

无氧磨浆工艺对腐竹品质的影响

The effects of oxygen-insulated grinding process on the quality of yuba

季秋燕 孔祥珍 华欲飞

JI Qiu-yan KONG Xiang-zhen HUA Yu-fei

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(Food Faculty of Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:分别采用常规磨浆和无氧磨浆两种磨浆工艺生产豆浆,考察了二者成分及蛋白质组成的差异,并分析了以两种豆浆制备的腐竹的得率、成分组成、色泽、延伸率和耐煮性的差异。结果表明:两种磨浆工艺生产的豆浆的成分组成及蛋白质组成无明显区别,SDS-PAGE 结果发现,无氧豆浆的氧化程度较低;两种豆浆生产的腐竹得率相近,但腐竹中的蛋白质含量变化趋势存在显著差异,同时无氧磨浆条件制备的腐竹中的脂肪含量普遍较高;无氧磨浆条件下制备的腐竹的色泽均一性较好,呈亮黄色,而常规磨浆条件下制备的腐竹褐变现象严重;无氧腐竹的延伸率和耐煮性较好,分别较常规腐竹提高 35% 和 25%。

关键词:腐竹;无氧磨浆;豆浆;组成;品质

Abstract: Firstly, the soymilk was produced by oxygen-insulated and normal grinding processes. The basic components and protein components were test. Then the soymilk was used to make yuba. And the yield, components, color, elongation ratio and boiling fastness of two kinds of yuba were compared. There was no significant difference in the components and protein compositions of soybean milk produced by different grinding processes. Oxygen-insulated soybean milk had a low degree of oxidation according to the SDS-PAGE. The yield of the two soybean milk products was similar. The change trends of protein contents in different yuba were different, and the fat content of oxygen-insulated yuba was generally higher than the normal one. The color uniformity of oxygen-insulated yuba was good, and it was bright yellow. While the browning reaction of the normal yuba was serious. The elongation ratio and boiling fastness of oxygen-insulated yuba were better, which were 35% and 25% higher than that of normal yuba respectively.

Keywords: yuba; oxygen-insulated; soymilk grinding process; components; quality

腐竹是由豆浆中的蛋白质受热变性 with 脂类物质在空

气中吸热聚合,同时蒸发脱水凝结而形成的薄膜^[1]。使用普通磨浆工艺生产的豆浆普遍存在豆腥味,是因为脂肪氧合酶催化不饱和脂肪酸氧化产生过氧化氢产物^[2]被分解为芳香类物质,如 *n*-己醛和 *n*-戊醛,为豆腥味的主要成分;另一方面脂肪氧合酶参与到了豆浆中-SH 基团的氧化过程中,形成-S-S 键、-SO₂H 或-SO₃H,降低了大豆蛋白形成凝胶的能力^[3]。

目前对于腐竹加工工艺改进的研究主要集中在三方面,① 改变一些物理条件,如:泡豆温度、浆液 pH、揭竹浓度、揭竹深度、选用不同种大豆等^[4],主要目的是提高腐竹产量;② 使用食品添加剂,如:变性淀粉、酪蛋白酸钠、甘油酯等来提高产量和韧性^[5];③ 改变豆浆的加热方式,采用电加热的方式^[6]来提高腐竹的产量。对于豆浆本身品质的研究主要集中在调节豆浆中的蛋白质和脂肪的含量,以提高腐竹的产率和机械性能^[7]。而脂肪氧合酶对豆浆的品质具有很大的影响,其催化过程需要在有氧条件下进行。本研究拟使用一套自制研发的无氧磨浆设备^[8-9],对大豆进行特殊磨浆处理,并比较无氧磨浆豆浆和常规豆浆生产的腐竹的性能指标,旨在为实际生产提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

东北福牌大豆:市售。

硫酸钾、硫酸铜、硫酸、盐酸、石油醚、无水乙醚、氯化钡:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

磨浆机:24CB10C 型,美国 Waring Commercial 公司;
数显水浴锅:HH-4 型,江苏亿通电子有限公司;
不锈钢腐竹成型锅:尺寸为 20 cm×20 cm×8 cm,实验室自制;

烘箱:DHG-9203A 型,上海一恒科学仪器有限公司;
自动凯氏定氮仪:K9840 型,山东海能科学仪器有限公司;

无氧磨浆设备(如图 1):实验室自制;

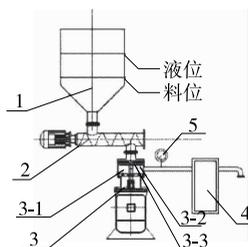
高精度分光测色仪:UltraScan Pro 1166 型,美国

作者简介:季秋燕,女,江南大学在读硕士研究生。

通信作者:孔祥珍(1980—),女,江南大学副教授,博士。

E-mail: xzkong@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2019-03-12



1. 前置罐 2. 固相物料定量喂料罐 3. 磨浆机 3-1. 磨室
3-2. 定磨盘 3-3. 动磨盘 4. 磨糊流量控制器 5. 压力表

图 1 无氧磨浆设备(竖磨式)结构示意图
Figure 1 Structural diagram of oxygen-insulated grinding equipment (upright)

Hunterlab 公司;

物性分析仪:TA—XT plus 型,英国 SMS 公司。

1.3 腐竹生产工艺

1.3.1 常规磨浆工艺制备腐竹

原料大豆→清洗→浸泡→清洗→磨浆→过滤→煮浆→过滤→揭竹→风干→成品

浸泡的料液比为 1:5 (g/g),18℃条件下浸泡 12 h。浸泡吸水后的大豆质量约为原料质量的 2.3 倍。磨浆的料液比为 1:7 (g/g)。过滤均使用 200 目纱布。煮浆条件:95℃以上,保温 5 min。调节浆液的固形物含量为 7%,豆浆温度控制在 86~89℃,每 20 min 揭竹 1 次,揭竹 12 次,得到 12 张腐竹。揭竹完成后自然风干 24 h。

1.3.2 无氧磨浆工艺制备腐竹

原料大豆→清洗→浸泡→清洗→无氧磨浆设备磨浆→揭竹→风干→成品

泡豆条件和煮浆工艺与常规腐竹一致,使用无氧磨浆代替常规磨浆的过程,并使用 105~110℃闪蒸工艺进行灭酶处理。

1.4 分析方法

1.4.1 成分分析

(1) 水分测定:按照 GB 5009.3—2016 中直接干燥法进行测定。

(2) 蛋白质测定:按照 GB 5009.5—2016 中凯氏定氮法进行测定。

(3) 脂肪测定:按照 GB 5009.6—2016 中酸水解法进行测定。

(4) 灰分测定:按照 GB 5009.4—2010 进行测定。

(5) 蛋白质组成分析:采用 SDS-PAGE 凝胶电泳法^[10-11]。

1.4.2 性能分析

(1) 腐竹得率测定:将揭竹生产的腐竹进行干燥处理后得到腐竹的干重,按式(1)计算腐竹得率。

$$Y = \frac{M}{C \times V} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

Y——腐竹得率,%;

M——腐竹干重,g;

C——揭竹豆浆固形物浓度,g/mL;

V——揭竹豆浆体积,mL。

(2) 腐竹色度测定:将自然干燥后的腐竹进行粉碎处理,使用高精度分光测色仪测定自然干燥后的腐竹的色度。采用 Hunter Lab L*a*b* 表色系统对腐竹色泽进行表征,L 表示明暗度,L⁺表示明度,L⁻表示暗度。a、b 表示不同色调方向,a⁺呈现红色调,a⁻呈现绿色调,b⁺显示黄色调,b⁻显示蓝色调,本试验重复 3 次,取平均值作为该腐竹的色度值。

(3) 腐竹延伸率测定:根据欧锦强等^[12]的方法,并作修改,具体修改如下:以揭竹的第 1、3、6、9、12 张为代表,将单层腐竹膜裁成 2 cm×10 cm 的长条,在饱和氯化钡溶液中平衡 43 h,用质构物性分析仪测定腐竹膜的断裂延伸率(E)。有效伸长度为 4 cm,选用 A/KIE 探头,测前速度 1 mm/s,测时速度 2 mm/s,每张腐竹膜重复测定 5 次。按式(2)计算延伸率。

$$E = \frac{L_1 - L_0}{L_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

E——腐竹延伸率,%;

L₁——腐竹断裂时的长度,mm;

L₀——腐竹膜的原长度,mm。

(4) 腐竹蒸煮损失率测定:根据赵秋艳等^[13]的方法,并作修改,具体修改如下:腐竹的第 1、3、5、7、9、11 张用于进行蒸煮损失率测定。将腐竹进行预处理,裁成 2 cm×10 cm 的长条,称取大约 2 g 样品于 100 mL 水中,直接沸水煮 10 min,对煮熟的腐竹淋洗数次,将腐竹汤液和淋洗水过筛,转移到 250 mL 容量瓶中定容。移取 25 mL 溶液于恒重容器中干燥至恒重,称量容器质量。按式(3)计算蒸煮损失率。

$$L = \frac{m_1 - m_0}{m} \times 10 \times 100\% \quad (3)$$

式中:

L——蒸煮损失率,%;

m——样品质量,g;

m₀——恒重容器质量,g;

m₁——容器干燥后质量,g。

2 结果与讨论

2.1 两种磨浆工艺制得的浆液对比

2.1.1 主要成分 将两种浆液的固形物含量控制在 7%,测定浆液中的主要成分,测定结果如表 1 所示。

由表 1 可知,豆浆中固形物大部分由蛋白质和脂肪组成,其中,蛋白质含量约占豆浆固形物含量的 46%,脂肪约占 21%^[14]。经过两种磨浆工艺生产的豆浆的主要组成成分无明显差异。因为无氧磨浆工艺只是抑制了脂

表 1 两种豆浆的主要组成成分

Table 1 Main components of the soymilk made by two grinding processes (n=3) %

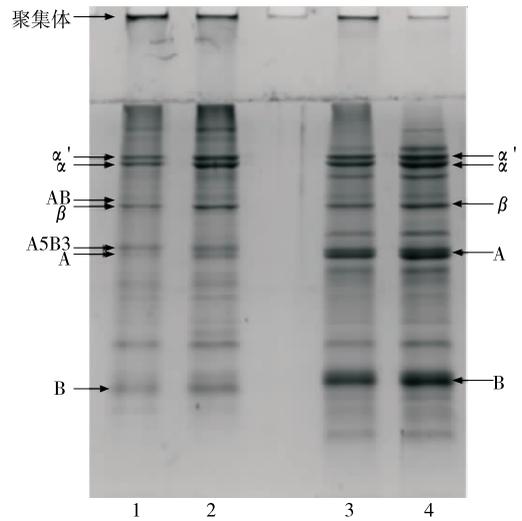
样品	蛋白质	脂肪	灰分	总糖
常规豆浆	3.25±0.05	1.40±0.12	0.36±0.02	1.12±0.10
无氧豆浆	3.28±0.03	1.50±0.10	0.35±0.03	1.14±0.11

肪氧合酶对豆浆的氧化作用,对宏观的物质组成未产生很大影响。所以初始浆液的物质组成无差异。而蛋白质和脂肪是形成腐竹的最主要成分,浆液中的蛋白质和脂肪的含量,直接影响腐竹的产量和物质组成。

2.1.2 蛋白质组成 两种磨浆工艺获得的浆液的蛋白质组成基本相同,但各条带浓度存在差异,泳道 1 内条带明显较泳道 2 浅,而聚集体比泳道 2 多(如图 2 所示)。说明常规豆浆中有较多蛋白质发生氧化,分子之间形成二硫键,故在非还原电泳谱图上体现为浓缩胶上端的聚集体增多;对比分析无氧磨浆制备的豆浆中,由于豆浆蛋白质氧化程度低,形成的聚集体较少。两种豆浆经还原处理后,进行 SDS-PAGE 所得谱图如泳道 3、4 所示,发现泳道 3 内的条带较泳道 4 浅,而泳道 3 上方的仍有聚集体存在。说明常规磨浆制备的豆浆中的蛋白质除巯基氧化形成二硫键后形成聚集体外,可能还以其他形式形成了难以还原的聚集体。由此可以推断出常规磨浆工艺生产的豆浆的氧化形成聚集体的现象较无氧磨浆工艺生产的豆浆明显。

2.2 磨浆工艺对腐竹得率的影响

控制两种浆液的 pH 为 7,固形物浓度为 6.2% 进行揭竹,得到的腐竹得率如表 2。由表 2 可知,两种浆液生产的腐竹的得率相差不大,无氧豆浆生产的腐竹的得率仅提高了约 5.6%。推测腐竹的得率与豆浆中的蛋白质和脂肪含量有关,当两种豆浆的物质组成和含量相同时,腐竹的得率不会产生很大变化。



1. 常规磨浆豆浆非还原样品 2. 无氧磨浆豆浆非还原样品
3. 常规磨浆豆浆还原样品 4. 无氧磨浆豆浆还原样品

图 2 两种豆浆的 SDS-PAGE 谱图

Figure 2 SDS-PAGE patterns of the soymilk made by two grinding processes

表 2 两种磨浆工艺的腐竹得率

Table 2 Yields of the yuba made by two grinding processes (n=3)

条件	产量/g	干重/g	得率/%
常规	59.0±2.1	55.0±1.9	59.17±1.77
无氧	62.6±2.3	58.1±2.1	62.47±1.95

2.3 磨浆工艺对腐竹组成的影响

使用两种不同的浆液进行揭竹,选取奇数张作为代表,测定两种浆液生产的腐竹的主要成分,其结果如表 3。

由表 3 可以看出,两种腐竹的成分的差异主要体现在蛋白质、脂肪和总糖含量上。采用常规磨浆生产的豆浆进行揭竹,腐竹的蛋白质含量在 49.66%~53.41% 范围

表 3 两种磨浆工艺生产腐竹的主要成分[†]

Table 3 Main components of the yuba made by two grinding processes (n=3) %

指标		1	3	5	7	9	11
蛋白质	常规	53.41±2.89 ^a	52.92±3.15 ^a	52.60±1.62 ^a	51.53±2.55 ^a	49.67±3.87 ^a	49.66±0.85 ^a
	无氧	42.66±2.44 ^c	44.31±2.26 ^c	45.23±1.25 ^c	47.15±1.26 ^{bc}	49.78±3.21 ^b	51.61±1.45 ^{ab}
脂肪	常规	31.84±4.06 ^a	31.20±2.78 ^{ab}	29.48±3.23 ^{ab}	29.29±2.98 ^{ab}	28.60±5.09 ^{ab}	25.81±5.19 ^b
	无氧	38.56±5.34 ^{ab}	37.37±4.20 ^{ab}	34.56±3.12 ^b	33.01±1.99 ^b	29.66±3.27 ^{bc}	24.75±2.01 ^c
水分	常规	6.43±0.83 ^a	6.46±0.73 ^a	6.13±0.38 ^a	7.18±0.59 ^a	7.04±0.22 ^a	7.02±0.56 ^a
	无氧	6.51±0.42 ^b	6.64±0.51 ^b	6.61±0.48 ^b	6.99±0.29 ^{ab}	7.52±0.49 ^a	7.88±0.76 ^a
灰分	常规	2.43±0.09 ^c	2.49±0.05 ^{bc}	2.52±0.09 ^b	2.73±0.10 ^{8b}	3.11±0.11 ^a	3.33±0.29 ^a
	无氧	1.89±0.30 ^b	1.85±0.24 ^b	1.84±0.57 ^b	2.13±0.42 ^b	2.42±0.31 ^{ab}	2.96±0.58 ^a
总糖	常规	5.89±1.45 ^b	6.94±1.25 ^b	9.28±2.23 ^b	9.27±3.11 ^b	11.57±4.00 ^{ab}	14.18±4.87 ^a
	无氧	10.39±3.20 ^a	9.83±2.98 ^a	11.77±3.75 ^a	10.72±3.98 ^a	10.63±3.90 ^a	12.81±1.21 ^a

† 同列字母不同表示具有显著性差异, P<0.05。

内,有略微下降趋势,但变化不显著,脂肪含量在 25.61%~31.84% 范围内,且有显著减少趋势,即随着时间的延长,越后期生产的腐竹的蛋白质和脂肪的含量越少,推测常规的豆浆中的蛋白质在揭竹初期快速聚集到了浆液表面,形成了腐竹,而后期剩余在浆液中的蛋白质含量虽不断增加,但其蛋白质结构不利于形成腐竹,但由于剩余浆液中蛋白质不断浓缩,浓度增加,所以仍有较多蛋白质结合到腐竹中。而采用无氧豆浆进行揭竹生产的腐竹的蛋白质变化趋势与常规豆浆相反,呈逐渐增大的趋势,揭竹后期无氧腐竹中的蛋白质含量超过常规腐竹,这与浆液不断浓缩有关,揭竹过程中剩余浆液中的蛋白质含量逐渐增大,聚集到浆液表面形成腐竹的蛋白质也增多。而将两种腐竹的脂肪含量进行对比,无氧豆浆生产的腐竹的脂肪含量要普遍比常规腐竹高,推测无氧豆浆中的脂肪更容易上浮到浆液表面与腐竹中的蛋白质网络结构结合。同时腐竹中也含有大约 10% 的糖类,常规豆浆生产的腐竹的总糖含量有显著增大趋势,最后 1 张腐竹中总糖含量约是第 1 张的 3 倍,而无氧豆浆生产的腐竹的总糖含量变化不显著。推测是因为揭竹过程中无氧豆浆中的成分较匀速地上浮形成腐竹,所以总糖变化较小;而常规豆浆中的蛋白质前期迅速形成腐竹,后期剩余的蛋白质品质较差不易形成腐竹,浓度逐渐升高的总糖附着在浆液表面的膜上,形成了腐竹。

2.4 磨浆工艺对腐竹品质的影响

2.4.1 色度 由图 3 可知,常规腐竹较无氧腐竹普遍颜色偏红、偏蓝,而无氧腐竹更偏黄、偏绿。常规豆浆的变化趋势比较一致, L^* 值呈减小趋势, a^* 呈增大趋势,随着揭竹时间的增加,腐竹越来越偏暗红色,而无氧豆浆制得的腐竹 L^* 、 a^* 值呈波动状态,上升和下降趋势均不明显,颜色统一性较好。推测是因为常规的豆浆氧化程度更高,揭竹过程中美拉德反应更加剧烈,导致后期揭出的腐竹的颜色加深。

2.4.2 延伸率 由图 4 可知,无氧豆浆生产的腐竹的断裂延伸率普遍高于常规豆浆生产的腐竹,且随着揭竹时间的增加,腐竹断裂延伸率的变化趋势也有所不同。常规腐竹前期腐竹的抗拉伸性较好,随着揭竹时间的增长,腐竹的断裂延伸率逐渐降低,而无氧腐竹的断裂延伸率先增加后降低,大约在第 9 张揭竹时达到峰值。一方面无氧豆浆的氧化程度低,浆液中游离的 -SH 在生成腐竹时形成 -S-S,有助于加强腐竹的结构,而常规豆浆中的 -SH 大多已经被氧化,形成腐竹膜时 -S-S 的作用较少,所以总体上无氧腐竹的延伸率较好,大约提高 35%;另一方面,两种腐竹的断裂延伸率变化趋势不同,推测与腐竹的物质组成相关,两种腐竹均在蛋白质/脂肪含量在 1.68~1.70 时有较强的抗拉伸性。

2.4.3 耐煮性 蒸煮损失率越高,腐竹的耐煮性越不好。由图 5 可以看出,两种腐竹耐煮性变化趋势相同,随着揭

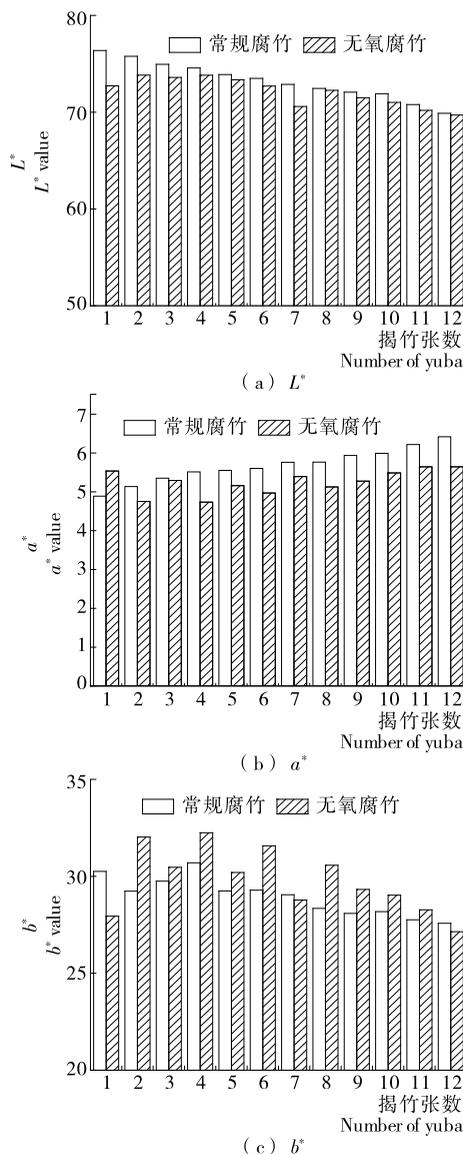


图 3 两种磨浆工艺生产腐竹的色泽

Figure 3 Color of the yuba made by two grinding proces (n=3)

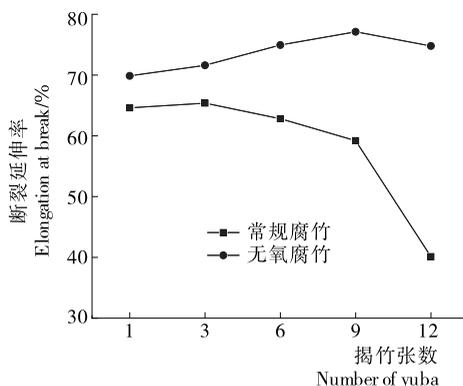


图 4 两种磨浆工艺生产腐竹的断裂延伸率

Figure 4 Elongation ratio of the yuba made by two grinding processes (n=3)

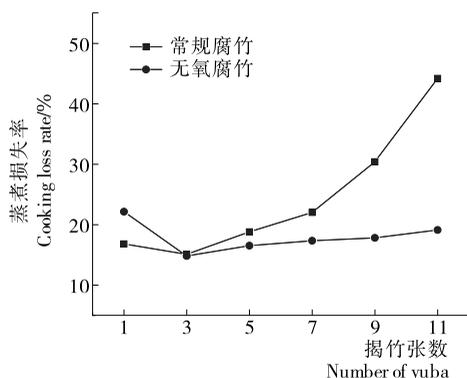


图5 两种磨浆工艺生产腐竹的蒸煮损失率

Figure 5 Cooking loss rate of the yuba made by two grinding processes ($n=3$)

竹张数的增加,越后期揭竹的腐竹的蒸煮损失率升高。两种腐竹的耐煮性有显著性差异($P<0.05$),常规工艺生产的豆浆和无氧工艺生产的豆浆制作的腐竹第1张的耐煮性一般,两种腐竹都是第3张耐煮性最佳,前5张的耐煮性均较好,但第5张以后,常规腐竹的耐煮性急剧降低,而无氧腐竹仍具有良好的品质,最终常规腐竹的煮出物的量大约是无氧腐竹的2倍。所以无氧豆浆生产的腐竹的均一性较好,其耐煮性的提高主要体现在揭竹后期生产的腐竹,耐煮性大约可以提高25%。

两种腐竹的煮出液与腐竹的主要物质组成密切相关,主要由蛋白质和脂肪组成。蛋白质和脂肪的变化趋势相同,均呈现逐渐降低的趋势,而总糖的含量在不断升高。同时常规腐竹煮出液的蛋白质含量约占固形物的43.4%~49.6%,无氧腐竹煮出液的蛋白质含量约占固形物的41.2%~49.4%,两种腐竹的煮出液中无氧磨浆工艺生产的豆浆制得的腐竹的蛋白质占比稍低于常规腐竹,结合蒸煮损失率,无氧腐竹的蛋白质损失要比常规腐竹少很多,推断无氧腐竹形成的蛋白质网络结构更加稳定,所以腐竹不容易破碎,蛋白质也不容易被煮出;常规腐竹煮出液的脂肪含量约占固形物的16.2%~28.2%,无氧腐竹煮出液的脂肪含量约占固形物的20.7%~35.1%,无氧豆浆生产的腐竹的煮出液中脂肪占比明显高于常规豆浆生产的腐竹,脂肪主要镶嵌在蛋白质网络结构中或者浮于腐竹表面,所以比较容易在蒸煮过程中转移到水中,而无氧腐竹本身的脂肪含量比较高,所以煮出液中的脂肪占比比较高。

结合腐竹的蒸煮损失率和煮出液的物质组成,由无氧磨浆工艺生产的豆浆制作腐竹能有效提高腐竹的耐煮性,从而一定程度上减少了腐竹中蛋白质的损失。

3 结论

本研究结果表明:使用无氧磨浆工艺生产的豆浆的氧化程度低,制成的腐竹得率大约提高5.6%。常规腐竹普遍蛋白质含量高,脂肪含量低,无氧腐竹普遍蛋白质含

量低,脂肪含量高,两种腐竹的成分组成差异较大。无氧豆浆生产腐竹的褐变现象不明显,呈亮黄色,色泽均一,常规腐竹的褐变现象严重,由亮白色变为暗红色。无氧磨浆工艺对提高腐竹的延伸率和耐煮性有很大的作用,而常规腐竹随着揭竹时间的延长,品质下降严重,且无氧腐竹的延伸率和耐煮性平均高出常规腐竹35%和25%左右。结合耐煮性和腐竹煮出液的主要成分可知无氧腐竹在蒸煮过程中蛋白质损失较少。

本试验未能阐明脂肪氧合酶在腐竹形成过程中的作用机理,还需进一步研究说明。

参考文献

- [1] 于新, 黄小丹. 传统豆制品加工技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011: 37-41.
- [2] ROBINSON D S, WU Z, DOMONEY C, et al. Lipoxygenases and the quality of foods[J]. Food Chem, 1995, 54(1): 33-43.
- [3] RUAN Qi-jun, CHEN Ye-ming, KONG Xiang-zhen, et al. Heat-induced aggregation and sulphhydryl/disulphide reaction products of soy protein with different sulphhydryl contents[J]. Food Chemistry, 2014, 156: 14-22.
- [4] 韩智, 石谷孝佑, 李再贵. 不同豆浆浓度和浆液深度对腐竹生产的影响[J]. 农业工程学报, 2005, 21(11): 179-181.
- [5] 项雷文, 陈亮, 陈文韬. 腐竹生产用复配添加剂的研制[J]. 中国食品添加剂, 2014(1): 173-177.
- [6] 欧阳平一, 刘炜松. 腐竹工业化加工工艺优化研究[J]. 食品与机械, 2010, 26(2): 123-125.
- [7] 臧茜茜, 吴婧, 潘思轶, 等. 蛋白及脂肪含量对腐竹差异成膜的影响[J]. 现代食品科技, 2015(6): 129-135.
- [8] 华欲飞, 张彩猛, 孔祥珍, 等. 一种植物蛋白原料处理装置: 中国, 201520832013.5[P]. 2016-03-23.
- [9] 华欲飞, 张彩猛, 孔祥珍, 等. 一种植物蛋白原料处理装置及其处理方法: 中国, 201510695967.0[P]. 2015-10-26.
- [10] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [11] CHEN Ye-ming, ONO T. The Mechanisms for Yuba Formation and Its Stable Lipid[J]. Agric. Food. Chem., 2010, 58(10): 6 485-6 489.
- [12] 欧锦强, 王兴国, 金青哲. 大豆组分对腐竹性能的影响[J]. 中国油脂, 2005, 30(2): 37-40.
- [13] 赵秋艳, 张平安, 宋莲军, 等. 揭竹过程中浆液成分与腐竹品质的变化及其相关性研究[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(9): 157-160.
- [14] 李家勋, 荣建华, 翁文丰, 等. 制浆工艺对豆浆营养成分构成的影响[J]. 粮食与饲料工业, 2016, 12(6): 21-24.