

室内饲养与野外台湾乳白蚁木质纤维素水解酶活性的比较研究

刘瑞娴¹ 曾文慧² 李志强² 刘炳荣² 李秋剑² 钟俊鸿^{2*}

(1. 中国科学院华南植物园 广州 510650; 2. 广东省昆虫研究所 广州 510260)

摘要 以台湾乳白蚁 *Coptotermes formosanus* Shiraki 的室内群体与野外群体为研究对象,测定工蚁体内 4 种糖基水解酶和滤纸酶活(FPA)的活力大小及分布。结果表明:内切- β -1,4-葡聚糖酶(EG)、 β -葡萄糖苷酶(BG)、外切- β -1,4-葡聚糖酶(CBH)、内切- β -1,4-木聚糖酶(EX)及 FPA 的活性在不同组织中有较大差异。两类群体的 BG、EX 及 CBH 有相似分布,BG 和 EX 分别高度集中于中肠和后肠,CBH 主要在中肠及后肠分布。FPA 和 EG 在两类群体中有不同分布,室内群体的主要在中肠,野外群体的则集中于后肠。两类群体各种酶活力大小顺序同为:EX > EG $\geq$ BG > CBH。此外,室内饲养群体的大小及年限对台湾乳白蚁木质纤维素酶活力无显著影响。

关键词 台湾乳白蚁, 纤维素酶, 半纤维素酶, 酶活力

Comparative study of the activity of lignocellulolytic enzymes in captive and field colonies of *Coptotermes formosanus*

LIU Rui-Xian¹ ZENG Wen-Hui² LI Zhi-Qiang² LIU Bing-Rong²

LI Qiu-Jian² ZHONG Jun-Hong^{2*}

(1. South China Botanical Garden, Guangzhou 510650, China; 2. Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510260, China)

Abstract Workers of *Coptotermes formosanus* Shiraki were collected from captive and field colonies. The activity of 4 kinds of glycoside hydrolase, and filter paper enzyme activity (FPA), were determined in different tissues including the salivary gland/foregut, midgut, hindgut and integument. The results show that the activities of glycoside hydrolase and FPA varied in different tissues. β -1,4-D-glucosidase (BG), endo- β -1,4-xylanase (EX) and exo-1,4- β -D-glucanase (CBH) were distributed similarly in both captive and field colonies. BG and EX were mostly located in the midgut and hindgut, respectively, whereas the highest CBH activity was observed in the midgut and hindgut. Endo-1,4- β -glucanase (EG) and FPA had different distributions in insects from the two types of colonies; concentrated in the midgut in insects from captive colonies but mainly located at the hindgut in those from field colonies. The relative activity of each glycoside hydrolase in both types of colonies was, in descending order, EX > EG $\geq$ BG > CBH. In addition, feeding size and age had no significant influence on the activities of lignocellulolytic enzymes in *C. formosanus*.

Key words *Coptotermes formosanus*, cellulase, hemicellulase, enzyme activity

木质纤维素是一类由纤维素(cellulose)、半纤维素(hemicellulose)以及木质素(lignin)等物质结合在一起组成的天然高分子化合物,广泛存在于植物组织中(Arakawa *et al.*, 2009)。作为全球最为丰富的可再生资源,其生物学酶降解转化为可再生资源,被认为是最具潜力的新能源开发利用领域之一(Wyman, 2007)。纤维素酶和半纤维素

酶均属于糖苷水解酶家族(glycoside hydrolase family, GHF),为多组分复合酶。纤维素酶传统上被分为 3 类组分:内切- β -1,4-葡聚糖酶(endo-1,4- β -glucanase, EC 3.2.1.4, 简称 EG 或 Cx);外切- β -1,4-葡聚糖酶(exo-1,4- β -D-glucanase, EC 3.2.1.91),即纤维二糖水解酶(cellobiohydrolase, 简称 CBH 或 Cl); β -葡萄糖苷酶(β -1,4-D-

* 通讯作者, E-mail: zhong@gdei.gd.cn

收稿日期:2011-01-24, 接受日期:2011-06-20

glucosidase, EC 3. 2. 1. 21, 简称 BG) (Clark, 1997; 顾方媛等, 2008; 相辉和周志华, 2009)。半纤维素主要成分木聚糖的降解需要多个水解酶的联合作用, 其中最为关键的是内切- β -1, 4-木聚糖酶 (endo- β -1, 4-D-xylanase, EC. 3. 2. 1. 8, 简称 EX) (李卫芬和孙建义, 2001)。

动物纤维素酶与微生物酶系有所不同, 作为一个新的纤维素酶体系, 它的研究具有重大理论价值。一些昆虫进化出高效利用木质纤维素的策略, 其中白蚁因其对木质纤维素惊人的转化能力, 在地球物质循环过程中起着重要作用, 在长期进化过程中形成了独特的木质纤维素降解机制, 因此白蚁木质纤维素酶系组成受到广泛关注 (Watanabe *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 2008; Willis *et al.*, 2010)。相关研究发现台湾乳白蚁工蚁体内有 2 个独立的木质纤维素消化酶系统, 一是依赖唾液腺和中肠细胞分泌的内源性木质纤维素酶, 二是依赖后肠共生微生物分泌的外源性木质纤维素酶。这 2 个酶系统共同完成白蚁肠道内木质纤维素的分解 (Watanabe *et al.*, 2006; 赵园园等, 2008; Tokuda *et al.*, 2009)。目前国内对白蚁纤维素酶活性的研究主要集中在不同种间和不同等级白蚁的纤维素酶比较, Mo 等 (2004) 对我国常见的 5 种白蚁, 即黄胸散白蚁 *Reticulitermes flaviceps*、细颚散白蚁 *Reticulitermes leptomandibularis*、台湾乳白蚁 *Coptotermes formosanus*、黑翅土白蚁 *Odontotermes formosanus* 和平阳堆砂白蚁 *Cryptotermes pingyangensis* 的肠道木质纤维素酶活性进行比较研究。结果表明这 5 种白蚁体内的内切- β -1, 4-葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶和内切- β -1, 4-木聚糖酶活性有较大的差异。目前白蚁体内的半纤维素酶和外切- β -1, 4-葡聚糖酶活性报道不多 (Nakashima *et al.*, 2002a)。

本研究选取我国常见的台湾乳白蚁为研究对象, 一方面比较了台湾乳白蚁工蚁肠道不同部位 EG、BG 及 CBH 活性, 并对 EX 和滤纸酶活 (FPA) 进行了测定; 另一方面, 比较长期室内饲养的台湾乳白蚁群体与野外台湾乳白蚁群体的木质纤维素酶活性差异, 进而研究人工饲养条件对台湾乳白蚁体内木质纤维素酶的影响, 为白蚁纤维素酶的进一步研究与利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试白蚁 野外群体为野外采集台湾乳白蚁的各个品级, 其中将工蚁装入有生理盐水的冷冻管中, 现场放入液氮内保存, 后转移至 -80°C 低温冰箱 (VXE570) 保存。室内群体的供试虫源为作者所在实验室玻璃容器内用木块饲养 (表 1), 饲养温度为 $(25 \pm 1)^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 $65\% \pm 5\%$ 。

表 1 供试台湾乳白蚁

Table 1 Termite sources

群体编号 Colonies number	配对/采样时间 Matching/ sampling time	备注 Notes
cf01	1992-05-12	室内大巢饲养
cf02	1999-05-13	室内大巢饲养
cf03	1996-10-03	室内大巢饲养
cf04	1998-05-12	室内小巢饲养
LD	2010-06-04	广州龙洞
MF	2010-06-22	广州帽峰山
LH	2010-07-09	广州莲花山
LF	2010-07-09	惠州罗浮山

1.1.2 主要试剂 葡萄糖 (glucose, 广州试剂), 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na, 天津福晨), D-水杨苷 (D-Salicin, 上海晶纯), 对硝基苯- β -D-纤维二糖苷 (p-NPC, Sigma), 木聚糖 (xylan from birchwood, Sigma), D-木糖 (D-Xylose, Genview), 3, 5-二硝基水杨酸 (DNS, 广州光华), 酒石酸钾钠 (天津福晨), 结晶酚 (北京鼎国), 无水硫酸钠 (广州化学), 考马斯亮蓝 G-250 (广州化学), 对硝基苯酚 (p-NP, Sigma), 牛清血蛋白组分 V (BSA, 北京鼎国), 0.9% 生理盐水 (Saline, NaCl 溶液), 磷酸, SAB 缓冲液 (醋酸-醋酸钠缓冲液), 碳酸钠 (广州化学), 滤纸 (双圈定性滤纸)。

1.2 方法

1.2.1 粗酶制备 选取工蚁 15 ~ 20 头, 用预冷 0.9% 生理盐水中反复漂洗, 滤纸吸干表面水分, 置于预冷的灭菌平皿。在解剖镜下将白蚁分成唾液腺/前肠 (包括白蚁头部)、中肠、后肠、表皮 (切除头部并取出整个肠道组织后的剩余部分) 4 部

分,并分别收集进 500 mL SAB 缓冲液(0.1 mol/L, pH 5.6, 预冷)。与未经解剖处理的 5 头工蚁一道分别转移至玻璃组织匀浆器,在冰浴中研磨,匀浆液在 12 000 r/min 依次 10、5 min(4℃)低温离心(Sigma 3K15),得离心上清液即为粗酶液,于 -20℃ 保存待酶活力测定用。

1.2.2 蛋白质浓度的测定 蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法(Bradford, 1976)。将粗酶液按一定比例稀释,取 50 μ L 稀释后的粗酶液与 350 μ L 考马斯亮蓝 G-250 显色剂混匀显色,静置 3 min 后用多功能酶标仪(PerkinElmer, 1420-012 victor3)测定 595 nm 波长处的各吸光值。根据同时测定的蛋白质标准曲线求酶液的蛋白质含量。每个反应体系 3 个重复。

1.2.3 滤纸酶活测定 FPA 的测定参照 Miller (1959)方法,采用还原糖法测定。取 120 μ L SAB 缓冲液(0.1 mol/L, pH 5.6)浸润滤纸小圆片(约 3.5 mg/piece, 高温灭菌),加入不同部位提取的粗酶液 12 μ L,对照管用 SAB 缓冲液代替粗酶液,37℃ 恒温水浴反应 1 h。反应完毕后加入 120 mL DNS 显色剂终止反应,沸水浴 5 min 显色,迅速冷却,用 SAB 缓冲液定容到 500 μ L,测定 540 nm 波长处的各吸光值,根据同时测定的葡萄糖标准曲线计算酶活力。酶活力单位(U)定义为在 37℃, pH 5.6 反应条件下,每分钟水解底物产生 1 μ g 还原糖的酶量。比活力(IU)为每毫克酶蛋白具有的酶活力单位数,表示为 U/mg。

1.2.4 内切- β -1,4-葡聚糖酶, β -葡萄糖苷酶及内切- β -1,4-木聚糖酶的活性测定 EG、BG 及 EX 的活性测定均采用还原糖法测定,分别以 1% CMC-Na 溶液,1% Salicin 溶液及 1% Xylan 溶液为底物。取 120 μ L 底物溶液与不同部位提取的粗酶液 12 μ L 在 37℃ 水浴反应 1 h,对照管用 SAB 缓冲液(0.1 mol/L, pH 5.6)代替粗酶液。反应完毕后加入 120 μ L DNS 溶液终止反应,沸水浴 5 min 显色,迅速冷却,用 SAB 缓冲液定容到 500 μ L,测定 540 nm 波长处的各吸光值。BG 和 EG 根据同时测定的葡萄糖标准曲线计算酶活力,EX 根据同时测定的木糖标准曲线计算酶活力。

1.2.5 外切- β -1,4-葡聚糖酶的活性测定 CBH 的活性测定以 0.1 mmol/L pNPC 为底物。取 120 μ L 底物溶液和不同部位提取的粗酶液 12 μ L 在 37℃ 水浴反应 1 h,对照管用 SAB 缓冲液(0.1

mol/L, pH 5.6)代替粗酶液。反应完毕后加入 120 μ L 1 mol/L Na_2CO_3 溶液终止反应,用 SAB 缓冲液定容到 500 μ L,测定 405 nm 波长处的各吸光值,根据测定的对硝基苯酚(p-NP)标准曲线计算相应酶活力。酶活力单位(U)定义为在 37℃, pH 5.6 反应条件下,每分钟水解底物产生 1 μ g p-NP 的酶量。比活力(IU)为每毫克酶蛋白具有的酶活力单位数,表示为 U/mg。上述每个反应均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 室内群体与野外群体台湾乳白蚁 4 种糖基水解酶及 FPA 活力的肠道分布特点

4 个室内群体和 4 个野外群体乳白蚁的不同组织酶活力测定结果显示:除 BG 活力在两类群体中大小相当,其他各类酶活力大致显现出野外群体略大于室内群体,但最大值多出现在室内群体 cf01 或 cf04, EX 的最大值为野外群体 LH。

室内群体乳白蚁的 FPA 和 EG 活力集中在中肠,其次是在唾液腺/前肠,而野外群体的 FPA 和 EG 活力则主要集中在后肠,其次是在中肠,最大值 FPA(3.33 U/mg)和 EG(4.61 U/mg)均出现在室内群体 cf04。BG 活力在野外及室内群体中大小相当,且明显集中于中肠,其他各部分活力相近,最大值是室内群体 cf01(13.15 U/mg)。两类群体的 CBH 活力主要分布于中肠和后肠,最大值出现在室内群体 cf01(0.36 U/mg)。两类群体的 EX 活力均较明显地集中在后肠,其次是中肠,最大值为野外群体 LH(15.34 U/mg)(图 1)。

室内饲养群体的 FPA、EG、BG、CBH 活力在中肠的比例较野外群体的相应比例大。此外,室内群体的 EG、BG、CBH 及 EX 活力对其 FPA 影响大且成正比例关系,其中以 EX 和 BG 影响最大。与室内群体情况相反,野外群体肠道分布的 FPA 大小则和 EG、BG、CBH 及 EX 活力大小呈现出反比例关系。5 种酶活性在台湾乳白蚁表皮中也有一定分布,野外群体的 EG、FPA 和室内群体的 FPA 在表皮有较大比例分布(图 1)。

2.2 整头乳白蚁 4 种糖基水解酶活力及 FPA 活力大小对比

整头乳白蚁各种木质纤维素酶活力测定显示:与不同组织酶分布实验结果不同,整头白蚁酶活力对比实验中,野外群体的大部份酶活力大于

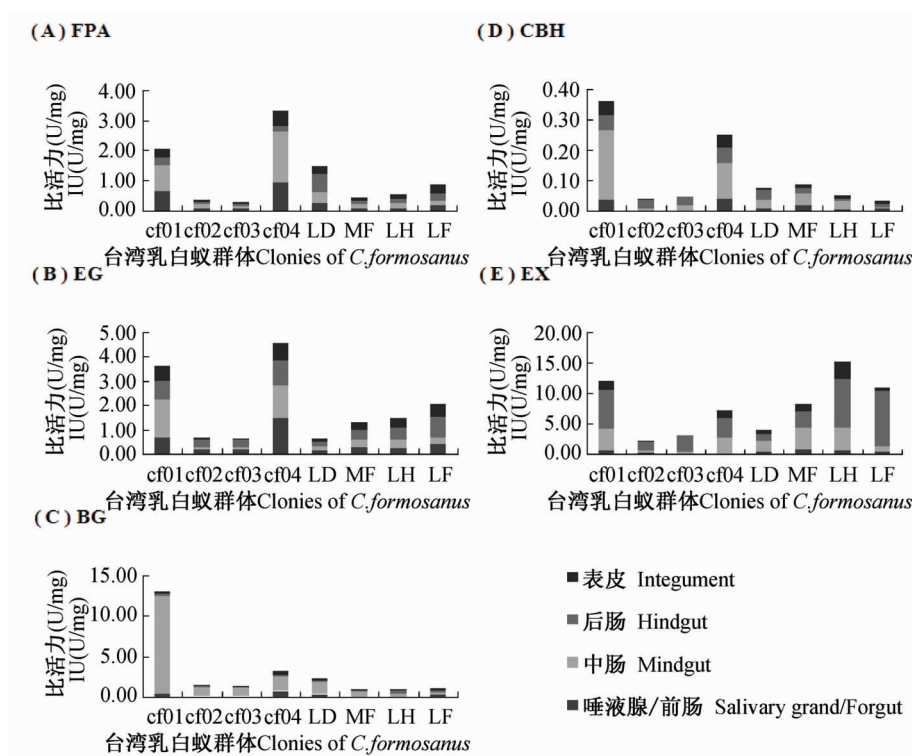


图1 台湾乳白蚁室内及野外群体的各类木质纤维素酶活性的肠道分布

Fig. 1 The comparative distribution of different kinds of lignocellulolytic enzymes in different tissues collected separately from workers of *Coptotermes formosanus* from captive and field colonies

室内群体,两类群体的3种纤维素酶堆积活力(即EG + BG + CBH)相当。FPA最大值是野外群体LD(0.52 U/mg),其次是室内群体cf04(0.22 U/mg)。EX最大值是野外群体MF(6.73 U/mg),其次是野外群体LH(5.52 U/mg)。野外群体EX活力与FPA、EG + BG + CBH成反比,而室内群体中的EX活力则与FPA、EG + BG + CBH成正比。此外,两类台湾乳白蚁群体的EX活力差异较其他酶系大,且各酶活力大小顺序同为:EX > EG ≥ BG > CBH(图2)。

2.3 室内饲养环境及饲养时间对台湾乳白蚁工蚁的木质纤维素酶活力的影响

进行试验的4个室内饲养群体中,小巢饲养样cf04的酶分布实验结果显示,各类木质纤维素酶活力大小和其他3个大巢饲养群体相比较没有呈现出弱化趋势,在整头乳白蚁各项酶活力测定实验中也有类似反映,小巢饲养环境对台湾乳白蚁的木质纤维素酶活力无限制影响。室内不同饲养年份的台湾乳白蚁纤维素酶活力没有呈现和时间相关的规律,即饲养年限不会影响台湾乳白蚁

的木质纤维素酶活力(图1,2)。

3 讨论

乳白蚁自身分泌纤维素酶的部位主要有唾液腺和中肠,后肠共生微生物为其提供外源纤维素酶(Watanabe *et al.*, 1998; Tokuda *et al.*, 1999, 2004)。正是通过利用这2种不同来源的纤维素酶,台湾乳白蚁才能把木质纤维素高效地降解为葡萄糖(Nakashima *et al.*, 2002b)。实验结果显示BG活力集中于中肠,而EX活力集中于后肠,EG在肠道各部分的分布较为均衡,CBH则在中肠的活力稍大。我们推测台湾乳白蚁BG主要为自身分泌的内源性酶,而EX基本为后肠共生微生物来源。由于EG在肠道各部分都有一定比例的活性,可以看出EG在整个木质纤维素降解过程中的重要性。同时,EG是否为内源和外源双向来源,白蚁肠道各部分之间是否存在着肠液的相互运输,还需要进一步的探索。到目前为止,CBH基因只在低等白蚁后肠共生微生物中发现(Nakashima *et al.*, 2002b),因此前肠及中肠中出现的CBH活

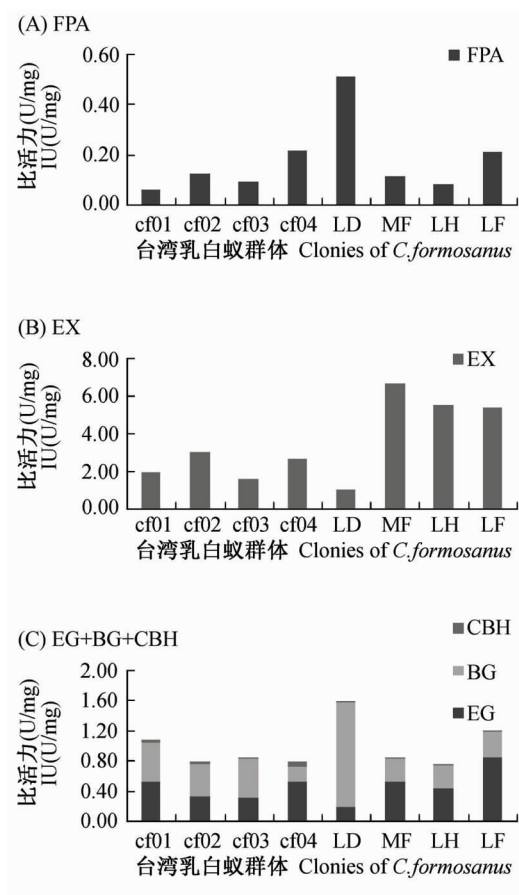


图2 台湾乳白蚁4个室内群体和4个野外群体的各类木质纤维素酶的整头活性

Fig. 2 The comparative distribution of different kinds of lignocellulolytic enzymes in whole body of *Coptotermes formosanus* from captive and field colonies

力的来源为后续工作需要解决的问题。

对于天然木质纤维素,只有当包裹内层纤维素的半纤维素物质得到降解,纤维素酶才能渗透至纤维素层对其进行分解(Arakawa *et al.*, 2009)。由此推测,增加降解半纤维素酶活力将大大有利于纤维素酶的酶解作用,进而提高天然木质纤维素的降解效率。本实验结果显示,台湾乳白蚁的总酶活力中,EX所占比例最大,这对于半纤维素酶的降解具有重要意义。

FPA测定的是乳白蚁对天然纤维素的降解能力,一方面野外群体和室内群体乳白蚁FPA活力分布情况不同,前者主要分布在后肠,后者主要分布于中肠。相似情况是唾液腺/前肠与后肠的FPA活力所占比例不稳定且呈现2个区域的FPA酶活力此消彼长的现象。室内群体中肠占大比例

的FPA活力,说明室内饲养的台湾乳白蚁仅仅依靠自身分泌的内源纤维素酶也能够有效地将天然纤维素降解为单糖,且中肠对滤纸的降解效率大于后肠。另一方面,室内4个群体的FPA与EG、EX成正比,野外4个群体的情况则成反比,且室内群体的EG集中于中肠,野外群体的EG则集中于后肠。因此可以推测,由于室内乳白蚁群体的食料比较单一固定,饲养环境稳定,因此其后肠的共生微生物种类比野外环境下的乳白蚁少,在对滤纸(天然纤维素)进行水解时,需要自身分泌的内源纤维素酶来进行大量的补充,使得室内乳白蚁的内源性纤维素酶成为天然纤维素降解的主要酶活力来源。野生状态下的乳白蚁则因肠道微生物类群更为丰富多样,外源纤维素酶种类和分泌量都较室内饲养乳白蚁大,因而其内源性纤维素分泌系统处于相对沉默的状态。此外,有研究显示半纤维素和木质素的水解终产物对纤维素酶的活力大小和分泌量有反馈抑制作用(Knauf and Moniruzzaman, 2004),假设野外乳白蚁更为丰富的肠道微生物可以提供较大比例的半纤维素酶,则可能由此反馈抑制了内源性纤维素酶的分泌。

实验中发现台湾乳白蚁的表皮也有不同大小的5种木质纤维素酶活力,杨天赐等(2003)对黄胸散白蚁纤维素酶的研究也有类似发现。推测可能是由于低等白蚁表皮细胞能够分泌少量纤维素酶,或是来源于体内共生微生物,其原因有待进一步研究。

室内乳白蚁饲养年份最长的群体为1992年的cf01,其余3个依次为1996年(cf03)、1998年(cf04)和1999年(cf02)。首先,各群体乳白蚁酶活力没有随饲养时间增长而呈现减小趋势。其次,3个大巢饲养的乳白蚁与一个小巢饲养的乳白蚁在酶活力分布上没有显示出差异。最后,5种酶活力也没有显示室内和野外的差异,表现为个体浮动。因此,推测室内饲养年限和小巢饲养不会对台湾乳白蚁的木质纤维素酶产生限制影响。

参考文献(References)

- Arakawa G, Watanabe H, Yamasaki H, Maekawa H, Tokuda G, 2009. Purification and molecular cloning of xylanases from the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73(3):710—718.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the

- quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248—254.
- Clark AJ, 1997. Biodegradation of Cellulase; Enzymology and Biotechnology. Lancaster: Technomic Pub. Co. 1—272.
- Deng T, Zhou Y, Cheng M, Pan C, Chen C, Mo J, 2008. Synergistic activities of the symbiotic fungus *Termitomyces albuminosus* on the cellulase of *Odontotermes formosanus* (Isoptera: Termitidae). *Sociobiology*, 51(3): 733—740.
- Knauf M, Moniruzzaman M, 2004. Lignocellulosic biomass processing: A perspective. *Int. Sugar J.*, 106 (1263): 147—150.
- Miller GL, 1959. Use of determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31: 426—428.
- Mo JC, Yang TC, Song XG, Cheng JA, 2004. Cellulase activity in five species of important termites in China. *Appl. Entomol. Zool.*, 39(4): 635—641.
- Nakashima KI, Watanabe H, Azuma JI, 2002a. Cellulase genes from the parabasalian symbiont *Pseudotrichonympha grassii* in the hindgut of the wood-feeding termite *Coptotermes formosanus*. *Cell. Mol. Life Sci.*, 59(9): 1554—1560.
- Nakashima KI, Watanabe H, Saitoh H, Tokuda G, Azuma JI, 2002b. Dual cellulose-digesting system of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(7): 777—784.
- Tokuda G, Lo N, Watanabe H, Arakawa G, Matsumoto T, Noda H, 2004. Major alteration of the expression site of endogenous cellulases in members of an apical termite lineage. *Mol. Ecol.*, 13(10): 3219—3228.
- Tokuda G, Lo N, Watanabe H, Slaytor M, Matsumoto T, Noda H, 1999. Metazoan cellulase genes from termites: intron/exon structures and sites of expression. *Biochim. Biophys. Acta*, 1447(2/3): 146—159.
- Tokuda G, Miyagi M, Makiya H, Watanabe H, Arakawa G, 2009. Digestive beta-glucosidases from the wood-feeding higher termite, *Nasutitermes takasagoensis*: intestinal distribution, molecular characterization, and alteration in sites of expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39(12): 931—937.
- Watanabe H, Noda H, Tokuda G, Lo N, 1998. A cellulase gene of termite origin. *Nature*, 394(6691): 330—331.
- Watanabe H, Takase A, Tokuda G, Yamada A, Lo N, 2006. Symbiotic “Archaezoa” of the primitive termite *Mastotermes darwiniensis* still play a role in cellulase production. *Eukaryotic Cell*, 5(9): 1571—1576.
- Willis JD, Oppert C, Jurat-Fuentes JL, 2010. Methods for discovery and characterization of cellulolytic enzymes from insects. *Insect Sci.*, 17(3): 184—198.
- Wyman CE, 2007. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *Trends Biotechnol.*, 25(4): 153—157.
- 顾方媛, 陈朝银, 石家骥, 钱世钧, 2008. 纤维素酶的研究进展与发展趋势. *微生物学杂志*, (1): 83—87.
- 李卫芬, 孙建义, 2001. 木聚糖酶的特性研究. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 27(1): 103—106.
- 相辉, 周志华, 2009. 白蚁及共生微生物木质纤维素水解酶的种类. *昆虫知识*, 46(1): 32—39.
- 杨天赐, 莫建初, 程家安, 刘文军, 2003. 黄胸散白蚁纤维素酶的研究. *中国森林病虫*, 22(6): 4—7.
- 赵园园, 丘雪红, 韩日畴, 2008. 白蚁的分子生物学研究进展. *昆虫知识*, 45(4): 532—536.