

产葡聚糖明串珠菌的分离鉴定及发酵条件研究

王英, 黄开红, 李思睿, 马艳弘, 李莹, 周剑忠*

(江苏省农业科学院 农产品加工研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 从实验室保存的开菲尔粒中分离筛选高产葡聚糖菌株。经乳酸菌的初筛和胞外多糖产糖量分析, 筛选出一株能高产葡聚糖的菌株, 命名 T-L1, 结合形态学特征和 16S rRNA 的序列分析, 将该菌株鉴定为明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*), 采用单因素和正交试验对该菌发酵条件进行优化研究, 结果表明该菌的最佳发酵条件发酵温度为 28 ℃、发酵时间为 24 h、接种量体积分数为 5%, 培养基起始 pH 值为 6.5。在此优化条件下, 葡聚糖的产量为 30.12 g/L, 比优化前提高了 41%。

关键词: 分离; 鉴定; 葡聚糖; 肠膜明串珠菌; 正交试验

中图分类号: TQ 92 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2012)07-0727-06

Isolation and Identification of Dextran-Producing Strain and Study of Fermentation Conditions

WANG Ying, HUANG Kai-hong, LI Si-rui, MA Yan-hong, LI Ying, ZHOU Jian-zhong*

(Institute Agro-product processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: In this study, a dextran-producing strain T-L1, was isolated from kefir by by lacto-bacillus screening and dextran yeild analysis. Then strain T-L1 was identified as *Leuconostoc mesenteroides* by the morphological properties and 16S rRNA sequence. Furthermore, the single factor experiments and orthogonal experiments were adopted to optimize the nutrients and environmental conditions for increasing production of dextran by strain T-L1. The optimum conditions for dextran production listed as follows; the initial pH 6.5, the fermentation temperature 28 ℃, the inoculation volume 5% and the fermentation time 24 h. Under the optimum condtions, the titer of dextran was achieved at 30.12 g/L, higher 41.08% than that of the control.

Key words: Isolation, identification, dextran, *Leuconostoc mesenteroides*, orthogonal experiment

明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 存在于蔬菜、甘蔗、饲料和多种发酵食品等各种植物材料

中, 在各种乳制品和功能性食品中作为有益菌得到广泛应用, 是食品生物技术中表达不同蛋白的优良

收稿日期: 2011-07-20

基金项目: 国家 863 计划项目(2011AA100903)。

作者简介: 王英 (1978-) 女, 安徽濉溪人, 理学硕士, 助理研究员, 主要从事食品生物技术领域研究。E-mail: wy116009@126.com

* 通信作者: 周剑忠(1965-), 男, 江苏溧阳人, 工学博士, 研究员, 主要从事食品生物技术领域研究。E-mail: zhoujianzhong97@yahoo.com.cn

候选菌^[1],明串珠菌常被用于黄油、发酵乳以及干酪的发酵生产^[2]。明串珠菌产生的CO₂,使干酪变得松软,有较好的口感。肠膜明串珠菌和乳明串珠菌特异的柠檬酸盐代谢,产生双乙酰和芳香族物质,有助于乳制品风味的形成^[3-4],可作为非发酵菌株与其他乳酸菌互配发酵。

右旋糖酐是明串珠菌的右旋糖酐蔗糖酶催化蔗糖聚合而成的一种葡聚糖,具有免疫抗癌作用,是一种具有重要医用价值的产品,有不少研究者致力于它的开发研究^[5]。生产葡聚糖的方法较多,有微生物发酵生产、酶催化合成和分解、从植物或真菌中提取或从酵母中制取,但以微生物发酵生产为佳^[6-7]。

此外,明串珠菌代谢果糖产生甘露醇,甘露醇代谢不需要胰岛素,故可以制成适合糖尿病人的食品。利用“膜细胞循环生物反应器”可以大大提高明串珠菌代谢果糖生成甘露醇的产量^[8]。明串珠菌还可以产生K族维生素治疗疾病,并用于叶酸的发酵生产^[9]。某些明串珠菌菌株能够代谢产生细菌素及其它多种抑菌成分,对志贺菌属、沙门菌属、金黄色葡萄球菌等常见致病菌有拮抗作用。

目前的研究表明,明串珠菌在乳制品、食品和医药行业具有重要价值,但在生理、生物学特性和工业用途方面仍然存在菌株差异,所以筛选、鉴定具有优良特性的明串珠菌菌株仍然是未来的工作方向之一。加强明串珠菌菌株的筛选、鉴定、代谢和生理特性的基础研究工作,可以为商业性发酵剂的规模化生产提供新的优良菌株和资源。

作者从开菲尔中筛选出一株能利用蔗糖产葡聚糖的菌种,经鉴定为肠膜状明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*),并对其发酵产葡聚糖的条件进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验材料 开菲尔粒:作者所在实验室保存。

1.1.2 主要试验仪器 LRH-150生化培养箱:上海恒科技有限公司产品;JJ500精密电子天平:美国双杰兄弟集团有限公司产品;UV/V-16/18型紫外/可见分光光度计:上海美普达仪器有限公司产品;SW-CJ-1C型双人单面净化工作台:苏州佳宝净化

工程设备有限公司产品;SYQ-DSX-280B型不锈钢手提式压力蒸汽灭菌器:上海申安医疗器械厂产品;101A-型数字显示式干燥箱:上海浦东荣丰科学仪器有限公司产品。SIGMA 3K-15台式冷冻离心机:北京欣惠泽奥科技有限公司产品;ZD-2型自动电位滴定仪:上海雷磁电子仪器厂产品。

1.1.3 培养基 MRS培养基^[10],分离培养时添加溴甲酚紫作为指示剂;筛选培养时将MRS培养基原始配方中的20.0g葡萄糖改为5.0g,并加50.0g蔗糖,其他组分不变,不加琼脂为产糖发酵培养基。糖发酵培养基及其它鉴定试验培养基均参照文献^[11]。

1.2 实验方法

1.2.1 产葡聚糖菌株的筛选 无菌条件下取1g开菲尔粒在研钵中研碎后进行系列梯度稀释,10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵5个梯度,取后3个稀释度,采用涂布法在加有指示剂溴甲酚紫的MRS培养基平板上进行菌种分离,菌株生长产酸使培养基的PH值变低,指示剂溴甲酚紫会由紫色变为黄色,挑取使培养基变黄的单菌落,在平板上划线分离,反复纯化,经革兰氏染色和接触酶反应,挑出革兰氏阳性、接触酶阴性菌株斜面保存。将上述分离的乳酸菌分别接种于添加蔗糖的MRS培养基平板上,30℃培养,筛选出能在平板上产生粘液的菌株。

1.2.2 胞外多糖的分离提取 胞外多糖的提取参照文献^[12-13]并作适当改进。取10mL发酵液于离心管中,冷冻离心去除菌体。上清液分别用蛋白酶等处理以脱除蛋白,再添加3倍体积的冷乙醇于上清液中,4℃下静置过夜。冷冻离心得沉淀物,用冷乙醇洗涤沉淀物数次,再于90℃下干燥得胞外多糖粗提物。

1.2.3 胞外多糖的定量分析 采用苯酚-硫酸法^[14]以葡萄糖作标准曲线,490nm检测波长。同样的操作,取1mL的样品液,测定490nm吸收值,由标准曲线计算多糖含量。

1.2.4 菌株的鉴定 形态学和生理生化特征:根据凌代文等的乳酸菌种鉴定方法进行鉴定。

16S rDNA遗传学鉴定:乳酸菌基因组的提取方法参照文献^[15]进行。16S rDNA的PCR扩增方法参照文献^[16]进行。16S rDNA扩增产物经纯化后,以16S rDNA的通用引物为测序引物,委托上海生物工程有限公司进行测序。登陆NCBI

(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/),进行同源性比较。

1.2.5 产糖条件研究

1) 发酵温度对合成葡聚糖产量的影响 在产糖培养基起始 pH 为 6.8、接种体积分数为 3%、发酵时间为 28 h 的前提下,研究不同发酵温度(22、25、28、31、34、37 °C)对合成葡聚糖产量的影响。

2) 发酵时间对合成葡聚糖产量的影响 在产糖培养基起始 pH 为 6.8、接种体积分数为 3%、发酵温度为 30 °C 的前提下,研究不同发酵时间(12、16、20、24、28、32 h)对合成葡聚糖产量的影响。

3) 培养基起始 pH 对合成葡聚糖产量的影响 在接种量为 3%、发酵温度为 30 °C、发酵时间为 28 h 的前提下,研究产糖培养基的不同起始 pH(5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)对合成葡聚糖产量的影响。

4) 接种量对合成葡聚糖产量的影响 在产糖培养基起始 pH 为 6.8、发酵温度为 30 °C、发酵时间为 28 h 的前提下,研究不同接种量(1%、2%、3%、4%、5%、6%)对合成葡聚糖产量的影响。

5) 产葡聚糖发酵条件的优化 根据上述单因素多水平试验结果,选择影响菌体生长和葡聚糖产量较为显著的发酵温度、发酵时间、培养基起始 pH、接种量为正交试验因素,设计四因素三水平 [$L_9(3^4)$]正交试验(见表 1),以合成 EPS 的产量为试验指标,分析确定其优化发酵条件。

表 1 正交试验设计因素水平表

Tab. 1 Factors and levels in the orthogonal experiments

水平	因素			
	A 发酵温度/°C	B 发酵时间/h	C 接种量/%	D 培养基起始 pH 值
1	26	22	3	6.3
2	28	24	4	6.5
3	30	26	5	6.7

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

采用涂布法在加有指示剂溴甲酚紫的 MRS 培养基平板上进行菌种分离,菌株生长产酸使培养基的 PH 值降低,指示剂溴甲酚紫会有紫色变为黄色,根据颜色的变化初步分离出菌株 15 株,经过革

兰氏染色镜检、接触酶反应得到革兰氏阳性杆菌,接触酶阴性、无芽孢符合乳酸菌特性的 6 株菌,将 6 株菌在添加蔗糖的 MRS 培养基平板上划线接种培养,其中有一株能产粘液,命名为 T-L1。对其进行多糖提取,多糖产量为 21.35 g/L。

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 形态学及生理生化鉴定 通过形态观察和生理生化性质测定,T-L1 菌株菌体细胞呈球状,革兰氏染色呈阳性,无芽孢;菌落较小、扁平、光滑、灰白色;接触酶试验、运动性试验、吲哚试验、明胶液化试验、硫化氢产生试验、淀粉水解试验、硝酸盐还原试验、产气性能试验、精氨酸产氨试验均为阴性,无细胞色素,不能在 pH 值 4.8 以下生长,能发酵蔗糖产葡聚糖,能发酵果糖、葡萄糖、糖原、麦芽糖、棉籽糖、核糖、山梨糖、山梨醇、海藻糖、半乳糖、甘油、乳糖、和鼠李糖产酸,不发酵阿拉伯糖、七叶苷、纤维二糖、甘露醇、甘露糖、松三糖、水杨苷木糖。参照《乳酸菌分类鉴定及实验方法》,初步鉴定为肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)。

2.2.2 16S rDNA 序列分析 以菌株 T-L1 基因组总 DNA 为模板,采用通用 16S rDNA 引物进行 PCR 扩增,得到约 1.5 kb 的特异性扩增产物。扩增产物委托上海生物工程有限公司测序,测序结果提交至 GenBank,获得登录号为 HM484330,菌株 T-L1 的 16S rDNA 序列与 GenBank 中已登陆的 16S rDNA 序列进行同源性比较,结果显示菌株 T-L1 与肠膜明串珠菌属(*Leuconostoc mesenteroides*)的 16S rRNA 序列同源性超过 99%,一般来讲,在种分类等级上,如果 2 个分类单位间的 16S rRNA 序列同源性大于 97.5%,则认为属于同一个种^[17-18]。结合菌株的形态学和生理学特性,参照《伯杰氏细菌鉴定手册》^[19],最终可确定菌株 T-L1 为肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)。

2.3 T-L1 摇瓶发酵葡聚糖条件研究

2.3.1 发酵温度对合成葡聚糖产量的影响 温度是影响细胞生长繁殖和发酵合成葡聚糖的重要因素之一。发酵温度不同,菌株的生长及其合成葡聚糖的产量亦明显不同。一般菌体浓度与合成葡聚糖的产量成正相关。发酵温度过低,菌体生长缓慢,菌体浓度不高,从而影响葡聚糖的产量;发酵温度过高,菌体培养后期容易衰老而自溶,菌体浓度亦不高,也会影响葡聚糖的合成。由图 1 可知,不

同发酵温度条件下菌株 T-L1 合成葡聚糖的产量不同,发酵温度在 28 °C 时葡聚糖产量处于最大值,在低于 28 °C 时随着温度的升高,葡聚糖产量增加,但温度高于 28 °C 时葡聚糖产量开始下降,因此,菌株 T-L1 合成葡聚糖的适宜发酵温度是 28 °C。

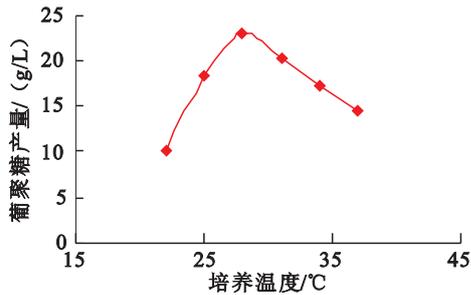


图 1 发酵温度对葡聚糖产量的影响

Fig. 1 Effects of fermentation temperature on the yield of dextran

2.3.2 发酵时间对合成葡聚糖产量的影响 图 2 是发酵时间对葡聚糖产量的影响结果,从图中可以看出发酵时间长短对葡聚糖的产量影响较大。在不同的发酵时间菌株 T-L1 合成葡聚糖的产量不同。发酵时间在 28 h 时葡聚糖产量处于最大值,但比发酵 24 h 的葡聚糖产量增加不明显,在发酵前期,葡聚糖产量较低,这种现象说明在对数生长期由于培养基的营养物质较充足,而有利于菌体生长繁殖,却不利于葡聚糖的积累。发酵后期,菌体会分泌多糖降解酶而降低葡聚糖的产量。考虑能耗,菌株 T-L1 合成葡聚糖的适宜发酵时间 24 h。

2.3.3 培养基起始 pH 对合成葡聚糖产量的影响

培养基起始 pH 高低对菌体生长繁殖与葡聚糖的合成影响亦较大。发酵液 pH 值的变化主要影响发酵过程中各种酶的活性,当 pH 值抑制菌体中某些酶的活性时,会阻碍菌体的新陈代谢。pH 值不同,引起菌体代谢过程不同,使代谢产物的产量和比例发生改变。许多研究证实,在接近中性偏酸的 pH 条件下,葡聚糖生物合成量较大^[20]。由图 3 可知,在培养基不同起始 pH 条件下菌株 T-L1 合成葡聚糖的产量不同。培养基的起始 pH 在 6.5,即弱酸性条件时,使发酵液中葡聚糖产量达到最大值;培养基的 pH 越接近中性偏碱条件,葡聚糖产量越低,当 pH 在超过 7.5 时葡聚糖产量较低;当培养基的 pH 过低时,一方面分泌的多糖酶类有降解葡聚糖的作用^[21],另一方面 pH 值的降低会因失去脂质载

体中间体而使葡聚糖的合成受阻^[22]。综上所述,合成葡聚糖的培养基适宜 pH 值为 6.5。

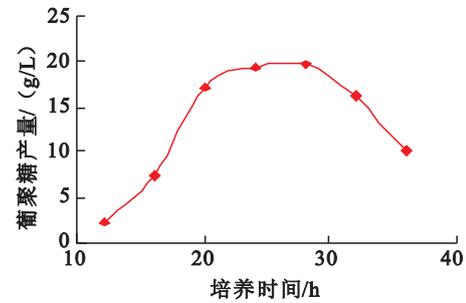


图 2 发酵时间对葡聚糖产量的影响

Fig. 2 Effects of fermentation time on the yield of dextran

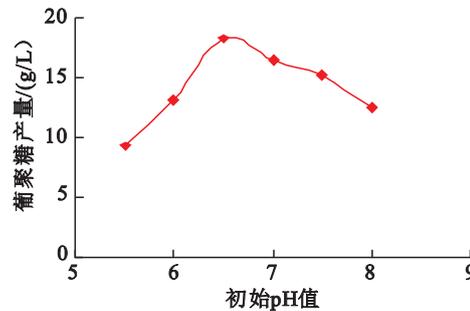


图 3 培养基初始 pH 值对葡聚糖产量的影响

Fig. 3 Effects of starting pH on the yield of dextran

2.3.4 接种量对合成葡聚糖产量的影响 接种量的大小直接影响在定量培养基中菌体的生长速度或菌体浓度,进而影响菌体的生理状态和酶的产量。适宜的接种量有利于菌体合理利用有限的营养物质进行大量繁殖。由图 4 可知,不同的接种量菌株 T-L1 合成葡聚糖的产量不同。

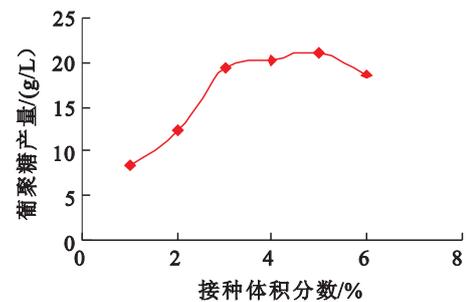


图 4 接种量对葡聚糖产量的影响

Fig. 4 Effects of inoculating rate on the yield of dextran

接种体积分数在 5% 时葡聚糖产量处于最大值;接种量小于 3% 时葡聚糖的产量处于较低水平;当接种量超过 4% 时葡聚糖产量急剧下降。这是由于接种量过高,发酵前期会使菌体生长过快、菌浓

度过高,中后期会因营养物质消耗殆尽而导致合成葡聚糖的前体物质的减少,从而降低葡聚糖的产量。综上所述,菌株 T-L1 合成葡聚糖的适接种量是 5%。

2.3.5 产葡聚糖发酵条件的优化 T-L1 菌株合成葡聚糖发酵条件除了受培养基的营养成分影响外,主要受发酵时间、发酵温度、培养基起始 pH 和接种量 4 个因素的影响。以发酵液中的葡聚糖产量为试验指标,按照表 1 进行试验,结果接分析见表 2。

表 2 优化发酵条件正交试验结果

Tab.2 Methods and results in the orthogonal test of the fermentation conditions optimization

因素	A 发酵 温度/℃	B 发酵 时间/h	C 接种量/ %	D 培养基 起始 pH	葡聚糖 产量/ (g/L)
1	1	1	1	1	12.25
2	1	2	2	2	18.33
3	1	3	3	3	16.41
4	2	1	2	3	23.57
5	2	2	3	1	28.31
6	2	3	1	2	27.55
7	3	1	3	2	20.15
8	3	2	1	3	22.31
9	3	3	2	1	19.55
K ₁	46.99	55.97	62.11	60.11	
K ₂	79.43	68.95	61.45	66.03	
K ₃	62.01	63.51	64.87	62.29	
K _{1/3}	15.66	18.66	20.70	20.04	
K _{2/3}	26.48	22.98	20.48	22.01	
K _{3/3}	20.67	21.17	21.62	20.76	
R	10.82	4.32	1.14	1.97	

由表 2 极差分析可知发酵温度是影响葡聚糖合成的最主要因素,发酵时间次之,接种量影响最小。同时从表中可以得出菌株 T-L1 发酵产葡聚糖的最优组合是 A2B2C3D2,即发酵温度为 28℃、发酵时间为 24 h、接种量为 5%,培养基起始 pH 值为 6.5。在该条件下,葡聚糖的产量为 30.12 g/L。

3 结 语

从开菲尔中分离到一株能够高产葡聚糖菌株,经形态学特征和 16SrRNA 的序列分析,将该菌株鉴定鉴定为肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*)。

通过单因素和正交实验对该菌株产葡聚糖的发酵条件进行优化研究,得到该菌的最佳发酵条件发酵温度为 28℃、发酵时间为 24 h、接种体积分数为 5%,培养基起始 pH 值为 6.5,在该条件下,葡聚糖的产量为 30.12 g/L,比优化前提高了 41%。

作者分离筛选出一株高产葡聚糖的明串珠菌,并对其发酵产糖条件进行了初步的研究,为菌株的进一步开发利用提供了理论基础,为开发新产品,尤其是明串珠菌在功能性食品(包括益生制品)方面的研究提供了优良的菌种资源。

参考文献(References):

[1] Heroine D, Foucaud C. *Leuconostoc* characteristics use in dairy technology and prospects in functional food[J]. **International Dairy Journal**, 2004, 14: 467-494.

[2] Jorge I S, Beatriz M, Ana R. Rational selection of *Leuconostoc* strains for mixed starters based on the physiological biodiversity found in raw milk fermentations[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2005, 105: 377-87.

[3] Vrdamuthu E R. The dairy leuconostoc; Use in dairy products[J]. **Dairy Science**, 1994, 77: 2725-2737.

[4] Ogier J C, Casalta E, Farrokh C, et al. The *Leuconostoc* genus[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2008, 126: 286-290.

[5] Kingfeng Bao, Jinyou Duan, Xuya Fang, et al. Chemical modifications of the (1-3)- α -D-glucan from spores of *Ganodema lucidum* and investigation of their physico-chemical properties and immunological activity[J]. **Chinese Academy of Sciences**, 2001, 336(2): 127-140.

- [6] 赵光远, 殷蔚申, 吴小荣. 用废啤酒酵母制备碱不溶性葡聚糖的研究[J]. 微生物学通报, 1997, 24(3): 148—152.
ZHAO Guang-yuan, YIN Wei-shen, WU Xiao-rong. Studies on hydrolysis of brewer's grains by cellulose[J]. **Microbiology**, 1997, 24(3): 148—152. (in Chinese)
- [7] 刘媛媛, 王强, 刘红芝. 酵母产细胞壁多糖分批发酵条件优化与发酵动力学[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(6), 941—947.
LIU Yuan-yuan, WANG Qiang, LIU Hong-zhi. Fermentation conditions optimization and kinetics analysis for cell wall polysaccharides production of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(6), 941—947. (in Chinese)
- [8] Weyman N, Hujanen M, Leisola M. Production of D • mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria [J]. **Process Biochem**, 2002, 37: 1207—1213.
- [9] Sybesma W. Effect of cultivation conditions on folate production by lactic bacteria [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2003, 69: 452—458.
- [10] 刘慧. 现代食品微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006.
- [11] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [12] Savadogo A, Cheik A, Savadogo O P. Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples[J]. **African Journal of Biotechnology**, 2004, 3(3): 189—194.
- [13] Zhen nai Yang, Eine Huttmen, Mikael Staaf. Separation, purification and characterisation of extracellular polysaccharides produced by slime-forming *Lactococcus/act/s* ssp. *cremoris* strains[J]. **International Dairy Journal**, 1999, 9(9): 631—638.
- [14] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术(第二版)[M]. 杭州: 浙江大学出版, 1999.
- [15] Giorgio G. An evaluation of chelex based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria[J]. **J Microbiol Meth**, 2000, 42: 175—184.
- [16] 王英, 滕齐辉, 崔中利. 免耕水稻土壤中细菌多样性及其空间分布的研究[J]. 土壤学报 2007, 44(1): 137—143.
WANG Ying, TENG Qi-hui, CUI Zhong-li, et al. Diversity and spatial distribution of bacteria in non-tillage paddy fields [J]. **Acta Pedologica Sinica**, 2007, 44(1): 137—143. (in Chinese)
- [17] Clayton R A, Sutton G, Hinkle P S, et al. Intraspecific variation in small-subunit 16S rRNA sequences in GenBank why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa[J]. **Int J Syst Bacteriol**, 1995, 45(3): 595—599.
- [18] Kolbert C P, Persing D H. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens[J]. **Curt Microbiol**, 1992, 2(3): 229, 305.
- [19] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [20] 刘慧, 张红星, 代娟. 藏灵菇嗜热链球菌高产胞外多糖发酵条件的优化研究[J]. 中国酿造, 2007, 6: 41—45.
LIU Hui, ZHANG Hong-xing, DAI Juan. Optimization of exopolysaccharide production conditions fermented by *Streptococcus thermophilus* from Tibetan kefir[J]. **China Brewing**, 2007, 6: 41—45. (in Chinese)
- [21] 刘丽波, 刘宁, 孟祥晨. 影响乳酸菌胞外多糖合成的因素[J]. 中国乳品工业, 2004, 32(2): 32—35.
LIU Li-bo, LIU Ning, MENG Xiang-chen. Studies on synthesis conditions for improving the yield of EPS[J]. **China Dairy Industry**, 2004, 32(2): 32—35. (in Chinese)
- [22] Jolly L, Stingel E. Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria in Dairy[J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2001, 11: 733—746.