

淀粉发酵体系中威兰胶产品的含量测定与分析

龚斌¹, 刘静², 李庭¹, 张永奎¹, 谢通慧^{1*}

(1. 四川大学化学工程学院, 四川 成都 610065;

2. 成都市环境监测中心站, 四川 成都 610042)

摘要:在鞘氨醇单胞菌发酵生产威兰胶的实验中,为去除残余淀粉并准确测定发酵液中威兰胶的产量,比较了吸附法、酸解法、酶解法对威兰胶溶液和淀粉溶液的影响,并采用单因素实验和正交实验优化实验条件。结果表明,酸解法最优,最优条件为:pH=1.0,温度为95℃,时间为180 min,在此条件下,淀粉的去除率达到99.19%,威兰胶的保留率为87.51%。经碘量法验证:威兰胶-淀粉混合溶液在最优条件下酸解,淀粉的去除率和威兰胶的保留率与正交实验所得结果相符;该方法能准确测定含淀粉的发酵液中威兰胶的含量,误差在5%以内。

关键词:鞘氨醇单胞菌;淀粉;威兰胶;酸解法;测定

中图分类号:TQ031.5

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2014)11-0158-05

Determination and analysis on welan gum in starch fermentation system

GONG Bin¹, LIU Jin², LI Ting¹, ZHANG Yong-kui¹, XIE Tong-hui^{1*}

(1. School of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

2. Chengdu Environmental Monitoring Center, Chengdu 610042, China)

Abstract: To remove the residual starch and detect accurately the production of welan gum by *sphingomonas* in the fermentation broth, the effects of adsorption method, acid hydrolysis and enzyme decomposition methods on the welan gum solution and starch solution are studied. The reaction conditions are optimized by using one-factor experimental design and orthogonal experimental design. The results show that acid hydrolysis is the best way and the optimal conditions are as follows: 1.0 of pH, 95℃ of temperature and 180 minutes of reaction time. Under this condition, the removal rate of starch can reach 99.19% and the retention rate of welan gum is 87.51%. When the mixed solution of starch and welan gum is processed under the optimal condition, the removal rate of starch and retention rate of welan gum determined by iodometric method are consistent with the orthogonal experimental results. This method can detect accurately the production of welan gum in the process of fermentation with the errors less than 5%.

Key words: *sphingomonas*; starch; welan gum; acid hydrolysis; determination

威兰胶是由鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 产生的一种胞外多聚糖^[1-6]。威兰胶比其他微生物胞外多糖如黄原胶、结冷胶等具有更好的流变学性能^[7],但较高成本对其工业化生产及应用造成了一定的制约,因此利用更廉价的原料降低成本已成为该领域发展的趋势。淀粉是一类常见的原料,价格低,生产方便,可作为鞘氨醇单胞菌生产威兰胶的碳源^[8-9],但淀粉未被完全利用,使培养基中存在残余的淀粉。淀粉和威兰胶都是单糖的多聚物,结构和性质相似,在乙醇提取过程中残余淀粉会随着威兰胶一起沉淀,导致发酵生产威兰胶的产量不准确。当前部分研究仅从数值上提高“胶”的含量,而忽略了威兰胶产品中掺杂的淀粉的影响,因此,除去威兰胶中的淀粉已成为必然。在研究淀

粉对威兰胶产量测定影响的同时,通过比较吸附法^[10]、酸解法^[11]和酶解法^[12]对淀粉去除的效果,采用单因素、正交实验优化实验条件,达到去除威兰胶中的淀粉的目的,为测定含淀粉的发酵液中威兰胶的含量提供一种方法。

1 实验材料与仪器

1.1 材料

威兰胶(自制)、淀粉、硅藻土(天津市博迪化工有限公司生产)、 α -淀粉酶和糖化酶(北京奥博星生物技术有限责任公司生产)。

1.2 仪器

电子天平(FA2204B)、离心机(TD-6M)、紫外-可见分光光度计(UV-1800PC)、NDJ-1型旋转式

收稿日期:2014-07-07

作者简介:龚斌(1988-),男,硕士生,研究方向为生物化工,781032539@qq.com;谢通慧(1986-),女,博士,讲师,研究方向为微生物科学与应用,通讯联系人,xietonghui@scu.edu.cn。

黏度计。

2 实验方法

2.1 溶液的配制

配制 10 g/L 的威兰胶溶液, 10 g/L 淀粉溶液, 威兰胶质量浓度为 5 g/L, 淀粉溶液质量浓度为 5 g/L 的威兰胶-淀粉混合溶液。

2.2 乙醇提取法与提取物产量计算

取待测溶液 10 mL, 加入 40 mL 95% 乙醇溶液, 玻璃棒搅动至出现絮状沉淀, 4 000 r/min 离心 20 min, 去除上清液, 再加入 20 mL 95% 乙醇溶液, 重复以上操作, 得提取物, 60℃ 干燥箱充分烘干后称重。提取物产量按下式计算:

$$\text{提取物产量} = \text{提取物质量(g)} / \text{原提取物体积(L)}$$

2.3 不同方法分别处理威兰胶溶液和淀粉溶液

(1) 吸附法: 加入 5% 硅藻土, 充分振荡 10 min 后在 4 000 r/min 条件下离心 20 min, 取上清液, 用乙醇法提取, 计算提取物产量。

(2) 酸解法: 用盐酸调节溶液 pH = 1.5, 90℃ 水浴, 酸解 180 min, 冷却, 用乙醇法提取, 计算提取物产量。

(3) 酶解法: 依次加入 α -淀粉酶 (1%, pH = 6.0, 30 min, 60℃) [13] 和糖化酶 (1%, pH = 4.0, 60 min, 60℃) [14] 对溶液进行充分水解, 冷却后用乙醇法提取, 计算提取物产量。

(4) 对照: 溶液不经过任何处理, 直接用乙醇法提取, 计算提取物产量。

2.4 酸解法的单因素实验

2.4.1 pH 对威兰胶溶液和淀粉溶液酸解的影响

分别取威兰胶溶液和淀粉溶液调节 pH 为 0.5、

1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0。90℃ 水浴 180 min, 冷却后用乙醇法提取, 计算提取物产量。

2.4.2 温度对威兰胶溶液和淀粉溶液酸解的影响

分别将 pH = 1.0 的威兰胶溶液和淀粉溶液 60、70、80、90、100℃ 水浴 180 min, 冷却后用乙醇法提取, 计算提取物产量。

2.4.3 时间对威兰胶溶液和淀粉溶液酸解的影响

分别将 pH = 1.0 的威兰胶溶液和淀粉溶液 90℃ 水浴 60、120、180、240、300 min, 冷却后用乙醇法提取, 计算提取物产量。

3 结果与讨论

3.1 淀粉对威兰胶提取的影响

将 10 g/L 的威兰胶溶液稀释得 5 g/L 的威兰胶溶液, 用乙醇法提取 5 g/L 威兰胶溶液和威兰胶-淀粉混合溶液, 提取物产量如表 1 所示。

表 1 乙醇法提取不同溶液结果

溶液	提取物产量/(g·L ⁻¹)	提取率/%
5 g/L 威兰胶溶液	4.99	99.8
威兰胶-淀粉混合溶液	9.88	98.8

由表 1 可知, 采用乙醇法提取威兰胶质量浓度相同的 2 种溶液, 威兰胶-淀粉混合溶液中的提取物产量明显高于只含 5 g/L 的威兰胶溶液。由 5 g/L 威兰胶溶液提取率 (99.8%) 及威兰胶-淀粉混合溶液提取率 (98.8%) 可知, 采用乙醇法提取威兰胶、淀粉都具有很好的效果; 综合考虑威兰胶及威兰胶-淀粉混合溶液提取率可知, 乙醇法在沉淀威兰胶的同时也可将大部分淀粉分离沉淀, 这表明淀粉的存在对威兰胶的提取影响很大。因此在采用淀粉

(上接第 157 页)

[2] 张刚生, 丁世磊, 贾太轩, 等. 珍珠及贝壳珍珠层文石的异常红外光谱特征[J]. 宝石和宝石学杂志, 2005, 7(3): 7-9.

[3] 夏静芬, 钱国英, 陈亮, 等. 傅里叶变换红外光谱法对珍珠粉和贝壳粉的研究[J]. 光谱实验室, 2010, 27(2): 524-527.

[4] 夏静芬, 钱国英, 陈亮, 等. 珍珠粉和贝壳粉的化学成分和结构特征分析[J]. 化学研究与应用, 2010, 22(11): 1467-1471.

[5] 宋德宏, 丁永生, 庞艳华, 等. 贝壳棱柱层和珍珠层的傅里叶变换红外光谱[J]. 大连海事大学学报, 2006, 32(4): 110-112.

[6] Zhang Guoqing, Guo Yili, Ao Ju, et al. Thermally induced phase transformation of pearl powder[J]. Mater Sci Eng, C, 2013, 33: 2046-2049.

[7] 曾跃武, 吕光烈, 廖杰, 等. 珍珠粉与蚌壳粉的鉴别[J]. 材料科学与工程学院学报, 2012, 30(6): 937-939.

[8] 张汉明, 林锦明, 王原. 珍珠粉及其伪品的差热分析研究[J]. 中成药, 1999, 21(4): 173-175.

[9] 杨林莎, 朱琰, 申小清, 等. 珍珠的热分解机理及质量分析方法研究[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(9): 518-520.

[10] 赵云志, 张秋燕. 药用珍珠粉真伪鉴别方法研究概况[J]. 中成药, 2000, 22(11): 797-798.

[11] 陆婉珍, 袁洪福, 徐广通, 等. 现代近红外光谱分析技术[M]. 北京: 中国石化出版社, 2000: 193.

[12] 李彦周, 闵顺耕, 刘霞. 近红外光谱技术在中草药分析中的应用[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(7): 1549-1553.

[13] 肖雪, 梁琼麟, 王义明, 等. 近红外光谱技术在医药领域中的应用进展[J]. 现代仪器, 2011, 17(5): 9-12.

[14] 汪小莉, 李嫒, 秦昆明, 等. 近红外光谱学与化学计量学在中成药液体制剂过程分析中的应用[J]. 中草药, 2013, 44(15): 2165-2171.

[15] 丁念亚, 黎薇, 冯昕韡, 等. 近红外漫反射光谱在中药分类及真伪鉴别中的应用[J]. 计算机与应用化学, 2008, 25(4): 499-502. ■

作为碳源发酵生产威兰胶时必须采用适当的方法除去淀粉。

3.2 不同方法处理威兰胶溶液和淀粉溶液

采用硅藻土吸附、盐酸酸解和双酶酶解 3 种方法除淀粉, 比较对淀粉去除效果, 同时考察 3 种方法对威兰胶的影响, 结果如表 2 所示。

表 2 不同方法处理威兰胶溶液和淀粉溶液

方法	淀粉提取产量/(g·L ⁻¹)		威兰胶提取产量/(g·L ⁻¹)	
	对照	进行处理	对照	进行处理
硅藻土吸附	10	9.05	10	9.03
酸解法	10	0.32	10	8.57
酶解法	10	0.84	10	10.71

由表 2 可知, 3 种方法对威兰胶的产量变化不显著; 酸解法和酶解法对淀粉去除效果显著, 而硅藻土吸附对淀粉去除效果不明显。硅藻土吸附过程中, 仅少量威兰胶、淀粉大分子吸附在硅藻土表面^[15], 吸附量在 10% 左右, 吸附量很小。威兰胶具有较好的稳定性, 在温度升至 149℃ 时, pH = 2 ~ 13 范围内性质基本不变^[16], 所以酸解法对威兰胶的产量变化无明显影响; 威兰胶不含有淀粉酶特异性识别的 α-1,4-糖苷键和 α-1,6-糖苷键^[17], 所以酶解法对威兰胶产量变化也无明显影响; 酸解法和酶解法对淀粉去除效果较好是因为淀粉经酸解或酶解后分解成葡萄糖等小分子, 这些小分子可溶于乙醇中, 从而达到去除的目的。但是酶在乙醇溶液中发生变性, 聚集沉淀^[9], 离心过程中会随威兰胶一起沉淀, 使“威兰胶产量”有所增加, 因此采用酶法处理威兰胶溶液后所得提取物较未处理的有所增加。综合以上分析, 选择酸解法作为去除威兰胶中残余淀粉的处理方法。

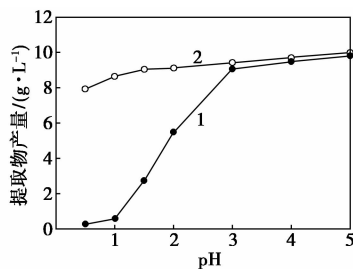
3.3 酸解法单因素实验

影响酸解的因素有 pH、酸解温度和酸解时间, 然而选择酸解条件时不仅要考虑淀粉的去除效果还要结合对威兰胶结构的影响。通过文献调研及前期试验确定酸解的基础条件为: 温度为 90℃, pH = 1.0, 时间为 180 min^[7-8]。

3.3.1 pH 对威兰胶溶液和淀粉溶液酸解的影响

pH 对威兰胶溶液和淀粉溶液酸解的影响如图 1 所示。

由图 1 可知, 在 90℃ 水浴 180 min 的条件下, 随着 pH 的降低, 威兰胶溶液、淀粉溶液提取物产量均有所下降。这是因为在酸性条件下, 淀粉和威兰胶均会被不同程度分解, 酸度越高, 分解速度越快。由



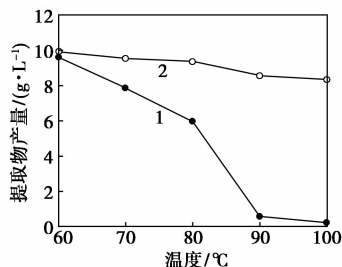
1—淀粉溶液; 2—威兰胶溶液

图 1 pH 对威兰胶溶液和淀粉溶液酸解的影响

于威兰胶具有较好的酸稳定性, 所以提取物的产量变化不大, 始终维持在一个较高水平; 而淀粉对酸稳定性较差, 随着酸度的降低被大量分解。当 pH = 1.0 时, 淀粉分解较为完全而威兰胶产量变化不大, 因此选择 pH = 1.0 为酸解的酸度。

3.3.2 温度对威兰胶溶液和淀粉溶液酸解的影响

温度对威兰胶溶液和淀粉溶液酸解的影响如图 2 所示。



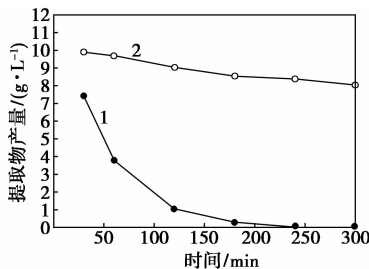
1—淀粉溶液; 2—威兰胶溶液

图 2 温度对威兰胶溶液和淀粉溶液酸解的影响

由图 2 可知, 在 pH = 1、水浴 180 min 的条件下, 随着温度的升高, 威兰胶溶液、淀粉溶液提取物产量均有所下降。这是因为温度越高, 使多糖分子运动越活跃, 连接分子间的键越容易断裂, 但威兰胶分子间作用力比淀粉大, 能耐受更高的温度。综合考虑能耗以及成本, 选择 90℃ 为酸解温度。

3.3.3 时间对威兰胶和淀粉酸解的影响

时间对威兰胶和淀粉水解的影响如图 3 所示。



1—淀粉溶液; 2—威兰胶溶液

图 3 时间对威兰胶和淀粉水解的影响

由图 3 可知,在 pH = 1.0,90℃ 下水浴,随着水浴时间的延长,威兰胶溶液、淀粉溶液提取物产量都会下降。这是因为时间越长,连接分子之间的化学键断裂得就越多,但威兰胶分子键作用力比淀粉大,能耐受更长的时间。当时间为 180 min 时,淀粉分解接近于 0,而威兰胶产量变化不大。所以酸解过程中,选择酸解时间为 180 min。

3.4 正交实验

根据单因素实验结果,在威兰胶溶液和淀粉溶液中,以相同条件下酸解后溶液内威兰胶浓度与淀粉浓度剩余量的差值为考察标准,按 $L_{16}(4^3)$ 正交表安排实验。酸解条件正交实验的几种考察因素及其水平见表 3,正交试验结果见表 4,方差分析见表 5。

表 3 正交试验因素和水平

水平	因素		
	pH(A)	温度(B)/℃	时间(C)/min
1	0.5	85	150
2	1.0	90	180
3	1.5	95	210
4	2.0	100	240

由表 4 可以看出,各因素对酸解影响次序为 A(pH) > B(温度) > C(时间),最优组合为 $A_2B_3C_2$,即酸解最优条件:pH 为 1.0,温度为 95℃,时间 180 min。由表 5 可见,pH 对酸解的影响显著,温度和时间影响较小,与表 4 结果一致。进行多次实验,所得威兰胶质量浓度与淀粉质量浓度剩余量的差值的平均值为 8.670 0 g/L,比正交实验每组结果都高,证明 $A_2B_3C_2$ 为最优条件。在此条件下,淀粉由 10 g/L 分解为 0.081 0 g/L,去除率为 99.19%;威兰胶由 10 g/L 变为 8.751 2 g/L,威兰胶的保留率为 87.51%。

表 4 正交试验结果与分析

实验号	因素						威兰胶与淀粉质量浓度的差值/(g·L ⁻¹)
	A	B	C	空列	空列	空列	
1	1	1	1	1	1	1	7.8830
2	1	2	2	2	2	2	7.8536
3	1	3	3	3	3	3	8.1146
4	1	4	4	4	4	4	5.0954
5	2	1	2	3	4	4	8.3767
6	2	2	1	4	3	3	6.3950
7	2	3	4	1	2	2	8.5760

8	2	4	3	2	1	8.6407
9	3	1	3	4	2	3.6290
10	3	2	4	3	1	4.1613
11	3	3	1	2	4	4.1351
12	3	4	2	1	3	5.2340
13	4	1	4	2	3	1.7500
14	4	2	3	1	4	0.6381
15	4	3	2	4	1	3.3268
16	4	4	1	3	2	3.4672
K_1	7.237	5.410	5.470	5.583	6.003	
K_2	7.997	4.762	6.198	5.595	5.881	
K_3	4.290	6.039	5.256	6.030	5.373	
K_4	2.296	5.609	4.896	4.612	4.561	
R	5.701	1.277	1.077	—	—	

表 5 正交试验结果的方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	86.143	3	2.814	3.860	*
B	3.261	3	0.107	3.860	
C	2.435	3	0.080	3.860	

3.5 验证实验

3.5.1 酸解法测定威兰胶-淀粉混合溶液中威兰胶质量浓度

取一定量的威兰胶-淀粉混合溶液在最优(pH 为 1.0,温度为 95℃,时间为 180 min)条件下酸解,冷却后测各组分质量浓度。通过碘量法^[18]测得剩余淀粉的质量浓度为 0.089 6 g/L,淀粉的去除率为 99.10%;通过乙醇法提取,提取物充分烘干后称量,计算提取物产量,得威兰胶的质量浓度为 8.742 4 g/L,威兰胶的保留率为 87.42%,其差值为:8.652 8 g/L,与正交实验结论相差不大,证明酸解法可作为测定混有淀粉的威兰胶溶液中威兰胶产量的一种方法。

3.5.2 酸解法测定不同配比的威兰胶-淀粉混合溶液中威兰胶质量浓度

在以淀粉作为碳源生产威兰胶实验中,根据威兰胶发酵液经乙醇沉淀后,淀粉和威兰胶各组分分配不同质量浓度配比的威兰胶-淀粉混合溶液,通过酸解、冷却后乙醇提取,测提取物产量,并计算混合溶液中威兰胶的质量浓度:威兰胶产量 = 酸解后提取物产量(g/L)/87.51%,结果如表 6 所示。

表6 酸解法测定威兰胶质量浓度

不同质量浓度配比的威兰胶-淀粉混合溶液	酸解法测得威兰胶质量浓度/(g·L ⁻¹)	误差/%
5 g/L 威兰胶溶液与 5 g/L 淀粉溶液	4.86	2.8
7.5 g/L 威兰胶溶液与 5 g/L 淀粉溶液	7.60	1.3
10 g/L 威兰胶溶液与 5 g/L 淀粉溶液	9.82	1.8

由表6可知,威兰胶-淀粉混合溶液经酸解法测得的威兰胶质量浓度与真实值相差较小,误差在5%以内。因此在利用淀粉发酵生产威兰胶的实验中,可先采用乙醇法提取,得到混有淀粉的威兰胶,通过酸解法,可以准确确定发酵液中威兰胶的质量浓度。当前部分研究人员用碘量法^[13]检测发酵液中淀粉的质量浓度^[9],利用碘与淀粉发生显色反应,通过测吸光度来确定淀粉的质量浓度,进而确定威兰胶的质量浓度。但是在以淀粉作为碳源发酵生产威兰胶实验中,淀粉先通过糊化使淀粉分子分散,然后变成糊精,再继续分解,供鞘氨醇单胞菌利用,中间物糊精不能使碘显色,但同样可以随乙醇沉淀^[19],使碘量法测得的数据不准确。但酸解法可以将淀粉充分水解变成葡萄糖,葡萄糖在乙醇沉淀时不会随威兰胶沉淀,使测得的威兰胶质量浓度更准确。

4 结论

以廉价的淀粉作为碳源进行的鞘氨醇单胞菌发酵生产威兰胶的实验中,采用乙醇法提取威兰胶时,未被完全利用的淀粉会随威兰胶一起沉淀,增加了威兰胶的测量值;通过比较吸附法、酸解法、酶解法对威兰胶溶液的影响和对淀粉的去除效果,结果表明酸解法最优。采用单因素实验和正交实验优化酸解实验条件,优化结果为:pH=1.0,温度为95℃,时间为180 min,在此条件下,淀粉的去除率达到99.19%,威兰胶的保留率为87.51%。经碘量法验证:威兰胶-淀粉混合溶液在最优条件下酸解,淀粉的去除率和威兰胶的保留率与正交实验所得结果相符;利用该方法测定不同质量浓度配比的威兰胶-淀粉混合溶液中威兰胶产量,测量误差在5%以内。本实验为去除威兰胶中的淀粉及准确测定含淀粉的

发酵液中威兰胶的质量浓度提供了一种有效方法,对威兰胶的纯化及量化具有参考价值。

参考文献

- [1] 李莎,徐虹,石宁宁. 微生物聚多糖 PS-238 合成条件的研究[J]. 食品与发酵工业,2004,30(12):6-9.
- [2] 贾薇,郑志永,刘汝冰,等. 一种新型微生物多糖流变学初探[J]. 食品科学,2009,30(1):135-138.
- [3] 李莎. 威兰胶发酵工艺优化及结构性能的研究[D]. 南京:南京工业大学,2005.
- [4] 陈芳,李建科,徐昶. 新型微生物多糖-韦兰胶的流变特性影响因素研究[J]. 食品科学,2007,28(9):49-52.
- [5] Kang K S, Veeder G T. Heteropolysaccharide S-130: US,4342866 [P]. 1982-08-03.
- [6] 胡国华. 新型食品胶在我国的应用现状及前景[J]. 中国食品添加剂,2005,11(COO):33-42.
- [7] 蒋芸. 新型微生物多糖威伦胶的发酵工艺研究[D]. 江苏:江南大学,2008.
- [8] Li S, Xu H, Li H, et al. Optimizing the production of welan gum by *Alcaligenes faecalis* NX-3 using statistical experiment design[J]. African Journal of Biotechnology, 2010,9(7):1024-1030.
- [9] Bajaj I B, Saudagar P S, Singhal R S, et al. Statistical approach to optimization of fermentative production of gellan gum from *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006,102(3):150-156.
- [10] 田钟荃,翁元声. 活性炭吸附淀粉及强制放电再生的研究[J]. 建筑技术通讯(给水排水),1989,15(6):12-16.
- [11] 沈建福,吴晓琴. 马铃薯酸解淀粉的研究[J]. 浙江农业大学学报,1997,23(3):297-300.
- [12] 李志达,陈剑锋,张蓉真,等. 双酶协同作用酶解淀粉制取麦芽低聚糖的工艺研究[J]. 中国粮油学报,1994,9(4):48-54.
- [13] 郝晓敏,王遂,崔凌飞. α-淀粉酶水解玉米淀粉的研究[J]. 食品科学,2006,27(2):141-143.
- [14] 李兴革,李志江,牛广财,等. 利用糖化酶水解马铃薯淀粉生产糖浆的工艺研究[J]. 中国酿造,2010,29(6):59-62.
- [15] 宋宝祥,孙德文. 硅藻土在造纸业的用途与开发应用现状[J]. 中国非金属矿工业导刊,2010,25(02):7-11.
- [16] 姬彬. 威兰胶发酵及其流变性研究[D]. 江苏:江南大学,2012.
- [17] 吉武科,赵双枝,董学前,等. 新型微生物胞外多糖-韦兰胶的研究进展[J]. 中国食品添加剂,2011,17(1):210-215.
- [18] Nampoothiri K M, Singhanian R R, Sabarinath C, et al. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis* [J]. Process Biochemistry, 2003,38(11):1513-1519.
- [19] 吴胜旭,徐勇,寇秀颖. 微波-乙醇沉淀法制备抗性糊精工艺研究[J]. 农业机械,2011,18(12):114-116. ■