

## Bakteriyel Ekstraselüler Polisakkaritler (EPS)<sup>1</sup>

Murat Yılmaz<sup>2</sup>, Gökçen Yuvalı Çelik<sup>3</sup>

### EPS' in Genel Özellikleri

Mikroorganizmalar intraselüler (depo) polisakkaritler, ekstraselüler (EPS) polisakkaritler, ve yapısal formdaki polisakkaritler olmak üzere 3 ayrı polisakkarit türü sentezlemektedirler. EPS (ekzopolisakkaritler) formları hücre duvarı ile birleşmiş olabilen kapsüller veya büyük miktarlarda hücre duvarı dışında biriken ve kültür ortamına yayılan bağımsız salgılar olarak üretilen yapılardır (1, 2).

Bakteriyel EPS'ler genellikle immunojeniktirler. *In vitro* çalışmalarda EPS'lerin varlığı katı besi ortamlarında mukoid koloni, sıvı besi ortamlarında ise oldukça viskoz bir görünüm ile tespit edilmektedir (3).

Bakterinin dış yüzeyini kaplayan EPS kapsül veya slim formda olabilir Kapsüller EPS bakteri hücre yüzeyindeki fosfolipid veya lipid-A moleküllerine kovalent bağ ile bağlanmaktadır (4, 5). EPS'ler suda çözünen polimerlerdir ve doğada iyonik ya da iyonik olmayan yapılarda bulunabilirler (6).

EPS'ler glikozid bağları ile birbirine bağlı olan şeker ünitelerinden oluşmaktadır. Bakteriyel EPS'lerin çoğunluğu düzenli oligosakkaridlerin tekrarlanan birimlerinden oluşmuş heteropolisakkarid yapıda, bazı bakteriyel EPS'ler ise tek tip şekerden meydana gelen bir homopolisakkarid yapıdadır. EPS'yi oluşturan homopolisakkaridlerin çoğunluğu nötr olmasına rağmen bir çok bakteriyel EPS negatif yük taşır ve yüksek kütleye sahiptir. Ayrıca polisakkaridler hidrofilik özellik taşımakla birlikte çoğu polimerler lipofilik, hidrofilik ve biyofilm yapısında olabilen heterojenlerdir (3, 6-8).

EPS'deki yapısal ve düzenleyici genlerin üretimi kromozomal veya plasmid DNA kodlu olabilir. EPS üretimini düzenlenmesi oldukça komplekstir ve hem pozitif hem de negatif regülatörler içermektedir. Bu regülatörlerden bazıları global regülatörlerdir. Bunlar hücre dışı enzimler gibi diğer hücre metabolizmalarının sentezini de düzenlemektedir. Ozmolarite ve dehidrasyon gibi dış uyarıların etkisiyle EPS üretimi etkilenmektedir (9).

---

<sup>1</sup> Bu çalışma, 2006 yılında Yrd. Doç. Dr. Gökçen Yuvalı Çelik danışmanlığında tamamlanan "Bazı *Bacillus* Türlerinin Ekzopolisakkarid (EPS) Üretimleri" adlı yüksek lisans tezinden düzenlenmiştir.

<sup>2</sup> Yüksek Lisans Öğrencisi, <sup>3</sup>Yrd. Doç. Dr. Niğde Üniv. Fen Edebiyat Fakül. Biyoloji Bölümü, Kampüs- Niğde. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: [gycelik@niigde.edu.tr](mailto:gycelik@niigde.edu.tr)

EPS'ler bakterinin olumsuz çevre şartlarından korunmasını ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlamaktadır. Polisakkaritler, üretici suşlar tarafından katabolize edilemediklerinden enerji kaynağı değildirler, buna karşılık mikroorganizmayı veya ortamı kurumaya karşı korur, zararlı veya düşman bir ortamdan uzaklaştırırlar (10, 11). EPS, bakteriyi koruyucu bir örtü şeklinde sarmakta ve olası tehlikelere karşı onları korumaktadır. EPS'nin bakteriyi koruma özelliği ayrıca antibiyotiklere karşıda fiziksel bir koruyuculuk şeklinde de ortaya çıkmaktadır. Ortamdaki metalik iyonların tutulmasını sağlarlar ayrıca bitki, insan ve hayvan patojenlerinin ürettikleri EPS'lerin virulans faktörler oldukları da bilinmektedir (3, 12). Aynı zamanda bitkilerle bakteriler arasında bir etkileşim aracıdır. Sonuç olarak yüksek moleküler yapıya sahip EPS şekli koloninin direncini ve kararlılığını ortaya koymaktadır (13).

## **EPS Biyosentezi**

Polisakkaritler, bakteri şuşlarının çoğalmaları sırasında suşa ve çoğalma evresinin farklı kademelerine göre değişen koşullarda sentezlenir. Sentez olayı hücre dışında olduğu kadar membranda da meydana gelebilir (1). EPS sentezinin Sutherland tarafından önerilen genel modele göre gerçekleştiği düşüncesi ağırlık kazanmıştır. EPS'lerin oluşumunda (14);

- UDP-glukoz-dehidrogenaz
- glukozil-transferaz
- galaktozil – transferaz 1 ve 2
- polimeraz gibi polisakkarit sentezine özgü olmayan birçok enzim görev alır.

Heteropolisakkaridler hücre içinde sentezlenirler ve daha sonra hücre dışına çıkarılarak hücrenin etrafını sararlar. Bu işlemler için birçok enzimin varlığına ihtiyaç duyulur. Bu enzimlerden bazıları lipopolisakkaridlerin sentezinde de kullanılmaktadır. Nötral homopolisakkaridlerin sentezi farklıdır. Örneğin, nötral levan ve dekstran homopolisakkarid'in sentezi birbirinden farklıdır. Hücre dışında üretilen bu EPS'ler sukroz varlığında sırasıyla, levansukraz ve dekstransukraz enzimlerinin aktivitesi ile ekstraselüler olarak üretilmektedirler (4).

Sutherland, üretilen polimerin molekül ağırlığının, bakterinin çoğalma miktarının fonksiyonu olarak değiştiğini bildirmiştir (14).

EPS üretiminde bulunan yapısal genlerin keşfi, EPS üretiminin plasmid yeri için delil sağlamıştır (15, 16). Bunun tersine termofilik yoğurt bakterileri için, EPS üretiminin kromozomlar tarafından kodlandığı bulunmuştur (17-19).

## **EPS' in Kullanım Alanları**

Pek çok mikroorganizma, ekstraselüler polimerik araçların biyosentezi tarafından fonksiyonel bir konsorsiyum oluştururlar ve biofilm olarak isimlendirilen EPS'ler sentezlerler. Bu ürün bakterilerin koloniler olarak büyümelerine yardım eden, besleyiciler ile konuşlanmış sert yüzeylere tutunmalarını sağlayan yapılardır (20, 21). Bu EPS'ler ya bakteri yüzeyine tutulu olarak kalırlar ya da yapışkan bir şekilde ekstraselüler ortamlarda serbest olarak bulunurlar. Jel formasyonu flokulasyon,

emülsiyon, absorpsiyon, film formasyonu ve koruma gibi pek çok rolü sahip bu polimerler biyolojik aktif biyofilm, matriksinin yapı materyalidir (22).

EPS'ler yeni işlevsellikleri ile pek çok ilginç fiziki, kimyasal ve rehological (maddenin sıvı halindeki özellikleri) özelliklerinden dolayı yeni biyomateryaller gibi hareket ederler ve tekstil, deterjan, yapıştırıcı, mikrobiyal olarak zenginleştirilmiş petrol iyileştirmeleri (NEOR), atık su iyileştirmeleri, dere yatağı temizlemeleri, mayalanma, akarsu işleme sürecinde, kozmetik, eczacılık ve gıda katkı maddesi olarak oldukça geniş kullanım alanlarına sahiptirler (22-24 ).

Ayrıca biyofilm özelliği gösteren EPS'ler bakteriyi deterjanlara ve antibiyotiklere karşı dirençli hale getirirler (25-29). Yine biyofilm bakteriyi yalnızca dış ortamdan koruyarak yaşayabilmesi için değil aynı zamanda genetik özelliklerinin korunmasında ve genetik bilgi değişiminde de daha iyi ortamlar hazırlamaktadır (30).

Bu polimerleri sadece bakteriyi saran bir biyofilm tabakası olarak fonksiyon göstermeyip ticari amaçla da kullanılmaktadır. EPS'ler aynı zamanda insanoğlu üzerinde anti-tümör (31), antivirüs, ve ateş düşürücü etmen olarak, ilaç sanayisinde de kaplama materyali olarak pek çok fizyolojik aktivitelere katkıda bulunurlar ayrıca interferon, trombosit yığınları birikmesi ve faktör sentezlerini uyaran koloniler için teşvik edici olarak kullanılırlar. 40.000-70.000 Da gibi düşük mol ağırlıklı olanlar tıpta en çok kullanılanlardır. Dekstran-demir kompleksi anemi vakalarında, dekstran-kalsiyum kompleksi ise hayvan beslemede hipokalsemi tedavisinde kullanılır. Ağ yapılı sephadeks dekstranlar ise, biyolojik maddelerin saflaştırılması ve fraksiyonlara ayrılmasında devreye girerler (6, 32).

Yapılan çalışmalar sonucunda EPS'lerin bağırsak florasını düzenlediği, kolesterolü düşürdüğü ve antiülser aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (8, 38). Aynı zamanda kimya alanında inceltici olarak ve farmokolojinin bir çok alanında da EPS'den yararlanılmaktadır (7).

Yoğun çalışmaların konusu olan ve günümüzde ticaret ürünü olarak pazarlanan farklı biyopolimerler şunlardır; *Xanthomonas campestris* tarafında sentezlenen ksantan zamkı, *Sphingomonas paucimobilis* tarafından sentezlenen gellan, *Pseudomonas türleri* ve *Acetobacter chorococcum* tarafında sentezlenen alginatlar, *Acetobacter xylinium* bakterisi tarafından sentezlenen bakteriyel selüloz, *Streptococcus equii* tarafından sentezlenen hiyaluronik asit ve *Rhizobium* tarafından sentezlenen süksinoglikan gibi ürünler yaygın bir kullanım alanına sahiptirler (32, 34).

Bakteriler haricinde pek çok mantarda gelişimi boyunca glikoz ile ekstraselüler homopolimer sentezi yapmaktadır. Mantarlar tarafından üretilen bu polimerlerde gıda, kozmetik ve ecza endüstrilerinde ticari kullanım alanları bulurlar. Ayrıca  $\beta$  (1→3) ve  $\beta$  (1→3;1→6) mantarimsı glikan tiplerinin anti-tümör (31), anti-inflamatuar ve immunodilasyon aktivitelerine sahip oldukları bilinmektedir (35, 36).

## EPS Üreten Mikroorganizmalar

Son yıllarda yeni mikrobiyal EPS'lerin araştırmasına büyük önem verilmiş, mikroorganizmaların birçoğunun değişen kompozisyonlarda ekzopolisakkarit

ürettikleri rapor edilmiştir (7, 32, 34, 47). Bu EPS'lerin çoğunun ilginç ve faydalı özellikler içerip içermediği araştırılmıştır (22).

Mikrobiyal EPS'lerin, birçok bakteri ve maya cinsleri tarafından üretildikleri ve bu ürünlerin karbon kaynakları için yarışan metabolitler oldukları bildirilmektedir (7, 38).

EPS'ler toprak, deniz, tatlı su gibi farklı çevresel örneklerden izole edilen, *Bacillus* 'lar, *Pseudomonas* 'lar, *Lactobacillus* 'lar ve *Azotobacter* 'ler gibi daha birçok bakteri tarafından sentezlenmektedir (7).

Bitki patojeni olan cinslerin birçoğu (*Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Ralstonia* ve *Xanthomonas*) EPS üretimi gerçekleştirebilen bakterilerdir (37). Yine *Xanthomonas campestris* tarafından ksantan zamkı, *Sphingomonas paucimobilis* tarafından gellan, *Pseudomonas türleri* ve *Acetobacter chorococcum* tarafında alginatlar, *Acetobacter xylinium* bakterisi tarafından bakteriyal selülozlar, *Streptococcus equii* tarafından hiyaluronik asit ve *Rhizobium* tarafından süksinoglikan sentezlenmektedir (32, 34). Alginat, amilovorana, selüloz, levan, marginalan, stevartan, süksinoglikan ve ksantan zammının tam yapıları bilinmektedir. Bu EPS'ler genellikle endüstriyel amaçla üretilir ve ticari olarak gıda sanayisinde ve diğer bazı alanlarda kullanılmaktadır (7, 39).

*Escherichia coli*'nin 80 adedin üzerinde farklı EPS sentezlediği, diğer bir çok türün ise tek veya daha fazla sayıda EPS ürettikleri bildirilmektedir (40).

Bazı araştırmacılar tarafından *Bacillus* türleri tarafından oldukça viskoz ve üstün pseudoplastik özelliklere sahip EPS'lerin üretildiği rapor edilmiştir (41).

Maugeri ve arkadaşları, halofilik, termotolerant bir *Bacillus* suşunu (B3-15) izole etmişler ve bu suşun %0,6 glikoz varlığında EPS (165 mg/L) ürettiğini bildirmişlerdir (42).

Yapılan bir diğer çalışmada, haloalkalofilik bir *Bacillus* sp. I-450 suşu tarafından pseudoplastik özelliğe sahip EPS üretimi olduğu tespit edilmiştir (43).

Bakteriler haricinde pek çok mantarda gelişimi boyunca glikoz ile ekstraselüler homopolimer ürettikleri (35) ve bunların en çok üretilen mantarimsı glikan,  $\beta$  (1→3; 1→6)-glikan, *Sclerotium rolfsii* (44) ve *S. glaucanicum* tarafından üretilen sikleroglikandır (45).

*Botryosphaeria* sp. odunumsu mantarının tek karbon kaynağı olarak glikozu kullanarak  $\beta$ -glikan ürettiği rapor edilmiştir (46).

## Kaynaklar

- 1- Sutherland I. W., 1998. Novel and Established Applications of Microbial Polysaccharides, *Tibtech.*, 38, 41-47.
- 2- Ramesh H. P. and Tharanathan R. N., 2003. Carbohydrates the Renewable Raw Materials of High Biotechnological Value, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 23, 149-173.

- 3- Gugliandolo C., Maugeri TL., Cacamo D., Stackebrandt E., 2003. *Bacillusaeolius* sp. Nov a Novel Thermophilic, Holophilic Marine *Bacillus* Species from Eolian Islands (Italy), Systematic and Applied Microbiology, 26/2, 172-176.
- 4- Sutherland I.W., 1990. *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides*, Cambridge University Press, Cambridge.
- 5- Costerton J. W., Lewandowski Z., DeBeer D., Caldwell D., Korber D., and James G., 1994. Biofilms the Customized Microniche, J. Bacteriol. 176, 2137-2142.
- 6- Calazans G. M. T., Lopes C. E., Lima R. M. O. C., de Franc FP., 1997. Antitumor Activities of Levans Produced by *Zymomonas mobilis* Strains, Biotechnol Lett, 19, 19-21.
- 7- Lee I.Y., Seo W. T., Kim G. J., Kim M. K., Ahn S. G., Kwon G. S., Park Y. H., 1997. Optimization of Fermentation Conditions for Production of Exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*, Bioprocess and Biosystems Engineering, 16/2, 71-75.
- 8- Kenne L., and Lindberg B., in Aspinnall G.O., ed., 1983 pp. The Polysaccharides, vol. 2, Academic Press, New York, 287-363.
- 9- Shankar S, Ye RW., Schlichtman D., Chakrabarty AM., 1995. Exopolysaccharide Alginate Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Enzymology and Regulation of Gene Expression, Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol., 70, 221-255
- 10- Moriello VS., Lama L., Poli A., Gugliandolo C., Maugeri TL., Gambacorta A., Nicolaus B., 2003. Production of Exopolysaccharides from a Thermophilic Microorganism Isolated from a Marine Hot Spring in Flegrean Areas, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 30/2, 95-101.
- 11- Ophir T., and Gutnick D. L., 1994. A Role for Exopolysaccharides in the Protection of Microorganisms from Desiccation, Appl. Environ. Microbiol., 60, 740-745.
- 12- Denny T. P., 1995. Involvement of Bacterial Polysaccharides in Plant Pathogenesis, Annu. Rev. Phytopathol., 33, 173-197.
- 13- <http://www.bioline.org.br/request?bf98002>
- 14- Sutherland I. W., 1977 pp. Microbial Exopolysaccharide synthesis, In Extracellular Microbial Polysaccharide (eds Sanford, P. A. and Laskin, A.) Am. Chem. Soc., Washington., 40-57.
- 15- Van Kranenburg R., J. D. Marugg., I. I. Van Swam., N. J. Willem, and W. M. de Vos., 1997. Molecular Characterization of the Plasmid-Encoded EPS gene cluster Essential for Exopolysaccharide Biosynthesis in *Lactococcus lactis*. Mol. Microbiol., 24, 387-397.
- 16- Van Kranenburg R., H. R. Vos. I. I., Van Swam, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos., 1999a. Functional Analysis of Glycosyltransferase Genes from *Lactococcus lactis* and other Gram-Positive Cocci: Complementation, Expression, and Diversity. J. Bacteriol., 181, 6347-6353.
- 17- Lamothe G. T., 2000. Molecular Characterization of Exopolysaccharide Biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. PhD thesis, L'Universite de Lausanne, Lausanne, Switzerland,
- 18- Almiron-Roing, E., F. Mulholland, M. J. Gasson, A. M. Griffin., 2000. The Complete EPS Gene Cluster from *Streptococcus thermophilus* NCFB 2393 Involved in the Biosynthesis of a New Exopolysaccharide. Microbiol, 146, 2793-2802.
- 19- Stingle F., R. R. Neeser., and B. Mollet, 1996. Identification and Characterization of the EPS (Exopolysaccharide) Gene Cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. J. Bacteriol, 178, 1680-1690.
- 20- Costerton J. W., Cheng K. J., Geesey G. G., Ladd T. I., Nickel J. C., Dasgupta M., et al., 1987. Bacterial Biofilms in Nature and Disease, Annu Rev Microbiol., 41, 435-64.

- 21- Kumar C. G., Anand S. K., 1998. Significance of Microbial Biofilms in Food Industry: a Review., *Int J Food Microbiol*, 42, 9-27.
- 22- Yalpani M., Sandford P. A., 1987 p. Commercial Polysaccharides: Recent Trends and Developments. In: Yalpani M., editor, *Industrial Polysaccharides Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 311-35.
- 23- Sutherland I. W., 1998. Novel and Established Applications of Microbial Polysaccharides, *Trends Biotechnol*, 16, 41-46.
- 24- Becker A., Katzen A., Pühler L., Ielpie. 1998. Xanthan Gum Biosynthesis and Application: a Biochemical/Genetic Perspective, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 145-152.
- 25- Wolfaardt G., Lawrence J., Roberts R., Caldwell S., Caldwell D., 1994. Multicellular Organization in a Degradative Biofilm Community, *Appl. Env. Microbiol.*, 60, 434-446.
- 26- Costerton J., Lewandowski Z., Caldwell D., Korber D., Lappin-Scott H., 1995. Microbial Biofilms, *Annu. Rev. Microbiol*, 49, 711-745.
- 27- Davey M., O'Tool G., 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics, *Microbiol. Mol. Rev.*, 64, 847-867.
- 28- Stewart P., Costerton J. W., 2001. Antibiotic Resistance in Biofilms, *Lancet*, 358, 135-138.
- 29- Krylova T., Popova L., Pechurkin N., Kashperova T., Belyavskaya V., 2000. Population Heterogeneity of Plasmidbearing and Plasmid-Free *Bacillus subtilis* Strains Under Different Environmental Conditions, *Microbiologia*, 69, 220-224.
- 30- Moller S., Sternberg C., Andersen J., Christensen B., Ramos J., Givskov M., Molin, S., 1998. Insituexpression in Mixed-Culture Biofilms: Evidence of Metabolic Interactions Between Community Members, *Appl. Environ. Microbiol*, 64, 721-732.
- 31- Kitazawa H., T. Toba T., Itoh N., Kumano S., Adachi and T., Yamaguchi, 1991. Antitumoral Activity of Slime-Forming, Encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Isolated from Scandinavian Ropy Sour Milk, "villi", *Animal Sci. Technol.*, 62, 277-283.
- 32- Margaritis A., Pace G. W., Microbial Polysaccharides. In: Blanch H. W., Drew S., Wang D. I. C., editors, 1985 p. *Comprehensive Biotechnology*, vol. 3. *The Practice of Biotechnology: Current Commodity Products*. Oxford: Pergamon Pres., 1005-44
- 33- Nakajima H., Y. Suzuki, H. Kaizu, and T. Hirota, 1992a. Cholesterol Lowering Activity Of Ropy Fermented Milk. *J. Food. Sci*, 57, 1327-1329.
- 34- Sutherland I. W., 1996 p. Extracellular Polysaccharides. In: Rehm H. J., Reed G., editors. *Biotechnology*, Weinheim VCH., 6, 615-57.
- 35- Wasser S. P., 2002. Medicinal Mushrooms as a Source of Antitumor and Immunomodulating Polysaccharides, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 258-274.
- 36- Hosono A. J., Lee A., Ametani M., Natsume M., Hirayama T., Adachi and S. Kaminogawa, 1997. Characterization of a Water-Soluble Polysaccharide Fraction With Immunopotentiating Activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 312-316.
- 37- Fett W. F., 1993. Bacterial Exopolysaccharides their Nature Regulation and Role in Host-Pathogen Interactions, *Curr. Top. Bot. Res*, 1, 367-390.
- 38- Tavernier P., Portais J. C., Nava Saucedo J. E., Courtois J., Courtois B. and Barbotin J. N., 1997. Exopolysaccharide and Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Coproduction in two *Rhizobium Meliloti* Strains, *Appl. Environ. Microb.*, 63, 21-26.

- 39- Sutherland I.W., in Swings J.G. and Civerolo E.L., eds., 1993 pp. Xanthomonas, Chapman & Hall, London, 363-388.
- 40- Roberts I. S., 1996. The Biochemistry and Genetics of Capsular Polysaccharide Production in Bacteria, Annual Review of Microbiology, 50, 285-315.
- 41- Mitsuda S., Miyata N., Hirota T., Kikuchi T., 1981. High viscosity polysaccharide produced by *Bacillus polymyxa*. Hakkokogaku, 59, 303-309
- 42- Maugeri TL., Gugliandolo C., Caccamo D., Panico A., Lama L., Gamb A., 2002. Halophilic Thermotolerant *Bacillus* Isolated from a Marina Hot Spring, Biotechnology Letters, 24/7, 515-519
- 43- Kumar, C. G., Joo, H-S, Choi, J-W, Koo, Y-M, Chang, C-S., 2004. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450. Enzyme and Microbial Technology, 34, 673-681.
- 44- Farina J. I., Sineriz F., Molina O.E., and Perotti N. I., 1998. High Scleroglucan Production by *Sclerotium rolfsii*: Influence of Medium Compozition, Biotechnol. Lett., 20, 825-831.
- 45- Selbmann L., Crognale S., and Petruccioli M., 2002. Exopolysaccharide Production from *Sclerotium gluconicum* NRRL 3006 and *Botryosphaeria rhodina* DABAC-P82 on Raw and Hydrolysed Starchy Materials, Lett. Appl. Microbiol., 34, 51-55.
- 46- Dekker R. F. H., and Barbosa A. M., 2001. The Effect of Aeration and Veratryl Alcohol on the Production of two Laccases by the Ascomycete *Botryosphaeria* sp., Enzyme Microb. Technol., 28, 81-88.