

固定化麹菌 *Aspergillus oryzae* による溶液中の アクリルアミド低減技術の開発

若泉 賢功*・桐藤 万裕・加座健士郎・山元 宏貴・安田 直子・大箸 信一・尾関 健二

金沢工業大学ゲノム生物学研究所

(2009年9月16日受付 2010年4月9日受理)

Developed technique for reducing acrylamide in liquid solution by immobilized *Aspergillus oryzae* — Note —

Masanori Wakaizumi*, Kazuhiro Kirifuji, Kenshiro Kaza, Hirotaka Yamamoto, Naoko Yasuda, Shinichi Ohashi, and Kenji Ozeki (*Genome Biotechnology Laboratory, Kanazawa Institute of Technology, 3-1 Yatsukaho, Hakusan, Ishikawa 924-0838*) *Seibutsu-kogaku* **88**: 296-300, 2010.

Acrylamide (AA), a probable human carcinogen, is formed during the cooking of many commonly consumed foods and drinks. Accordingly, AA concentration reduction is an important issue for human health. In this study, methods of decreasing AA concentration by *Aspergillus oryzae* spores entrapped in alginate were investigated. Immobilization of *A. oryzae* spores by culture in yeast potato dextrose medium decreased AA concentration in roasted green tea batch culture and bioreactor under aerobic conditions. On the other hand, AA-degrading amidase was found in *A. oryzae* mycelia cultured using AA as the only carbon source in minimal medium. Compared with AA-added potato dextrose medium, this modified minimal medium showed a slight decrease in AA concentration in roasted green tea bioreactor.

[**Key words**: *Aspergillus oryzae*, acrylamide, immobilized, amidase, bioreactor]

アクリルアミド (以下, AAと記す) は, 主にポリアクリルアミドの製造原料となる化合物であるが, 遺伝毒性および発がん性が報告され¹⁻³⁾, 国際がん研究機関はAAを「ヒトに対して恐らく発がん性がある物質 (2A)」に分類している⁴⁾. このAAが2002年にThe Swedish National Food Administrationとストックホルム大学によって, 炭水化物を含む食品を高温で加工・調理した食品 (ポテトチップス, フライドポテト, ビスケットなど) に含まれることが報告された⁵⁾. 2005年には食品汚染物質のリスク評価を行う国連食糧農業機関 (FAO) と世界保健機関 (WHO) 合同専門家会議は, 食品から摂取するAAの健康への影響を否定できないため, 食品中のAA濃度を低減するための取り組みを継続するように勧告している⁶⁾. 2006年にはEU食品飲料業連合が低減化のガ

イドラインを, 2009年7月には食品規格作成を行う国際機関であるCodex委員会がじゃが芋加工品と穀類加工品を対象とした食品中のAA低減のための実施規範を公表した. しかし, それらの方法によってすべての食品で十分なAA低減を実現することは困難である. また, 設備追加, 高価な酵素⁷⁾および抗酸化剤などの使用は低価格食品では実用困難である. 日本では食品中の基準値が設定されていないために, 緊急性はないが, 低減困難な食品などに利用できる安全で安価なAA低減化方法が開発されることで, 食品製造事業者はその利用性を検討することができる.

一方, AAを分解する土壌細菌は報告されている⁸⁻¹¹⁾が, それらの微生物は食品製造には使用できない. きわめて安全性が高く, 食品製造や酵素製造に使用されている微

*連絡先 E-mail: m.wakaizumi@gmail.com

生物からAA分解性能を示す微生物を見つけ、その基礎的知見を得ることができれば、新たなAA低減化方法の開発を進めることができる。著者らは、これまでにきわめて安全性が高く「国菌」とも言われる麹菌 *Aspergillus oryzae* がAA分解性能を示すことを報告した¹²⁾。また、コーヒーよりもAAを高含有するほうじ茶¹³⁾を食品モデルとして、AA低減化を検討したところ、AAを30-40 ng/ml含有するほうじ茶浸出液およびAAを200 µg/ml添加したほうじ茶浸出液でAA低減が可能であり、外観および香りの変化は許容範囲内であることを確認している^{14,15)}。AA分解生成物としては、アクリル酸が一時的に増加し、その後は減少することを確認している¹²⁾。また、AAよりも遺伝毒性および発がん性の高いグリシドアミドは検出されなかった¹²⁾。アクリル酸は安全性を評価するための十分なデータがないため、食品中に蓄積されることは避けるべきである。菌体抽出液を用いるとアクリル酸の分解は進まず、蓄積されることから、AA低減化方法の研究には菌体を利用した。しかし、菌体を用いることは、処理時間が長くなることで味への影響が懸念されることから、微生物発酵が進まない短時間でAA分解処理をすることが重要になる。また、処理後の菌体を食品から分離する必要もある。よって、バッチ式ではなく連続式処理を可能にするリアクター式での利用がより実現性があると考えられた。また、前報¹⁴⁾のバッチ式処理では非常に多くの菌体を使用したために、短時間でAA分解が進んだが、少ない菌体量で処理できる方法が望ましい。麹菌のバイオリアクターでは、有機酸の製造、食品排水処理の報告はあるが、それらはエアリフト型であり^{16,17)}、また、固定化法ではヘチマ繊維体¹⁸⁾やセルロース担体を利用している。ゲル包括法により固定化した菌体を利用したリアクターによる有害物質の分解・低減、あるいは有用物質の生産を明らかにした報告は少ない。

よって、本研究では、アルギン酸カルシウムで包括固定化した *A. oryzae* 分生子をバッチ式およびリアクター式で使用し、ほうじ茶浸出液中のAA分解低減処理を検討した。また、菌体のAA分解性能にamidase活性が関係していることを明らかにし、固定化菌体をamidaseが誘導されやすい培地で培養し、AA分解処理時間の短縮化を検討した。

ドイツでは、加工食品13品目について実態調査結果からその90パーセンタイル値（上限1.00 µg/g）を各々の低減目標値に設定している。13品目にほうじ茶は含まれていないため、水上らの報告¹³⁾を基に90パーセンタイル値を算出した結果、17.1 ng/mlであったので、この値を低減目標濃度とした。高濃度品は41.2 ng/mlであることから、低減目標濃度以下のほうじ茶浸出液を製造可能にするためにはAA低減割合が60%以上であればよい。よって、本研究ではAA低減目標割合を60%と設定した。実

際のほうじ茶に含まれる低濃度のAAの測定には gas-chromatography-mass spectrometry が用いられるが、試料検体の前処理には、AAを固相抽出後、さらに誘導体化を行わなければならないため¹³⁾煩雑である。一方、1 µg/ml以上の濃度であれば high-performance liquid chromatography (HPLC) によってAA低減効果が検討可能である。著者はこれまでの研究^{14,15)}によって、約40 ng/mlから200 µg/mlの範囲では低減傾向は大きく変わらないことを知り得ている。よって、本研究では、モデル飲料としてAA約10 µg/ml添加したほうじ茶浸出液を使用することで実験の迅速化を計り、AA分解処理方法の開発を行った。

供試菌株には、*A. oryzae* KBN1010株（ビオック社保有；AA高分解株）、*A. oryzae* No.100株（樋口松之助商店保有；AA高分解株）、*A. oryzae* M-01株（樋口松之助商店保有；AA低分解株）を使用した。

試薬は、AAは東京化成社製、その他は和光純薬工業社製を使用した。培地は、Difco社製 potato dextrose agar 培地（PDA培地、組成：ポテトエキス0.4%、グルコース2%、寒天1.5%、いずれもw/v）、yeast peptone dextrose 培地（YPD培地、組成：酵母エキス1%、ペプトン2%、デキストロース2%、いずれもw/v）を使用した。各培地の調製法は次の通りである。PDA培地は、PDA培地39.0 gを蒸留水1 lに溶解して作製した。YPD培地は、YPD培地50.0 gを蒸留水1 lに溶解して作製した。Czapek-Dox培地（CD培地）は、Sucrose 30.0 g、NaNO₃ 3.0 g、MgSO₄·7H₂O 0.50 g、KCl 0.50 g、K₂HPO₄ 0.10 g、FeSO₄·7H₂O 0.01 gを蒸留水に1 lに溶解し、pHを0.1N-NaOHで調整して作製した。すべての培地は常法に従い、121°C15分間オートクレーブ殺菌して使用した。なお、AA添加は水溶液を作製し0.22 µmフィルターでろ過滅菌した後、各培地に添加した。ほうじ茶は、2008年に石川県内のスーパーで購入し、ティパック2袋（茶葉15 g）に沸騰したお湯1 lを加え、室温程度になるまで放置して浸出液を得た。

分生子の固定化は、アルギン酸カルシウムによる包括法で行った。各菌株をPDA培地に植菌し、30°Cで7日間静置培養後、0.01%-Triton X-100含有滅菌水を加えて分生子を分散させ、分生子懸濁液を作製した。分生子密度をトーマの血球計算盤で検鏡し、滅菌水で1×10⁷ spores/mlになるように希釈し、この分生子懸濁液1 mlを滅菌済みの2.0%（w/v）アルギン酸ナトリウム水溶液9 mlとよく混合した。混合液を滅菌済みの0.5%（w/v）塩化カルシウム水溶液に滴下し、30分間冷蔵保存後、目開き約1 mm²のビニール製網でゲルビーズ（直径約2-4 mm）を回収した。

菌体抽出液は、菌体を液体窒素で凍結させ、乳鉢でよくすり潰し、菌体湿重量の2倍量の0.1M-McIlvaine緩衝

液 (pH 7.0) を加えてよく攪拌して、氷上で 30 分放置後、遠心して上清を使用した。

Amidase 活性測定は、菌体抽出液 0.4 ml に AA 2000 $\mu\text{g/ml}$ 含有 0.1M-Mcllvaine 緩衝液 (pH7.0) 0.4 ml を加え、30°C で 30 分間反応後、0.5N-HCl 0.2 ml を添加して、反応を停止させた。この反応液を 0.45 μm メンブレンフィルターでろ過し、生成したアクリル酸量を HPLC で定量した。比活性はタンパク質 1 mg あたり 1 分間に生成したアクリル酸量で表した。タンパク質濃度の定量はバイオラッド社製 Bradford 法 (プロテインアッセイ) を用いて行った。

AA およびアクリル酸の定量は HPLC を用いた。HPLC は島津製作所社製 LC-2010AHT HPLC システム、カラムは資生堂社製 CAPCELL PAK C8 (type SG120, 5 μm , 4.6 mm I.D. \times 250 mm), 移動層は 0.1% (w/v) リン酸水溶液、測定条件はカラム温度: 40°C, 検出波長: 200 nm, 送液速度: 1 ml/min で行った。

バイオリアクターは、内径 12.9 mm のポリエチレン製反応器にゲルビーズ 10.0 g (湿重量) を充填し、上部に液循環用のテフロンチューブとエアレーション用の除菌フィルター付テフロンチューブを取り付けたシリコン栓を付け、下部には液循環用のテフロンチューブを接続して作製した。

はじめに、固定化分生子の AA 分解性能を明らかにするため、固定化分生子を栄養培地で培養した後、フラスコ培養によるバッチ式で AA 分解試験を行った。具体的には、*A. oryzae* KBN1010 株, No. 100 株, および M-01 株分生子を含むゲルビーズ 10.0 g (湿重量, 分生子 1×10^8 spores 含有) を, YPD 培地で 30°C, 3 日間振盪培養後、吸引ろ過により回収し、ゲルビーズの 10 倍量の滅菌水で洗浄した。このゲルビーズを 100 ml 振盪フラスコに入れ、AA 添加ほうじ茶浸出液 30 ml (AA 添加濃度 8-12 $\mu\text{g/ml}$) を加えて 30°C で振盪 (100 rpm) し、1, 2, 3 日後に AA 濃度を測定した。その結果、AA 濃度は 2 日後まではすべての菌株でわずかな低下であったが、3 日後には *A. oryzae* KBN1010 株, No. 100 株の 2 株はそれぞれ 4 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ まで低下した (Fig. 1)。*A. oryzae* KBN1010 株で AA 濃度の低下がみられなかったことから、ゲルビーズに吸着による AA 濃度の低下はないことが確認された。一方、栄養培地で培養した *A. oryzae* KBN1010 株, No. 100 株の 2 株は、3 日後に AA 濃度の低下を示した。2 日後までは AA 分解が低下せず、3 日後には急激に低下がみられた原因として、菌体内もしくはゲルビーズ内に存在した YPD 培地成分が 2 日以内に枯渇したことで、*A. oryzae* は AA を炭素源もしくは窒素源として利用するために AA 分解酵素を産生し、AA 分解が進んだと推測された。一方、前報¹²⁾ では、AA 添加ほうじ茶浸出液 30 ml に *A. oryzae* No. 100 株の分生子を 3.0×10^7 spores 加えることで、約 1

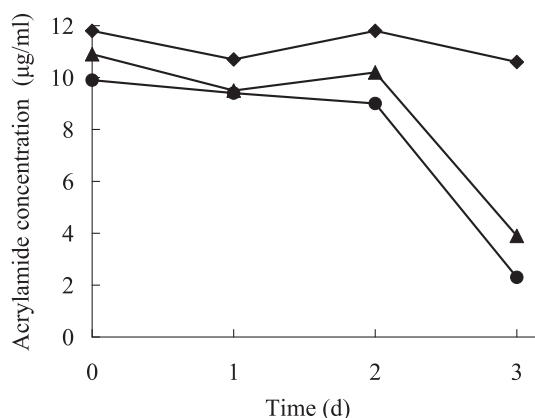


Fig. 1. Acrylamide concentration decrease by immobilized *A. oryzae* spores in batch-type culture. *A. oryzae* KBN1010 (▲), *A. oryzae* No. 100 (●), *A. oryzae* M-01 (◆).

日で AA 濃度は低減目標に達したが、本報の分生子量 (30 分の 1) であっても、固定化後に YPD 培地で培養することで菌糸が増殖し、3 日以内に低減目標に達したと推測された。しかし、一般に麹菌などの糸状菌はゲルビーズ中ではその表面のみで増殖して、固定化深部では増殖しにくいことから、さらに菌糸の増殖向上を図る検討が必要であると考えられた。

次に、栄養培地で培養した固定化分生子 (ゲルビーズ) を利用してリアクター式での AA 分解試験を行った。使用したバイオリアクターの概要を Fig. 2 に示した。バッチ式同様に YPD 培地で培養したゲルビーズをバイオリアクター反応器に充填し、AA 添加ほうじ茶浸出液 80 ml (AA 添加濃度約 9 $\mu\text{g/ml}$) を流量 150 ml/h で循環させ、1, 2, 3 日後に AA 濃度を測定した。エアレーション量は 15 ml/min で行った。その結果、エアレーションを行わな

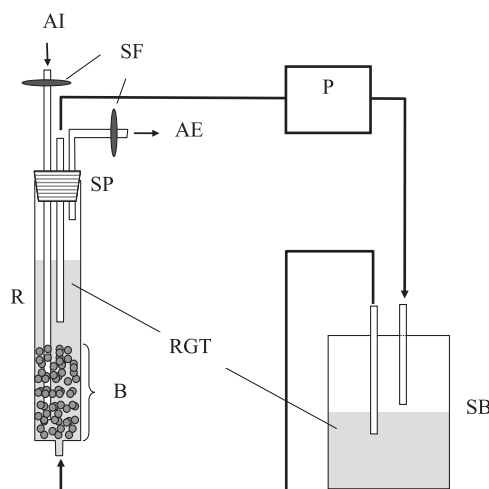


Fig. 2. Schematic view of bioreactor. R, reactor vessel; SB, test solution stock base; B, gel beads; SP, silicon plug; AI, air in; AE, air exit; RGT, roasted green tea infusion; P, internal pump; SF, sterilization filter.

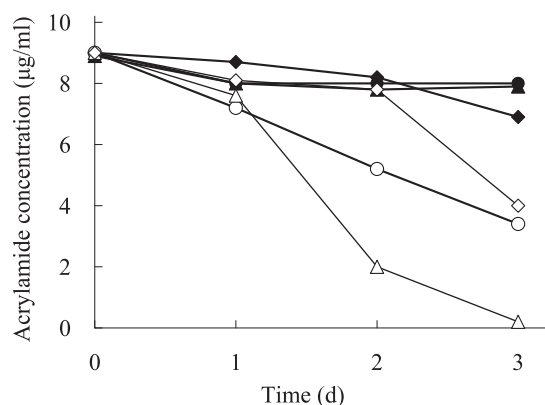


Fig. 3. Aeration effect on acrylamide degradation in bioreactor by immobilized *A. oryzae* spores. *A. oryzae* KBN1010 (▲, non aeration; △, aeration), *A. oryzae* No. 100 (●, non aeration; ○, aeration), *A. oryzae* M-01 (◆, non aeration; ◇, aeration).

かった場合は、3菌株ともAA濃度の低下はわずかであった。一方、エアレーションを行うと、3菌株ともにAA濃度の低下がみられ、*A. oryzae* No. 100株では、1日後に約7 µg/ml、2日後には約2 µg/mlまで低下した (Fig. 3)。以上の結果から、固定化分生子を栄養培地で培養した後、バイオリアクターに充填し、エアレーションを行うことで好気条件を保つことによってAAの分解処理が可能であることが明らかになり、バッチ式と比べてAA分解時間の短縮がみられた。しかし、最もAA分解が進んだ*A. oryzae* No. 100株であっても低減目標に達するためには2日近くを要するため、さらにAA分解時間短縮を検討する必要がある。

次に、前報¹⁵⁾ではAAを唯一の炭素源として添加した最少液体培地で菌糸体を培養することによってAA分解能の顕著な向上がみられたことから、菌糸体抽出液のamidase活性を測定し、AA分解性能との関連性を調査した。すなわち、*A. oryzae* KBN1010株、No. 100株、およびM-01株の3株の分生子をYPD培地30 mlに 1×10^6 spores/ml植菌し、30°C、2日間振盪培養 (120 rpm) し、生育した菌糸体を回収した。この菌糸体を、さらにCD培地あるいはAA 200 µg/ml添加改変CD培地 (Sucrose 0%, NaNO₃ 0%, 以下誘導培地と記す) で30°C、2日間振盪培養 (120 rpm) した。各菌糸体から抽出液を調製し、amidase活性を測定した。その結果、CD培地で培養した菌糸体抽出液ではアクリル酸は検出されなかった (data not shown)。一方、誘導培地で培養した菌糸体抽出液では、*A. oryzae* M-01株のアクリル酸産生は低値であったが (比活性0.12 nmol/min/mg)、*A. oryzae* KBN1010株、No. 100株の2株のアクリル酸産生は高値であり、その比活性は、それぞれ21.42、29.72 nmol/min/mgであった (Table 1)。以上の結果から、*A. oryzae* 菌糸体をAAを唯

Table 1. Amidase activity of *A. oryzae*.

Strain	Protein (mg/ml)	Acrylic acid (µg/ml)	Amidase activity (nmol/min/mg)
KBN1010	2.5	289.6	21.42
No.100	2.3	369.6	29.72
M-01	1.6	1.0	0.12

Modified Czapek-Dox medium (sucrose- and NaNO₃-deficient, AA200 µg/ml, pH 7.5) at 48 h.

一の炭素源とする最少液体培地で培養することで、AA分解を示すamidaseが産生することを初めて確認した。菌糸体抽出液がamidase活性を示したことから、*A. oryzae*のamidaseは菌体内あるいは膜結合酵素であることが示唆された。しかし、菌株によってamidase活性に差異がみられたことは今後検討が必要である。

次に、AA分解時間短縮のため、誘導培地で培養した固定化分生子を用いてバイオリアクターでAA分解試験を行った。*A. oryzae* No. 100株のゲルビーズ10.0 g (湿重量、分生子 1×10^6 spores含有)をYPD培地で3日間培養後、さらに誘導培地で2日間培養した。このゲルビーズをバイオリアクター反応器に充填し、AA添加ほうじ茶浸出液80 mlまたはAA水溶液80 ml (添加濃度約10 µg/ml)を循環し、循環開始直後および24時間後のAA濃度を測定した。比較のため、AA添加YPD培地を用いて同様に試験を行った。その結果、24時間後のAA分解率は、AA添加YPD培地で培養したゲルビーズでは、ほうじ茶浸出液およびAA水溶液で、それぞれ16.9%、15.5%であった。一方、誘導培地で培養したゲルビーズのAA分解率は、ほうじ茶浸出液およびAA水溶液で、それぞれ45.3%、50.1%であった (Table 2)。以上の結果から、誘導培地によってamidase産生が促進されたことでバイオリアクターでもAA分解性能が向上することが明らかになった。しかし、24時間以上の処理では顕著ではないが微生物発酵が進むため、さらに短時間処理の必要がある。酵素を利用することでより短時間でAAを低減できると考えられるが、アクリル酸の蓄積が懸念される。著者らはこれまでの研究^{12,14,15)}で、分生子および菌糸体がアクリル酸も分解することを確認しているため、AA分解処理には酵素を使用するよりも菌体利用が適していると考え、菌体利用法を検討した。

本研究によってアルギン酸カルシウムによって包括固定化することでAA低減が可能であったことから、固定化菌体を利用できる可能性が確認された。しかし、さらにAA低減処理時間を短縮し、食品の風味変化を最小限に抑えることが重要であると考えられた。*Escherichia coli*

Table 2. Effect of decreased acrylamide concentration in the culture medium used for induced cultivation.

Medium	Sample	AA concentrations ($\mu\text{g/ml}$)		Degradation rate of acrylamide (%)
		0 h	24 h	
AA-added YPD	AA solution	14.4 \pm 1.2	12.2 \pm 4.4	15.5
	Roasted green tea infusion	23.8 \pm 1.0	19.8 \pm 5.9	16.9
AA-added CD	AA solution	12.6 \pm 1.4	6.2 \pm 2.7	50.1
	Roasted green tea infusion	11.9 \pm 1.2	6.4 \pm 2.7	45.3

Modified Czapek-Dox medium (sucrose- and NaNO_3 -deficient AA, 200 $\mu\text{g/ml}$, pH 7.5) at 48 h. The results were obtained from three independent replicates. The data points represent means and standard deviations.

では固定化によって amidase 産生最大時間の短縮が報告され¹⁰⁾, *Rhodococcus* sp. ではアルギン酸で包括した菌体を AA 含有 HEPES 緩衝液中で冷蔵保存することで, AA 分解性能が著明に向上することが報告されている¹¹⁾. これらの方向からも固定化菌体の利用は AA 分解性能の誘導促進に有益であることが推測された. よって, 現在, 固定化菌体の AA 分解性能を向上させる最適誘導条件検討, 固定化方法, 担体強度およびリアクターの種類を検討している. また, amidase 高生産株の育種も検討しているので, 今後, より現実的な処理方法を提案していきたい.

要 約

アクリルアミド (以下, AA) は食品を加熱することで生じる遺伝毒性および発がん性が懸念される有害化学物質のひとつであり, 食の安全性確保のため, 低減方法が研究されている. 本研究では, 麹菌 *A. oryzae* による AA 低減処理方法の開発を目的に, アルギン酸カルシウムで包括固定化した *A. oryzae* 分生子による AA 低減が, バッチ式および循環式で可能かを調査した. また, *A. oryzae* が AA 低減を顕著に示す条件下で amidase 活性を測定し, 同条件で固定化分生子を培養し, 循環式によって AA 低減時間が短縮可能か検討した. その結果, 栄養培地で培養した固定化分生子は, バッチ式で AA 濃度の低下を示した. また, 循環式ではエアレーションなしでは AA 濃度の低下はわずかであったが, エアレーションを行うことで AA 濃度の低下がみられ, *A. oryzae* No. 100 株では約 1.5 日で AA 濃度を 60% 低減可能であった. また, *A. oryzae* 菌糸体を唯一の炭素源として AA を添加した最少液体培地で培養することで, AA を分解する amidase の誘導を初めて確認した. さらに, 同条件で培養した固定化分生子は, 循環式で AA 低減時間の短縮がみられた. しかし, AA 低減時間短縮は更なる検討が必要である.

文 献

- 1) Lorelei, M., Sven, S., and Katarina, B.: *JAMA*, **293**, 1326–1327 (2005).
- 2) Mucci, L., Lindbl, A., Steineck, P. G., and Adami, H. O.: *Int. J. Cancer*, **109**, 774–776 (2004).
- 3) Hogervorst, J. G., Schouten, L. J., Konings, E. J., Goldbohm, R., and van den Brandt, P. A.: *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, **16**, 2304–2313 (2007).
- 4) International Agency for Research on Cancer (IARC): IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some industrial chemicals. 60. Lyon (France): IARC; 389–433 (1994).
- 5) Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., and Törnqvist, M.: *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4998–5006 (2002).
- 6) FAO/WHO: Summary and consultation form the 64th Meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JACFA); WHO: Rome, Italy, 7–17 (2005).
- 7) Pedreschi, F., Kaack, K., and Granby, K.: *Food Chemistry*, **109**, 386–392 (2008).
- 8) Mallevialle, J., Bruchet, A., and Fiessinger, F.: *Journal of the American Water Works Association*, **76**, 87–93 (1984).
- 9) Ma, J., Li, G., and Graham, N. J. D.: *Aqua*, **43**, 287–295 (1994).
- 10) Nampoothiri, K. M., Roopesh, K., Chacko, S., and Pandey, A.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **120**, 97–108 (2005).
- 11) Nawaz, M. S., Billedeau, S. M., and Cerniglia, C. E.: *Bio-degradation*, **9**, 381–387 (1998).
- 12) 若泉賢功, 山元宏貴, 藤本 (安田) 直子, 尾関健二: 醸協, (印刷中)
- 13) Mizukami, Y., Kohata, K., Yamaguchi, Y., Hayashi, N., Sawai, Y., Chuda, Y., Ono, H., Yada, H., and Yoshida, M.: *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 7370–7377 (2006).
- 14) Wakaizumi, M., Yamamoto, H., Fujimoto, N., and Ozeki, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **108**, 391–393 (2009).
- 15) 若泉賢功, 山元宏貴, 安田直子, 尾関健二: 生物工学, **87**, 490–495 (2009).
- 16) Tang, T. Q., 宮田直幸, 岩堀恵祐: 日本水処理生物学会誌, **41**, 25–39 (2005).
- 17) Futamura, T., Ishihara, H., Tamura, T., Yasutake, T., Huang, G., Kojima, M., and Okabe, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 360–365 (2001).
- 18) Ogbonna, J. C., Tomiyama, S., and Tanaka, H.: *Process Biochemistry*, **31**, 737–744 (1996).