 分子量分布的测定 根据林栋等^[23]的方法略作修改。配制浓度为 10 mg/mL 的样品溶液, 采用 Waters 高效液相色谱仪(配 2489 紫外检测器), 对样品溶液的分子量分布进行测定。色谱条件为: 色谱柱: TSKgelG2000SWXL (300 mm×7.8 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水-三氟乙酸 45 : 55 : 0.1(v/v/v); 检测波长: 220 nm; 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 30 ℃; 进样量 10 μL 。

1.2.6.7 氨基酸组成的测定 参照王颖颖等^[24]的方法略作修改。称取 0.05 g 样品于水解管中, 加入 10 mL 6 mol/L 的 HCl 混匀, 连续吹入氮气后封口, 在 110 ℃ 下酸水解 22~24 h。水解结束后过滤并用超纯水定容至 50 mL, 取适量滤液用 0.02 mol/L HCl 稀释 5 倍, 最后通过 0.22 μm 微滤膜过滤上样, 使用全自动氨基酸分析仪测定除色氨酸以外的氨基酸。

色氨酸的测定参照何峰等^[25]的方法略作修改。标准曲线的绘制: 准确称取 10 mg L-色氨酸, 加入 0.1 mL 10% NaOH 和少量水溶解并定容至 100 mL。取 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mL 色氨酸溶液并分别用蒸馏水定容至 1 mL, 加 1 mL 6 mol/L 的 NaOH 和 5 mL 1% 对二氨基苯甲醛(用 9 mol/L 硫酸溶解), 摇匀, 避光反应 1 h, 加入 0.05 mL 0.2% NaNO_2 溶液, 摇匀, 室温放置 30 min 备用, 以空白调零, 在 595 nm 处测定各溶液的吸光值, 得标准曲线方程为 $y = 7.9317x + 0.0195$, $R^2 = 0.9981$ 。

样品测定: 取适量样品置于 25 mL 水解管中, 加

5 mL 6 mol/L NaOH 溶液, 110 ℃ 水解 24 h, 过滤水解液, 调节 pH6.0~8.0, 并定容至 100 mL。取 2 mL 上清液放入具塞试管中, 加入 5 mL 1% 对二氨基苯甲醛溶液, 摇匀。另取 2 mL 上清液加入 5 mL 9 mol/L H₂SO₄ 作样品空白, 摇匀, 避光反应 1 h。向每支试管加入 0.05 mL 0.2% NaNO₂ 溶液, 摇匀, 室温放置 30 min。以样品空白调零, 在 595 nm 处测定样品溶液的吸光值。

1.3 数据处理

采用 IBM SPSS Statistics 21 软件对单因素实验结果进行显著性差异分析; 采用 Design-Expert 11 软件进行响应面试验设计及优化分析; 所有实验均重复 3 次, 实验数据以平均值±标准差 (X±SD) 表示。

2 结果与分析

2.1 基本成分分析

鲜活冰岛刺参内脏团水分达到 87.04%±0.21%, 其他主要成分粗蛋白、多糖、脂肪、灰分分别占干重的比例如表 2 所示。

表 2 冰岛刺参内脏团基本成分表

Table 2 Basic composition of *Cucumaria frondosa* visceral mass

成分	粗蛋白	多糖	脂肪	灰分
含量(以干基计, %)	48.54±0.11	4.90±0.02	26.68±0.07	13.16±0.04

2.2 单因素实验

2.2.1 底物质量分数对 DPPH 自由基清除率的影响

由图 1 可知, 当底物质量分数从 1% 增加到 4% 时, DPPH 自由基清除率显著上升 ($P<0.05$), 随着底物质量分数的增加, 酶与底物结合的机会增大, 从而提高酶解速率, 小分子抗氧化活性肽含量增加, 抗氧化活性显著增强; 当底物质量分数为 4% 时, DPPH 自由基清除率达到最大值 88.67%; 继续增加底物质量分数, DPPH 自由基清除率显著下降 ($P<0.05$), 这可能是由于底物质量分数较高时, 蛋白吸水溶胀导致

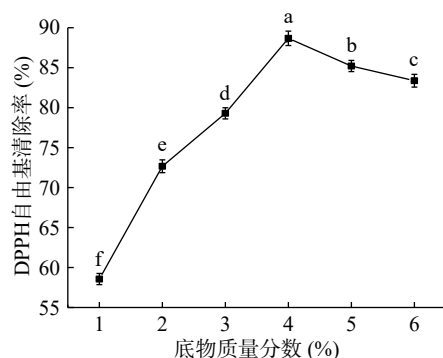


图 1 底物质量分数对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.1 The effect of substrate mass fraction on the scavenging rate of DPPH free radicals

注: 不同小写字母表示显著性差异 ($P<0.05$); 图 2~图 5 同。

流动性变差, 与蛋白酶接触不完全, 酶解速率降低, 抗氧化活性减弱。

2.2.2 加酶量对 DPPH 自由基清除率的影响 由图 2 可知, 当加酶量在 1000~5000 U/g 之间逐渐增加时, DPPH 自由基清除率显著上升 ($P<0.05$); 当加酶量为 5000 U/g 时, DPPH 自由基清除率达到最大值 83.21%; 继续提高加酶量, DPPH 自由基清除率显著下降 ($P<0.05$)。在底物质量分数一定时, 加酶量从 1000 U/g 增加到 5000 U/g, 酶与底物接触完全, 蛋白酶解充分, 抗氧化肽含量增加, 抗氧化活性增强; 酶量过多, 酶与底物结合位点达到过饱和, 进而酶解已生成的抗氧化肽, 抗氧化活性减弱。

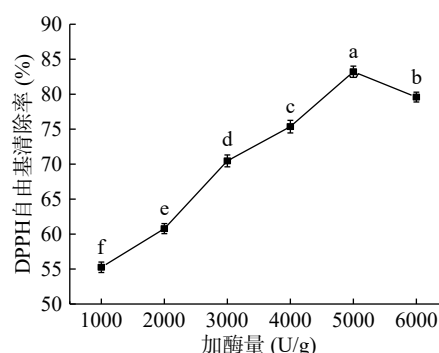


图 2 加酶量对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.2 The effect of the amount of enzyme added on the scavenging rate of DPPH free radicals

2.2.3 pH 对 DPPH 自由基清除率的影响

由图 3 可知, 当 pH 处于 5.5~7.0 范围内时, DPPH 自由基清除率随 pH 增加而增大; 当 pH 为 7.0 时, DPPH 自由基清除率达到最大值 68.35%; 当 pH 超过 7.0 时, DPPH 自由基清除率逐渐减小。蛋白酶在适宜 pH 范围内才可以发挥较佳的酶解效果, 偏酸或偏碱会使酶活力减弱甚至失活, 导致酶解速率降低, 抗氧化活性减弱。

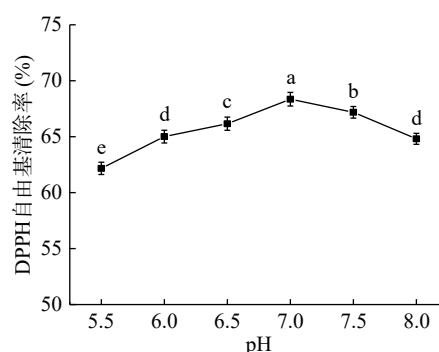


图 3 pH 对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.3 The effect of pH on the scavenging rate of DPPH free radicals

2.2.4 酶解温度对 DPPH 自由基清除率的影响

由图 4 可知, 当酶解温度在 35~55 ℃ 之间逐渐增加时, DPPH 自由基清除率显著上升 ($P<0.05$); 当酶解温度为 55 ℃ 时, DPPH 自由基清除率达到最大值 84.86%; 继

续提高温度,DPPH 自由基清除率显著下降($P<0.05$)。温度较低时,酶解速率较低,酶解反应不彻底,抗氧化活性较弱;随着温度的增加,有助于蛋白酶达到最适酶解温度,从而使酶解反应加快,抗氧化活性增加;而温度较高时,则会抑制蛋白酶的活性,导致酶解效果变差,无法使蛋白完全水解成具有抗氧化活性的小分子肽,抗氧化活性减弱。

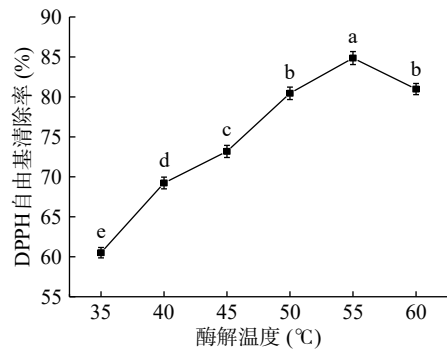


图 4 酶解温度对 DPPH 自由基清除率的影响
Fig.4 The effect of enzymolysis temperature on the scavenging rate of DPPH free radicals

2.2.5 酶解时间对 DPPH 自由基清除率的影响 由图 5 可知,当酶解时间从 1 h 增加到 4 h 时,DPPH 自由基清除率显著上升($P<0.05$),在酶解反应初期酶与底物充足,酶解速率较快,蛋白大分子逐渐水解成具有抗氧化活性的小分子肽,抗氧化活性增强;当酶解时间为 4 h 时,DPPH 自由基清除率达到最大值 78.25%;继续增加酶解时间,DPPH 自由基清除率显著下降($P<0.05$),酶解时间过长,底物不再充足,从而过度水解已生成的抗氧化肽,生成抗氧化活性较低甚至不具备抗氧化活性的短肽或游离氨基酸,抗氧化活性减弱。

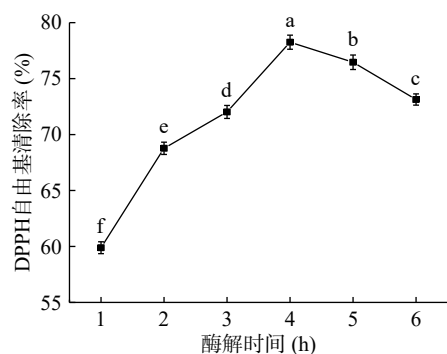


图 5 酶解时间对 DPPH 自由基清除率的影响
Fig.5 The effect of enzymolysis time on the scavenging rate of DPPH free radicals

2.3 响应面试验结果分析

2.3.1 响应面试验设计及结果 在单因素实验基础上,以 A(底物质量分数)、B(加酶量)、C(酶解温度)、D(酶解时间)为自变量,Y(DPPH 自由基清除率)为响应值,按照中心组合设计响应面试验,试验方案与结果见表 3。

表 3 响应面试验设计与结果
Table 3 Design and results of response surface experiment

试验号	因素				Y DPPH 自由基清除率 (%)
	A 底物质量分数	B 加酶量	C 酶解温度	D 酶解时间	
1	0	1	0	-1	75.74
2	0	0	1	-1	81.70
3	0	0	1	1	83.26
4	0	-1	0	1	83.09
5	-1	0	0	-1	78.08
6	-1	0	0	1	75.09
7	0	1	1	0	82.35
8	0	0	0	0	89.96
9	0	-1	1	0	78.82
10	1	-1	0	0	82.57
11	-1	1	0	0	74.89
12	0	0	0	0	89.89
13	1	0	0	1	85.63
14	0	1	-1	0	71.31
15	0	0	0	0	88.87
16	1	0	0	-1	79.64
17	1	0	-1	0	82.80
18	0	0	0	0	88.59
19	-1	-1	0	0	76.82
20	0	1	0	-1	78.13
21	1	0	1	0	84.39
22	0	0	-1	-1	76.90
23	0	-1	0	-1	78.17
24	0	0	0	0	88.31
25	0	0	-1	1	80.39
26	1	1	0	0	79.68
27	-1	0	-1	0	72.37
28	0	-1	-1	0	80.21
29	-1	0	1	0	81.50

2.3.2 回归模型的建立及方差分析 利用 Design-Expert 11 软件对表 3 结果进行回归分析,得到二次多项回归方程:

$$Y=89.12+3.00A-1.47B+2.34C+1.28D-0.24AB-1.88AC+2.24AD+3.11BC-0.63BD-0.48CD-4.69A^2-6.15B^2-4.38C^2-4.40D^2。$$

由表 4 可知,模型 $P<0.0001$,表示该模型差异极显著;失拟项 $P=0.4261>0.05$,不显著,说明模型拟合程度好,所选模型适宜;模型决定系数 $R^2=0.9863$,校正系数 $R^2_{Adj}=0.9726$,说明试验结果与模型预测结果一致性良好,模型可靠,误差较小,可用于冰岛刺参内脏团酶解产物 DPPH 自由基清除率的分析 and 预测。由 F 值可知,各因素对冰岛刺参内脏团酶解产物 DPPH 自由基清除率影响的主次顺序为 A(底物质量分数)> C(酶解温度)> B(加酶量)> D(酶解时间)。

2.3.3 各因素交互作用分析 由图 6~图 8 可知,三个响应曲面坡度均较陡峭且等高线为椭圆形,说明底物质量分数与酶解温度、底物质量分数与酶解时间、加酶量与酶解温度的交互作用对 DPPH 自由基清除率的影响较大,而且根据曲面坡度陡峭程度可以看出,底物质量分数对 DPPH 自由基清除率的影响最大,其次是酶解温度、加酶量,酶解时间对 DPPH 自

表 4 回归模型的方差分析

Table 4 Analysis of variance of the regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	709.81	14	50.70	72.08	<0.0001	**
A	107.76	1	107.76	153.20	<0.0001	**
B	25.75	1	25.75	36.61	<0.0001	**
C	65.52	1	65.52	93.15	<0.0001	**
D	19.66	1	19.66	27.95	0.0001	**
AB	0.23	1	0.23	0.33	0.5762	
AC	14.21	1	14.21	20.21	0.0005	**
AD	20.16	1	20.16	28.66	0.0001	**
BC	38.63	1	38.63	54.91	<0.0001	**
BD	1.60	1	1.60	2.27	0.1537	
CD	0.93	1	0.93	1.32	0.2692	
A ²	142.88	1	142.88	203.12	<0.0001	**
B ²	245.59	1	245.59	349.15	<0.0001	**
C ²	124.20	1	124.20	176.57	<0.0001	**
D ²	125.48	1	125.48	1778.39	<0.0001	**
残差	9.85	14	0.70			
失拟项	7.55	10	0.76	1.31	0.4261	不显著
纯误差	2.30	4	0.57			
总和	719.66	28				

注: *表示差异显著($P<0.05$); **表示差异极显著($P<0.01$); $R^2=0.9863$, $R^2_{Adj}=0.9726$ 。

由基清除率的影响最小,与响应面方差分析一致。

2.3.4 最佳酶解工艺验证实验 利用 Design- Expert 11 对响应面结果进行分析,得到冰岛刺参内脏团抗

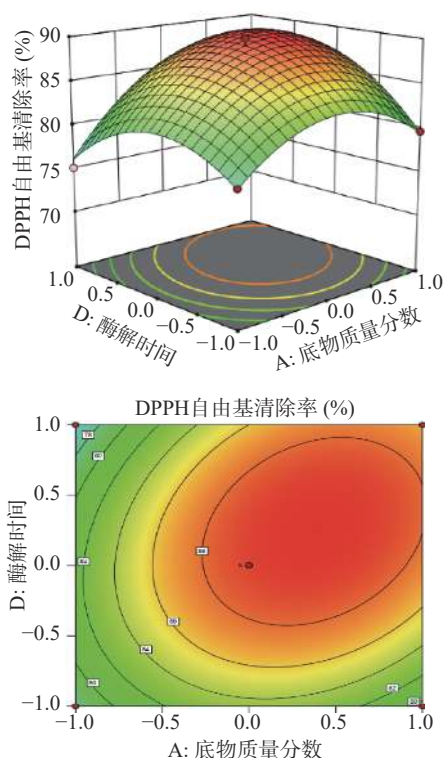


图 7 底物质量分数与酶解时间交互作用对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.7 The effect of the interaction between the mass fraction of the substrate and the enzymatic hydrolysis time on the scavenging rate of DPPH free radicals

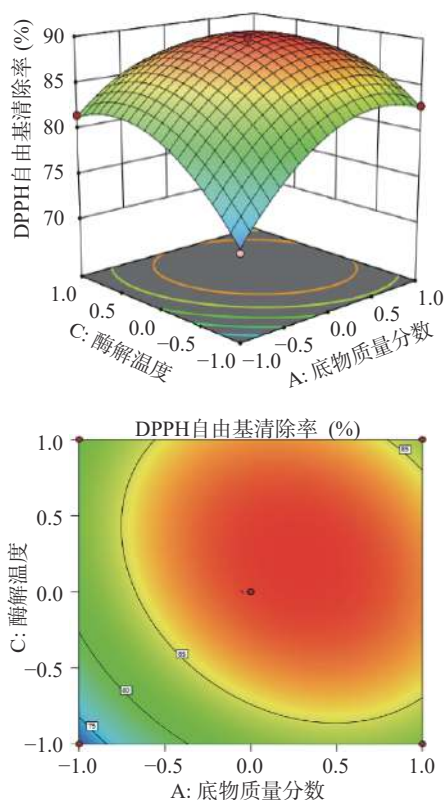


图 6 底物质量分数与酶解温度交互作用对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.6 The effect of the interaction between the mass fraction of substrate and the temperature of enzymatic hydrolysis on the scavenging rate of DPPH free radicals

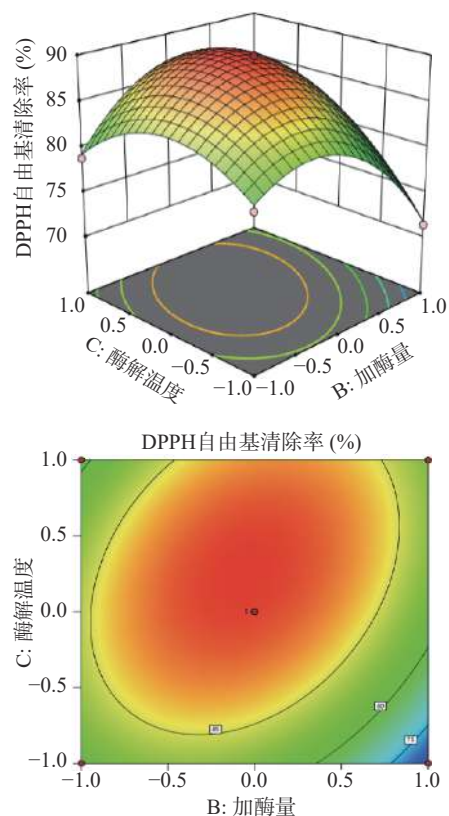


图 8 加酶量与酶解温度交互作用对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.8 The effect of the interaction between the amount of enzyme added and the temperature of enzymatic hydrolysis on the scavenging rate of DPPH free radicals

氧化肽的最佳酶解工艺为底物质量分数 4.373%, 加酶量 4887 U/g, 酶解温度 55.66 ℃, 酶解时间 4.22 h, 预测 DPPH 自由基清除率为 90.03%。在最佳酶解工艺下进行验证实验, 为方便操作, 将其调整为底物质量分数 4.4%, 加酶量 4887 U/g, 酶解温度 56 ℃, 酶解时间 4.2 h。进行 3 次验证实验, 结果如表 5 所示, 得到酶解产物的 DPPH 自由基清除率为 89.18%±0.11%, 与模型预测值的相对误差是 0.95%, 说明模型与实验结果相符, 能够较好地优化酶解工艺条件。此外, 在最佳酶解工艺下制得的抗氧化肽, 0.5 mg/mL 样品的 ABTS 自由基清除率和 Fe²⁺螯合率分别为 68.11%±0.12%、72.59%±0.08%; 1.5 mg/mL 样品的羟基自由基清除率和还原力 A₇₀₀ 分别为 71.86%±0.09%、0.7473±0.0105, 表现出较强的综合抗氧化活性。

表 5 抗氧化肽活性评价	
Table 5 Evaluation of antioxidant peptide activity	
抗氧化指标	数值
DPPH自由基清除率(% , 2 mg/mL)	89.18±0.11
ABTS自由基清除率(% , 0.5 mg/mL)	68.11±0.12
羟基自由基清除率(% , 1.5 mg/mL)	71.86±0.09
Fe ²⁺ 螯合率(% , 0.5 mg/mL)	72.59±0.08
还原力(A ₇₀₀ , 1.5 mg/mL)	0.7473±0.0105

2.4 分子量分布

由图 9 和表 6 可知, 冰岛刺参内脏团抗氧化肽中分子量低于 1000 Da 的肽占 94.26%, 分子量低于 500 Da 的肽占 83.86%, 说明在最佳酶解工艺下酶解效果较好, 得到小分子低聚寡肽含量高。肽段长短与抗氧化能力高低密切相关, 分子量在 500~2500 Da 的寡肽比多肽具有更强的抗氧化能力, 分子量为 200~500 Da 的二肽或三肽与单个氨基酸相比也表现出较强的抗氧化能力^[26]。因此, 推测冰岛刺参内脏团抗氧化肽表现出的抗氧化能力与其较低的分子量分布有关。

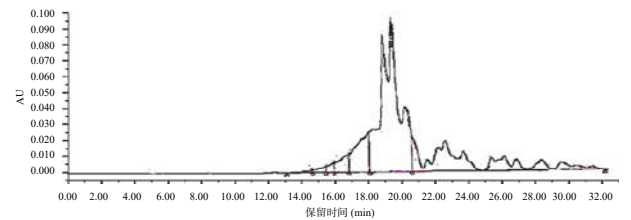


图 9 冰岛刺参内脏团抗氧化肽分子量分布色谱图
Fig.9 Chromatogram of molecular weight distribution of antioxidant peptides in the visceral mass of *Cucumaria frondosa*

2.5 氨基酸分析

酸性氨基酸因其侧链有氨基或羧基而具有螯合金属离子和作为质子供体的能力, 对肽抗氧化能力大小有一定的影响^[27], 源于红色黄貂鱼的抗氧化肽以及太平洋鲱鱼抗氧化肽中的 Glu 残基, 其金属螯合作用使多肽具有良好的抗氧化活性^[28-29]。由表 7 可

表 6 冰岛刺参内脏团抗氧化肽分子量分布结果
Table 6 Results of molecular weight distribution of antioxidant peptides in the visceral mass of *Cucumaria frondosa*

分子量分布范围(Da)	峰位保留时间(min)	峰面积	峰面积百分比 λ _{220 nm} (%)
>5000	14.877	48801	0.36
5000~3000	15.680	112866	0.87
3000~2000	16.197	145547	1.13
2000~1000	17.055	437342	3.38
1000~500	18.299	1343378	10.40
500~189	19.827	7120908	55.10
<189	20.833	3714921	28.75

知, 冰岛刺参内脏团抗氧化肽中酸性氨基酸含量丰富, 占氨基酸总量的 29.68%, 其中, Glu 含量较高, 占氨基酸总量的 18.87%, 对肽的抗氧化能力有一定贡献。研究表明, 疏水性氨基酸在抗氧化肽序列中出现的频率较高, 这类氨基酸有助于抗氧化肽接近自由基, 向自由基提供质子或电子以保持活性氧的稳定, 对清除自由基和抑制脂质过氧化有积极作用^[30], 包斐^[31]从长蛇鲭鱼肉中得到的抗氧化肽富含 Pro、Met、Val、Phe、Ile、Leu、Trp 等疏水性氨基酸; Umayaparvathi 等^[32]从牡蛎中分离纯化出三种抗氧化肽均含有疏水性氨基酸, 对 DPPH 自由基具有较强的清除能力。冰岛刺参内脏团提取出来的抗氧化肽也含有大量的疏水性氨基酸(40.27%), 使冰岛刺参内脏团抗氧化肽具有较强的抗氧化活性。由此推断, 冰岛刺参内脏团抗氧化肽表现出较强的抗

表 7 冰岛刺参内脏团抗氧化肽的氨基酸组成
Table 7 Amino acid composition of antioxidant peptides in the visceral mass of *Cucumaria frondosa*

氨基酸种类	含量(%)
天冬氨酸(Asp) ^b	10.81
苏氨酸(Thr) ^a	6.12
丝氨酸(Ser)	6.20
谷氨酸(Glu) ^b	18.87
甘氨酸(Gly) ^c	10.01
丙氨酸(Ala) ^c	8.23
半胱氨酸(Cys)	0.25
缬氨酸(Val) ^{ac}	4.71
甲硫氨酸(Met) ^{ac}	0.72
异亮氨酸(Ile) ^{ac}	2.59
亮氨酸(Leu) ^{ac}	4.59
酪氨酸(Tyr)	1.37
苯丙氨酸(Phe) ^{ac}	3.28
赖氨酸(Lys) ^a	8.28
组氨酸(His)	1.43
精氨酸(Arg)	6.40
脯氨酸(Pro) ^c	3.00
色氨酸(Trp) ^{ac}	3.14
必需氨基酸	33.43
酸性氨基酸	29.68
疏水性氨基酸	40.27

注: a: 必需氨基酸; b: 酸性氨基酸; c: 疏水性氨基酸。

氧化活性与其氨基酸组成密不可分。

3 结论

本研究以 DPPH 自由基清除率为评价指标,通过单因素实验和响应面法优化得到复合蛋白酶酶解冰岛刺参内脏团制备抗氧化肽的最佳工艺条件:底物质量分数 4.4%,加酶量 4887 U/g, pH7.0, 酶解温度 56 °C, 酶解时间 4.2 h, 由此条件得到的酶解产物的 DPPH 自由基清除率为 89.18%±0.11%(2 mg/mL), ABTS 自由基清除率 68.11%±0.12%(0.5 mg/mL), 羟基自由基清除率为 71.86%±0.09%(1.5 mg/mL), Fe²⁺螯合率为 72.59%±0.08%(0.5 mg/mL), 还原力为 0.7473±0.0105(1.5 mg/mL)。此外,分子量分布和氨基酸结果表明,冰岛刺参内脏团抗氧化肽中分子量低于 1000 Da 的肽占 94.26%、低于 500 Da 的肽占 83.86%,大部分为小分子低聚寡肽,并且酸性氨基酸、疏水性氨基酸含量丰富,分别占氨基酸总量的 29.68% 和 40.27%,显示出良好的抗氧化活性。本研究为酶解冰岛刺参内脏团蛋白制备抗氧化肽的工业化生产提供了理论基础,也为冰岛刺参加工产业提供新的发展方向。

参考文献

- [1] 曹建, 贾子才, 丛培旭, 等. 冰岛刺参和南非花刺参脑苷脂分子种的比较[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2016, 46(9): 38-44. [CAO J, JIA Z C, CONG P X, et al. Comparison of cerebroside molecular species from sea cucumbers *Cucumaria frondosa* and *Stichopus variegatus* [J]. Periodical of Ocean University of China, 2016, 46(9): 38-44.]
- [2] 徐梦豪, 侯召华, 林荣芳, 等. 冰岛刺参抗癌物质 Frondoside A 的研究进展[J]. 特产研究, 2020, 42(5): 71-77. [XU M H, HOU Z H, LIN R F, et al. Advances in research on the anticancer substance Frondoside A of *Cucumaria frondosa*[J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 2020, 42(5): 71-77.]
- [3] THARINDU R L S, DEEPLKA D, FERREDOON S. Antioxidant potential and physicochemical properties of protein hydrolysates from body parts of North Atlantic sea cucumber (*Cucumaria frondosa*)[J]. *Food Production, Processing and Nutrition*, 2021, 3(1): 3.
- [4] HOSSAIN A, DAVE D, SHAHIDI F. Northern sea cucumber (*Cucumaria frondosa*): A potential candidate for functional food, nutraceutical, and pharmaceutical sector[J]. *Marine Drugs*, 2020, 18(5): 274.
- [5] 徐梦豪, 梁艳, 姚艳艳, 等. 响应面法优化亚临界萃取冰岛刺参内脏油脂工艺[J]. 食品与机械, 2021, 37(4): 165-170. [XU M H, LIANG Y, YAO Y Y, et al. Optimization of subcritical extraction of oil from *Cucumaria frondosa* visceral by response surface[J]. Food & Machinery, 2021, 37(4): 165-170.]
- [6] LIU Y, DAVE D, TRENHOLM S, et al. Effect of drying on nutritional composition of atlanticsea cucumber (*Cucumaria frondosa*) viscera derived from new found land fisheries[J]. *Processes*, 2021, 9(703): 703.
- [7] 党仪安, 王文亮, 弓志青, 等. 食用菌生物活性肽制备及功能活性研究进展[J]. 食品工业, 2019, 40(8): 228-231. [DANG Y A, WANG W L, GONG Z Q, et al. Advances in preparation and functional activity of bioactive peptide from edible fungus[J]. The Food Industry, 2019, 40(8): 228-231.]
- [8] HEYMICH M L, NIL L, HAHN D, et al. Antioxidative, antifungal and additive activity of the antimicrobial peptides leg1 and leg2 from chickpea[J]. *Foods*, 2021, 10(3): 585.
- [9] BABA W N, BABY B, MUDGIL P, et al. Pepsin generated camel whey protein hydrolysates with potential antihypertensive properties: Identification and molecular docking of antihypertensive peptides[J]. *LWT- Food Science and Technology*, 2021(1): 111135.
- [10] HUI S, HU X Q, ZHENG H, et al. Two novel antioxidant peptides derived from *Arca subcrenata* against oxidative stress and extend lifespan in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021(81): 104462.
- [11] 叶盛旺, 杨最素, 李维, 等. 青蛤免疫调节肽的酶解制备工艺研究[J]. 食品工业, 2018, 39(5): 1-4. [YE S W, YANG Z S, LI W, et al. Process optimization for preparation of immunoregulatory peptides from cyclinasinensis by enzymatic hydrolysis[J]. The Food Industry, 2018, 39(5): 1-4.]
- [12] 李娜, 周德庆, 刘楠, 等. 鳕鱼鱼鳔抗氧化肽制备工艺研究[J]. 渔业科学进展, 2020, 41(2): 191-199. [LI N, ZHOU D Q, LIU N, et al. Research on preparation of antioxidant peptides from cod swim bladder[J]. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(2): 191-199.]
- [13] 李亚会, 李积华, 吉宏武, 等. 远东拟沙丁鱼抗氧化肽的分离纯化及结构解析[J]. 中国食品学报, 2021, 21(2): 229-238. [LI Y H, LI J H, JI H W, et al. Isolation, purification and structural analysis of antioxidant peptides from *Sardinops sagax*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(2): 229-238.]
- [14] SIERRA L, FAN H, ZAPATA J, et al. Antioxidant peptides derived from hydrolysates of red tilapia (*Oreochromis* sp.) scale[J]. *LWT*, 2021: 146.
- [15] 罗春萍, 陆友利, 王星星. 苯酚-硫酸法快速测定多糖方法的优化[J]. 化工管理, 2021(3): 90-91. [LUO C P, LU Y L, WANG X X, et al. Optimization of rapid determination of polysaccharides by phenol-sulfuric acid method[J]. Chemical Enterprise Management, 2021(3): 90-91.]
- [16] 李云嵌, 杨曦, 刘江, 等. 超声波辅助碱法提取美藤果分离蛋白及其加工性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(9): 128-135. [LI Y Q, YANG X, LIU J, et al. Ultrasonic-assisted alkaline extraction of *Plukenetia volubilis* protein isolate and its processing properties[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(9): 128-135.]
- [17] 包斐, 孙丽霞, 孙建华, 等. 长蛇鳐鱼蛋白水解制备抗氧化肽工艺研究[J]. 食品科技, 2019, 44(8): 241-247. [BAO F, SUN L X, SUN J H, et al. Optimization of technology conditions for antioxidant peptides from protein hydrolysates of lizard fish[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(8): 241-247.]
- [18] ZHUANG H, TANG N, YUAN Y. Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal[J]. *Journal of Functional Foods*, 2013, 5(4): 1810-1821.

- [19] SARABABDI K, MAHOONAK A K, HAMISHEKAR H, et al. Microencapsulation of casein hydrolysates: Physicochemical, antioxidant and microstructure properties[J]. *Journal of Food Engineering*, 2018, 23: 86–95.
- [20] 李斌, 李元魁, 孟宪军, 等. 北五味子藤茎三萜抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(3): 121–123. [LI B, LI Y S, MENG X J, et al. Study on antioxidant activity of triterpenes from caulis of *Schisandra chinensis* (Turcz.) baill[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(3): 121–123.]
- [21] ZHENG Z J, LI J X, LI J W, et al. Physicochemical and antioxidative characteristics of black bean protein hydrolysates obtained from different enzymes[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 97: 105222.
- [22] YOU L J, ZHAO M M, CUI C, et al. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2009, 10(2): 235–240.
- [23] 林栋, 李丽娟, 何英, 等. 芡实多肽的分步酶解法制备及抗氧化活性研究[J]. *食品科技*, 2021, 46(2): 217–224. [LIN D, LI L J, HE Y, et al. Two-step enzymatic preparation and antioxidant activity *in vitro* of peptides from *Euryale ferox*[J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(2): 217–224.]
- [24] 王颖颖, 李迎秋. 酶解牡丹籽蛋白抗氧化特性的研究[J]. *中国调味品*, 2020, 45(12): 159–164. [WANG Y Y, LI Y Q. Study on antioxidant characteristics of enzymatic hydrolysis of tree peony seed protein[J]. *China Condiment*, 2020, 45(12): 159–164.]
- [25] 何峰, 李婉茹, 武贝贝. 对二氨基苯甲醛比色法测定羊肚菌中色氨酸含量[J]. *食品工业*, 2021, 42(5): 426–429. [HE F, LI W R, WU B B. Determination of tryptophan in *Morchella* by p-diaminobenzaldehydecolorimetry[J]. *The Food Industry*, 2021, 42(5): 426–429.]
- [26] 黄明, 王璐莎. 动物蛋白源抗氧化肽的研究进展[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(22): 4763–4773. [HUANG M, WANG L S. A review of the antioxidant peptides derived from animal protein[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(22): 4763–4773.]
- [27] RAJAPAKSE N, MENDIS E, BYUN H G, et al. Purification and *in vitro* antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2005, 16(9): 562–569.
- [28] PAN X Y, WANG Y M, LI L, et al. Four antioxidant peptides from protein hydrolysate of red stingray (*Dasyatis akajei*) cartilages: Isolation, identification, and *in vitro* activity evaluation[J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(5): 263.
- [29] WANG X Q, YU H H, XING R, et al. Preparation and identification of antioxidative peptides from pacific herring (*Clupea pallasii*) protein[J]. *Molecules*, 2019, 24(10): 1946.
- [30] ZHANG L, ZHAO G X, ZHAO Y Q, et al. Identification and active evaluation of antioxidant peptides from protein hydrolysates of skipjack tuna(*Katsuwonus pelamis*) head[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2019, 8(8): 318.
- [31] 包斐. 长蛇鲻鱼肉蛋白酶解制备抗氧化肽的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2019. [BAO F. Study on the preparation of antioxidant peptides by enzymatic hydrolysis of anchovy[D]. Nanning: Guangxi University, 2019.]
- [32] UMAVAPARVATHI S, MEENAKSHI S, VIMALIAJ V, et al. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*)[J]. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2014, 4(3): 343–353.