

Pekmezde Maillard Esmerleşme Reaksiyonlarının Kinetik Modellenmesi

Hüseyin BOZKURT, Fahrettin GÖĞÜŞ, Sami EREN
Gaziantep Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü,
27310 Gaziantep-TÜRKİYE

Geliş Tarihi 14.10.1996

Özet

Pekmezde saklama sırasında ortaya çıkan Maillard reaksiyonu üzerine pH, sıcaklık ve çözünebilir kuru madde miktarının etkileri hızlandırılmış saklama testleri ile belirlendi. Reaksiyon bir ara ürün olan 5-Hidroksimetil furfural birikimi referans alınarak takip edildi. Reaksiyon hızı sabitlerindeki değişim pH, sıcaklık, çözünebilir kuru madde miktarına bağlı olarak kinetik bir modelle tanımlandı. Deneysel olarak belirlenen hız sabitleri, bağımsız değişkenler (pH, T ve çözünebilir kuru madde miktarı) ile korrele edilerek bunların cinsinden ifade edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Maillard reaksiyonu, Sıcaklık, pH, Konsantrasyon

Kinetic Modelling of the Maillard Browning Reaction in Pekmez (Grape Molasses)

Abstract

The effects of pH, temperature and total soluble solids on the Maillard reactions which occurred during the storage of Pekmez were determined using accelerated storage test. The reaction was followed measurement of by the amount of 5-Hydroxymethyl furfural, an intermediate product of the Maillard reaction. The change in the reaction rate was defined with a kinetic model as a function of pH, temperature and the total soluble solids. The reaction rate was correlated with the independent variables studied (pH, T and ÇKM).

Key Words: Maillard reaction, Temperature, pH, Concentration

Giriş

Gıda maddelerinin paketlenme ve formülasyonlarındaki değişiklikler ve aynı zamanda yeni ürünlerin piyasaya sunulması genellikle raf ömürlerinin hesaplanmasını gerektirmektedir. Gıdaların raf ömürleri belirlenirken test süresini kısaltmak amacıyla hızlandırılmış saklama testleri tercih edilmektedir.

Gıda maddeleri değişik kimyasal bileşikleri farklı konsantrasyonlarda ihtiva ettiklerinden, işleme ve depolama dönemlerinde özellikle ısı, nem, oksijen ve ışıktan farklı düzeylerde etkilenirler.

Gıda maddelerinde kaliteyi etkileyen temel kimyasal reaksiyonlardan biri olan enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları, gıdaların işleme ve saklanmaları aşamalarında meydana gelmektedir.

Maillard reaksiyonu enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarının gıdalarda gözlenen en önemli tipidir. Maillard reaksiyonu, indirgen özelliğe sahip olan şekerlerle amino asitlerin amino grubu arasında meydana gelmektedir. Besinlerin ısıtılması veya uzun süre saklanması sırasında meydana gelen

kahverengileşmenin başlıca nedeni Maillard reaksiyonu olarak bilinmektedir.

Bir çok iç ve dış faktörler Maillard reaksiyonunun hızını etkilemektedirler. Sıcaklık değişiminin (Labuza ve Saltmarch, 1981) yanı sıra reaksiyona giren maddelerin konsantrasyonları (Lerici ve ark., 1991) ve birbirlerine oranı (O'Brian ve Morrisey, 1989), ortamın pH'sı (Ashoor ve Zent, 1984), metallerin varlığı (Kato ve ark., 1969) ve su aktivitesinin değişmesi (Eichner ve Karel, 1972) Maillard reaksiyonunun hızını etkilemektedir.

Pekmez üretiminde esmerleşme reaksiyonları renk ve tat oluşumunda önemli bir rol oynadıkları için istenen reaksiyonlar olmakla birlikte, reaksiyonun belli aşamalarında oluşan 5-Hidroksimetil furfural (5-HMF) gibi mutajenik ara ürünlerin oluşumu nedeniyle kontrol altında tutulması gereklidir.

5-HMF; düşük pH değerinde Amadori ürünlerinin parçalanması sonucu meydana gelmektedir (Hodge, 1953). aynı zamanda 5-HMF, heksozların asidik ortamda bozulmalarından da meydana gelebilmekte ve oluşan 5-HMF bazı gıda maddelerinde bozulma indisi olarak kabul edilmektedir. domates salçası (Poretta, 1991), greylift (Saguy ve ark., 1994) ve meyve ürünleri (Leif, 1985) bu gıda maddelerine örnek olarak verilebilirler. Pekmezde de kaliteyi belirleyen en önemli unsur yine 5-HMF birikimidir. birinci sınıf Pekmez en çok 25 ppm 5-HMF içerebilmektedir (TSE, 3792).

Bu çalışmanın amacı; değerli bir besin olan Pekmezde, 5-HMF birikimi üzerine toplam indirgen şeker ve amino asit konsantrasyonlarının, sıcaklığın ve pH'nın etkilerinin tesbit edilmesi ve bu faktörlerin tümünü içeren bir kinetik modelin çıkartılmasıdır.

Materyal ve Metod

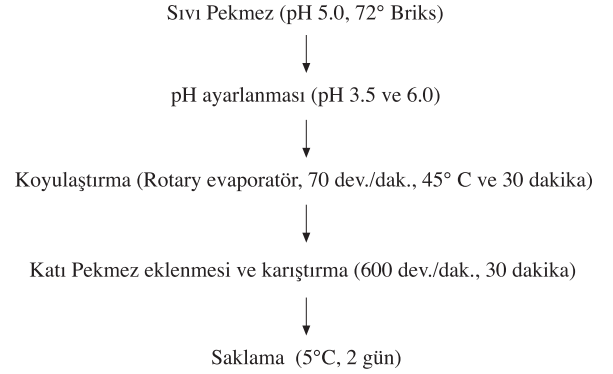
Materyal:

P-toluidin, asetik asit, potasyum ferrosiyonid, çinko asetat, iyot (Riedel De-Haen, Almanya), nişasta (Pancreac, İspanya), sodyum hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl) ve barbitrik asit, 5-HMF, 2-propanol, ftalat anhidrat (Merck, Almanya).

Metod

Piyasada temin edilen sıvı pekmez, NaOH ve HCl kullanarak pH'ları 3.5 ve 6.0'a ayarlanmıştır. pH'ları ayarlanan sıvı pekmezler rotary evaporatörde çözünebilir katı madde (ÇKM) miktarı 73 oluncaya kadar konsantre edilmiştir. Koyulaştırma işlemi sonunda pH'nını belirgin bir değişiklik göstermediği

tesbit edilmiştir. ÇKM'si 73 olan bu konsantrasyona katı Pekmez eklemek suretiyle katılaştırılmıştır (Şekil 1). ÇKM miktarı (Briks) Abbe refraktometre kullanılarak tayin edilmiştir.



Şekil 1. Pekmez yapım şeması.

Pekmez numuneleri katılaştırılan Pekmezlerin farklı konsantrasyonlarda seyreltilmesi suretiyle hazırlandı. Seyreltme işlemi NaOH-ftalat tamponları (pH 3.5 ve 6.0) kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada Tablo 1'de verilen ÇKM miktarlarına sahip farklı iki pH değerinde hazırlanan model pekmez numuneleri kullanılmıştır. Hazırlanan pekmez numuneleri ağız kapalı tüplerde sıcaklıkları 55, 65 ve 75°C'a ayarlanmış etüv içerisinde on gün boyunca saklanmıştır.

Tablo 1. Model pekmez numunelerinin pH ve çözünebilir kuru madde (ÇKM) miktarları

Numuneler	pH	ÇKM (Briks)
N1	3.5	73.0
N2	3.5	36.5
N3	3.5	12.8
N4	6.0	73.0
N5	6.0	36.5
N6	6.0	12.8

5-HMF ölçümü için; 5-HMF'in barbitrik asit ve p-toluidin ile reaksiyonu sonucu oluşan kırmızı renkli kompleksin 550 nm'de soğurmasının ölçülmesi esasına dayanan spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. 5-HMF analizleri IFFJP (1974) tarafından sunulan yöntemle göre 550 nm'de Spectronic-Bausch-20 spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır. Bütün ölçümler iki kez tekrarlanmıştır.

Reaksiyon hız sabitleri lineer regresyon analizi (Sigma Plot 41) yardımıyla belirlenmiştir. Varyans analizleri Statgraf paket program kullanılarak $P \leq$

0.05 düzeyinde önemli çıkan farklılıklar ile Asgari Önemli Fark (L.S.D.) testine göre yapılmıştır.

Sonuç ve Tartışma

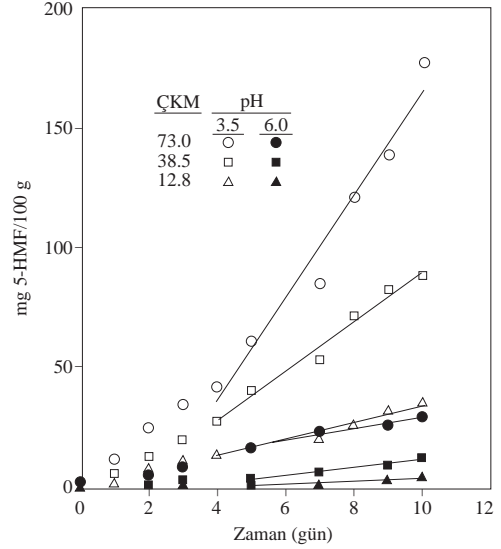
Taze meyve sularında 5-HMF bulunmamasıyla birlikte, meyve suyu ürünlerinde işleme aşamalarındaki yüksek sıcaklıktan dolayı önemli oranlarda 5-HMF oluştuğu gözlenmiştir (Toribio ve Lozano, 1987). Pekmezde de üretim esnasında uygulanan yüksek sıcaklığın 5-HMF oluşumuna neden olduğu ve saklama sırasında konsantrasyonunun arttığı ve buna bağlı olarak da Pekmez kalitesinin düştüğü gözlenmiştir (Artık ve Velioglu, 1993). Şekil 2, 3 ve 4 sırasıyla 55, 65 ve 75°C'lerde farklı ÇKM miktarlarındaki pekmez numunelerinde zamana karşı 5-HMF birikimini göstermektedir (pH 3.5 ve 6.0). 5-HMF birikiminin ÇKM miktarı 73.0 olan numunelerde her üç sıcaklıkta da en fazla olduğu, çözünebilir kuru madde miktarının azalmasıyla 5-HMF birikiminin de azaldığı görülmektedir.

pH değeri 3.5 olan pekmez numunelerinde 5-HMF birikimi, 55°C'de 4 günden sonra, 65°C'de ise 3 günden sonra lineer olarak artmıştır. Aynı sıcaklıklarda pH değeri 6.0 olan pekmez numunelerinde ise adaptasyon sürecinin 5 gün olduğu gözlenmiştir. Fakat 75°C'de adaptasyon sürecinin tüm Pekmez numunelerinde ortadan kalktığı, 5-HMF birikiminin hızlı bir artış gösterdiği tesbit edilmiştir. Esmerleşme reaksiyonları için adaptasyon süresi ortamda bulunan reaktiflerin, indirgen şekerler ve amino asitlerin konsantrasyonuna, ortamın pH ve su aktivitesine (Toribio ve Lozano, 1987), ve sıcaklığa (Rapusas ve Driscoll, 1995) bağlı olarak değişir. pH değişimine bağlı olarak adaptasyon sürecindeki bu değişim, 5-HMF birikimi açısından da benzer bir özellik göstererek daha düşük pH değerlerinde daha hızlı bir artışla sonuçlanmıştır. Örneğin; sıcaklık 75°C'de 5-HMF birikimi pH 3.5'da, pH 6.0'da bulunan değer yaklaşık olarak 2.5 katı kadardır. Azalan pH bağlı olarak adaptasyon süresinin kısılması ve 5-HMF birikiminin daha hızlı artması asidik ortamlarda Maillard reaksiyonunun 5-HMF oluşumunu sağlayan 2,3-endiol yolunu tercih etmesi (Hodge, 1953) ile açıklanabilir.

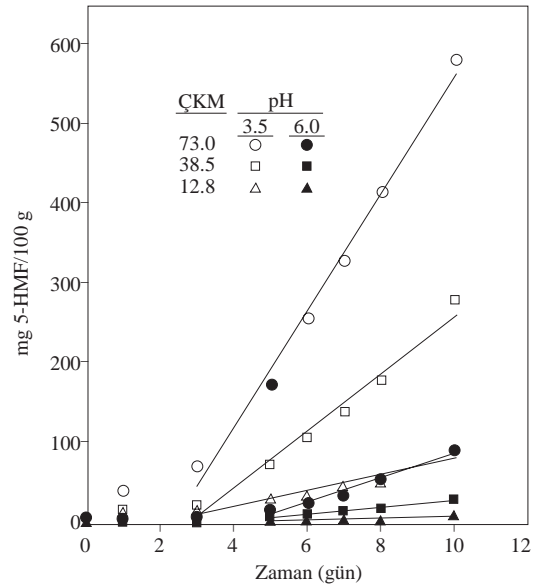
Reaksiyon Kinetiğinin Modellenmesi

Gıda maddeleri ve model sistemler kullanılarak çalışılan esmerleşme reaksiyonları değişik kinetik modellerle izah edilmiştir (Le ang Nagy, 1990). Kinetik modelleme için belirlenmesi gereken ilk

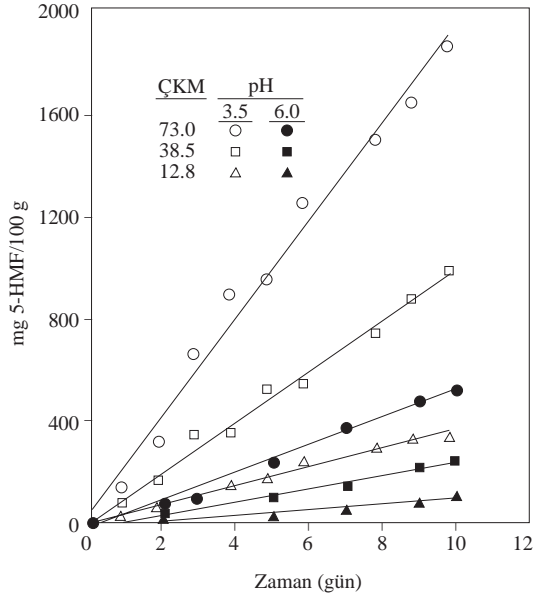
parametre reaksiyon derecesidir. Bu nedenle, yapılan çalışmalarda öncelikle reaksiyon derecesi belirlenmiş ve daha sonra diğer sabitler bulunmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda 5-HMF birikimi için reaksiyon derecesi sıfır ile iki arasında değişim göstermiştir (Peleg ve ark., 1992; Shallenberger ve Mattik, 1983). Buda göstermektedir ki 5-HMF için reaksiyon derecesi oldukça esneklerdir.



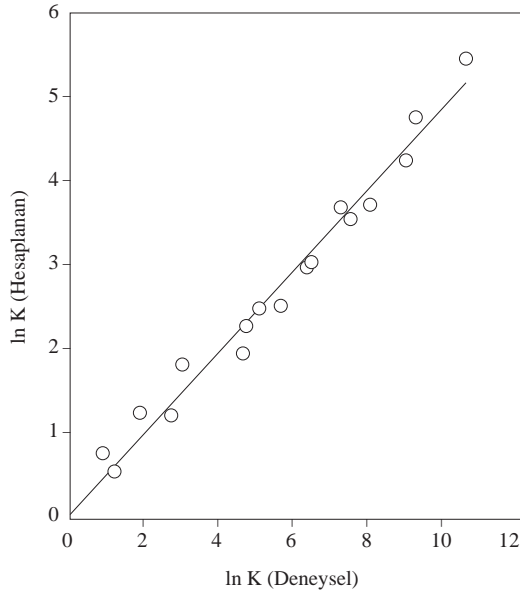
Şekil 2. Farklı pH ve çözünebilir kuru madde miktarlarındaki pekmez numunelerinin 55°C'de zamana bağlı olarak 5-HMF birikimi.



Şekil 3. Farklı pH ve çözünebilir kuru madde miktarlarındaki pekmez numunelerinin 65°C'de zamana bağlı olarak 5-HMF birikimi.



Şekil 4. Farklı pH ve çözünebilir kuru madde miktarlarındaki numunelerin 75°C'de zamana bağlı olarak 5-HMF birikimi.



Şekil 5. Değişen parametrelere bağlı olarak bulunan deneysel ve hesaplanan hız sabitlerinin karşılaştırılması

Bugüne kadar yapılan modelleme çalışmalarında genellikle reaksiyona etki eden faktörler tek tek çalışılmıştır (Labuza ve Saltmarch, 1981). Yalnızca bir kaç çalışmada bu faktörler aynı model içerisinde düşünülerek reaksiyon hızı üzerine olan etkileri ortaya konmuştur (Toribio ve Lozano, 1987; Resnik

ve ark., 1985; Rapusas ve Driscoll, 1985). Yapılan bu çalışmalarda genellikle reaksiyon hızı esmer pigment oluşumuna bağlı olarak belirlenmiştir. Ancak reaksiyonun yavaş olduğu veya ilk aşamalarında ortaya çıkan ara ürünlerin kalite unsuru olarak değerlendirildiği sistemlerde reaksiyonun nasıl ilerlediği hakkında bilgi vermesi açısından bu ara ürünlerin takibi gerekmektedir. Tüm bunlar göz önünde bulundurularak 5-HMF birikimine bağlı bir kinetik model geliştirilmiştir. Model; sıcaklık pH ve çözünebilir kuru madde miktarının fonksiyonu olarak reaksiyon hız sabiti değişimini göstermektedir.

Şekil 2-4 incelendiğinde adaptasyon süreci sonrası artışın lineer olduğu görülmektedir. Yapılan lineer regresyon analiz sonuçları bunu doğrulamaktadır (Tablo 2). Lineer regresyon analizleri sonuçlarına bağlı kalınarak çalışılan parametre aralıkları içerisinde görünür reaksiyon derecesi sıfır olarak alınmış ve buna bağlı olarak reaksiyon sabitleri belirlenmiştir. Tablo 2, pH 3.5 ve 6.0 için elde edilen reaksiyon sabitlerini ve lineer regresyon analizi sonuçlarını göstermektedir.

Reaksiyon hızı ortamda bulunan reaktiflerin konsantrasyonlarının üstsel fonksiyonu olarak tanımlanmaktadır. Pekmezdeki çözünebilir kuru madde indirgen şekerler ve amino asitlerin toplamı olduğu varsayılırsa, reaksiyon hızı çözünebilir kuru madde (ÇKM) miktarı ile doğru orantılıdır ve bu ilişkiden aşağıdaki benzerliği yazmak mümkün olmaktadır.

Tablo 2. Farklı konsantrasyon ve pH'lardaki numuneleri reaksiyon hız sabitleri (mg 5-HMF/100g/gün) ve lineer regresyon sonuçları

Numuneler	55°C)		65°C)		75°C)	
	K	R ²	K	R ²	K	R ²
N1	23.12	0.98	86.55	0.99	188.85	0.99
N2	10.30	0.98	41.14	0.97	98.26	0.99
N3	3.83	0.97	12.32	0.97	36.17	0.99
N4	2.49	0.99	16.19	0.99	53.12	0.99
N5	1.79	0.99	4.40	0.98	24.41	0.99
N6	0.73	0.96	1.53	0.98	9.84	0.97

$$\text{Reaksiyon hızı} \propto [\text{Çözünebilir Kuru Madde}]^a \quad (1)$$

Buradan;

$$\text{Reaksiyon hızı} = K [\text{Çözünebilir Kuru Madde}]^a \quad (2)$$

burada; a reaksiyon mertebesi sabit sayısı ve k reaksiyon hız sabitidir. Ancak reaksiyon ürünü (HMF) ve reaksiyona giren (Çözünebilir kuru madde) konsantrasyonları sayısal olarak karşılaştırıldığında ürün göreceli olarak çok düşük kaldığından ve kendisi de kuru madde sınıflamasına girebileceğinden reaksiyon ilerledikçe ÇKM miktarı sayısal olarak fazla

değişmemektedir. bu nedenle ÇKM konsantrasyonu, efektif olarak reaksiyon hız sabitinin bir belirleyicisi olarak düşünülebilir.

Yapılan kinetik modellerde genellikle reaksiyon hız sabitleri (Weismann ve ark., 1993), oluşan ara ürün (Toribio ve Lozano, 1987; Le and Nagy, 1988) veya son ürün konsantrasyonları (Bayındırlı ve ark., 1995) reaksiyon hızını etkileyen faktörlerin fonksiyonu olarak tanımlanmışlardır. Bu çalışmada reaksiyon hız sabiti; pH, sıcaklık, çözünebilir kuru madde miktarının fonksiyonu olarak tanımlanmıştır. Yapılan regrasyon analiz sonuçları hız sabiti ile ÇKM ($R^2=0.99$) arasındaki ilişkinin eşitlik 3'teki gibi olduğunu göstermiştir.

$$\ln K = b(pH, T) + c \ln \text{ÇKM} \quad (3)$$

burada; c sabit sayıdır.

Bir çok kimyasal reaksiyonda olduğu gibi sıcaklığın Maillard reaksiyonu üzerine etkisi Arrhenius eşitliğine (4) uyumştur.

$$\ln K = \ln A(\text{ÇKM}, pH) - \frac{Ea}{RT} \quad (4)$$

burada; R: gaz sabiti

Ea: aktivasyon enerjisi

T: sıcaklıktır

Bu çalışmada da sıcaklığın reaksiyon hızına olan etkisi Arrhenius eşitliğine uyumlu ($R^2=0.99$) bulunmuştur.

Reaksiyon üzerine pH'nın etkisi yarı logaritmik grafik üzerinde lineer artan düz bir çizgi ile tanımlanabilir (Weismann ve ark., 1993). Bu amaçla yazılacak eşitlik aşağıdaki gibi olacaktır.

$$\ln K = d(\text{ÇKM}, T) + epH \quad (5)$$

burada; e sabit sayıdır.

Eşitlik 3, 4 ve 5 birleştirilir ve değişkenler arasında herhangi bir etkileşim olmadığı varsayılırsa eşitlik 6'da verilen kinetik model elde edilir:

$$\ln K = a_1 + a_2 \ln \text{CKM} + a_3 \frac{1}{T} + a_4 pH \quad (6)$$

burada; a_1, a_2, a_3 ve a_4 sabit sayılardır.

Tüm verileri kullanmak suretiyle yapılan regrasyon analizi sonucunda bulunan a_1, a_2, a_3 ve a_4 sabitleri ve R^2 değerleri Tablo 3'de verilmiştir. Bu sabitler kullanılarak değişen koşullar için hesaplanan reaksiyon hız sabitleri bulunmuştur. Şekil 5 deneysel reaksiyon hız sabiti değerlerine karşı hesaplanan reaksiyon hız sabiti değerleri grafiğini göstermektedir. Hesaplanan ve deneysel değerler için çizilen bu grafiğin R^2 değeri 0.98 olarak bulunmuştur. Ayrıca yapılan varyans analizi sonucunda da ($P \leq 0.05$) kullanılan kinetik modelin veriler ile deneysel verilerin tam bir uyum içerisinde olduğu görülmüştür.

Tablo 3. Kinetik modeldeki sabit sayılar ve R^2 değerleri

Sabitler	Değerler	R^2
a_1	44.20	-
a_2	1.02	0.99
a_3	-14144	0.99
a_4	-0.69	0.94

Sistemin aktivasyon enerjisi hesaplamak için eşitlik içerisinde $1/T$ 'nin katsayısı olan a_4 sabitinin değerini kullanmamız yeterlidir. Buna göre, sistemin aktivasyon enerjisi;

$$a_4 = -Ea/R = -14144$$

buradan $Ea=28$ kkal/mol olarak bulundu.

Kinetik model elde ettiğimiz deneysel verileri tatminkar biçimde ifade etmektedir. 5-HMF oluşumunu kestirmeye yönelik olan bu model; sıcaklık 55–75°C, pH 3.5-6.0, 12.8-73 ÇKM aralıklarında tanımlıdır. Tüm faktörleri reaksiyon hızına etkileri bu basit korrelasyonla ortaya konulabilmektedir. Ancak hesaplanacak hız sabitinin kullanımı ile adaptasyon süresi sonrasında oluşacak 5-HMF konsantrasyonunun kestirilebildiği de dikkate alınmalıdır. Belirlenen adaptasyon süreleri modellemeye pek müsait olmadığından kullanıcı gereken parametreler kombinasyonuna en yakın deneysel verilerimizden fikir edinme durumundadır.

Kaynaklar

Artık, N. ve Velioglu, S., "Bazı Pekmez Örneklerinin Standard Uygunluğunun Belirlenmesi Üzerine Araştırma", Standard, 51-54, Nisan, 1993.

Ashoor, S. H. and Zent, J. B., "Maillard Browning in Common Amino Acids and Sugars", J. Food Sci., 49, 1206-1207, 1984.

Bayındırlı, A., Khalafi, S. and Yeniçeri, A., "Nonenzymatic Browning Reactions in Clarified Apple Juice at High Temperatures: A Response Surface Analysis", J. Food Process. and Preserv., 19, 223-227, 1995.

Eichner, K. and Karel, M., "The Influence of Water

- Content and Water Activity on the Sugar-Amino Browning Reaction Model Systems under Various Conditions", *Food Chem.*, 20, 218-223, 1972.
- IFFJP, "Analyses", International Federation of Fruit Juice Producers, 12, 1-4, 1974.
- Hodge, J. E., "Chemistry of Browning Reactions in Model Systems", *J. Agric. Food Chem.*, 1, 928-943, 1953.
- Kato, H., Yamamoto, M. and Fujimaki, M. "Mechanisms of Browning degradation of D-fructose in special comparison with D-glucose-glycine reaction", *Agric. Biol. Chem.* 33, 939-940, 1969.
- Labuza, T. P. and Saltmarch, M., "The Nonenzymic Browning Reaction As Affected by Water in Foods", In *Water Activity Influences Food Quality*, Academic Press., New York, 1981.
- Lee, H. S. and Magy, S. "Relative reactivities of sugars in the formation of 5-hydroxymethylfurfural in sugar-catalyst model systems", *J. Food Proc. and Pres.* 14, 171-178, 1990.
- Lee, H. S. and Nagy, S., "Relationship of Sugar Degradation to Detrimental Changes in Citrus Juice Quality", *Food Tech.*, 42, 91-97, 1988.
- Leif, P., "The Influences of Ripeness and Juice Storage Temperature on the Sensory Evaluation and Composition of Apple Juice", *Lebensm. -Wiss, u. Technol.*, 18, 205-211, 1985.
- C. R., Munari, M. and Sensidoni, A., "Early Indication of Chemical Changes in Food due to Nonenzymatic Browning Reactions", *Lebensm.-Wiss, u. Technol.*, 24, 218, 1991.
- O'Brian, J. and Morrissey, P. A., "Nutritional and Toxicological Aspects of the Maillard Browning Reaction in Foods", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28, (3), 211-248, 1989.
- Peleg, H., Naim, M., Zehavi, U., Rouseff, R. L. and Nagy, S. "Pathway of 4-vinylguayacol formation from ferulic acid in model solution of orange juice", *J. Sci. Food Agric.* 40, 74-767, 1992.
- Poretta, S., "Determination of 5-(Hydroxymethyl)-2-Furfural in Tomato Products: Proposal of a Rapid HPLC Method and Its Comparison with Colorimetric Method", *Food Chem.*, 39, 51-57, 1991.
- Rapusas, R. S. and Driscoll, R. H., "Kinetics of Nonenzymatic Browning in Onion Slices During Isothermal Heating" *J. Food Eng.*, 24, 417-429, 1995.
- Resnik, S. L., Cerrutti, P., Seldes, A. and Fontan, C. F., "Kinetics of Deteriorative Reactions in Model Systems of High Water Activity; Glucose Loss, 5-HMF Accumulation and Fluorescence Development due to Nonenzymatic Browning", *J. Food Sci.*, 50, 627-630, 656, 1985.
- Saguy, S. I., Cohen, E., Birk, Y. and Manneheim, C. H., "Kinetic parameter Estimation for Quality Change During continuous Thermal Processing of Grape Juice", *J. Food Sci.*, 59, (1), 155-158, 1994.
- Shallenberger, R. S. and Mattik, L. R. "Relative stability of glucose and fructose at acidic pH", *Food Chem.* 12, 159-165, 1983.
- Toribio, J. L. and Lozano, J. E., "Formation of 5-Hydroxymethylfurfural in Clarified apple Juice during Heating at Elevated Temperatures", *Lebensm.-Wiss, U. Technol.*, 20, 59-63, 1987.
- Türk Standardları Enstitüsü, "Sıvı Pekmez", TSE 3792, 1983.
- Weismann, I., Raman, O., Kopelman, I. J. and Mizrahi, S., "A Kinetic Model for Accelerated Tests of Maillard Browning in a Liquid Model System" *J. Food Process. and Preserv.*, 17, 455-470, 1993.