

栓菌漆酶在毕赤酵母中高效表达及重组酶的性质

High Output of a *Trametes* Laccase in *Pichia pastoris* and Characterization of Recombinant Enzymes

周宏敏^{1†}, 洪宇植^{1†}, 肖亚中^{1*}, CUI Teng-Jiao², WANG Xiao-Tang², 蒲春蕾³

ZHOU Hong-Min^{1†}, HONG Yu-Zhi^{1†}, XIAO Ya-Zhong^{1*}, CUI Teng-Jiao², WANG Xiao-Tang² and PU Chun-Lei³

1 安徽大学生命科学学院 & 现代实验技术中心, 合肥 230039

2 佛罗里达国际大学化学与生物化学系, 迈阿密 FL 33199, 美国

3 中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230026

1 School of Life Sciences & Modern Experiment Technology Center, Anhui University, Hefei 230039, China

2 Department of Chemistry and Biochemistry, Florida International University, 11200 SW 8th Street, Miami, FL 33199, USA

3 School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China

摘 要 栓菌 420 (*Trametes* sp. 420) 漆酶基因 *lacD* 以两种方式在巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 进行异源表达, 产生两种重组漆酶 rLacDx (具有天然 N-末端) 和 rLacDe (N-末端带有 8 个额外的氨基酸残基)。摇瓶发酵 18d, rLacDx 和 rLacDe 的产量分别为 1.21×10^5 u/L, 7.38×10^4 u/L [以 2,2'-连氮-3-乙苯-二噻唑-6 磺酸 (ABTS) 为底物]。在高密度发酵条件下, rLacDx 的产量增加到 2.39×10^5 u/L, 同时其生产周期降至 7.5 d。两种重组酶对愈创木酚底物的氧化特性相似, 且在 50°C 和 pH 3 ~ 10 的范围内均稳定。然而, rLacDx 对底物 ABTS 的比活力 (1761 u/mg) 高于 rLacDe (1122 u/mg), 其表现 K_m 值 (427 μ mol/L) 低于 rLacDe (604 μ mol/L)。

关键词 异源表达, 高密度发酵, 漆酶, 毕赤酵母, 栓菌 420

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)06-1055-05

Abstract A laccase gene (*lacD*) from the basidiomycete *Trametes* sp. 420 was heterologously expressed in *Pichia pastoris* in two ways, resulting in two recombinant enzymes of rLacDx with native N-terminus and rLacDe with eight additional amino acid residues at N-terminus. The yields of rLacDx and rLacDe in shaken-flask cultures after an 18-day growth were 1.21×10^5 u/L and 7.38×10^4 u/L, respectively, as determined with 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazole-6-sulfonic acid) (ABTS) as substrate. The yield of rLacDx was further increased to 2.39×10^5 u/L under high-density fermentation while the production process was decreased to 7.5 days. In addition, rLacDx and rLacDe exhibited similar enzymatic characters in oxidizing substrate guaiacol, and were stable at 50°C and at a pH range from 3 to 10. However, the specific activity of rLacDx (1761 u/mg) for ABTS was

Received: March 7, 2007; Accepted: March 27, 2007.

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China (Nos. 30370045, 30470056 and 30670069), the Science & Technology Foundation of Distinguished Young Scholars of Anhui Province (Nos. 04043048 and 2006KJ049A), the National High Technology Research & Development Program of China (863, No. 2007AA098421) and the Innovative Research Team of 211 Project in Anhui University (No. 02203109).

* Corresponding author. Tel: 86-551-5108509; Fax: 86-551-5107408; E-mail: yzxiao@ahu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 30370045, 30470056 和 30670069), 安徽省优秀青年基金 (No. 04043048), 安徽省教育厅自然科学基金重点 (No. 2006KJ049A), 国家 863 高技术研究与发展计划项目 (No. 2007AA09Z421) 和安徽大学 211 创新团队计划 (No. 02203109) 资助。

† 作者周宏敏和洪宇植对本文的贡献相同。

‡ ZHOU Hong-Min and HONG Yu-Zhi contributed equally to the study.

higher than that of rLacDe (1,122u/mg), and the apparent K_m value of rLacDx (427 μ M) was less than that of rLacDe (604 μ M).

Key words heterologous expression, high-density fermentation, laccase, *Pichia pastoris*, *Trametes* sp. 420

漆酶(Laccase, EC 1.10.3.2)属于蓝铜氧化酶家族,广泛存在于真菌(特别是担子菌)和植物^[1]中。它能够催化单酚、二酚、多酚、芳香胺和甲基酚等多种芳香化合物发生氧化,同时伴随有分子氧还原成水^[2]。因而,漆酶在木质素降解、纸浆漂白/制浆^[2]、纺织染料脱色与脱毒^[3]、生物传感器^[4]等工业和环保方面具有潜在重要应用价值。

漆酶的应用需要大量廉价酶制剂。然而,目前绝大多数真菌漆酶的产量较低,难以满足商业化需求,并且漆酶的生产往往需要酚类化合物的诱导^[5,6]。毒性或昂贵诱导剂的使用不仅增加了生产成本,而且发酵液净化处理难度大,易污染环境。因此,探索安全、廉价的漆酶生产策略/方法吸引了许多学者的兴趣。

多个漆酶基因已被克隆并实现重组表达,宿主有酵母[酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)^[7], *P. pastoris*^[8,9]、甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*)^[10]、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)^[11]、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)^[12]]和丝状真菌[瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)^[13]、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)^[14]、黑曲霉(*Aspergillus niger*)^[15]、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)^[16]、云芝(*Coriolus versicolor*)^[17]、灰盖鬼伞菌(*Coprinopsis cinerea*)^[18]]等。然而,在这些研究中,重组漆酶的产量普遍低于 1.0×10^4 u/L。

Trametes sp. 420 是一株新的漆酶生产菌,在邻甲苯胺的诱导下能够产生唯一的漆酶组分 LacE^[19]。该菌株的其它4个同工酶基因也已被克隆,然而在多种化学诱导物的诱导下均未见有这些基因编码的蛋白产物。我们前期在 *P. pastoris* 中对这些克隆的漆酶同工酶基因进行了重组表达,初步检测表明重组 lacD 的转化子具有相对高的漆酶产率。本文报道了 lacD 的重组表达情况,同时考察了 N-末端的额外氨基酸残基(来源于酵母表达质粒)对酶性质的影响,并且通过高密度发酵策略,获得了较高的漆酶产量。

1 材料与方法

1.1 菌株、试剂和培养基

Trametes sp. 420 本研究组自选,大肠杆菌

(*Escherichia coli*)JM109 菌株购自美国 Stratagene 公司, *P. pastoris* GS115 菌株和表达质粒 pPIC9K 购自美国 Invitrogen 公司。DNA 或 RNA 用酶购自大连 TaKaRa 公司。如无特殊说明,所有的化学试剂均为分析纯或更高纯度级别。

BMM、BMG、BMGY、MD 和 YPD 培养基均按照 *Pichia* 表达手册(Invitrogen)配制。发酵基本盐(FBS)培养液和痕量盐(PTM₁)培养液按照 *Pichia* 发酵操作指南(Invitrogen)配制。

1.2 表达载体的构建

Trametes sp. 420 经邻甲苯胺诱导,按文献[20]的方法建立 cDNA 文库。依据已克隆的 lacD DNA 序列(AY839942),设计正义引物 Ps1(AAAGCTCGAGAAAAGAGCCATCGGTCCGGT)和反义引物 Pa(AAAGAATTCGCCATCGGTCCGGTTCG)和反义引物 Pa(AAAGCGGCCGCTCAGATGCCGTCCGGGTA)。以引物对 Ps1-Pa 和 Ps2-Pa 分别 PCR 扩增获得完整的 lacD cDNA 片段,两片段经相应酶切,分别连接到 pPIC9K 载体的 Xho I - Not I 和 EcoR I - Not I 位点之间;目标表达载体 pPDx 和 pPDe 分别转化 *E. coli* JM109 细胞,转化子用于测序分析,确保开放读码框(ORF)正确。

1.3 漆酶分泌性转化子的筛选

pPDx、pPDe 和空白质粒 pPIC9K 经 Hpa I 酶切后,分别电转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞。转化细胞涂布 MD 平板,筛选 His⁺ 克隆。随机挑取若干 His⁺ 克隆,点接到含有 0.3mmol/L CuSO₄ 和 0.2 mmol/L ABTS 的 BMM(pH6)平板上,培养一定时间,菌落周围有特征反应色的克隆即为具有漆酶分泌功能的目标转化子。

1.4 摇瓶发酵

来源于 pPDx 和 pPDe 的转化子(分别记录为 GSDx 和 GSDe)分别任意选取 10 个,接种到含有 10mL BMG 培养液的 100mL 锥形瓶中,30℃、150 r/min 培养 24h。种液在室温下 3000g 离心 5min,细胞沉淀用 30mL BMM 培养液(pH6.0,含 0.3mmol/L CuSO₄ 和 0.6% 丙氨酸)重悬至光密度 OD₆₀₀ 约为 1 时,悬液置于 150mL 锥形瓶,20℃、200r/min 继续振荡培养,每天补充 0.5% 体积的甲醇,并在发酵 12d

左右补加氨水维持 pH6。每天取样测定漆酶的活力和细胞密度。

1.5 高密度发酵

任意选取一个 GSDx 转化子(GSDx1)接种到含有 100mL BMGY 培养液的 500-mL 锥形瓶中,30℃ 振荡培养至光密度 $OD_{600} = 5 \sim 10$ 。培养物全部转移到含有 1.2L FBS 培养液的 2L 发酵罐中,添加 5.2mL PTM₁ 痕量盐和 1mL 消泡剂,30℃ 培养 22h 后,以 5.3mL/h 的速率同时补加甲醇和 50% 甘油(各含 1.2% 体积的 PTM₁ 营养液,时间 4h,然后停止补加甘油营养液,并将温度降至 20℃ 继续发酵培养 7d。通过自动控制搅拌速度维持溶氧 $\sim 30\%$ ^[8],补加氨水调节并维持 pH6.0。

1.6 生物量和漆酶活力分析

样品适当稀释后,用分光光度法在 600nm 处测定菌体光密度(1 OD_{600} 约为 5×10^7 细胞)。漆酶酶活以愈创木酚^[21]或 ABTS^[9]为底物进行测定。1 个活力单位(u)定义为每分钟氧化 $1\mu\text{mol}$ 底物所需的酶量。每一样品平行 3 份进行测定,取值为标准偏差小于 5% 的数据的平均值。

1.7 酶性质分析

重组漆酶按文献[9]方法用一步阴离子交换层析分离和纯化。蛋白的表观分子量用 SDS-PAGE 电泳^[6]测定,蛋白浓度用 BCA 试剂盒(美国 Hyclone)测定。pH 对酶稳定性影响的测定在 100mmol/L 柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液(Buffer A, pH3.0~8.0)和甘氨酸-NaOH 缓冲液(Buffer B, pH8.0~10.0)中进行,底物为 1mmol/L 愈创木酚;酶对愈创木酚的最适 pH 在 Buffer A 中 30℃ 测定,最适温度在 30℃、40℃、50℃ 和 60℃ 处测定;热稳定性在 Buffer A (pH7.0)中测定。为了便于比较,以 ABTS 为底物在 30℃ 测定漆酶的动力学参数,方法参考文献[21]。

2 结果与讨论

2.1 产漆酶转化子的筛选

Trametes sp. 420 *lacD* 完整的 cDNA 序列长 1494bp 编码 498 氨基酸残基的成熟多肽。该 cDNA 序列分别克隆到 pPIC9K 载体的 *Xho* I - *Not* I 位点和 *Eco*R I - *Not* I 位点,构建出的表达载体 pPDx 和 pPDe 长 10.8kb。每 μg 质粒 DNA 可以从 MD 板上获得 50~100 个 His⁺ 转化子。三种类型的转化子各挑取 200 克隆,点接到含 ABTS 的 BMM 平板上,来源于 pPDx 和 pPDe 的转化子(相应为 GSDx、GSDe)约有

90% 克隆的周围有漆酶氧化 ABTS 形成的特征色生成,说明这些克隆能够分泌表达活性漆酶,而在空白对照克隆(来源于 pPIC9K)中未检测到。

2.2 重组漆酶的生产

分别随机挑取 10 个 GSDx 和 GSDe 转化子进行摇瓶发酵,同一类型转化子的发酵液漆酶酶活基本相同(数据未显示),因此从两种类型转化子中各随机选择一个克隆(指定为 GSDx1 和 GSDe1)用于后续研究。在含有 0.3mmol/L CuSO_4 和 0.6% 丙氨酸的 BMM 培养液(pH6.0)中 20℃ 培养 18d,GSDx1 和 GSDe1 发酵液的漆酶酶活分别达到 $1.21 \times 10^5 \text{ u/L}$ 和 $7.38 \times 10^4 \text{ u/L}$ (Fig. 1),并且具有持续增长趋势。但是由于 *P. pastoris* 代谢产酸能力强,在发酵后期难以依靠丙氨酸代谢中和其酸性,发酵液 pH 在 1d 内可降至 pH3 左右^[9],从而导致漆酶活力丧失。

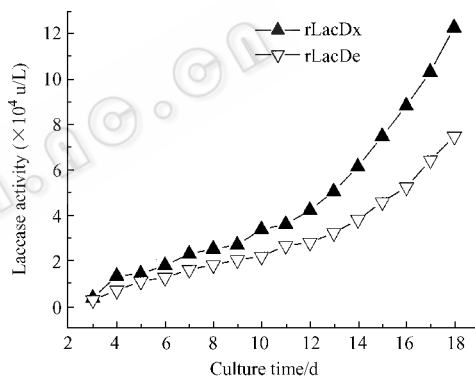


图1 重组漆酶的摇瓶发酵生产

Fig. 1 Production of recombinant laccases in shaken-flask cultures

据报道,通过高密度发酵策略 *Pichia* 重组漆酶的产量提高了 12 倍,达到 $1.4 \times 10^5 \text{ u/L}$ ^[8]。由于 GSDx1 比 GSDe1 具有更高的酶产量,因而被用来高密度发酵生产漆酶。与摇瓶发酵相比,GSDx1 高密度发酵的漆酶酶活提高了 1 倍,达到 $2.39 \times 10^5 \text{ u/L}$ (Fig. 2),同时细胞密度提高了 20 倍,达到 OD_{600} 约为 600。酶活力和生物量增长倍数的差异,很可能是由于在摇瓶和高密度发酵中所用的培养基和发酵条件的不同引起的。

由于漆酶在工业和环保方面具有重要应用潜能,因而提高漆酶产量已成为当前研究的一个兴趣和难点。多个漆酶基因已在酵母和丝状真菌中重组活性表达^[18],然而据我们所知,重组漆酶的产量大多低于 $1.0 \times 10^4 \text{ u/L}$,难以满足工业化应用的需要。本研究获得的重组漆酶 rLacDx 的最高产量为 $2.39 \times 10^5 \text{ u/L}$,与朱红密孔菌(*Pycnoporus cinnabarinus*)同源表达的漆酶产量($2.8 \times 10^5 \text{ u/L}$)

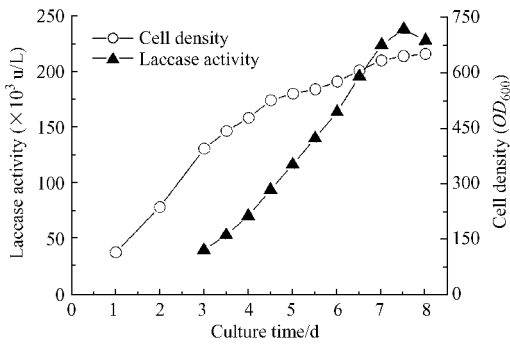


图2 高密度发酵生产 rLacDx

Fig.2 Production of rLacDx under high-density fermentation

相当,然而 rLacDx 的发酵周期仅为 7.5d,远少于后者的生产周期 (>20d)。

根据 rLacDx 的专一性活力(1761u/mg),可以计算出 rLacDx 的表达量为 135mg/L,与其他在 *Pichia* 中异源表达的蛋白产量(如载脂蛋白 AI 为 160 mg/L)^[23]相近。并且 rLacDx 的生产不需要使用酚类化合物等毒性诱导物,与漆酶天然生产菌相比,其发酵工艺更为环境友好。

2.3 分子量、比活力和 K_m 值

依据 *lacD* cDNA 序列计算出 LacD 蛋白的分子量为 53.3kD。推测来源于 pPDx 的重组漆酶 rLacDx 的 N-端序列与天然酶相同,而来源于 pPDe 的重组漆酶 rLacDe 的 N-端序列则多了额外的 8 个氨基酸残基(Glu-Ala-Glu-Ala-Tyr-Val-Glu-Phe)。两种重组酶经离子交换层析纯化,纯酶溶液均呈现蓝铜氧化酶特有的蓝色。SDS-PAGE 结果显示 rLacDx 和 rLacDe 的表观分子量分别为 77kD 和 78kD (Fig.3),推导出它们的糖基化程度约为 30%。

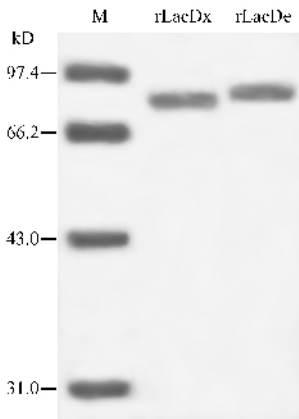


图3 rLacDx 和 rLacDe 的 SDS-PAGE

Fig.3 SDS-PAGE of rLacDx and rLacDe

M standard molecular weight marker.

rLacDe 对底物 ABTS 的比活力为 1122u/mg,明显低于 rLacDx 的比活力(1761u/mg);它们的比活力

与在酵母中表达的其他重组漆酶^[8,9]相近。已有研究表明,以真菌漆酶的天然信号肽代替 *S. cerevisiae* α -因子的信号肽引导重组漆酶的分泌,能够提高酶的产量^[24]。本研究结果显示,漆酶 N-端额外的氨基酸残基将导致酶比活力降低。rLacDx 和 rLacDe 的比活力差异与它们的产量差异 (Fig.1) 成正相关,表明比活力很可能是 rLacDx 具有更高产量的直接原因。另一方面, rLacDe 对 ABTS 的 K_m 值为 604 $\mu\text{mol/L}$,高于 rLacDx (427 $\mu\text{mol/L}$)。

2.4 pH 和温度对漆酶活力的影响 (Figs.4 and 5)

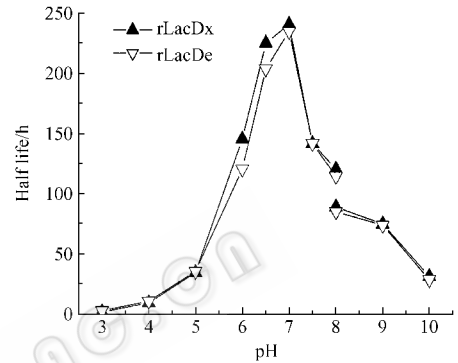


图4 pH 对漆酶稳定性的影响

Fig.4 Effect of pH on laccase stability.

rLacDx and rLacDe were incubated at 30°C in buffer A at a pH range from 3 to 8 and in buffer B at pH range from 8 to 10.

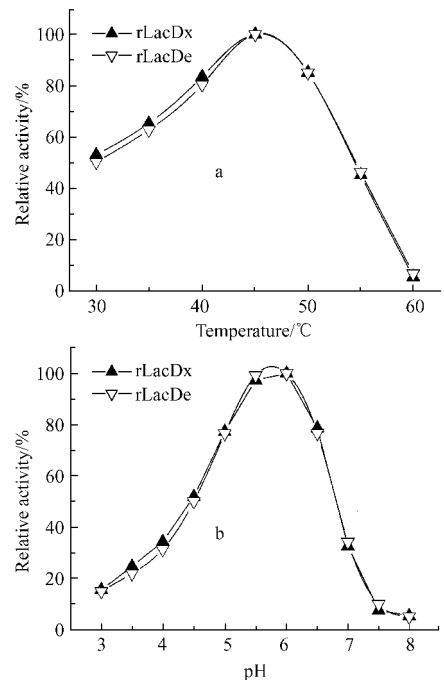


图5 pH 和温度对漆酶活力的影响

Fig.5 Effects of pH and temperature on laccase activity.

a: rLacDx and rLacDe were incubated at different temperatures in buffer A at pH 5.8; b: they were incubated at 30°C in buffer A at different pH values. Guaiacol was used as the test substrate.

pH 和温度对 rLacDx 和 rLacDe 酶活力的影响基本相同。两种酶在 pH3 ~ 10 范围内均能保持稳定, 在 pH7.0 处稳定性最佳, 30℃ 时的半衰期为 240h (Fig. 4)。随着温度的升高, 酶稳定性下降, 在 40℃、50℃ 和 60℃ 时的半衰期约分别为 11h、45min、2min。另一方面, 两种酶对底物愈创木酚的最适温度 (45℃, Fig. 5a) 和最适 pH (pH5.8, Fig. 5b) 也相同。

总之, 漆酶基因 *lacD* 在 *Trametes* sp. 420 中不能通过化学诱导进行表达, 该基因在 *P. pastoris* 异源表达的产量较高, 在高密度发酵条件下培养 7.5d, 重组漆酶 rLacDx 的产量达到 2.39×10^5 u/L。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Ranocha P, McDougall G, Hawkins S, et al. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccase - a divergent gene family - in poplar. *Eur J Biochem*, 1999, **259**: 485 - 495.
- [2] Thurston F. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 1994, **140**: 19 - 26.
- [3] Harazono K, Nakamura K. Decolorization of mixtures of different reactive textile dyes by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete sordida* and inhibitory effect of polyvinyl alcohol. *Chemosphere*, 2005, **59**: 63 - 68.
- [4] Roy JJ, Abraham TE, Abhijith KS, et al. Biosensor for the determination of phenols based on cross-linked enzyme crystals (CLEC) of laccase. *Biosens Bioelectron*, 2005, **21**: 206 - 211.
- [5] Soden DM, Dobson ADW. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology*, 2001, **147**: 1755 - 1763.
- [6] Xiao YZ, Tu XM, Wang J, et al. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **60**: 700 - 707.
- [7] Kojima Y, Tsukada Y, Kawai Y, et al. Cloning, sequence analysis, and expression of ligninolytic phenoloxidase genes of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *J Biol Chem*, 1990, **265**: 15224 - 15230.
- [8] Hong F, Meinander NQ, Jansson LJ. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*, 2002, **79**: 438 - 449.
- [9] Hong YZ, Xiao YZ, Zhou HM, et al. Expression of a laccase cDNA from *Trametes* sp. AH28-2 in *Pichia pastoris* and mutagenesis of transformants by nitrogen ion implantation. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, **258**: 96 - 101.
- [10] Guo M, Lu FP, Pu J, et al. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Trametes versicolor* and heterologous expression in *Pichia methanolic*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **69**: 178 - 183.
- [11] Piscitelli A, Giardina P, Mazzoni C, et al. Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **69**: 428 - 439.
- [12] Jolivalt C, Madzak C, Brault A, et al. Expression of laccase IIIb from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **66**: 450 - 456.
- [13] Saloheimo M, Leena M, Paavola N. Heterologous production of a ligninolytic enzyme: expression of the *Phlebia radiata* laccase gene in *Trichoderma reesei*. *Biotechnol*, 1991, **9**: 987 - 990.
- [14] Yaver DS, Xu F, Golightly EJ, et al. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **63**: 3151 - 3157.
- [15] Record E, Punt PJ, Chamkha M, et al. Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *Eur J Biochem*, 2002, **269**: 602 - 609.
- [16] Larrondo LF, Avila M, Salas L, et al. Heterologous expression of laccase cDNA from *Ceriporiopsis subvernispura* yields copper-activated apoprotein and complex isoform patterns. *Microbiology*, 2003, **149**: 1177 - 1182.
- [17] Kajita S, Sugawara S, Miiyazaki Y, et al. Overproduction of recombinant laccase using a homologous expression system in *Coriolus versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **66**: 164 - 199.
- [18] Kilaru S, Hoegger PJ, Majcherczyk A, et al. Expression of laccase gene *lcc1* in *Coprinopsis cinerea* under control of various basidiomycetous promoters. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **71**: 200 - 210.
- [19] Hong YZ, Tong PG, Xiao YZ, et al. High production of laccase by a new basidiomycete, *Trametes* sp. *Biotechnol Lett*, 2007, **29**: 295 - 301.
- [20] Xiao YZ, Hong YZ, Li JF, et al. Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **71**: 493 - 501.
- [21] Xiao YZ, Chen Q, Wu J, et al. Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. *Mycologia*, 2004, **96**: 26 - 35.
- [22] Alves AM, Record E, Lomascolo A, et al. Highly efficient production of laccase by the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 6379 - 6384.
- [23] Feng MQ, Cai QS, Song DX, et al. High yield and secretion of recombinant human apolipoprotein AI in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2006, **46**: 337 - 342.
- [24] Brown MA, Zhao ZW, Mauk AG. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. *Inorg Chim Acta*, 2002, **331**: 232 - 238.