Coordonator
Constantin Banu

BIOTEHNOLOGII
în industria alimentară



Editura Tehnică

nr 13502dn
663
B 27

Prof. dr. ing. CONSTANTIN BANU
Şef lucrări ing. NICOLAE BUTU
Conf. dr. ing. VIOREL SAHLEANU
Şef lucrări ing. DORULEŢ RĂSMERIŢĂ
Prof. dr. ing. ANTOANETA STOICESCU
Prof. dr. ing. TRAIAN HOPULELE

BIOTEHNOLOGII ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ

Coordonator: prof. dr. ing. Constantin Banu

UNIVERSITATEA
BIBLIOTECA 1

EDITURA TEHNICĂ
Bucureşti, 2000

Copyright © 2000, S.C. Editura TEHNICĂ S.A.
Toate drepturile asupra acestei ediții sunt rezervate editurii

Adresă: **S.C. Editura TEHNICĂ S.A.**
Piața Presei Libere 1
33 Bucureşti, România
cod 71341

Contribuția autorilor:

prof. dr. ing. Constantin Banu: capitolele 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
prof. dr. ing. Antoaneta Stoicescu: capitolul 8
prof. dr. ing. Traian Hopulele: capitolul 7
şef lucrări ing. Doruleț Răsmeriță: capitolul 5
şef lucrări ing. Nicolae Butu: capitolele 10, 20
conf. dr. ing. Viorel Sahleanu: capitolul 11

Coperta: **SIMONA DUMITRESCU**

Redactor: **OLGA STOIAN**
Tehnoredactor: **ANDREEA STAICU**

Bun de tipar: 10.01.2000; coli tipar: 43,50
C.Z.U. 664

ISBN 973-31-1380-8

Tipărit SEMNE

CUPRINS

ÎN LOC DE „CUVÂNT ÎNAINTE" 5

INDEX DE TERMENI EXPLICATIV 15

1. ASPECTE GENERALE PRIVIND ENZIMELE ŞI MICROORGANISMELE 31
   - 1.1. Definiţia şi obiectul biotehnologiei alimentare 31
   - 1.2. Clasificarea generală a enzimelor 32
   - 1.3. Unităţi de măsură ale activităţii enzimatice 33
   - 1.4. Preparate enzimatice 33
     - 1.4.1. Preparate enzimatice ca atare 33
     - 1.4.2. Enzime imobilizate 40
   - 1.5. Condiţiile de inocuitate pe care trebuie să le îndeplinească preparatele enzimatice 47
   - 1.6. Imobilizarea celulelor de microorganisme 48
     - 1.6.1. Imobilizarea prin înglobare în diferite geluri 48
     - 1.6.2. Alte tehnici de imobilizare a celulelor de microorganisme 49

2. ENZIME MAI IMPORTANTE PENTRU INDUSTRIA ALIMENTARĂ 51
   - 2.1. Oxidoreductaze 51
     - 2.1.1. Oxidoreductaze FAD - dependente (flavinenzime, respectiv dehidrogenaze aerobe) 52
     - 2.1.2. Oxidoreductaze NAD - dependente (dehidrogenaze anaerobe) 52
     - 2.1.3. Oxidaze 53
   - 2.2. Hidrolaze 62
     - 2.2.1. Lipaze, esteraze, fosfolipaze 62
     - 2.2.2. Enzime oligozidazice şi poliglucozidazice 64
     - 2.2.3. Amilaze 65
     - 2.2.4. Celulaze şi hemicelulaze 69
     - 2.2.5. Enzime pectolitice 70
     - 2.2.6. Peptid hidrolazele 73
   - 2.3. Izomeraze 77

3. MICROORGANISME UTILIZATE ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ 83
   - 3.1. Consideraţii generale 83
   - 3.2. Grupe de microorganisme utilizate în industria alimentară 93
     - 3.2.1. Bacterii 93
     - 3.2.2. Drojdii 108
     - 3.2.3. Mucegaiuri 111

4. CULTURI STARTER DE MICROORGANISME 117
   - 4.1. Definiţie 117
   - 4.2. Culturi starter de bacterii lactice 118
   - 4.3. Culturi starter utilizate în industria laptelui 121
     - 4.3.1. Laptele ca mediu de cultură 121

4.3.2. Tratamentul termic aplicat laptelui destinat ca mediu de cultură 122
4.3.3. Condiţiile de incubare (termostatare) 123
4.3.4. Interacţiunile dintre speciile din cultura starter 124
4.3.5. Bacteriofagii 125
4.3.6. Instabilitatea culturilor lactice 127
4.3.7. Tipuri de culturi starter utilizate în industria laptelui 129
4.3.8. Activarea culturilor starter lactice prin proteoliza laptelui 133
4.3.9. Controlul culturilor starter de bacterii lactice 134
4.4. Culturi starter concentrate de microorganisme 134
4.4.1. Definiţie 134
4.4.2. Tehnologia de obţinere a culturilor starter concentrate 135
4.4.3. Culturi starter concentrate de bacterii lactice pentru industria laptelui 136
4.4.4. Culturi starter concentrate de bacterii propionice pentru industria laptelui 137
4.4.5. Culturi starter concentrate de bacterii pentru industria cărnii 137
4.4.6. Culturi starter concentrate de spori de mucegai 140

5. BIOTEHNOLOGII ÎN INDUSTRIA AMIDONULUI 141
5.1. Dezvoltarea proceselor biotehnologice în industria amidonului 141
5.2. Amidonul: structură şi proprietăţi 142
5.3. Tipurile de transformări enzimatice suferite de amidon 148
5.3.1. Hidroliza amidonului 149
5.3.2. Izomerizarea siropurilor de dextroză. Obţinerea izosiropurilor 161
5.3.3. Reacţii de sinteză enzimatică 169
5.4. Fişele tehnice (modificate de autor) 172
5.4.1. Termamyl LC 172
5.4.2. Promozyme 172
5.4.3. Sweetzyme T 173
5.4.4. Novozym 348 173
5.4.5. Novozym 875 174
5.4.6. Dextrozyme 174
5.4.7. Maltogenase 175
5.4.8. BAN 175
5.4.9. Shearzyme L 175

6. FOLOSIREA ENZIMELOR ŞI MICROORGANISMELOR ÎN INDUSTRIA BERII 177
6.1. Tehnologia maltului 177
6.2. Tehnologia berii 182
6.3. Folosirea nemalţificatelor la fabricarea berii 188
6.4. Folosirea preparatelor enzimatice exogene la fermentaţia primară 192
6.5. Folosirea preparatelor enzimatice exogene la fermentaţia secundară şi la maturarea berii 193
6.6. Fişe tehnice (modificate de autor) pentru preparatele enzimatice ale firmei Novo 198
6.6.1. Termamyl® 198
6.6.2. Fungamyl® 200
6.6.3. Finizym 200 L 202
6.6.4. Ultraflo L 203
6.6.5. Ceremix 2XL 204
6.6.6. Ceremix 6XMG 206
6.6.7. Cereflo 206
6.6.8. Amiloglucozidaza (AMG) 208
6.6.9. Maturex L 210
6.6.10. Neutraza 211

6.7. Fişe tehnice (modificate de autor) pentru preparatele enzimatice ale firmei Enzymes et Derivates 213
6.7.1. Nervanase BT-2 213
6.7.2. β-Glucanase 200 L 215
6.7.3. Alphalase AP-3 216
6.7.4. Proteinaze 200 L 217
6.7.5. Abazyme LE-300 218
6.7.6. Amylozyme 200 L 218
6.7.7. Glucox RF 219
6.7.8. Papaina Chilko P 220

7. FOLOSIREA ENZIMELOR ŞI MICROORGANISMELOR LA FABRICAREA SPIRTULUI 221
7.1. Materiile prime 221
7.2. Materiile auxiliare 223
7.2.1. Malţul 223
7.2.2. Preparatele enzimatice de origine microbiană 224
7.3. Tehnologia de fabricare 225
7.3.1. Fierberea 225
7.3.2. Fermentarea plămezilor de cereale şi cartofi 231
7.4. Tehnologia de fabricare a spirtului din melasă 234
7.5. Fişe tehnice (modificate de autor) pentru unele preparate enzimatice Novo folosite în industria spirtului 237
7.5.1. Spirizym 300 L 237
7.5.2. San Super 240 L 239
7.5.3. Viscozyme L 239
7.5.4. Thermamyl 120 L tip S 240

8. BIOTEHNOLOGIA OBŢINERII DROJDIEI DE PANIFICAŢIE 241
8.1. Materii prime şi auxiliare, precum şi drojdie pentru obţinerea de biomasă 241
8.2. Biotehnologia obţinerii drojdiei de panificaţie 242

9. FOLOSIREA ENZIMELOR ŞI MICROORGANISMELOR ÎN INDUSTRIA VINULUI 249
9.1. Principalele enzime din musturi şi vinuri 249
9.2. Folosirea enzimelor exogene în vinificaţie 251
9.2.1. Folosirea preparatelor enzimatice la macerare 251
9.2.2. Folosirea preparatelor enzimatice la clarificarea musturilor şi vinurilor 254
9.2.3. Folosirea enzimelor pectolitice pentru facilitarea filtrării şi limpezirea vinurilor 255
9.3. Microflora implicată în producţia vinicolă 256
9.3.1. Bacteriile 256
9.3.2. Drojdiile 259
9.3.3. Mucegaiurile 262
9.4. Folosirea culturilor de drojdii indigene 263
9.4.1. Culturi de producţie de drojdii indigene 264
9.4.2. Culturi starter (inocul) de drojdii pentru vinificaţie 265
9.5. Fermentaţii care au loc la producerea vinului 268
9.5.1. Fermentaţia alcoolică 268
9.5.2. Aspecte fizico-chimice, biochimice şi microbiologice ale vinificării strugurilor roşii 275
9.5.3. Fermentaţia malo-lactică a vinurilor 277
9.6. Fişe tehnice (modificate de autor) ale preparatelor enzimatice Novo cu utilizare în industria vinurilor 284
9.6.1. Vinozym G 284
9.6.2. Vinozym FCE.G 285

9.6.3. Novoclair™ FCE.G 285
9.6.4. Ultrazym 286
9.6.5. Novoferm 12 287
9.6.6. Vinoflow G 287
9.6.7. Glucanex 288
9.7. Tehnici de stabilizare a vinului față de tulbureala tartrică 289
9.7.1. Teoria cristalizării tartratului 289
9.7.2. Tehnici de stabilizare tartrică a vinului 291
9.7.3. Controlul eficienței tratamentului prin frig al vinului din punct de vedere al stabilității tartrice 297
9.7.4. Electrodializa 300

10. UTILIZAREA PROCESELOR BIOTEHNOLOGICE LA FABRICAREA OȚETULUI ȘI A ACIDULUI ACETIC GLACIAL 307
10.1. Fabricarea acidului acetic prin metode chimice 307
10.2. Fabricarea acidului acetic prin procedee biotehnologice 308
10.2.1. Schema tehnologică generală 308
10.2.2. Prepararea substratului hidroalcoolic 308
10.2.3. Fermentația acetică 309
10.3. Tipuri de oțet de fermentație și caracteristici compoziționale 316

11. UTILIZAREA ENZIMELOR ȘI A MICROORGANISMELOR ÎN INDUSTRIA CĂRNII 319
11.1. Enzimele proprii țesutului muscular și importanța lor în procesul de rigiditate și maturare a cărnii 319
11.2. Corelația dintre acțiunea enzimelor proteolitice și frăgezimea cărnii 324
11.3. Corelația dintre evoluția biochimică, consistența și suculența cărnii 327
11.4. Corelația dintre aroma cărnii (gust și miros) și evoluția biochimică a acesteia 328
11.5. Frăgezirea artificială a cărnii 328
11.5.1. Metode de frăgezire (tenderizare) a cărnii 329
11.5.2. Utilizarea enzimelor proteolitice exogene 329
11.6. Alte utilizări ale enzimelor în industria cărnii 330
11.6.1. Decolorarea enzimatică a sângelui 331
11.6.2. Degresarea oaselor destinate fabricării gelatinei 334
11.6.3. Recuperarea cărnii de pe oase 335
11.6.4. Prelucrarea pieilor 335
11.6.5. Îndepărtarea părului de la porcinele prelucrate prin opărire 336
11.7. Microflora salamurilor și cârnaților cruzi 336
11.7.1. Microorganisme din compoziție 336
11.7.2. Rolul diferitelor microorganisme la maturarea preparatelor din carne crude 340
11.8. Folosirea culturilor starter în industria cărnii 341
11.8.1. Microorganisme care se folosesc în culturile starter și tipuri de culturi starter 345
11.8.2. Modalități de comercializare a culturilor starter de bacterii și drojdii 346
11.8.3. Modalități de comercializare a culturilor starter de mucegaiuri 347
11.8.4. Factorii care influențează acțiunea fermentativă a bacteriilor din culturile starter 348
11.8.5. Utilizarea culturilor starter la diferite tipuri de salamuri crude 351
11.9. Modificările fizice care au loc la fabricarea preparatelor din carne crude 351
11.10. Formarea aromei preparatelor din carne crude 353
11.10.1. Mecanisme de formare a substanțelor de aromă 356
11.10.2. Producerea de amine biogene în produsele de carne fermentate 366

12. FOLOSIREA ENZIMELOR ENDOGENE ŞI A PREPARATELOR ENZIMATICE EXOGENE ÎN INDUSTRIA PEŞTELUI ŞI A ALTOR MATERII PRIME ACVATICE 369
12.1. Produse fermentate tradiţional 369
12.2. Hidrolizate proteice din peşte (FPH) 370
12.3. Alte aplicaţii ale enzimelor în industria peştelui 373
12.3.1. Desolzirea 373
12.3.2. Prelucrarea creveţilor, midiilor şi stridiilor 374
12.3.3. Îndepărtarea pieii la cefalopode şi peşte 374
12.3.4. Folosirea preparatelor enzimatice la prelucrarea icrelor negre (Caviar) 374
12.3.5. Prelungirea conservabilităţii creveţilor şi a peştilor congelaţi 375
12.3.6. Influenţa enzimelor proteolitice din peşte asupra calităţii gelului de surimi 375

13. FOLOSIREA ENZIMELOR ŞI A MICROORGANISMELOR LA FABRICAREA LAPTELUI 377
13.1. Enzimele laptelui 377
13.2. Preparate enzimatice folosite în industria laptelui 385
13.3. Biotehnologia fabricării brânzeturilor 386
13.3.1. Însămânţarea laptelui cu culturi lactice, adaosul de $CaCl_2$ şi maturarea acestuia 386
13.3.2. Închegarea laptelui 389
13.3.3. Maturarea brânzeturilor 397
13.4. Produse lactate acide dietetice 418
13.4.1. Prepararea culturilor starter de producţie 418
13.4.2. Controlul calităţii culturilor intermediare şi al culturilor starter de producţie 421
13.4.3. Defectele culturilor starter de producţie 422
13.4.4. Condiţii pe care trebuie să le îndeplinească laptele destinat fabricării produselor lactate acide dietetice 423
13.4.5. Iaurtul 423
13.4.6. Laptele bătut 431
13.4.7. Laptele acidofil 432
13.4.8. Chefirul 434
13.4.9. Importanţa dietetică a produselor lactate acide 441
13.4.10. Calitatea proteinelor din produsele lactate acide 442
13.4.11. Valoarea biologică a produselor lactate dietetice acide 443
13.5. Biotehnologia produselor probiotice 444
13.5.1. Microbiota tractului digestiv 444
13.5.2. Rolul microflorei intestinale 445
13.5.3. Microbiota digestivă şi colonizarea tractului intestinal la om 446
13.5.4. Microbiota tractului digestiv la păsări 448
13.5.5. Microbiota tractului digestiv la porcine 449
13.5.6. Microbiota tractului digestiv la bovine 450
13.5.7. Modul de acţiune al probioticelor 452
13.5.8. Bacteriile lactice şi acţiunea lor probiotică 453
13.5.9. Bifidobacteriile şi acţiunea lor probiotică 454
13.5.10. Drojdiile şi utilizarea lor ca probiotice 456
13.5.11. Produse de tip probiotic pentru oameni 457
13.5.12. Produse farmaceutice 461
13.5.13. Produse probiotice pentru pui 462
13.5.14. Produse probiotice pentru purcei 462
13.5.15. Produse probiotice pentru rumegătoare 463
13.5.16. Obţinerea de lactoferină şi lactoperoxidază 466

14. FOLOSIREA ENZIMELOR ŞI A MICROORGANISMELOR ÎN PANIFICAŢIE 469
14.1. Enzimele existente în făină şi enzimele exogene folosite în panificaţie 470
14.1.1. α- şi β- Amilazele 470
14.1.2. Hemicelulazele 471
14.1.3. Proteazele 472
14.1.4. Ester-esterazele 472
14.1.5. Oxidoreductazele 473
14.2. Acţiunea enzimelor din făină şi a celor adăugate în diferite etape de panificare, cu consecinţe asupra aromei pâinii 476
14.2.1. Frământarea 478
14.2.2. Fermentarea 481
14.2.3. Coacerea 483
14.3. Acţiunea bacteriilor lactice în aluat 494
14.4. Folosirea preparatelor enzimatice în industria panificaţiei 494
14.4.1. Accelerarea maturizării făinii de grâu 494
14.4.2. Condiţionarea aluatului prin folosirea de preparate enzimatice exogene 495
14.4.3. Preparate enzimatice comercializate pentru industria panificaţiei 496
14.5. Utilizarea culturilor starter în panificaţie 506
14.6. Produse din cereale fermentate 507
14.6.1. Extractul bactolactic 507
14.6.2. Băuturi pe bază de cereale 508

15. FOLOSIREA ENZIMELOR ŞI A MICROORGANISMELOR LA PRELUCRAREA FRUCTELOR ŞI LEGUMELOR 513
15.1. Fructe şi legume mai importante 513
15.2. Evoluţia principalelor componente din fructe şi legume în cursul maturării 514
15.3. Folosirea enzimelor implicate în hidroliza polizaharidelor pereţilor parietali 528
15.3.1. Folosirea enzimelor înainte de operaţia de presare 528
15.3.2. Folosirea enzimelor pentru clarificare (limpezire) 532
15.3.3. Folosirea enzimelor pectolitice în tehnologia nectarurilor de fructe 536
15.3.4. Implicaţiile enzimelor pectolitice în tehnologia sucului de tomate 537
15.3.5. Alte utilizări ale enzimelor pectolitice la prelucrarea fructelor 538
15.3.6. Preparate enzimatice comerciale pentru industria sucurilor 544
15.4. Folosirea microorganismelor la conservarea produselor vegetale 547
15.4.1. Procesele fermentative 549

16. FOLOSIREA ENZIMELOR ÎN INDUSTRIA ULEIURILOR ŞI A GRĂSIMILOR 565
16.1. Uşurarea extracţiei 565
16.2. Rafinarea uleiului 566
16.3. Interesterificarea 566
16.4. Obţinerea de gliceride care conţin acizi graşi cu lanţ mediu (TCM) 567
16.5. Obţinerea de acizi graşi liberi din trigliceride 568
16.6. Esterificarea cu ajutorul enzimelor 568
16.7. Utilizarea microorganismelor în industria grăsimilor şi a uleiurilor 569

17. FOLOSIREA PREPARATELOR ENZIMATICE ÎN INDUSTRIA ZAHĂRULUI ŞI A PRODUSELOR ZAHAROASE 571
17.1. Folosirea invertazei în industria produselor zaharoase 571
17.2. Folosirea preparatelor enzimatice complexe la confierea fructelor 572
17.3. Folosirea enzimelor în industria zahărului 573
17.3.1. Folosirea dextranazei 574
17.3.2. Folosirea galactozidazei 575

18. VALORIFICAREA CHIMICĂ ŞI ENZIMATICĂ A LACTOZEI 577

19. VALORIFICAREA ENZIMATICĂ A ZAHAROZEI 583

20. UTILIZAREA PROCEDEELOR BIOTEHNOLOGICE ÎN PRODUCȚIA DE EDULCORANȚI CU PUTERE MARE DE ÎNDULCIRE 587
20.1. Folosirea enzimelor pentru producerea aspartamului 587
20.1.1. Structura și proprietățile aspartamului 587
20.1.2. Sinteza aspartamului 588
20.2. Folosirea enzimelor pentru producerea sucralozei 589
20.2.1. Structura și proprietățile sucralozei 589
20.2.2. Sinteza sucralozei 590
21. FOLOSIREA ENZIMELOR PENTRU OBȚINEREA DE HIDROLIZATE PROTEICE ȘI ÎMBUNĂTĂȚIREA CALITĂȚII PROTEINELOR 591
21.1. Hidrolizatele proteice 591
21.1.1. Procedee de obținere a hidrolizatelor proteice 592
21.2. Extractul de drojdie 596
21.3. Procedee enzimatice de îmbunătățire a proprietăților funcționale ale proteinelor 598
21.3.1. Hidroliza enzimatică parțială (redusă) 598
21.3.2. Plasteinizarea 602
22. FOLOSIREA ENZIMELOR ȘI A MICROORGANISMELOR PENTRU OBȚINEREA DE AROMATIZANȚI, POTENȚIATORI DE AROMĂ ȘI PENTRU DETOXIFIERE 607
22.1. Arome produse de β-glicozidaze 608
22.2. Arome produse de β-tioglicozidaze 611
22.3. Folosirea lipazelor pentru obținere de arome 617
22.4. Folosirea enzimelor proteolitice pentru obținerea de arome 621
22.5. Folosirea enzimelor lipooxigenază și hidroperoxidliază pentru obținerea de arome 622
22.6. Folosirea alcooldehidrogenazei pentru obținerea de arome 624
22.7. Obținerea de potențiatori de aromă de tip nucleotidic pe cale enzimatică 625
22.8. Producerea de aromatizanți și potențiatori de aromă cu ajutorul microorganismelor 626
23. FOLOSIREA ENZIMELOR PENTRU OBȚINEREA DE SUBSTANȚE PREBIOTICE 631
23.1. Galactooligozidele 631
23.2. Fructooligozidele naturale 634
23.3. Fructooligozaharidele de sinteză 636
23.4. Glucooligozidele 639
23.4.1. Maltooligozidele 639
23.4.2. Izomaltooligozidele 640
23.4.3. Ciclodextrinele 640
23.4.4. Gențiooligozidele 643
23.5. Polimerii de tip dextranic 644
23.6. Xilooligozidele 645
23.7. Beneficiile ingestiei de oligozide 645
24. ALTE UTILIZĂRI ALE ENZIMELOR ȘI MICROORGANISMELOR 647
24.1. Acidul fitic 647
24.1.1. Modalități de reducere a conținutului de fitat din cereale și din produsele de panificație 652
24.2. Îndepărtarea pe cale enzimatică a substanțelor responsabile de flatulență în derivatele proteice de origine vegetală 654
24.3. Obținerea de produse fermentate din cereale și semințe cu ajutorul microorganismelor 655
24.3.1. Considerații generale 655
24.3.2. Produse pe bază de soia 657

25. FOLOSIREA ENZIMELOR ŞI MICROORGANISMELOR PENTRU OBŢINEREA DE POLIZAHARIDE **669**
25.1. Obţinerea de polizaharide pe cale enzimatică 669
25.2. Utilizarea microorganismelor pentru obţinerea de polizaharide 670
26. FOLOSIREA DE MICROORGANISME PENTRU OBŢINEREA DE BIOMASĂ ŞI PENTRU ÎMBOGĂŢIREA CU PROTEINE A UNOR PRODUSE VEGETALE **673**
26.1. Producerea de biomasă 673
26.1.1. Biomasa din zer 674
26.1.2. Obţinerea de biomasă din petrol 677
26.1.3. Obţinerea de biomasă din deşeuri celulozice şi leşii sulfitice 680
26.1.4. Obţinerea de biomasă din alcool 681
26.1.5. Obţinerea de biomasă din amidon 681
26.1.6. Obţinerea de biomasă din metan 682
26.1.7. Obţinerea de biomasă din CO_2 şi H_2 682
26.2. Îmbogăţirea cu proteine a unor produse de origine vegetală pe calea fermentaţiei cu microorganisme 683
26.2.1. Făină de manioc îmbogăţită cu proteine prin fermentaţie fungică 683
26.2.2. Crupe de grâu îmbogăţite cu proteine prin fermentaţie cu fungi filamentoşi 685
26.2.3. Lapte de soia îmbogăţit cu lizină 685
26.2.4. Obţinerea de furaje bogate în proteine 686
27. MICROORGANISMELE EXTREMOFILE ŞI ENZIMELE SECRETATE DE ACESTEA **687**
BIBLIOGRAFIE **695**