浙江科技学院学报,第 33 卷第 3 期,2021 年 6 月 Journal of Zhejiang University of Science and Technology Vol. 33 No. 3, Jun. 2021

doi: 10.3969/j. issn. 1671-8798. 2021. 03.008

姜汁凝乳的研究进展

鲍文娜1,2,陈 怡1,潘海峰3,刘士旺1,2

(1. 浙江科技学院 生物与化学工程学院,杭州 310023;2. 浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室,杭州 310023;3. 博顺科技(浙江)有限公司,浙江 湖州 313002)

摘 要:姜汁凝乳作为传统甜品得到众多消费者的青睐,但其凝乳机理仍存在争议。对此,在剖析生姜组分及姜醇、姜酚、姜烯等主要活性成分的基础上,结合姜汁凝乳的制备工艺,综述分析姜汁添加量、温度等关键影响因素:姜汁添加量 会影响牛奶中 κ -酪蛋白的分解程度,温度会影响分子运动,进而影响牛奶凝乳状况;并最终总结得到生姜的主要凝乳成分是生姜蛋白酶,生姜是通过水解作为牛奶中酪蛋白胶束外壳的 κ -酪蛋白使其失去稳定性形成凝胶的凝乳机理。

关键词: 生姜;凝乳;生姜蛋白酶;κ-酪蛋白

中图分类号: TS252.5 文献标志码: A 文章编号: 1671-8798(2021)03-0234-05

Research progress on ginger-juice milk curd

BAO Wenna^{1,2}, CHEN Yi¹, PAN Haifeng³, LIU Shiwang^{1,2}

 School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, Zhejiang, China;
Zhejiang Provincial Key Laboratory for Chemical and Biological Processing Technology of Farm Produce, Hangzhou 310023, Zhejiang, China;
Boshun Technology(Zhejiang) Co., Ltd, Huzhou 313002, Zhejiang, China)

Abstract: Ginger-juice milk curd is favored by many consumers as a traditional dessert, but the study on coagulated mechanism of ginger juice remains controversial. In this regard, based on analyzing the components of ginger and the main active materials such as gingerol, shogaol and zingiberene in combination with the preparation technology of ginger-juice milk curd, this study analyzed the key influencing factors such as the addition amount of ginger juice and temperature. It is found that the addition amount of ginger juice may affect the degree of hydrolysis of κ -casein in milk, and the temperature can affect the molecular movement, eventually affecting the coagulated situation of milk. Finally, it is concluded that the main coagulated component of ginger is ginger protease, and the coagulated mechanism works when the ginger is hydrolyzing κ -casein which serves as the outer shell of casein micelle in milk,

收稿日期: 2020-09-24

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LQ19C200001);浙江省重点研发计划项目(2020C02052)

通信作者:刘士旺(1964—),男,江苏省连云港人,教授,博士,主要从事食品生物技术和农副产品生物加工技术研究。E-mail:liushiwang@zust.edu.cn。

leading to its loss of stability and formation of the curd.

Keywords: ginger; milk coagulation; ginger protease; κ -casein

姜汁加入适温的牛奶中静置,可得姜汁凝乳,俗称姜撞奶。它是一种广东、福建等地盛行的传统甜品,其口味醇厚、风味独特[1],具有暖胃、驱寒、抗菌、促进血液循环、增强免疫力等作用[2],兼具牛奶和生姜的营养价值,颇受消费者喜爱。姜汁中有凝乳成分,可作为天然凝乳剂。人们对姜汁凝乳成分及其机理的研究日益深入,但凝乳机理尚存争议,故本综述在剖析生姜主要组分及活性功能的基础上,结合对姜汁凝乳制备工艺中影响因素的分析,探讨其凝乳成分并总结其凝乳机理。

1 生姜组分及活性功能的研究

生姜原产于太平洋群岛,是草本植物姜的根茎,姜属于姜科薯芋类^{[3]36},品种多样,在中国河南、山东、广东等地也有种植。虽然中国生姜产量很高,但对其综合利用程度很低^[4]。它的根茎肥厚、扁平,有辛辣味,既可作为调味品,也可作为中药,还能作为天然食品添加剂,具有化痰止咳、消炎抗菌、抗肿瘤、降血糖、改善血液循环等功效^[5]。生姜的主要成分包括淀粉、脂类、蛋白质和无机化合物,其风味特征是由其单萜和倍半萜化合物决定的^[6]。它含有丰富的蛋白质、多糖、维生素及胡萝卜素和钙、铁、磷等营养物质^[7],还含有大量可溶性膳食纤维。研究发现,每 100 g 生姜(可食部分)中,含蛋白质 1.4 g、糖 8.8 g、脂肪 0.7 g、钙 20 mg、铁 7.0 mg、维生素 B1 0.01 mg、维生素 C 4 mg、胡萝卜素 0.18 g、磷 45 mg 及尼克酸 0.4 mg 等^{[3]37}。

生姜主要功能活性成分包括生姜蛋白酶、姜醇、姜酚、姜烯、黄酮等物质,此外,还含有抗菌成分,新鲜姜汁对大肠杆菌、啤酒酵母、青霉有较明显的抑菌效果^[8]。由于生姜中含有酚类、β-二酮基类、姜辣素、二苯基庚烷等物质,因此具有抗氧化作用^[9],它们能够抑制体内过氧化脂质的生成并清除自由基^[10],姜辣素类物质的抗氧化活性大于维生素 E,用有机溶剂提取生姜得到的提取物极性越大,抗氧化活性则越大。生姜对不同癌细胞均有抑制作用,其抗癌作用主要是通过调节多种信号分子来实现的^[11]。姜烯可以刺激胃黏膜合成内源性胃蛋白酶原并释放,内源性胃蛋白酶原具有保护细胞的作用,从而保护胃黏膜,起到健胃止吐的作用。姜烯酚和姜醇具有消炎镇痛、驱寒活血的作用,可减轻牙痛、缓解偏头痛,生姜泡酒能缓解关节炎的疼痛。此外,生姜具有驱寒活血的功效,还能降低血液中胆固醇的含量,从而降低血脂、促进血液循环。

2 姜汁凝乳的制备工艺及影响因素研究

姜汁凝乳的工艺路线是:牛奶制备→调节 pH→杀菌→与姜汁(纱布过滤)冲浆混合→混匀后静置→观察。在制备过程中要注意选择无伤痕、无异味、能储存—段时间的老姜。

目前,姜汁凝乳的市场普及率不高且相关研究也较少,对其工艺研究主要集中在复合物添加比例和凝乳机理等方面。钟红梅等[12]通过单因素及正交试验来测定姜汁凝乳的质构指标、感官指标、持水力等,发现牛奶温度、姜汁添加量、pH、氯化钙添加量都会影响姜汁凝乳的口感和品质。王文亮等[13]发现除了姜汁添加量和凝乳温度、氯化钙添加量之外,柠檬酸添加量也会影响姜汁凝乳的效果。张卫佳等[14]研究了姜汁添加量、冲浆温度、酸度及杀菌条件等因素对姜汁凝乳效果的影响,发现姜汁添加量和温度是影响姜汁凝乳效果的主要外部因素。而张佳程等[15]认为影响姜汁凝乳效果的主要外部因素是温度和 pH,干酪素和氯化钙是凝乳促进物。综上,影响姜汁凝乳效果的主要因素有姜汁添加量、温度、pH、氯化钙等。

从理论上分析,姜汁添加量越大,则生姜蛋白酶含量越高,牛奶中 κ -酪蛋白被分解得越多,疏水性通道也随之增多,那么进入的凝乳促进物离子如 Ca^{2+} 也增加, α_{s1} -酪蛋白的活性部位变多,因此姜汁添加量的增加可使酪蛋白凝聚成完整的凝块,凝乳的效果更好。但姜汁添加量若过高会造成辣味过重,影响姜汁凝乳的口感及品质,因此要选择适宜的姜汁添加量。温度可影响生姜蛋白酶的活性,蛋白酶具有较高的最适温度(60 \mathbb{C})。除此之外,温度还与分子运动有关,随着温度的升高,分子运动加剧,增加了胶束间的碰撞,从而增加结合部位,进而增大凝块强度^[16]。当 pH 值小于 5.0 时,牛奶发生酸凝乳,其凝乳状态

与姜汁凝乳不同; 当 pH 值大于 6.0 时,凝乳效果随 pH 值增大而变差,因此最佳 pH 值为 5.0~6.0^{[15]58}。温度和 pH 可影响生姜蛋白酶活性,为取得较好的凝乳效果,要选择合适的温度和 pH 范围。Ca²⁺可进入酪蛋白胶束的疏水通道促进凝乳,因此添加了 CaCl₂ 的牛奶凝乳时间缩短且效果好。

3 姜汁凝乳机理的研究

3.1 生姜凝乳成分

人们对姜汁凝乳成分及其机理的研究日益深入,但也有所争议。唐琳等^[17]发现姜汁水浸提液和水蒸气蒸馏液具有显著的凝乳功能,这与其中含有蛋白酶、姜醇等物质有关。张平平等^[18]分别利用挥发油及生姜蛋白酶粗提物进行凝乳试验,其结果是前者无法使奶凝固,而后者可行。曾剑超等^[19]分别利用生姜蛋白酶粗提液、姜精油和姜油树脂进行凝乳试验,发现只有生姜蛋白酶提取物有凝乳效果,后两物均无法凝乳。现有研究表明,姜汁中的生姜蛋白酶是主要的凝乳因子^[20],且姜醇、姜烯酚、副姜油酮等物质对凝乳起辅助作用^[21]。生姜蛋白酶具有较高的凝乳活性和蛋白酶活性,从凝乳活性、蛋白酶活性和对 κ-酪蛋白的特异性等方面来看,生姜蛋白酶是一种很有发展前景的类凝乳酶蛋白酶,它作为凝乳酶在乳品工业中具有替代和催化的潜在用途,可用于奶酪和乳制品的生产。

3.2 生姜蛋白酶

生姜根茎中含有蛋白酶 GP-I 和 GP-II,现已确定 GP-II 的完整氨基酸序列和 GP-I 约 98%的氨基酸序列^[22]。生姜蛋白酶是半胱氨酸蛋白酶,与木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶、菠萝蛋白酶、猕猴桃蛋白酶同属于木瓜蛋白酶超家族,其中猕猴桃蛋白酶和生姜蛋白酶所产生的凝乳纹理特性与小牛皱胃凝乳酶相似^[23]。这些肽酶被合成为带有信号肽和 N(氨基)端前肽区的酶原或非活性前体,并通过蛋白水解裂解激活,然后从酶中分离出 N 端片段或 pro(酶原)区域^[22]。生姜蛋白酶中半胱氨酸残基上的巯基是其能凝固牛乳的活性部位,使用生姜作为凝乳酶,既利用了中国产量大但利用率低的生姜资源,又能降低产品的生产成本。除此之外,生姜蛋白酶还能水解肉类、酒类中的蛋白质从而达到嫩化肉类、澄清酒类的效果^[24]。

生姜蛋白酶提取方法主要有超滤法和有机溶剂沉淀法。超滤技术利用超滤膜能去除酶促褐变反应产生的酚类物质,防止酶促褐变^[25],超滤法操作简单、效率高、安全、成本低,用它得到的生姜蛋白酶活性高,适合工业化生产。用有机溶剂提取生姜蛋白酶常用的沉淀剂为丙酮、硫酸铵、单宁等,这种方法提取纯度高,但成本高、效率低。因此可采取超滤法与有机溶剂相结合来达到提取生姜蛋白酶的目的^[26],提取得到的生姜蛋白酶浓缩液利用弱阴离子交换树脂对生姜蛋白酶进行纯化^[27]。

生姜蛋白酶能水解 α_{s1} -、 κ -、 κ -酪蛋白, α_{s1} -酪蛋白对生姜蛋白酶最敏感, κ -酪蛋白具有比 α_{s1} -和 β -酪蛋白更高的水解特异性,且随着温度的升高,生姜蛋白酶对 κ -酪蛋白的特异性也升高。 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 能抑制生姜蛋白酶的活性,而 Ca^{2+} 、乙二胺四乙酸和二硫苏糖醇能激活生姜蛋白酶 $[^{28]}$ 。目前对生姜蛋白酶的研究及利用较少,在人们越来越追求天然、绿色的食品添加剂的背景下,生姜蛋白酶作为食品添加剂可成为产品的优势,利用生姜中蛋白酶的凝乳作用,结合生姜与牛乳二者的优势,制备功能性酸奶和干酪具有现实意义。

3.3 生姜凝乳的分子机理

牛乳蛋白中 80%是酪蛋白,它主要由 α_{s1} -酪蛋白、 α_{s2} -酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白组成。 α_{s1} -酪蛋白的疏水性较强,带有较多的丝氨酸磷酸化残基位点,能与 Ca^{2+} 结合,是钙敏感性蛋白质。 α_{s2} -酪蛋白在所有酪蛋白中亲水性最强,其结构中带有 3 簇负电荷的磷酸丝氨酸和谷氨酸残基。 β -酪蛋白是所有酪蛋白中疏水性最强的,其 N 端含有负电荷磷酸化丝氨酸簇,能与 Ca^{2+} 结合,C(羧基)端非常疏水,占整个链长的 3/4。 κ -酪蛋白的亲水性较强,只有一个磷酸丝氨酸残基,没有苏氨酸糖苷化残基,对 Ca^{2+} 不敏感,凝乳酶可水解 Phel05-Metl06 残基之间的肽键,产生副 κ -酪蛋白(κ -CN)[29]。

牛乳中 95%以上的酪蛋白以悬浮胶体的形式存在,胶束呈球形,其直径约为 40~300 nm。关于酪蛋白胶束的结构模型较多,有套核模型、内部结构模型、亚单元模型、Holt模型、双结合模型等^[30],现公认的酪蛋白胶束的结构模型是,酪蛋白胶束中心主要由疏水性较强的 $α_{s1}$ -酪蛋白和 β-酪蛋白组成,能结合

 Ca^{2+} ,它们通过疏水区域相互作用形成疏水核心,胶粒外层主要是由亲水的 κ-酪蛋白组成,形成亲水区域,阻挡住了中央疏水性核心,进而防止乳浆中 Ca^{2+} 与胶粒中心的 $α_{s1}$ -酪蛋白和 β-酪蛋白的结合,从而使得酪蛋白胶束以相对稳定的胶体悬浮液形式存在。从以上分析中可以看出,κ-酪蛋白是酪蛋白胶束得以稳定的原因,若将 κ-酪蛋白降解,可解除外层的亲水保护,暴露胶束中心的 $α_{s1}$ -酪蛋白和 β-酪蛋白,使之与 Ca^{2+} 结合,最终导致凝乳 $[^{31}]$ 。

姜汁中含有生姜蛋白酶,目前对姜汁凝乳机理的研究主要集中在生姜蛋白酶方面。生姜蛋白酶与凝乳酶的作用机理类似,只是酶的性质和作用位点不同。凝乳酶水解 κ-酪蛋白在 Phe105-Met106 之间的肽键,释放亲水 C 端的酪蛋白巨肽,使酪蛋白胶束不再稳定,从而导致牛奶凝结^[29]。生姜蛋白酶的水解性质受底物特性、温度等因素影响^[32]。当水解底物为 κ-酪蛋白单体且温度高于 60 °C 时,Ala90-Glu91 和 His102-Leu103 是生姜蛋白酶的首选靶键,其次为 Thr121-Ile122,它们分别产生 κ-CN(f1-90)、κ-CN(f1-102)和 κ-CN(f1-121)的 N 末端疏水性肽段。但若水解底物为 κ-酪蛋白单体且温度较低时,水解特异性降低,除产生上述 3 种肽段外,还会产生分子量高于 κ-CN(f1-121)的产物。当水解底物为脱脂乳体系时,生姜蛋白酶几乎不能水解 $α_{s1}$ -酪蛋白、 $α_{s2}$ -酪蛋白和 β-酪蛋白,而是主要作用于 κ-酪蛋白的 Thr121-Ile122 肽键,产生 N 末端的副 κ-酪蛋白 κ-CN(f1-121)和 C 末端的酪蛋白巨肽,使酪蛋白失去稳定性而凝结成凝胶^[33],酪蛋白颗粒越小,形成的凝胶强度则越大^[34]。

综上所述,姜汁凝乳的分子机理是:生姜蛋白酶可水解酪蛋白胶束亲水外层 κ-酪蛋白的 Thr121-Ile122 肽键,产生 N 末端的副 κ-酪蛋白 κ-CN(f1-121)和 C 末端的酪蛋白巨肽,降低酪蛋白胶束之间静电 斥力和空间位阻作用,破坏了酪蛋白胶粒的稳定性,使得胶束疏水中心的 $α_{s1}$ -酪蛋白和 β-酪蛋白暴露。生姜蛋白酶水解形成的酪蛋白巨肽是可溶的,可直接释放到乳清中。当大多数 κ-酪蛋白被降解时,副 κ-酪蛋白 κ-CN(f1-121)、 $α_{s1}$ -酪蛋白和 β-酪蛋白在牛乳中 Ca^{2+} 的作用下,彼此之间形成"钙桥",酪蛋白相互凝聚,最终产生凝胶。

4 展 望

现有研究表明,生姜具有消炎抗菌、改善血液循环等功能,对人体健康有益,生姜蛋白酶作为生姜中的主要凝乳成分,除了凝乳作用之外,还具有嫩滑肉类、澄清酒类的作用,具有广泛的应用前景。同时,姜汁凝乳制备工艺、凝乳因子成分及其凝乳作用方式也已明确,但目前对姜汁凝乳机理的研究停留于酶凝乳阶段。姜汁凝乳是在酸化与生姜蛋白酶共同作用下诱导形成的,即酸酶共促凝乳,它涉及酸化和酶解两个因素及其相互作用,但目前对酸酶共促凝乳的机理尚未明确,研究难度较大。因此研究姜汁凝乳的风味特征、流变学和结构学性质,并通过数学模型表征它们之间的相互作用,可进一步明确姜汁的酸酶共促凝乳机理,加快生姜蛋白酶在乳品工业中的应用,以替代价格较昂贵的小牛皱胃凝乳酶,有效提高中国生姜的利用率。此外,生姜蛋白酶易失活,在明晰其凝乳机理的基础上,如果能提高它的稳定性,则可进一步降低成本,扩大它的应用领域,提高生姜的利用价值。

5 结 语

姜汁凝乳具有暖胃、驱寒、促进血液循环、增强免疫力和抗菌等作用,姜汁凝乳机理的研究为干酪生产中凝乳酶的开发提供了新思路。现有研究表明生姜中的主要凝乳因子是生姜蛋白酶,同时姜醇、姜烯酚、副姜油酮等物质也有一定的凝乳作用。对姜汁凝乳的风味物质、流变学、结构学性质及其相互作用的研究可进一步明确姜汁凝乳机理,这也许是未来研究的热点与方向。

参考文献:

- [1] 曾剑超,马力,吴希茜,等.姜撞奶的研制[J]. 乳业科学与技术,2007(6):298.
- [2] LI H J, LIU Y N, LUO D, et al. Ginger for health care: an overview of systematic reviews[J]. Complementary Therapies in Medicine, 2019(45):114.

- 「3」 陈艳,杜红霞. 生姜营养价值及加工应用研究进展「JT. 中国果菜,2018,38(12):36-37.
- [4] 李莉峰,徐立伟.生姜综合利用研究进展及前景分析[J].农业科技与装备,2011,99(7):17.
- [5] AWE F B, FAGBEMI T N, IFESAN B O T, et al. Antioxidant properties of cold and hot water extracts of cocoa, hibiscus flower extract, and ginger beverage blends[J]. Food Research International, 2013, 52(1):490.
- [6] CHARI K L N, MANAA D, SRINIVAS P, et al. Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from ginger [J]. Food Chemistry, 2013, 139(1/2/3/4):509.
- [7] GHAFARLO M H, JOUKI M, TABARI M. Production and characterization of synbiotic Doogh, a yogurt-based Iranian drink by gum arabic, ginger extract and B. bifidum[J]. Journal of Science and Technology-Mysore, 2020, 57(3):1159.
- [8] ALTAMIMI J, ALFARIS N, ALOUSA L, et al. Pollen beverage from date palm spathe: impact of fortification with ginger on the nutritional and sensory quality of the product[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2020.14(4):2053.
- [9] 黄雪松,王建华,路福绥.生姜抗氧化作用的研究[J].食品工业科技,1997(4):17.
- [10] MANCINI S, PREZIUSO G, BOSCO A D, et al. Modifications of fatty acids profile, lipid peroxidation and antioxidant capacity in raw and cooked rabbit burgers added with ginger[J]. Meat Science, 2017(133):158.
- [11] ELASHMAWY N E, KHEDR N F, ELABAHRAWY H A, et al. Ginger extract adjuvant to doxorubicin in mammary carcinoma; study of some molecular mechanisms[J]. European Journal of Nutrition, 2017, 53(3);981.
- [12] 钟红梅,陈炼红.姜撞奶加工工艺研究[J].西南民族大学学报,2017,43(4):347.
- [13] 王文亮,祝清俊,吕铁信,等.姜汁乳的工艺研究[J].现代食品科技,2007,23(10):56.
- [14] 张卫佳,陈家树,章幸愉.姜汁凝乳的制备工艺与凝乳机理探讨[J].广东农业科技,2010,37(7):124.
- [15] 张佳程,王珏,万广伟,等. 姜汁凝乳影响因素的研究[J]. 食品与发酵工业,2005,31(10):58-59.
- [16] 纪丽莲,丁红军.姜汁凝乳的研制[J].中国乳品工业,1997,255(2):10.
- [17] 唐琳, 樊庆义. 姜汁凝乳的研究[J]. 山东师大学报(自然科学版), 1999, 14(3); 312.
- [18] 张平平,黄雪松,刘宪华.姜汁凝乳的研究[J].中国乳品工业,1999,27(5):18.
- [19] 曾剑超,马力,吴希茜.姜汁凝乳的研究和展望[J].酿酒,2007,34(5):59.
- [20] 刘艳艳. 姜汁凝乳的实验研究[J]. 食品研究与开发,2012,33(8):3.
- [21] 姜子涛,李荣.姜辣素化学及其研究进展[J].食品研究与开发,1998,3(1):8.
- [22] HASHIM M M, DONG M S, IQBAL M F, et al. Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease [J]. Phytochemistry, 2011, 72(6):458.
- [23] MAZORRA-MANZANO M A, PEREA-GUTIERREZ T C, LUGO-SANCHEZ M E, et al. Comparision of the milk-clotting properties of three plant extracts[J]. Food Chemistry, 2013, 141(3):1902.
- [24] GONZAL B N, BADILLO-CORONA J A, ARANDA-BARRADS J S, et al. Production of plant proteases in vivo and in vitro: a review[J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(6):983.
- [25] 范金波,侯宇,黄训文,等.生姜蛋白酶的分离、纯化及酶学性质研究[J].食品与发酵工业,2014,40(5):65.
- [26] 陈玮,田欣.生姜蛋白酶的提取及应用[J].食品安全导刊,2017(33):118.
- [27] KIM M, HAMILTON S E, GUDDAT LW, et al. Plant collagenase: unique collagenolytic activity of cysteine proteases from ginger[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2007, 1770(12): 1628.
- [28] HUANG X W, CHEN L J, LUO Y B, et al. Purification, characterization, and milk coagulating properties of ginger proteases[J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94(5):2259.
- [29] 刘显庭,秦倩,罗洁,等. 凝乳形成过程及其流变与结构性质的研究进展[J]. 中国奶牛,2017(7):54.
- [30] 方海田,德力格尔桑,刘慧燕.牛乳中酪蛋白胶束结构理论模型的研究进展[J].农业科学研究,2006,27(3):86.
- [31] 曾剑超. 姜汁凝乳机理的探讨[D]. 成都: 西华大学, 2008:15.
- [32] 范金波,侯宇,黄训文,等.生姜蛋白酶的凝乳作用及相关机理探讨[J].食品与发酵工业,2014,40(2):63.
- [33] RAYNAL K, PARK Y W, GAUCHERON F, et al. Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk[J]. Small Ruminant Research, 2007, 68(1):217.
- [34] DEVOLD T G, VEGARUD G E. Importance of casein micelle size and milk composition for milk gelation[J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93(4):1447.