

## 魔芋葡甘聚糖分子链形态及链参数研究

李 斌, 谢笔钧\*

(华中农业大学 食品科技系 天然产物研究室, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 目的 研究魔芋葡甘聚糖分子链形态, 测定分子链参数。方法 采用光散射、凝胶渗透色谱及粘度法测定溶液行为; 采用原子力显微镜及透射电镜直接观测分子形貌。结果 魔芋葡甘聚糖重均分子量  $M_w$ 、均方根旋转半径  $\langle S^2 \rangle^{1/2}$  以及第二维利系数  $A_2$  分别为  $1.04 \times 10^6$ ,  $(105.0 \pm 0.9)$  nm, 和  $(-1.59 \pm 0.28) \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mL} \cdot \text{g}^{-2}$ , 多分散系数  $M_w/M_n$  为 1.02, Mark-Houwink 方程为  $[\eta] = 5.96 \times 10^{-2} M_w^{0.73}$ ; 分子链参数  $M_L = 982.82 \text{ nm}^{-1}$ ,  $q = 27.93 \text{ nm}$ ,  $d = 0.74 \text{ nm}$ ,  $h = 0.26 \text{ nm}$ ,  $L = 1054.11 \text{ nm}$ 。结论 直接观察到的分子形貌和根据溶液行为的推测均说明, 魔芋葡甘聚糖为伸展的有一定刚性的半屈曲性直链分子, 不存在支链。

**关键词:** 魔芋葡甘聚糖; 链参数; 分子形貌; 原子力显微镜; 光散射

中图分类号: R912 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2003)11 - 0838 - 05

## Study on molecular chain morphology and chain parameters of konjac glucomannan

LI Bin, XIE Bi-jun\*

(Natural Product Chemistry Research Laboratory, Food Science Department of Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** **Aim** To study the molecular chain morphology and chain parameters of konjac glucomannan (KGM). **Methods** Solution behavior was studied by using light scattering (LS), gel permeation chromatograph (GPC) and method of viscosity. The molecular morphology was observed directly by atom force microscope (AFM) and transmission electron microscope (TEM). **Results** The average molecular weight ( $M_w$ ), root-mean-square ratio of gyration ( $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ ), second Virial coefficients ( $A_2$ ) and multi-disperse coefficients ( $M_w/M_n$ ) are  $1.04 \times 10^6$ ,  $105.0 \pm 0.9 \text{ nm}$ ,  $(-1.59 \pm 0.28) \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mL} \cdot \text{g}^{-2}$  and  $(1.020 \pm 0.003)$  respectively; Mark-Houwink equation was established as  $[\eta] = 5.96 \times 10^{-2} M_w^{0.73}$ , the molecular chain parameters were as follows:  $M_L = 982.82 \text{ nm}^{-1}$ ,  $q = 27.93 \text{ nm}$ ,  $d = 0.74 \text{ nm}$ ,  $h = 0.26 \text{ nm}$ ,  $L = 1054.11 \text{ nm}$ . **Conclusion** Both the result showed by direct observation and the deduction drawn by solution behavior confirmed that the KGM molecular is stentering semi-flexible linear chain without branch.

**Key words:** konjac glucomannan; molecular chain parameter; molecular morphology; atom force microscope; light scattering

魔芋古名蒟蒻, 中国的魔芋医药历史悠久, 汉末的《名医别录》已有记载。魔芋的球茎作为中药, 其性寒、味辛、有毒, 可消肿攻毒, 主治痈疮、肿毒、结块等, 对毒蛇咬伤、肿瘤、颈淋巴结核、疔疮、疝气等均

有一定疗效。日本、美国和中国学者对魔芋的医疗作用做了大量的研究, 包括临床试验, 肯定了其减肥、调节糖代谢等方面的疗效<sup>[1-4]</sup>。同时, 另一些研究还指出, 魔芋葡甘聚糖在这方面的疗效大小可能和其分子链形态或链参数有某种联系, 特别指出分子的均方根旋转半径、持久长度在某范围时, 将程度不同的显示这些疗效, 而在范围之外则不显示<sup>[5]</sup>。这说明对魔芋葡甘聚糖分子链形态和链参数的研究

收稿日期: 2003-01-18.

基金项目: 湖北省“十五”重点科技攻关项目(2001AA207B01)

\* 通讯作者 Tel: 86 - 27 - 87283201, E-mail: zpp@public3.bta.net.cn

对阐明其作用机理是十分必要的,在此基础上,可进一步建立魔芋葡甘聚糖链参数和其疗效的对应关系。

魔芋葡甘聚糖(konjac glucomannan, KGM)是由 $\beta$ -D-葡萄糖(Glc)和 $\beta$ -D-甘露糖(Man)按1:1.6<sup>[6]</sup>或1:1.69<sup>[7]</sup>的摩尔比组成的杂多糖, Maeda 报道<sup>[6]</sup>, KGM是以 $\beta$ -1,4-吡喃糖苷键连接而成的直链多糖,但也有报道<sup>[8-10]</sup>认为,在主链的甘露糖C<sub>3</sub>位上存在着通过 $\beta$ -1,3-键结合的支链结构,每32个糖残基上有3个支链,并且每19个糖残基上有1个乙酰基。

Maeda 还利用光散射法<sup>[6]</sup>测得 KGM 的重均分子量为 $1.12 \times 10^6$ 或 $2.619 \times 10^5$ ,而 Xu 等<sup>[8]</sup>则测得 KGM 的粘均分子量为 $8.09 \times 10^5$ 。但关于 KGM 高分子链参数均缺乏系统研究,对分子链是否存在支链报道不一,本文试图将高分子溶液行为和直接成像相结合,进一步了解 KGM 分子链结构特征。

## 材料与amp;方法

**材料** 魔芋精粉由湖北恩施楚业魔芋食品厂提供,均系魔芋属花魔芋(*Amorphophallus konjac* K. Koch),1%水溶胶粘度为15.0 Pa·s。淀粉酶(40 kU)及甘露聚糖酶(60 kU)购自 Sigma 公司。其他试剂均系分析纯。

**KGM 的分离纯化** 称取魔芋精粉10.0 g,用含0.1%叠氮钠(以抑制葡甘聚糖酶的水解作用)的50%乙醇50 mL洗涤3次,除去水溶性杂质,待自然晾干后,用无水乙醚/无水乙醇(2:1)50 mL在40℃搅拌8 h脱脂,随后将脱脂样品以蒸馏水配成0.6%水溶胶,用超速冷冻离心机(Himac Centrifuge, Hitachi)以16 000 r·min<sup>-1</sup>速度离心20 min,去除纤维素及其他不溶性杂质,取上清液,加入适量淀粉酶于常温下酶解以去除所含的少量淀粉,待酶解完全后,取酶解液以 Sevag 法脱蛋白,重复5次,再次离心取上清液,依次用40%、60%和80%乙醇沉淀,收集沉淀经真空冷冻干燥(Alpha-Z, Germany)得到白色粉末状 KGM。

**不同相对分子量魔芋葡甘聚糖样品制备** 称取一定量 KGM,加适量水溶胀后,添加一定量甘露聚糖酶,于室温下酶解不同时间,分别将各降解产物超速离心,取上清液,用不同浓度乙醇溶液进行分级沉淀,冷冻干燥后得到4种分子量大小不同的降解产物(KGM<sub>1</sub>, KGM<sub>2</sub>, KGM<sub>3</sub>和 KGM<sub>4</sub>),作为光散射和粘度法测定的待测样品。

**分子量测定** 凝胶渗透色谱法测定:将待测样

品配制成 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液,采用 Waters GPC 2000 高效液相色谱仪, Sephadex G-100 糖分析柱,折光检测器测定,进样量为20  $\mu\text{L}$ ,流动相为 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 溶液,流速为 $1.0 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ,运行时间为20 min,以 Pullulans 系列作为标准品。

**光散射测定**:采用 DAWN DSP 广角激光光度计(Wyatt Technology Co., USA),PI00 泵及恒温分离设备,TSK-gel G7000 HHR 柱(7.8 mm  $\times$  300 mm),RF-150 型示差检测器。双光束微分折光仪(DRM1020, Otsuka Electronics Co.),检测波长633 nm,在25℃下测定。

**待测样品配制** 多糖溶液配制48 h后经砂芯漏斗过滤,通过 $0.2 \mu\text{m}$ 孔径过滤器(MFHV)直接进样。KGM在 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 溶液中的折光指数增值( $d_n/d_c$ )为 $0.14 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 。数据的获取和分析均采用 Astra 软件。

**粘度法** 采用乌氏粘度计(0.58 mm)于25℃超级恒温器( $\pm 0.05 \text{ }^\circ\text{C}$ )中测定,并作吸附校正,溶剂采用 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 溶液。

**KGM 的分子形貌观察** 透射电镜:KGM 样品以蒸馏水溶解,3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS法)标定浓度,并准确稀释到 $1.5 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,随后将配好的溶液粘在涂有碳膜的铜网上,待溶液挥发干后,以 $7^\circ$ 角喷涂钨钨合金,在透射电镜(Philips Tem400st, Holand)下放大40 000倍,观察魔芋葡甘聚糖的分子形貌。

**原子力显微镜观测**:采用 AF-III 型 SPM 仪,样品浓度 $1.5 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,采用振动 TM 模式,扫描范围为( $6 \mu\text{m} \times 6 \mu\text{m}$ )~( $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ ),分辨率(以云母表面晶格为准)XY方向 $< 0.4 \text{ nm}$ ,Z方向 $< 0.1 \text{ nm}$ ,针尖逼近行程 $\geq 20 \text{ nm}$ ,精度 $\leq 0.1 \mu\text{m}$ ,图像均在 Tapping 模式下获得;接触作用力控制在3~4 nN 量级以内,所有实验均在大气、常温(20℃)及相对湿度30%下完成。

## 结果与amp;讨论

### 1 KGM 的分子量

由凝胶渗透色谱图可以看出 KGM 分子量分布为一单峰呈高斯正态分布,其中  $M_n$   $1.04 \times 10^6$ ,  $M_p$   $1.03 \times 10^6$ ,  $M_w$   $1.09 \times 10^6$  和  $M_w/M_n = 1.04$ ,可见 KGM 为一种相对分子量分布较窄的多糖。

KGM 分子量采用凝胶色谱-光散射联用法分析,结果表明,示差检测器得到的凝胶渗透色谱图与利用激光散射测量光强度得到的光散射分子量分布

图十分吻合,且呈正态分布,多分散系数  $M_w/M_n = 1.02$ ,  $M_n$ ,  $M_w$  和  $M_z$  分别为  $1.03 \times 10^6$ ,  $1.04 \times 10^6$  和  $1.04 \times 10^6$ , 均方根旋转半径  $\langle S^2 \rangle^{1/2} 105.0 \text{ nm}$ 。

以上通过凝胶渗透色谱相对方法与凝胶色谱-光散射联用绝对方法得到的平均分子量十分接近,说明所测得 KGM 平均分子量可靠。

采用光散射单机测定 KGM 相对分子量,得到 KGM 在  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$  溶液中的 Zimm 图(图 1),从而计算得到 KGM 的重均摩尔质量  $M_w 1.03 \times 10^6$ , 均方根旋转半径  $\langle S^2 \rangle^{1/2}$  为  $104.0 \text{ nm}$  和第二维利系数  $A_2 (-1.59 \pm 0.28) \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mL} \cdot \text{g}^2$ 。至于表示分子链柔性的参数  $A_2$  呈现出负值的原因尚不清楚,可能与多糖复杂的结构和溶液行为以及多糖链间相互作用有关,尚待进一步研究。KGM 的  $\langle S^2 \rangle^{1/2}$  值近似于相对分子量相近的单螺旋链黑木耳葡聚糖<sup>[11]</sup>、三螺旋链裂褶菌聚糖和双螺旋链黄原胶<sup>[12]</sup>及香菇多糖 L-F<sub>6</sub> 等<sup>[13]</sup> 在水溶液中的值,由此表明 KGM 在水溶液中分子链伸展。

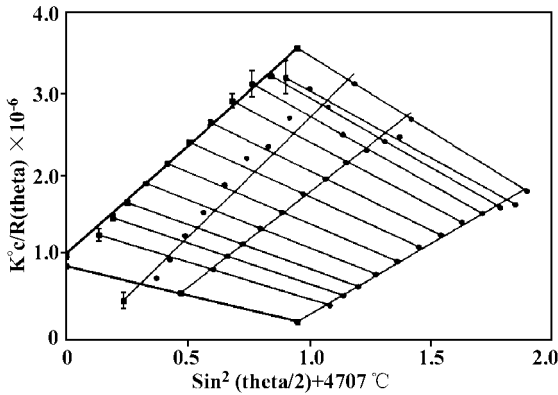


Figure 1 Zimm plot of konjac glucomannan (KGM) in  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$

## 2 KGM 分子链参数

**2.1 分子链形状判断** 根据光散射及粘度法测得 KGM 及其不同相对分子质量的  $KGM_1 - KGM_4$  的  $M_w$  和特征粘度  $[\eta]$  数据,以  $\log[\eta]$  对  $\log M_w$  作图,得到  $R^2$  为 0.987 的直线,该方程的建立为粘度法测定 KGM 分子量的一个快速简易方法。依据直线的斜率和截距求得  $K = 5.96 \times 10^{-2}$ ,  $\alpha = 0.73$ 。从而建立 KGM 的 Mark-Houwink 方程为  $[\eta] = 5.96 \times 10^{-2} M_w^{0.73}$ 。

$\alpha$  (粒子极化率)是一个特性常数,其数值大小取决于高分子溶液体系的性质及高分子链结构,与分子链的刚性程度和溶剂化能力有关。它是判断高分

子链形态的一个重要参数,魔芋葡甘聚糖  $\alpha = 0.73$ ,表明 KGM 分子在水溶液中的形态为半柔顺性高分子链<sup>[14]</sup>。

**2.2 链参数的计算** KGM 为半柔顺性链(或半柔性蠕虫状链)可采用下列公式<sup>[14]</sup>。

$$(M_w^2/[\eta])^{1/3} = I + SM_w^{1/2} \tag{1}$$

$$I = 1.5416 \times 10^{-8} A_0 M_L (\text{g}^{1/3} \cdot \text{cm}^{-1}) \tag{2}$$

$$S = 1.5416 \times 10^{-8} B_0 (2L_p/M_L)^{-1/2} (\text{g}^{1/3} \cdot \text{cm}^{-1}) \tag{3}$$

$M_L$  —单位长度摩尔质量  $\text{nm}^{-1}$

$L_p$  —持久长度

$B_0$  —常数,可由查表得到,一般为  $1.05 \sim 1.08$ ,

KGM 计算取中间值  $B_0 = 1.065$ 。

分别将 KGM,  $KGM_1 \sim KGM_4$  的  $M_w$  及  $[\eta]$  的值代入①中,以  $(M_w^2/[\eta])^{1/3}$  对  $M_w^{1/2}$  作图,得一直线后根据截距和斜率求得  $I$  和  $S$ 。即  $I = 201.51$ ,  $S = 0.68$ 。由公式

$$d_r^2/A_0 = (4\phi_0/1.215\pi N_A)(\nu/I)S^4 \tag{4}$$

$$\log(d_r^2/A_0) = 0.173 + 2.158 \log d_r \tag{5}$$

$\phi_0$  —Flory 常数,  $d_r \leq 0.1$  时,取值  $2.86 \times 10^{23}$

$N_A$  —Avogadro 常数

$\nu$  —偏微比容

将④式  $d_r^2/A_0 = 1.23 \times 10^{-4}$  中的值代入⑤中,得到  $d_r = 13.15 \times 10^{-3}$ ,  $A_0 = 1.33$ ,再由公式

$$d = d_r \times 2L_p \tag{6}$$

$$h = (M_0/x)/M_L \tag{7}$$

$$L = M_0/M_L \tag{8}$$

$$X = L/d \tag{9}$$

$d$  —链径, nm

$h$  —链上单位葡萄糖残基围长(螺距), nm

$M_0$  —重复单元相对分子量,  $M_0 = 162$

$x$  —链上重复单元所含葡萄糖残基个数,

$L$  —轮廓长度, nm

$X$  —轴比

计算得到链参数如下:

$$M_L = 982.82 \text{ nm}^{-1}, L_p = 27.93 \text{ nm}, d = 0.74 \text{ nm},$$

$$h = 0.26 \text{ nm}, L = 1054.11 \text{ nm}, X = 4054.27$$

$M_L$  是表征分子链特征(构象、刚性)的重要参数之一,其值愈大链愈刚直,一般在  $500 \sim 2200 \text{ nm}^{-1}$ ,而 KGM 的  $M_L$  为  $982.82 \text{ nm}^{-1}$ ,小于单螺旋链的黑木耳  $\beta$ -D-葡聚糖的  $1030 \text{ nm}^{-1}$ ,更小于黄原胶 ( $1940 \text{ nm}^{-1}$ ) 和裂褶菌葡聚糖 ( $2170 \text{ nm}^{-1}$ ),但大于

半柔性的三硝基纤维素的  $520 \text{ nm}^{-1}$ , 因此可以由此推测 KGM 链形态应处于单螺旋链和柔性链之间的一定刚性的半柔顺性链。

$L_p$  值代表链的支撑能力, 即表征链的刚柔程度, 其值越大链的刚性愈强, 几种天然多糖及其衍生物的  $L_p$  值: 三硝基纤维素(17 nm) < KGM(27.93 nm) < 黑木耳  $\beta$ -D-葡聚糖(90 nm) < 黄原胶(120 nm) < 裂褶菌葡聚糖(200 nm), 可见 KGM 的  $L_p$  值远小于黑木耳多糖等刚性分子, 且仅略大于柔性多糖三硝基纤维素, 进一步支持了以上的推测。

### 3 分子形貌观察

TEM 是常用于直接观察和研究分子链较长的高分子链形貌的一种有效方法, 它可以获得样品表面的二维信息。而 AFM 是在近 10 年来发展起来的一种研究微观世界的新方法, 超越了光和电子波长对显微镜分辨率的限制, 能在三维立体上获得观察物质的形貌特征, 采用轻敲模式, 可在不破坏分子链的情况下, 直接观察多糖的分子形貌<sup>[5]</sup>。

KGM 的原子力显微镜照片表明 KGM 分子链呈现出伸展的链状结构。糖链的密度依赖于初始浓度及其沉积到云母表面的量; 图像与针尖上的作用力相关, 作用力太大易损坏糖链, 而太小则对比度差, 因此本试验选择作用力在 3~4 nN 量级, 获得了较为清晰、稳定的图像。可以确认的 KGM 单链长度 950~1 100 nm, 平均分子链长约 1 020 nm, 高度约 0.7~1.0 nm, 与光散射测量的计算值相比, 链长相差仅约 3.5%, 高度也与计算的链径接近。

由 AFM 观测得到的 KGM 链宽度为 35.0 nm 左右, 远大于糖单链分子的估算值(一般多糖分子链宽度为 0.1~1 nm), 高分辨率图像以及立体图像也显示出这一点, 产生这种增宽效应的原因可能是由于有限大小的针尖, 在扫描到不同的部位时与分子链作用而出现。Bustamante 等<sup>[16]</sup>用原子力显微镜观察 DNA 时也出现类似现象。

KGM 放大 40 万倍的透射电镜照片(图 2)显示, KGM 分子主要为伸展的直链分子, 没有观察到支链存在, 可能是因为支链太短造成, 这与 Xu<sup>[8]</sup>提出的多支链结构不一致, 与 Ogawa<sup>[17]</sup>提出的二折螺旋也不同(可能是由于试验材料魔芋的种类差异造成)。分子链长度为 950~1 125 nm 之间, 平均约为 1 050 nm, 与 AFM 观测的结果接近, 分子链比 AFM 图中仅略微伸展一些(可能与喷金及真空操作有关), 与前述链参数的计算值也几乎一致。分子链径 0.5~1.0 nm(平均约 0.7 nm)的范围也与由通过光散射得到

的计算值相吻合。

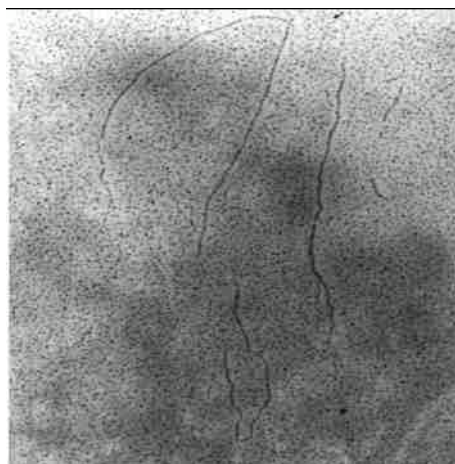


Figure 2 TEM image of KGM

### 结论

采用高分子溶液行为和直接成像观察研究魔芋葡甘聚糖的形态, 两种方法测定的链长相差小于 3.5%, 链径基本接近, 表明直接成像观察的实验结果与计算值吻合, 从而证实了高分子溶液行为对分子形态的推论。

魔芋葡甘聚糖是一种相对分子量分布较窄的多糖, 魔芋葡甘聚糖分子链为伸展的有一定刚性的半屈曲直链分子, 不存在支链, 分子链参数  $M_w = 982.82 \text{ nm}^{-1}$ ,  $L_p = 27.93 \text{ nm}$ ,  $d = 0.74 \text{ nm}$ ,  $h = 0.26 \text{ nm}$ ,  $L = 1 054.11 \text{ nm}$ 。

### References:

- [1] Yan BX, Li YL, Su YF, et al. Action of glucomannan in amorphophallus rivieri durieu on matured obese rats [J]. *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 1998, 13(4): 32-35.
- [2] Gu YD, Shi JX, Hu ZY. Fight against senium action of konjac polysaccharides [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(2): 78-81.
- [3] Mao CP, Yu NY, Gu ZL. Hypoglycemic effects of amorphophallus konjac in alloxan diabetic rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药理学), 2001, 18(3): 12-17.
- [4] Liu H. Therapeutic effect of glucomannan on experimental diabetic mice [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2002, 18(1): 12-17.
- [5] Chong ZZ. *Konjac Science* (魔芋科学) [M]. Chongqing: Chongqing Food Industry Institute, 1987. 95-98.
- [6] Maeda M, Shimahara H, Sugiyama N. Detailed examination of the braced structure of konjac glucomannan [J]. *Agric Biol Chem*, 1980, 44(2): 245-252.
- [7] Jia CY, Chen SW, Mo WP. Study on *amorphophallus albus*

- and *amorphophallus konjac* K. Koch glucomannan [ J ]. *J Biochem* ( 生物化学杂志 ), 1988 ,4(5) :407 - 413 .
- [ 8 ] Xu SY, Yang L. Study on character of konjac glucomannan and quality of konjac flour [ J ]. *J Wuxi Inst Light Ind* ( 无锡轻工业学院学报 ), 1990 ,9(3) :26 - 32 .
- [ 9 ] Kishida N, Okimasu S. Preparation of water-soluble methyl konjac glucomannan [ J ]. *Agric Biol Chem*, 1978 ,42(3) :669 - 670 .
- [ 10 ] He DB, Zhan DF, Zhang WJ. Study on interaction and gelatin between konjac flour and Xanthan [ J ]. *Acta Polym Sin* ( 高分子学报 ), 1999 ,4 :460 - 464 .
- [ 11 ] Zhang LN, Yang LQ. Studies on structure-activity relationship of acidic hetero polysaccharide for *auricularia auricula-Judae* [ J ]. *Biopolymers*, 1995 ,36(4) :695 - 699 .
- [ 12 ] Diao HX, Liang FL, Liang XJ, *et al.* Studies on the synergism of interaction of xanthan NK-01 and galactomannan [ J ]. *Acta Univ Nankai Sci Nat* ( 南开大学学报自然科学版 ), 2001 ,34(1) :15 - 20 .
- [ 13 ] Zhang LN, Zhang PY, Li X, *et al.* Studies on components and molecular weights of polysaccharides from *lentinus edodes* [ J ]. *Chem J Chin Univ* ( 高等学校化学学报 ), 1998 ,19(9) :456 - 461 .
- [ 14 ] Zhu SN. *Polymer Chain Structure* ( 高聚物链结构 ) [ M ]. Beijing : Science Press , 1996 .123 - 130 .
- [ 15 ] Rief M, Oesterhelt F, Heymann B, *et al.* AFM, a tool for single-molecule experiments [ J ]. *Science*, 1997 ,275(21) :1295 - 1297 .
- [ 16 ] Bustamante C, Vesenka D, Tang CL, *et al.* Study on conformation of DNA by using atomic force microscopy [ J ]. *Biochemistry*, 1992 ,31(11) :22 - 32 .
- [ 17 ] Ogawa K, Yui T, Mizuno T. Molecular and crystal structure of konjac glucomannan in the mannan II polymorphic form. *Agric Biol Chem*, 1991 ,55(8) :2105 - 2111 .