

• 研究论文 •

过氧化氢调控藜芦醇介导木素过氧化物酶催化氧化邻苯三酚红研究

蓝靖^a 王芳^a 黄锡荣^{*,a,b} 李越中^b 曲音波^b 高培基^b

(山东大学 ^a胶体与界面化学教育部重点实验室 ^b微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要 木素过氧化物酶(LiP)催化H₂O₂氧化邻苯三酚红(PR)反应的氧化产物受H₂O₂与PR的摩尔比控制, H₂O₂与PR的摩尔比不同, 所得降解产物不一样. 分析表明, H₂O₂在LiP催化氧化PR过程中的双重作用(即低浓度的H₂O₂是LiP的激活剂, 高浓度的H₂O₂是LiP的抑制剂)是导致上述现象的根本原因. 藜芦醇(VA)对LiP催化氧化PR的反应有促进作用, 尤其是当H₂O₂与PR的摩尔比较高时这种促进作用更为明显; 然而PR对LiP催化氧化VA的反应却有抑制作用. 后者可以用来解释为什么在用白腐菌降解染料时在培养液中常常检测不到LiP的藜芦醇活力. 分析表明, VA的存在不但促进了LiP酶中间体LiP(II)和/或LiP(III)向LiP的转化, 使LiP的催化循环加速, VA生成的VA⁺也间接氧化了染料PR, 从而使PR的氧化速率提高.

关键词 木素过氧化物酶; 邻苯三酚红; 氧化降解; 藜芦醇; 抑制作用

Studies on the Hydrogen Peroxide Regulated Veratryl Alcohol Mediated Oxidation of Pyrogallol Red Catalyzed by Lignin Peroxidase

LAN, Jing^a WANG, Fang^a HUANG, Xi-Rong^{*,a,b}

LI, Yue-Zhong^b QU, Yin-Bo^b GAO, Pei-Ji^b

(^aKey Laboratory of Colloid and Interface Chemistry of the Ministry of Education of China, ^bState Key Laboratory of Microbial Technology of China, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract The oxidation reaction of pyrogallol red (PR) by H₂O₂ in the presence of lignin peroxidase (LiP) was studied at different concentrations of H₂O₂. Experiments showed that the oxidation products depended on the molar ratio of H₂O₂ to PR, suggesting that the LiP catalyzed oxidation products of PR should be controllable. This phenomenon was caused by the dual roles of H₂O₂, *i.e.*, at lower concentrations it was an activator of LiP, while at higher concentrations it was an inhibitor. Veratryl alcohol (VA) could stimulate the oxidation of PR catalyzed by LiP, especially at higher molar ratios of H₂O₂ to PR, however, PR inhibited the LiP catalyzed oxidation of VA. The inhibition should be used to explain a phenomenon that no veratryl alcohol activity was detected in the culture of white rot fungi where dye was effectively decolorized. Kinetics analysis suggested that VA should accelerate the conversion of LiP(II) and/or LiP(III) to LiP, and therefore the catalytic cycle of LiP. Indirect oxidation of PR by the veratryl alcohol cationic radical was also contributed to the increase in the oxidation rate of PR.

Keywords lignin peroxidase; pyrogallol red; oxidative degradation; veratryl alcohol; inhibition

染料废水的脱色、降解是环境科学与技术研究领域里亟待解决的一大难题. 白腐菌能降解各种人工合成染

料^[1-4], 因而受到这一领域里科技工作者的青睐. 黄孢原毛平革菌是白腐真菌的典型菌种, 据文献报道, 黄孢

* E-mail: xrhuang@sdu.edu.cn

Received August 18, 2005; revised October 24, 2005; accepted November 28, 2005.

国家自然科学基金(Nos. 30470048, 30570014)、山东省自然科学基金(No. 65310044)和山东省优秀中青年科学家奖励基金(No. 03BS082)资助项目.

原毛平革菌在产酶条件下可以降解偶氮类、蒽醌类、三苯甲烷类等多种类型的染料^[1,5~7]。白腐菌降解染料主要基于次生代谢过程中合成且被分泌到胞外的过氧化物酶系,它们在 H_2O_2 引发下发生一系列自由基链反应,依靠氧化还原反应对染料进行脱色、降解^[1]。木素过氧化物酶(LiP)是此过氧化物酶系中最重要的一种,对不同种类不同结构的染料, LiP 均具有很强的脱色能力^[3,9]。然而也有文献报道在用黄孢原毛平革菌降解染料废水时,废水虽然脱色,但在培养液中却检测不到 LiP 的活力(用藜芦醇作底物)^[5,10]。藜芦醇(VA)是黄孢原毛平革菌的一种次生代谢产物,可诱导 LiP 的合成,也是 LiP 的生理底物。另据报道,VA 对 LiP 催化氧化芳香化合物有明显促进作用^[11,12]。为此,有必要研究 VA 和染料共存时 LiP 催化过氧化氢氧化双底物的反应机制。本文中,我们以三苯甲烷类染料邻苯三酚红(PR)为代表,对 LiP 催化过氧化氢氧化 PR 反应进行了较为深入细致的研究。发现 VA 对 LiP 催化氧化 PR 脱色有促进作用,然而 PR 对 VA 的氧化却有抑制作用。后者可以用来很好地解释为什么在用白腐菌降解染料废水时在培养液中常常检测不到 LiP 的藜芦醇活力的原因。研究还发现,VA 促进作用的大小受 PR 与 H_2O_2 的摩尔比控制。控制不同的摩尔比,可以得到不同的 PR 氧化产物。文中对上述现象的原因进行了较为深入的讨论。上述研究对基于 LiP 的选择性生物合成与转化、染料废水的高效脱色降解等生物技术的开发有重要意义。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

岛津 UV-240 型紫外可见分光光度计及其恒温附件。

藜芦醇(VA)为 Fluka 公司产品,邻苯三酚红(PR), H_2O_2 及各种缓冲液试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 LiP 酶的制备

木素过氧化物酶(LiP)的制备按文献方法进行^[13]。

1.3 实验方法

30 °C 下,向 1 cm 石英比色皿中依次加入一定量的缓冲液、底物溶液(PR 或 VA 溶液或两者都有)、LiP 酶液,混匀后再加入 H_2O_2 溶液(引发反应),迅速摇匀(总体积为 3.0 mL)并放入分光光度计中进行全波长扫描(以缓冲液为参比)或记录某一波长下的吸光度(A)随时间(t)的变化曲线(以对应的无 H_2O_2 体系为参比)。以上为一般步骤,具体实验条件见图注说明。

在记录的全波长扫描动力学图谱中,470 nm 处,自上而下第一条曲线为过氧化氢引发前混合体系的吸收光谱,第二条曲线为过氧化氢引发后即刻记录的吸收光

谱,此后,每隔 2.5 min 扫描一次。文中 $\Delta A/\Delta t$ 表示单位时间内体系吸光度的增量($A_2 - A_1$), dA/dt 是用吸光度代替浓度表示的反应初速率(单位是 $\text{a.u.}\cdot\text{min}^{-1}$)。

染料 PR 有两个特征吸收峰,分别在 470 和 276 nm 处。在低过氧化氢含量及低 LiP 酶活力(酶活力与过氧化氢的含量有关)下,反应引发后,PR 在 470 和 276 nm 处的特征吸收峰强度逐渐降低,而 388 nm 处的吸光度逐渐增大,形成一新的吸收峰,此峰对应的氧化产物我们称之为产物 I;在适量 H_2O_2 及高 LiP 酶活力下,PR 先被氧化生成产物 I,388 nm 处的吸光度升至最大值后逐渐降低,同时在 340 nm 处伴随出现一新峰,其对应氧化产物称之为产物 II。LiP 催化氧化 VA 的产物为藜芦醛,在 310 nm 处有特征吸收。

2 结果与讨论

2.1 H_2O_2 对 PR 氧化产物的调控

LiP 酶是 H_2O_2 依赖酶,在 H_2O_2 存在下, LiP 先被 H_2O_2 氧化生成中间体 I [LiP(I)], LiP(I)经过底物单电子还原生成中间体 II [LiP(II)], LiP(II)再经过单电子还原生成 LiP,从而完成一个催化循环。LiP(II)还原成 LiP 是整个酶催化循环的限速步骤^[14,15]。在过量 H_2O_2 存在下, LiP(II)可以与过量 H_2O_2 反应生成无催化活性的中间体 LiP(III),从而对 LiP 表现出一定的抑制作用,使底物的氧化速率降低。由此可见, H_2O_2 既是 LiP 的激活剂,又是 LiP 的抑制剂,表现出双重作用。

图 1a~1e 分别为 H_2O_2 与 PR 摩尔浓度比为 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 时 LiP 催化 H_2O_2 氧化 PR 染料反应体系的全波长扫描动力学图谱,图中箭头指向为此波长下吸光度变化的趋势。由图 1 可见, H_2O_2 与 PR 的摩尔浓度比不一样时,所得的 PR 氧化产物不同。比值为 1:1 时,所生成氧化产物在 388 nm 处有特征吸收,对应的氧化产物称之为产物 I;比值为 2:1 时,先生成产物 I(见图 1a),随反应的进行,产物 I 的特征吸收峰升至最大值,之后逐渐降低,同时在 340 nm 处伴随出现一新吸收峰(所对应的氧化产物称之为产物 II)并逐渐升高,360 nm 处等吸收点的存在表明 PR 先被氧化为产物 I,之后产物 I 又被氧化为产物 II(见图 1b);然而当比值大于 2:1 时,产物 II 的生成变得相对困难(见图 1c);当比值增至 4:1 以上时,只有产物 I 生成,没有产物 II 生成(见图 1d)。这说明在给定染料浓度下通过控制 H_2O_2 的量可以得到不同的氧化产物,这为 LiP 这一选择性宽泛的过氧化物酶在选择性生物合成与转化中的应用提供了依据。

依据 H_2O_2 在 LiP 催化循环中的双重作用,我们可以解释为什么给定染料浓度下, LiP 催化 H_2O_2 氧化 PR 的

氧化产物受 H_2O_2 的量的控制. 当 H_2O_2 与 PR 的摩尔比为 1 : 1 时, H_2O_2 的量只够用于使 PR 氧化成产物 I, 故没有产物 II 的生成. 当比例增至 2 : 1 时, H_2O_2 已足够将产物 I 进一步氧化为产物 II; 比例继续增大时, 体系过氧化氢量增多, 对 LiP 产生抑制作用, 使 LiP 活力在反

应过程中逐渐下降, 加之产物 II 是由产物 I 转化而来的, 故高 H_2O_2 含量时只能缓慢得到产物 I.

2.2 VA 对 PR 氧化的促进作用

当 H_2O_2 与 PR 摩尔比为 1 : 1 时, 加入 VA ($1\sim 0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 后, 可以看到 470 nm 处 PR 氧化褪色速度加

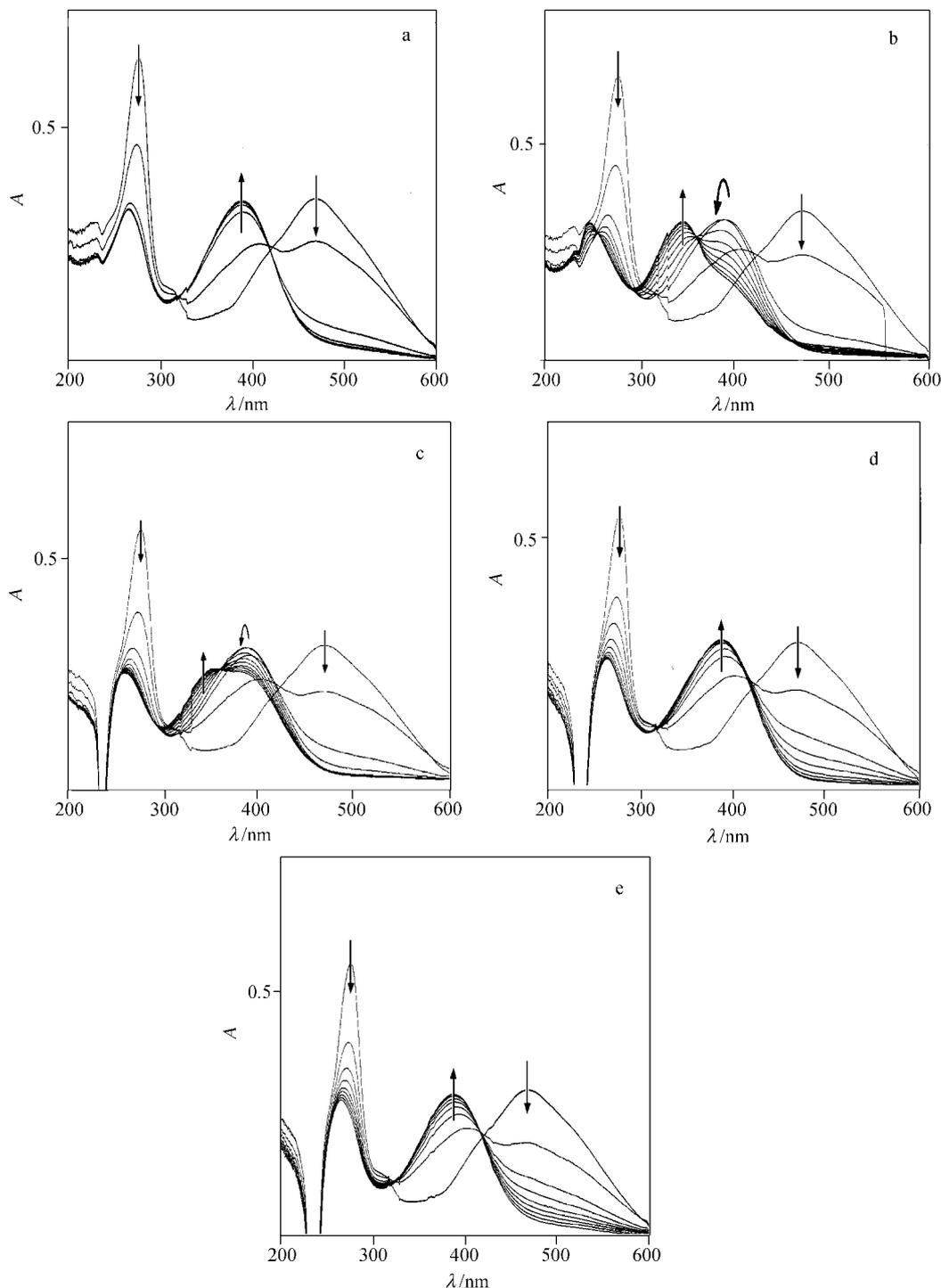


图 1 H_2O_2 与 PR 摩尔比对 PR 氧化降解产物的影响

Figure 1 Effects of the molar ratio of H_2O_2 to PR on the degradation of PR

Experimental conditions: $T=30\text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH}=3.4$; $\text{LiP } 40\text{ }\mu\text{L}$; $[\text{PR}]=20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{O}_2]=20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (a), $[\text{H}_2\text{O}_2]=40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (b), $[\text{H}_2\text{O}_2]=60\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (c), $[\text{H}_2\text{O}_2]=80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (d), $[\text{H}_2\text{O}_2]=100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (e). The time interval for scanning after the initiation was 2.5 min

快(因为引发后扫描的时间间隔相同,所以某一波长下吸光度随时间变化的快慢可以用来衡量反应速度的大小),但不明显;此外,VA的加入没有改变染料PR的氧化产物(此时仍为产物I),在反应后期也未在310 nm处出现藜芦醛的特征吸收峰.当 H_2O_2 与PR摩尔比为2:1时,情况与1:1的相似,只不过VA对PR氧化的促进作用较为明显.当 H_2O_2 与PR摩尔比为3:1或更高时,VA的作用就非常明显.

图2a, 2b分别为未加VA和加入VA后反应体系的全波长扫描动力学图谱,图中箭头指向为此波长下吸光度变化的趋势.由于此时 $[\text{H}_2\text{O}_2]$ 与 $[\text{PR}]$ 的摩尔比为5:1,故图2a只有产物I的吸收峰.加入VA后,不仅PR的氧化褪色速率明显加快,反应的终了产物也变成了产物II(见图2b);此外反应后期在310 nm处形成了藜芦醛的特征吸收峰.图2c中VA是在(条件同图2b)LiP催化 H_2O_2 氧化PR反应近乎停止(约15 min)时加入绘制的,由图2c可见,染料氧化又可继续进行,且有部分产物I转化成产物II.目前认为, LiP(II)的单电子还原是LiP酶

催化循环反应的限速步骤.由于酚类物质不能有效地还原LiP(II),间接促进了无催化活性中间体LiP(III)的形成,从而造成酶的循环速率下降,直至中止.VA是LiP的生理底物,它可以促进LiP(II)和/或LiP(III)转化为LiP,从而使酶促酚型染料的氧化得以继续进行.进一步比较图1b和图2b发现,虽然二者反应的终了产物相同,但就PR氧化反应速度而言,加入VA后,反应要快得多,尤其是产物I向产物II的转化,促进作用十分明显.此外,虽然VA促进了PR的氧化,但其氧化产物藜芦醛的特征吸收峰却在LiP催化 H_2O_2 氧化PR反应后期才出现.据此,我们推测在这里VA还有另外的作用——对PR的间接氧化.

2.3 VA的介导机制

由图2b可见,VA和PR共存时,PR先被氧化,在反应的后期,VA才被氧化生成藜芦醛;即VA对PR的氧化有促进作用,而PR对VA的氧化却存在抑制作用.这一现象可以解释为什么有些作者在用白腐菌降解染料

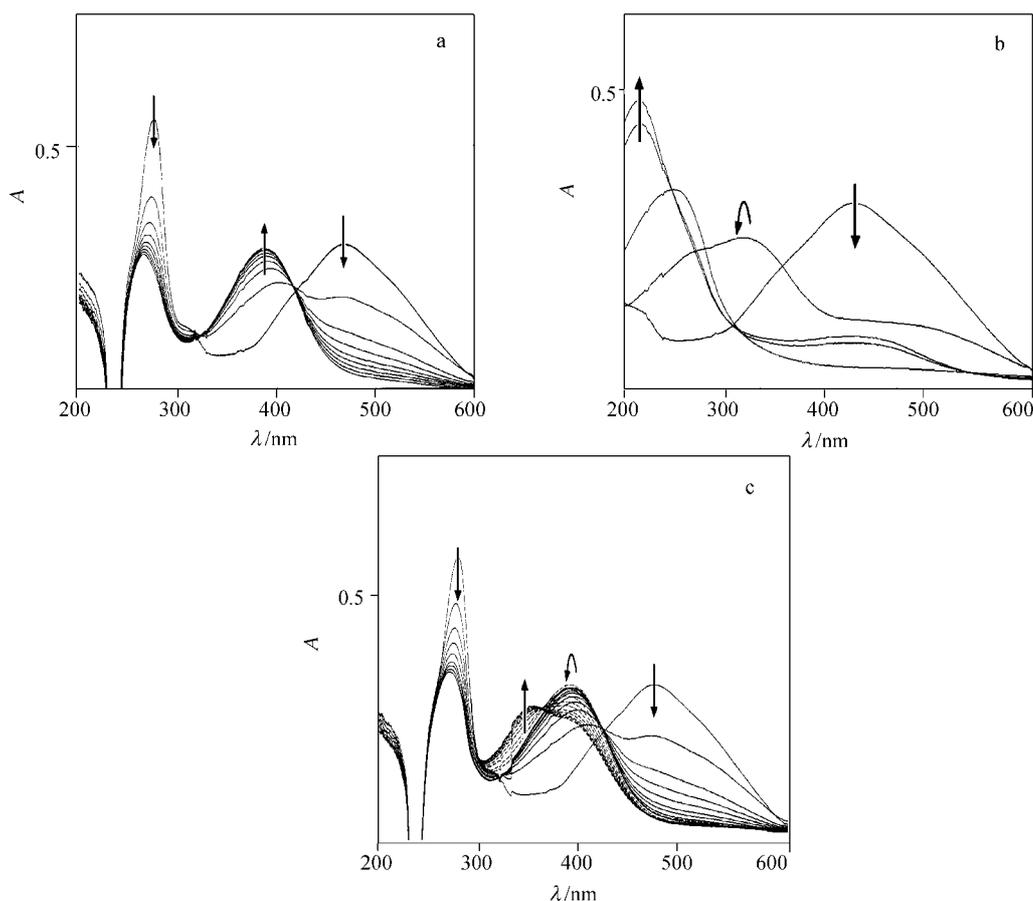


图2 VA对LiP催化 H_2O_2 氧化PR反应的影响

Figure 2 Effects of VA on the LiP catalyzed oxidation of PR by H_2O_2

Experimental conditions: $T=30\text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH}=3.4$; LiP $40\text{ }\mu\text{L}$; $[\text{PR}]=20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{O}_2]=100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{VA}]=0$ (a), $[\text{VA}]=0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (VA was added before the initiation by H_2O_2) (b), $[\text{VA}]=0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (VA was added *ca.* 15 min after the initiation; at that time the reaction had terminated) (c). The time interval for scanning after the initiation was 2.5 min

废水时在培养液中常常检测不到 LiP 的活力(以 VA 为底物)^[5,10]. 通常情况下, LiP 的活力是以 VA 为底物, 用 LiP 催化 H_2O_2 氧化 VA 反应的初速率(即反应引发后前五六分钟内)来表示. 用白腐菌降解染料废水时, 由于培养液中含有染料, 即使白腐菌分泌 LiP 酶, 在用 VA 检测培养液中 LiP 活力时, 由于染料与 VA 共存, LiP 催化 H_2O_2 氧化 VA 的反应将受到抑制; 又由于培养液中染料浓度一般较大, 故抑制时间通常在 6 min 以上, 从而导致在培养液中检测不到 LiP 活力. 为进一步阐明 VA 的介导机制, 我们作了几个染料浓度下的 $A_{310}-t$ 曲线(见图 3, PR 的氧化产物在此吸收较小). 从图 3 可以看出, PR 的存在, 使得藜芦醛的 $A_{310}-t$ 曲线出现滞后和生成速率的下降. 我们把藜芦醛特征吸收(在 310 nm 处)出现前这段滞后的时间称为抑制时间(t)(滞后阶段的光吸收是由 PR 的氧化产物引起的). t 与染料 PR 的浓度成正比(见图 4), 与 VA 的浓度成反比(见图 5).

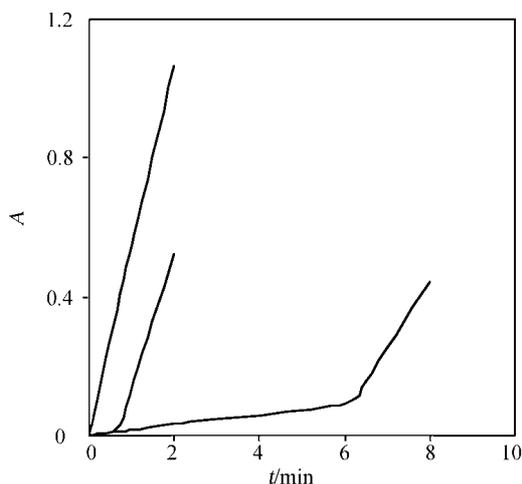


图 3 PR 存在下 LiP 催化 H_2O_2 氧化 VA 的动力学曲线

Figure 3 Kinetic curves of the LiP catalyzed oxidation reaction of VA by H_2O_2

Experimental conditions: $T=30\text{ }^\circ\text{C}$; $[VA]=3.3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; $[H_2O_2]=0.33\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; $LiP=40\text{ }\mu\text{L}$; $\lambda=310\text{ nm}$; the concentration of PR (from left to right) was 0, 10 or $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The corresponding reference contained no H_2O_2

VA 是 LiP 的生理底物, LiP 的催化活力通常也是用 VA 来标定的; 此外, 有关酚类物质对 LiP 的抑制作用也有报道^[11]. 那么 PR 和 VA 共存时, 为何 LiP 先氧化染料后氧化 VA? 我们认为这是 VA 生成的 VA^{+} 被 PR 还原所致; 即 PR 在被 LiP 氧化的同时, 也间接被 VA^{+} 所氧化, 从而导致 PR 的氧化褪色速率加快, VA 氧化滞后.

为了证实 VA^{+} 对 PR 的间接氧化, 我们测定了上述实验条件下高 $[H_2O_2]/[PR]$ 比例时(此时 LiP 受到较强抑制) LiP 催化氧化 PR 的平均反应速率 $\Delta A/\Delta t$. 发现 VA 存在时, 在给定时间间隔内, 470 nm 处吸光度的降幅随

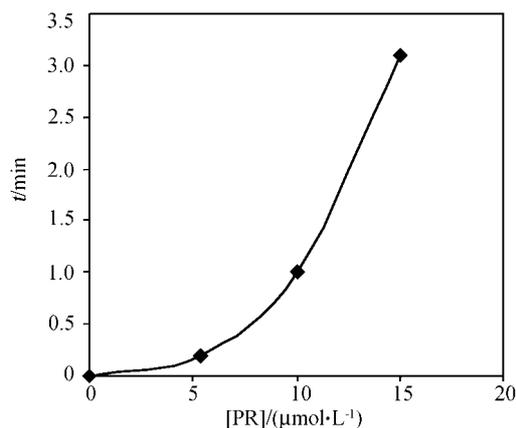


图 4 PR 浓度对抑制时间的影响

Figure 4 Effect of the concentration of PR on the duration of the lag period

Experimental conditions: $T=30\text{ }^\circ\text{C}$, $pH=3.4$, $[VA]=1.6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $LiP=40\text{ }\mu\text{L}$, $[H_2O_2]=0.33\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\lambda=310\text{ nm}$

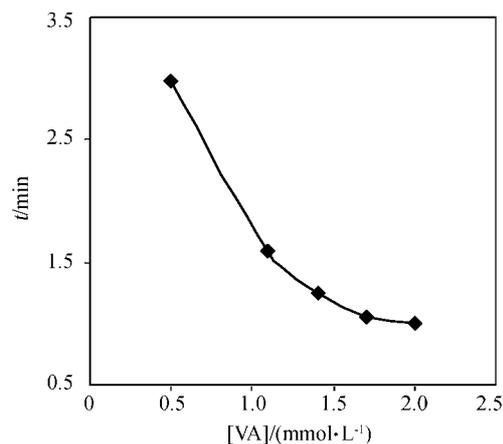


图 5 VA 浓度对抑制时间的影响

Figure 5 Effect of the concentration of VA on the duration of the lag period

Experimental condition: $T=30\text{ }^\circ\text{C}$, $pH=3.4$, $LiP=40\text{ }\mu\text{L}$, $[PR]=13\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $[H_2O_2]=0.17\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\lambda=310\text{ nm}$

PR 浓度的增加而减小; 然而, 在没有 VA 时, 470 nm 处吸光度的降幅却略有增大. 如果没有 VA^{+} 对 PR 的间接氧化, 只靠 LiP 酶对 PR 的直接氧化, 那么, 在给定 VA 浓度下, PR 的氧化速率随 PR 的增加应增大. 由此可见, 在上述条件下一定存在着 VA^{+} 对 PR 的间接氧化. 图 4 结果支持这一结论. 由图 4 可见, 当 LiP 酶和 VA 浓度一定时, 随着 PR 浓度的增加, 抑制时间逐渐变长. 合理的解释是, PR 与 VA 同时竞争 LiP 酶的活性中心, PR 浓度越大, VA 的竞争几率就越小, 生成的 VA^{+} 就越少, 对 PR 的间接氧化作用也就越小, 最终导致 PR 氧化褪色速率下降, 藜芦醛形成的滞后时间(即抑制时间)变长.

同样, 用 VA^{+} 对 PR 的间接氧化可以很好地解释

图5和图6的实验结果. 由图5可见, 当PR和LiP酶浓度一定时, 随着VA浓度的增加, 抑制时间 t 逐渐变短直至最后达一稳定值. 这是由于VA浓度越大, 单位时间内被LiP酶氧化产生的 VA^{+} 越多, 使得PR氧化速率加快, 从而缩短了PR氧化降解所需的时间; 进一步增加VA浓度导致LiP酶对VA饱和(见图6, VA及其产物在470 nm处无吸收), 使得单位时间内产生的 VA^{+} 的量不再增加, PR的氧化速率达到最大, 故抑制时间不再缩短.

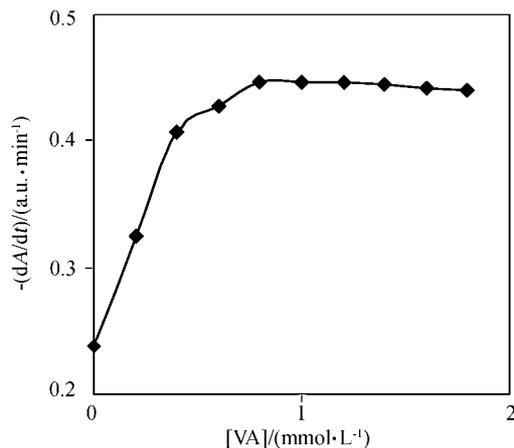


图6 VA浓度对LiP催化氧化PR反应初速率的影响

Figure 6 Effect of the concentration of VA on the initial velocity of the LiP catalyzed oxidation of PR by H_2O_2

Experimental condition: $T=30\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH}=3.4$, LiP $40\text{ }\mu\text{L}$, $[H_2O_2]=0.083\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $[PR]=33\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\lambda=470\text{ nm}$

3 结论

通过上述研究可以得到如下结论:

(1) H_2O_2 在LiP催化氧化PR过程中的双重作用(即低浓度时的激活作用和高浓度时的抑制作用)是导致 H_2O_2 与PR摩尔比不同氧化产物不一样这一现象的根本原因, 也是 H_2O_2 调控PR氧化产物的依据.

(2) VA对LiP催化氧化PR脱色有促进作用, 然而PR对VA的氧化却有抑制作用. 后者可以用来很好地解释为什么在用白腐菌降解染料废水时在培养液中常常检测不到LiP的藜芦醇活力的原因.

(3) VA对LiP催化氧化PR反应的促进作用有直接和间接两种. VA的直接促进作用是通过加快LiP(II)和/或LiP(III)向LiP的转化实现的; 间接作用是VA生成的 VA^{+} 对PR的氧化.

References

- Mester, T.; Tien, M. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2000**, *46*, 51.
- Tekere, M.; Mswaka, A. Y.; Zvauya, R.; Read, J. S. *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28*, 420.
- Wesenberg, D.; Kyriakides, I.; Agathos, S. N. *Biotechnol. Adv.* **2003**, *22*, 161.
- Xu, C.-Y.; Guo, B.; Zhou, L.; Zhuge, J. *Prog. Biotechnol.* **2002**, *22*, 57 (in Chinese). (徐成勇, 郭波, 周莲, 诸葛健, 生物工程进展, **2002**, *22*, 57.)
- Chagas, E. P.; Durrant, L. R. *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *29*, 473.
- Tatarko, M.; Bumpus, J. A. *Water Res.* **1998**, *32*, 1713.
- Martins, M. A. M.; Lima, N.; Silvestre, A. J. D.; Queiroz, M. J. *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1475.
- Li, H.-R.; Chen, W.; Chen, H.-Q. *Shanghai Environ. Sci.* **2003**, *11*, 738 (in Chinese). (李慧蓉, 陈武, 陈和谦, 上海环境科学, **2003**, *11*, 738.)
- Podgornik, H.; Grgic, I.; Perdih, A. *Chemosphere* **1999**, *38*, 1353.
- Zhang, Z.-H.; Xia, L.-M.; Lin, J.-P.; Cen, P.-L. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.* **2001**, *7*, 382 (in Chinese). (张朝晖, 夏黎明, 林建平, 岑沛霖, 应用与环境生物学报, **2001**, *7*, 382.)
- Huang, X.; Wang, D.; Liu, C.; Hu, M.; Qu, Y.; Gao, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *311*, 491.
- Christian, V.; Shrivastava, R.; Shukla, D.; Modi, H.; Vyas, B. R. M. *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *36*, 327.
- Li, Y.-Z.; Gao, P.-J.; Wang, Z.-N. *Acta Microbiol. Sinica* **1994**, *34*, 29 (in Chinese). (李越中, 高培基, 王祖农, 微生物学报, **1994**, *34*, 29.)
- Chung, N.; Aust, S. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *316*, 851.
- Cai, D.; Tien, M. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 11149.

(A0508182 CHENG, B.; LING, J.)