

固定化酶催化合成 CCK-8 C-端三肽衍生物

郭 丽^{*, a} 张凌之^b 吕子敏^c 徐 正^{a*}

(^a 四川大学华西药学院 成都 610041)

(^b 四川大学化学工程学院 成都 610065)

(^c 华中科技大学同济医学院药学院 武汉 430030)

摘要 报道胆囊收缩素 (CCK-8) C-末端片段三肽衍生物 Phac-Met-Asp (OMe)-Phe-NH₂ 的固定化酶催化法合成. 以 Phac-Met-OCam 为起始原料, 采用三种固定化酶——糜蛋白酶/ Celite-545、木瓜蛋白酶/ VA-Epoxy、嗜热菌蛋白酶/ Celite-545, 经过三步酶促反应得到目标三肽化合物. 对酶的专一性、酶的固定化、溶剂选择和合成条件等进行了研究, 比较了自由酶法与固定化酶法的结果.

关键词 酶法多肽合成, 固定化, CCK-8, 三肽衍生物

Synthesis of a CCK-8 C-Terminal Tripeptide Derivative Catalyzed by Immobilized Enzyme

GUO, Li^{*, a} ZHANG, Ling-Zhi^b LÜ, Zi-Min^c XU, Zheng^a

(^a West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041)

(^b College of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065)

(^c School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030)

Abstract Synthesis of tripeptide derivative Phac-Met-Asp (OMe)-Phe-NH₂ catalyzed by immobilized enzyme is reported. This tripeptide is a fragment of cholecystokinin C-terminal octapeptide CCK-8. Starting with Phac-Met-OCam, the target tripeptide derivative was successfully synthesized with three immobilized enzymes, -chymotrypsin/ Celite-545, papain/ VA-Epoxy and thermolysin/ Celite-545 by three reaction steps in reasonable yields. The choice of appropriate enzymes, solvents and immobilization was studied. By a comparative study of free and immobilized enzymatic synthesis, the results also show some advantages of the use of immobilized enzymes.

Key words enzymatic peptide synthesis, immobilization, CCK-8, tripeptide derivative

酶作为一种高效的生物催化剂, 具有特异的区域选择性和立体选择性. 酶催化合成肽是利用蛋白水解酶的逆转或转肽反应 (即转酰基作用), 在一定的条件下进行肽的合成. 利用酶法合成多肽的方法由于与化学法和基因工程比较有诸多优点, 越来越引起人们的重视^[1~3], 如酶法合成肽反应具有条件温和、消旋率小、氨基酸侧链常可不必保护和环境污染小等优点^[4]. 酶法作为化学法的补充, 发展较快, 近年来, 用酶催化法合成了许多生物活性肽, 如亮-脑啡肽及其类似物^[5,6]、CCK-8 保护二、三肽片段^[7,8]以及天冬甜肽^[9]等. 他们对底物的结构、酶在有机介质中的反应、酶的固定化等进行

了相应的研究.

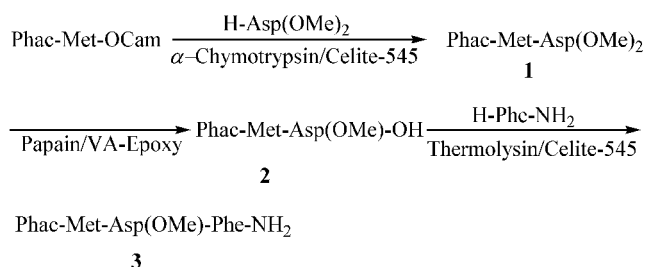
本文选择 Phac-Met-Asp (OMe)-Phe-NH₂ 作为酶催化合成研究对象, 这个三肽衍生物为生物活性肽胆囊收缩素 CCK-8 [Asp-Tyr (SO₃)-Met-Gly-Tip-Met-Asp-Phe-NH₂] 的 C-末端三肽片段, 也是胃泌激素 CCK-4 (Tip-Met-Asp-Phe-NH₂) 的 C-末端三肽片段. 研究工作以固定化的 -糜蛋白酶/ 硅藻土-545、木瓜蛋白酶/ 环氧聚醋酸乙烯酯、嗜热菌蛋白酶/ 硅藻土-545 (-chymotrypsin/ Celite-545, papain/ VA-Epoxy, thermolysin/ Celite-545) 为催化剂, Phac-Met-OCam 作为 N-端羧基组分向 C-端延伸, 酶催化法合成了 Phac-Met-Asp (OMe)-Phe-NH₂ (3), 并对

* E-mail: rosaguo2000@yahoo.com

Received July 15, 2002; revised September 17, 2002; accepted November 21, 2002.

四川大学校基金资助项目.

相关的因素进行了研究. *N*-端氨基保护基采用苯乙酰基 (Phac), 可在合成的最后用青霉素 G 酰胺酶 (Penicillin G Amidase, PGA) 催化脱保护而不影响肽键^[10]. 酶法合成路线如下:



合成的关键步骤是 Phac-Met-OCam 与 H-Asp(OMe)₂ 在 -糜蛋白酶/ Celite-545 催化下的 **1** 的合成以及 **1** 在木瓜蛋白酶/ VA-Epoxy 催化下, 选择性水解天冬氨酸上的 -甲酯, 得到 **2**. **2** 可不经分离与 H-Phe-NH₂ 在嗜热菌蛋白酶/ Celite-545 催化下得目标物 **3**. 酶催化合成与化学法合成产物相同, 反应产物经元素分析, TLC, HPLC, FAB 或 FD-MS 分析确定.

1 结果与讨论

1.1 酶的固定化及酶活力的测定

酶的固定化选用硅藻土-545 以及环氧聚醋酸乙烯酯为载体制得所需固定化酶 -糜蛋白酶/ Celite-545、木瓜蛋白酶/ VA-Epoxy、嗜热菌蛋白酶/ Celite-545. 酶的固定化及酶活性测定条件见表 1. 图 1 例举了木瓜蛋白酶/ VA-Epoxy 活力测定结果.

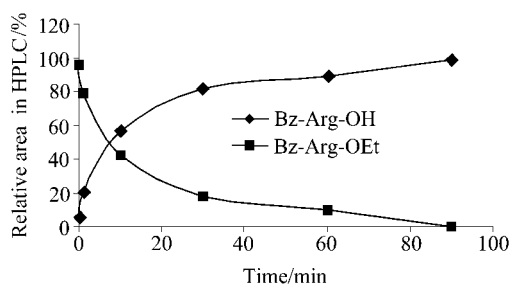


图 1 木瓜蛋白酶/ VA-Epoxy 活力测定结果

Figure 1 Activity test of papain/VA-Epoxy

1.2 Phac-Met-Asp(OMe)₂ (**1**) 的酶法合成

酶催化反应中, 酶对底物要求有一定的结构专一性, 反应介质对反应也有较大的影响. 通常情况下, 酶催化 Met 与 Asp 之间的肽键的形成是比较困难的^[11]. 作者以固定化的 -糜蛋白酶/ Celite-545、木瓜蛋白酶/ VA-Epoxy 为催化剂, 以 Phac-Met-OH(Me or Et 酯) 作羧基组分, 与 H-Asp(OMe)₂ 在缓冲液中反应, 未能得到化合物 **1**, 而只得到羧基组分酯的水解产物; 在含有 0.05 mol L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液的乙腈介质中, 只能得到 < 10 % 的 **1**, 结果见表 2. 改用 Phac-Met-OCam (Carbamylmethyl 酯) 作为羧基组分, -糜蛋白酶/ Celite-545 为酶催化剂, 在含有 0.05 mol L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液的乙酸乙酯介质中, 可得到大于 72 % 的 **1**. 有机溶剂中水含量对酶活性有着非常重要的影响^[9,12], 其中与酶分子表面结合的水对保持酶活性是必不可少的, 过多或过少的水反而会对反应造成不利影响. 研究表明, 在 **1** 的合成中, 当缓冲液的含量为 1.5 % (pH 9.0, V/V) 时, 反应的产率最佳; 当有机溶剂中缓冲液的含量大于 10 % 时, 肽键形成的收率很低; 在有机溶剂 (如乙酸乙酯或乙腈) 中不含缓冲液情况下, 肽键难以形成.

实验说明了必需水的存在是酶在有机溶剂中保持活性的关键. **1** 的酶法合成反应过程中, 仍存在羧基组分 Phac-Met-OCam 酯的水解反应, HPLC 分析结果显示, 在反应的初始阶段, 酯水解速度较快, 随着反应的进行, 酯水解反应趋于平衡, 约有 20 % 的羧基组分酯发生了水解.

1.3 Phac-Met-Asp(OMe)-Phe-NH₂ (**3**) 的酶法合成

从表 2 可见, 若以 **1** 为羧基组分, H-Phe-NH₂ 为氨基组分, 采用不同酶催化, 不能或仅得到收率很低的目标肽 **3**; 以木瓜蛋白酶为催化剂, 只能得到约 10 % 的 **3**, 酶对底物结构有一定的要求. 我们以木瓜蛋白酶为催化剂, 在 0.2 mol L⁻¹ KH₂PO₄, pH 6.0 缓冲液介质中, 选择性水解 **1** 中天冬氨酸双甲酯的 -酯^[13]而保留 -酯, 得到 **2**. 过滤除去固定化酶, 滤液中的 **2** 可不经分离, 在 pH 7.0 条件下, 用嗜热菌蛋白酶/ Celite-545 催化, **2** 和 H-Phe-NH₂ 可直接缩合生成 **3**.

1.4 自由酶与固定化酶催化合成目标三肽的比较

我们曾采用自由酶催化合成了 **3**, 取得了满意的结果. 但自由酶催化合成肽时存在酶不能回收、成本高、不稳定、容易变性等缺点. 固定化酶不仅可以回收循环使用, 而且可提高酶的稳定性、简化分离提纯工艺. 采用固定化酶催化反应条件稳定, 相同条件下 **1** 的收率 (72 %) 较自由酶催化收率

表 1 酶的固定化及活力测定条件

Table 1 Conditions of immobilization and activity test of enzymes

酶	载体	固定化条件	含量酶/载体 (mg g ⁻¹)	活力测定底物	活力测定条件
-Chymotrypsin	Celite-545	50 mmol L ⁻¹ Tris-HCl buffer, pH 9.0	10	Ac-Try-OEt	0.01 mol L ⁻¹ Tris-HCl buffer, pH 8.1
Papain	VA-Epoxy	1 mol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ buffer, pH 7.5	300	Bz-Arg-OEt	0.5 mol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ buffer, pH 6.0
Thermolysin	Celite-545	H ₂ O	25	Z-Asp-Phe-NH ₂	0.05 mol L ⁻¹ Tris-HCl buffer, pH 8.5

表 2 不同羧基组分对酶促肽合成的影响

Table 2 Influence of acyl donors on enzymatic synthesis of peptides

酶	C 组分	N 组分	反应介质	反应温度/	产物	收率/ %
-Chymotrypsin	PhacMetAsp (OMe) ₂	H-PheNH ₂	0.2 mol L ⁻¹ NaHCO ₃ buffer , pH 9.5	25	PhacMetAsp (OMe) PheNH ₂	—
Papain	PhacMetAsp (OMe) ₂	H-PheNH ₂	0.2 mol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ buffer , pH 8.5	25	PhacMetAsp (OMe) PheNH ₂	< 10
Thermolysin	PhacMetAsp (OMe) ₂	H-PheNH ₂	H ₂ O , pH 7.0	40	PhacMetAsp (OMe) PheNH ₂	< 1
Thermolysin	PhacMetAsp (OMe) OH	H-PheNH ₂	H ₂ O , pH 7.0	40	PhacMetAsp (OMe) PheNH ₂	88
Thermolysin ^a	PhacAsp (OMe) OH	H-PheNH ₂	H ₂ O , pH 7.0	38	PhacAsp (OMe) PheNH ₂	80
Thermolysin ^a	ZAsp (OMe) OH	H-PheNH ₂	H ₂ O , pH 7.0	38	ZAsp (OMe) PheNH ₂	92
-Chymotrypsin	PhacMetOCam	H-Asp (OMe) ₂	EtOAc-Tris-HCl buffer (pH 9.0, 1.5 % , V/ V)	25	PhacMetAsp (OMe) ₂	72
-Chymotrypsin ^a	PhacMetOCam	H-Asp (OMe) ₂	EtOAc-Tris-HCl buffer (pH 9.0, 1.5 % , V/ V)	25	PhacMetAsp (OMe) ₂	63
-Chymotrypsin ^a	PhacMetOH (or Me)	H-Asp (OMe) ₂	0.2 mol L ⁻¹ NaHCO ₃ buffer , pH 8.8	25	PhacMetAsp (OMe) ₂	—
-Chymotrypsin ^a	PhacMetOMe	H-Asp (OMe) ₂	CH ₃ CN ⁻ buffer (2 % , V/ V)	25	PhacMetAsp (OMe) ₂	7
Papain ^a	PhacMetOMe	H-Asp (OMe) ₂	CH ₃ CN ⁻ buffer (2 % , V/ V)	25	PhacMetAsp (OMe) ₂	10
Papain ^a	PhacMetOEt	H-Asp (OMe) ₂	0.2 mol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ buffer , pH 8.5	25	PhacMetAsp (OMe) ₂	—

^a Free enzymes.

(63 %)高.3的合成可直接以1为原料,用固定化的木瓜蛋白酶选择性地1中的天冬氨酸双甲酯的-酯水解得到2,过滤除去固定化酶,不经分离直接进行下一步反应,一匀烺法酶促合成得到3,以1原料计算,两步收率可达86%.若采用自由酶,由于酶无法分离,需分离提纯2,然后再进行3的合成,两步收率低于76%.

2 材料与方法

2.1 材料

-糜蛋白酶,从牛的胰脏中分离而得(-chymotrypsin, EC.3.4.21., Sigma 产品,40~60 U/mg 蛋白);木瓜蛋白酶来自 *Carica papaya* (papain, EC.3.4.22.2., Sigma 产品,10~20 U/mg, BAEE 测定);嗜热菌蛋白酶从 *Bacillus thermoproteolyticus rokko* 中分离而得(thermolysin, EC.3.4.24.2, Sigma 产品,50~100 U/mg 蛋白).氨基酸衍生物:Phac-Met-OCam^[14], H-Asp (OMe)₂, H-Phe-NH₂ 以及固定化酶活力

测定底物 Ac-Try-OEt, Bz-Arg-OEt, Z-Asp-Phe-NH₂ 均按参考文献[14~16]制得.其余试剂均为市售分析纯试剂,所用水为二次去离子水.

2.2 酶的固定化

-糜蛋白酶(10 mg)溶解在50 mmol L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH 9.0, 10 mL)中,加 Celite-545 (1 g),于室温振荡24 h,真空下冻干过夜得-糜蛋白酶/Celite-545,冰箱保存备用.

木瓜蛋白酶(300 mg)溶解在1 mol L⁻¹ KH₂PO₄ 缓冲液(pH 7.5, 10 mL)中,加入经1 mol L⁻¹ KH₂PO₄ 缓冲液充分洗涤的 VA-Epoxy (1 g),室温振荡24 h,过滤,水充分洗涤,得木瓜蛋白酶/VA-Epoxy, -20 保存备用.

嗜热菌蛋白酶(25 mg)溶解在水(10 mL)中,加 Celite-545 (1 g),悬浮液振荡24 h,真空下冻干,得嗜热菌蛋白酶/Celite-545,冰箱保存.

2.3 固定化酶的活性测定

活力测定所用底物及条件见表1,室温振荡,分时间段定时取反应液用 HPLC 检测底物和产物浓度.

2.4 HPLC, TLC分析及MPLC层析条件

2.4.1 HPLC分析

柱:Nucleosil 100RP-18, 5 μm , 100 \times 2 mm (Macherey-Nagel). 流动相:(系统 I) 溶剂 A, 0.05 mol L^{-1} NH_4OAc , pH 6.5; 溶剂 B, 80 % (V/V) 甲醇, 20 % 水, 洗脱梯度 45 % ~ 85 % B. (系统 II) 溶剂 A, H_2O (0.1 % TFA), 溶剂 B, 80 % 乙腈 (0.1 % TFA), 洗脱梯度 30 % ~ 70 % B; 流速 0.3 mL/min; UV 测定 260 nm.

2.4.2 TLC分析

薄板(Merck 产品, precoated silicagel 60F₂₅₄), 展开系统:(A) 二氯甲烷-甲醇 9:1; (B) 正丁醇-醋酸-水 3:1:1, 紫外 254 nm 检测及茚三酮显色.

2.4.3 MPLC层析

柱: polygosil C-18 60 ~ 200, 400 \times 100 mm (Macherey-Nagel), 35 % MeOH (0.005 mol L^{-1} NH_4OAc).

2.5 酶催化反应

2.5.1 Phac-Met-Asp(OMe)₂ (1)的酶促合成

将 H-Asp(OMe)₂ (200 mg, 1.2 mmol) 和 Phac-Met-OCam (230 mg, 0.7 mmol) 溶解于含有 0.05 mol L^{-1} Tris \cdot HCl 缓冲液 (pH 9.0, 90 μL) 的乙酸乙酯 (6 mL) 溶液中, 加入 α -糜蛋白酶/Celite-545 (800 mg) (100 mg α -chymotrypsin/10 g Celite-545), 旋转摇动室温下进行反应, HPLC 判断反应终点, 至 Phac-Met-OCam 峰消失. 过滤除去固相酶, 滤液中加乙酸乙酯 (50 mL) 稀释, 有机层分别用 5 % 碳酸钠溶液、10 % 柠檬酸溶液以及饱和氯化钠溶液充分洗涤, 有机层用无水硫酸钠干燥, 浓缩, 得白色固体 1 (210 mg, 72.2 %), m. p. 126 ~ 128 $^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ - 23.0 (c 1.0, DMF); FAB-MS m/z : 411 ($M + H$)⁺; HPLC 分析: 流动相 (系统 II), 洗脱梯度 30 % ~ 70 % B, 或流动相 (系统 I), 洗脱梯度 45 % ~ 85 % B.

2.5.2 Phac-Met-Asp(OMe)-OH (2)的酶促合成

将 1 (400 mg, 1.0 mmol) 悬浮在 0.2 mol L^{-1} KH_2PO_4 缓冲液 (pH 6.0, 20 mL) 中, 加 2-巯基乙醇 (30 μL), 悬浮的混合物中加入木瓜蛋白酶/VA-Epoxy (250 mg) (300 mg Papain/1 g VA-Epoxy), 旋转摇动室温下进行反应, pH 计控制下, 用 1 mol L^{-1} NaOH 溶液调节反应混合物的 pH 保持在 6.0. HPLC 检测判断反应进行情况, 至 1 的峰消失. HPLC 分析显示, 1 完全转化为 2. 过滤除去固相酶, 滤液用 6 mol L^{-1} HCl 调节 pH 至 2 ~ 3, 混合物用乙酸乙酯 (2 \times 30 mL) 提取, 合并乙酸乙酯层, 然后用 10 % 柠檬酸溶液以及饱和氯化钠溶液洗涤, 有机层经无水硫酸钠干燥, 浓缩, MPLC 层析纯化, 经冷冻干燥得白色固体 2. m. p. 141 ~ 144 $^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ - 22.3 (c 1.0, DMF); FD-MS m/z : 396 (M^+); HPLC 分析: 流动相 (系统 II), 洗脱梯度 35 % ~ 70 % B.

2.5.3 Phac-Met-Asp(OMe)-Phe-NH₂ (3)的酶促合成

将 H-Phe-NH₂ \cdot HCl (150 mg, 0.75 mmol) 溶解在水中 (10 mL), 将 2 (200 mg, 0.5 mmol) 悬浮在上述所得的溶液中. pH 计控制, 用 4 mol L^{-1} NaOH 溶液调节混合物的 pH 至 7.0, 反应物 2 完全溶解. 于反应混合物中加入嗜热菌蛋白酶/Celite-

545 (100 mg) (50 mg Thermolysin/2 g Celite-545), 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应, 有白色沉淀生成, 反应混合物保持在 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 3 h. 冰水浴充分冷却反应混合物后, 过滤收集固体. 加乙腈 (50 mL) 使固体物充分溶解, 过滤除去固定化酶, 滤液浓缩至干, 固体物分别用冷的 1 % 碳酸氢钠溶液、水、5 % 柠檬酸溶液充分洗涤, 然后再用水充分洗涤至中性, 真空干燥, 得白色固体 3 (240 mg, 88 %). m. p. 210 ~ 213 $^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ - 16.1 (c 1.0, DMF); FAB-MS m/z : 543 ($M + H$)⁺; HPLC 分析: 流动相 (系统 II), 65 % B.

2.5.4 Phac-Met-Asp(OMe)-Phe-NH₂ (3) 一勺烩酶促合成

将 1 (200 mg, 0.5 mmol) 悬浮在 0.2 mol L^{-1} KH_2PO_4 缓冲液 (pH 6.0, 12 mL) 中, 加入 2-巯基乙醇 (20 μL). 悬浮的混合物中加入木瓜蛋白酶/VA-Epoxy (150 mg) (300 mg Papain/1 g VA-Epoxy), 旋转摇动室温下进行反应, pH 计控制下, 用 1 mol L^{-1} NaOH 溶液将反应混合物的 pH 保持在 6.0. HPLC 检测判断反应进行情况, 至 1 的峰消失. 过滤除去固相酶, 滤液中投入 H-Phe-NH₂ \cdot HCl (150 mg, 0.75 mmol), 用 4 mol L^{-1} NaOH 溶液将混合物溶液的 pH 调节至 7.0. 于反应混合物中加入嗜热菌蛋白酶/Celite-545 (100 mg) (50 mg Thermolysin/2 g Celite-545), 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应, 有白色沉淀逐渐产生, 反应混合物保持在 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中过夜. 冰水浴充分冷却反应混合物后, 过滤收集固体. 加乙腈 (50 mL) 使固体物充分溶解, 过滤除去固定化酶, 滤液浓缩至干, 固体物分别用冷的 1 % 碳酸氢钠溶液、水、5 % 柠檬酸溶液充分洗涤, 然后再用水充分洗涤至中性, 真空干燥, 得白色固体 3 (227 mg, 以化合物 1 为原料计算, 两步收率 86 %).

References

- 1 Zhou, C.; Tian, G.-L.; Shen, H.-Y.; Ye, Y.-H. *Acta Chim. Sinica* **2001**, 59(10), 1707 (in Chinese). (周闯, 田桂玲, 沈鸿雁, 叶蕴华, 化学学报, **2001**, 59(10), 1707.)
- 2 Liu, P.; Tian, G.-L.; Ye, Y.-H. *Chem. J. Chin. Univ.* **2001**, 22(8), 1342 (in Chinese). (刘平, 田桂玲, 叶蕴华, 高等学校化学学报, **2001**, 22(8), 1342.)
- 3 Basso, A.; Martin, L. D.; Ebert, C.; Gardossi, L.; Linda, P. *Chem. Commun.* **2000**, 467.
- 4 Sinisterra, J. V.; Alcantara, A. R. *J. Mol. Catal.* **1993**, 84, 327.
- 5 Ye, Y.-H.; Tian, G.-L.; Xing, G.-W.; Dai, D.-C.; Chen, G.; Li, C.-X. *Tetrahedron* **1998**, 54, 12585.
- 6 Liu, P.; Ye, Y.-H.; Tian, G.-L.; Lee, K.-S.; Wong, M.-S.; Lo, W.-H. *Synthesis* **2002**, 726.
- 7 Fite, M.; Alvaro, G.; Clapes, P. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, 23(3), 199.
- 8 Capellas, M.; Benaiges, M. D.; Caminal, G.; Gonzalez, G.; Lopez-Santin, J.; Clapes, P. *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, 50,

- 700.
- 9 Martin, L. D. ; Ebert, C. ; Gardossi, L. ; Linda, P. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 3395.
- 10 Waldmann, H. ; Sebastian, D. *Chem. Rev.* **1994**, 94, 911.
- 11 Kullman, W. *Enzymatic Peptide Synthesis*, CRC Press, Florida, **1987**.
- 12 Tian, G.-L. ; Xing, G.-W. ; Ye, Y.-H. *Chin. J. Org. Chem.* **1998**, 18, 11 (in Chinese).
- (田桂玲, 邢国文, 叶蕴华, 有机化学, **1998**, 18, 11.)
- 13 Drauz, K. ; Waldmann, H. *Enzymatic Catalysis in Organic Synthesis*, VCH, Weinheim, **1995**.
- 14 Martinez, J. ; Laur, J. ; Castro, B. *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24 (47), 5219.
- 15 Brenner, M. ; Huber, W. *Helv. Chim. Acta* **1953**, 36, 1109.
- 16 Davey, J. M. ; Laird, A. H. ; Morley, J. S. *J. Chem. Soc. (C)* **1966**, 555.

(A0207157 LI, L. T. ; LING, J.)