

ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΑΣ ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΚΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΗΣ Β-ΓΛΥΚΟΖΙΔΑΣΗΣ ΑΠΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ *E. COLI* BL21

Σ. Καλαντζή¹, Χ. Κοντού Βρεττού¹, Σ. Κρικώνη¹, Δ. Χατζηνικολάου², Δ. Μαμμά¹,
Δ. Κέκος^{1*}

¹ Εργαστήριο βιοτεχνολογίας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ

² Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

(*kekos@chemeng.ntua.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι θερμόφιλοι μικροοργανισμοί αποτελούν πηγές δραστικών θερμοσταθερών ενζύμων, με ποικίλες βιοτεχνολογικές εφαρμογές, ενώ διαθέτουν πλήρες μεταβολικό δυναμικό αποδιάταξης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας καθώς και υδρογονανθράκων. Από αυτούς, οι κύριοι παραγωγοί θερμοσταθερών ενζύμων ανήκουν στο Βασίλειο των βακτηρίων.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκε η αριστοποίηση της ετερόλογης παραγωγής μίας θερμοσταθερής β-γλυκοζιδάσης από το θερμόφιλο βακτήριο *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. Το γονίδιο του ενζύμου έχει κλωνοποιηθεί σε πλασμιδιακό φορέα pET15b με τον οποίο και μετασχηματίστηκαν κύτταρα *E. coli* BL21 (DE03).

Αρχικά μελετήθηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης από τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* BL 21 (DE03). Ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο LB και για την επαγωγή της έκφρασης του ενζύμου, χρησιμοποιήθηκε IPTG (ισοπροπυλο-β,D-θειογαλακτοζιδάση). Το IPTG (ισοπροπυλο-β,D-θειογαλακτοζιδάση) είναι το δομικό ανάλογο της αλλολακτόζης, που αδρανοποιεί τον καταστολέα *Iac* (*IacI*) του πλασμιδιακού φορέα, επομένως επάγει την έκφραση των πρωτεϊνών που μεταγράφονται υπό τον έλεγχο του χειριστή του οπερονίου. Επομένως, το IPTG λειτουργεί ως επαγωγέας της έκφρασης του οπερονίου της λακτόζης και μιμείται το φυσικό επαγωγέα του οπερονίου, την αλλολακτόζη. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του IPTG (5, 10, 20, 40 μM) και η θερμοκρασία επαγωγής (20, 25, 30, 37°C) στην παραγωγή του ενζύμου. Ακολούθως μελετήθηκε η επίδραση του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης στην παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης χρησιμοποιώντας διαφορετικές πηγές άνθρακα, απουσία του τεχνητού επαγωγέα (IPTG). Οι πηγές άνθρακα που επιλέχθηκαν είναι: (α) γλυκόζη, (β) λακτόζη, (γ) γαλακτόζη, (δ) γλυκερόλη και (ε) μίγμα αυτών και η χρήση τους έχει ως στόχο την αντικατάσταση του επαγωγέα IPTG έτσι ώστε να προκύψει μία οικονομικά και οικολογικά συμφέρουσα διεργασία.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Υπάρχει ένα μεγάλο εύρος παραγόντων που επηρεάζουν την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών στο *E. coli* BL21 στέλεχος. Γενικά, η παρουσία ανασυνδιασμένου πλασμιδίου μειώνει τη διαθέσιμη μεταβολική ενέργεια του κυττάρου. Αυτό το ενεργειακό φορτίο μπορεί να μειώσει τον ρυθμό ανάπτυξης της καλλιέργειας. Συνολικά, οι παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο είναι: (α) η θερμοκρασία καλλιέργειας, (β) η σύσταση του θρεπτικού μέσου, (γ) η συγκέντρωση επαγωγέα, (δ) η χρονική φάση επαγωγής και (ε) η διάρκεια επαγωγής. Ο πιο διαδεδομένος επαγωγέας είναι το IPTG, είναι ένας ευρέως φύσης επαγωγέας του *Iac* υποκινητή, καθώς προσδέεται με τον καταστολέα και δεν του επιτρέπει να συνδεθεί με τον χειριστή. Το IPTG είναι ένα μεταβολικά ελεύθερο μόριο που δεν καταβολίζεται μέσα στο κύτταρο. Το εύρος συγκέντρωσης IPTG που χρησιμοποιείται συνήθως είναι από 0,005 mM έως 5mM στο θρεπτικό μέσο κατά την φάση επαγωγής. Σε πολλές περιπτώσεις, ιδανική συγκέντρωση επαγωγέα, επιλέγεται εκεί που ο ρυθμός ανάπτυξης της μετασχηματισμένης καλλιέργειας μειώνεται, ενώ η παραγωγή της πρωτεΐνης στόχου αυξάνεται [1]. Το IPTG είναι ακριβό σε κόστος,

είναι τοξικό για τον άνθρωπο και δεν μπορεί να απομακρυνθεί από το τελικό προϊόν της παραγόμενης πρωτεΐνης. Γι'αυτό σε φαρμακολογικές μελέτες δημιουργίας νέων φαρμάκων με γενετική μηχανική, προτιμάται η απουσία του IPTG στο σύστημα ετερόλογης έκφρασης του γονιδίου που θα παράγει την φαρμακευτική πρωτεΐνη. Στις μέρες μας μελετώνται τα αυτοεπαγώμενα συστήματα στα οποία ελέγχονται διάφορα θρεπτικά μέσα τα οποία έχουν τη δυνατότητα αφενός να λειτουργούν ως επαρκή μέσα για την ανάπτυξη της καλλιέργειας, αφετέρου να επάγουν το οπερόνιο της λακτόζης. Έτσι δεν χρειάζεται να ελέγχεται η πορεία καλλιέργειας κατά τη φάση επαγωγής. Για να κατανοηθούν οι μηχανισμοί αυτοεπαγωγής ελέγχονται διαφορετικά θρεπτικά μέσα γνωστής σύστασης και ποσοτικοποιείται η μείωση των υποστρωμάτων αλλά και η αύξηση της παραγόμενης πρωτεΐνης^[4]. Η λακτόζη και η γαλακτόζη έχουν προταθεί ως κύρια συστατικά στα αυτεπαγώμενα συστήματα. Η λακτόζη και η γαλακτόζη είναι διαθέσιμες σε μεγάλη κλίμακα από την βιομηχανία γάλακτος. Είναι συστατικά προϊόντων που αποτελούν παραπροϊόντα ενός εργοστασίου, όπως είναι το τυρόγαλα. Η λακτόζη και η γαλακτόζη είναι φυσικά στοιχεία μεταβολισμού του βακτηρίου *E.coli* και αφομοιώνεται στον καταβολισμό του, χωρίς να ενεργοποιούνται στρεσογόνες αποκρίσεις στο κύτταρο. Η λειτουργία τους ως επαγωγείς έγκειται στο ότι η λακτόζη διασπάται σε αλλολακτόζη και προσδέεται στον καταστολέα απενεργοποιώντας τον. Αντίστοιχα η γαλακτόζη προσδέεται στον καταστολέα και τον απενεργοποιεί^[2]. Η αλλολακτόζη έχει δέκα φορές μεγαλύτερη συγγένεια από την γαλακτόζη στην πρόσδεση της στον καταστολέα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Καλλιέργεια βακτηρίων με θρεπτικό μέσο LB, επαγωγή της έκφρασης του ενζύμου με IPTG

Για την παραγωγή του ενζύμου β-γλυκοζιδάσης από τα *E. coli* BL21 κύτταρα παρασκευάστηκε προκαλλιέργεια, η οποία λειτούργησε ως εμβόλιο για την καλλιέργεια. Η προκαλλιέργεια περιείχε θρεπτικό μέσο LB, αμπικιλίνη (100g/L) και κύτταρα μίας αποικίας των μετασηματισμένων *E. coli* BL21 και αφέθηκε να αναπτυχθεί στους 37°C, υπό συνεχή ανάδευση, εμβολιάστηκε υπό στείρες συνθήκες στην καλλιέργεια, η οποία περιείχε θρεπτικό μέσο LB και αμπικιλίνη (100 g/L). Αυτή αναπτύχθηκε στους 37°C, σε επωαστήρα, υπό έντονη ανάδευση. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δείγματα από την καλλιέργεια για να ελεγχθεί η οπτική της πυκνότητα. Όταν αυτή έφτασε στην εκθετική φάση (OD=0,6 στα 600nm), προστέθηκε επαγωγέας IPTG (5, 10, 20, 40 μM). Εν συνεχεία η καλλιέργεια αφέθηκε να αναπτυχθεί σε διαφορετικές θερμοκρασίες επαγωγής (20, 25, 30, 37°C) υπό συνεχή ανάδευση ενώ πραγματοποιούνταν δειγματοληψίες για την παρακολούθηση της ανάπτυξης του βακτηρίου και την μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου.

Καλλιέργεια βακτηρίων, με χρήση διαφορετικών πηγών άνθρακα

Κύτταρα από την προκαλλιέργεια εμβολιάστηκαν σε υγρές καλλιέργειες οι οποίες περιείχαν 4 g L⁻¹ (NH₄)₂HPO₄, 13.3 g L⁻¹ KH₂PO₄, 1.55 g L⁻¹ citric acid, 0.59 g L⁻¹ MgSO₄, 100.8 mg L⁻¹ Fe(III) citrate, 2.1 mg L⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O, 2.5 mg L⁻¹ CoCl₂·6H₂O, 15 mg L⁻¹ MnCl₂·4H₂O, 1.5 mg L⁻¹ CuCl₂·2H₂O, 3 mg L⁻¹ H₃BO₃, 33.8 mg L⁻¹ Zn (CH₃COOH)₂·2H₂O, 14.1 mg L⁻¹ Titriplex III πλην της πηγής άνθρακα η οποία διαφοροποιούνταν και ήταν 10g L⁻¹ (α) γλυκόζη, (β) λακτόζη, (γ) γαλακτόζη, (δ) γλυκερόλη και (ε) μίγμα γλυκόζης γλυκερόλης λακτόζης^[5]. Η καλλιέργεια αφέθηκε να αναπτυχθεί στους 37°C και λαμβάνονταν κατά τακτά χρονικά διαστήματα δείγματα για τον έλεγχο της ανάπτυξης των κυττάρων και την μέτρηση του παραγόμενου ενζύμου.

Αναλυτικές μέθοδοι

Διάρρηξη κυττάρων

Η διάρρηξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 8.000 rpm για 10 min, απόρριψη του υπερκείμενου υγρού, συλλογή των κυττάρων και επαναδιάλυση αυτών σε ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος με αυτό που απορρίφθηκε. Εισαγωγή των δειγμάτων σε

συσσκευή παραγωγής υπερήχων (Sonics and Materials, Vibra-Cell, 400W) και διάρρηξη των κυττάρων για την απελευθέρωση του εσωκυτταρικού ενζύμου της β-γλυκοζιδάσης.

Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας β-γλυκοζιδάσης

Η ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης προσδιορίστηκε με επώαση του ενζύμου στους 60°C σε διάλυμα 1mM p-νιτροφαινυλ-β-D-γλυκοκυρανοζίδιο για 15min. Η αντίδραση τερματίστηκε με προσθήκη ανθρακικού νατρίου 10% (β/ο) και η νιτροφαινόλη που απελευθερώθηκε προσδιορίστηκε φωτομετρικά σε μήκος κύματος 410nm.

Προσδιορισμός πρωτεΐνης

Η πρωτεΐνη προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford η οποία βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου χρωστικής (Coomassie Brilliant Blue G-250) –πρωτεΐνης και απορροφά στα 595 nm.

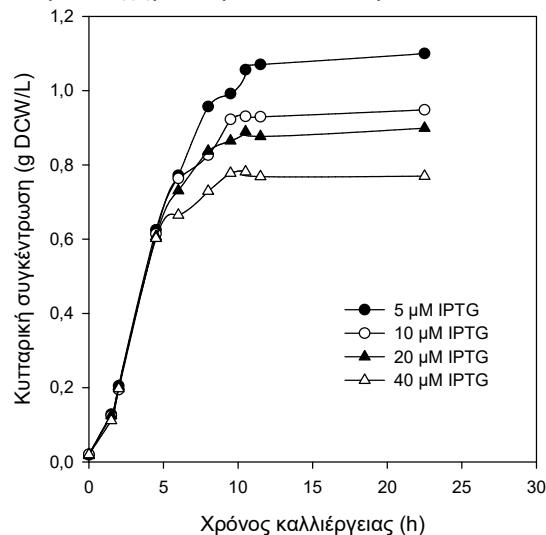
Μέθοδος μέτρησης θολερότητας ή οπτικής πυκνότητας (OD_{600nm})

Ο έλεγχος ανάπτυξης της βακτηριακής καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε φωτομετρικά με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Επίδραση της συγκέντρωσης του IPTG στην ανάπτυξη των μετασηματισμένων βακτηρίων

Διερευνήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του IPTG (5, 10, 20, 40 μM) στην ανάπτυξη της βακτηριακής καλλιέργειας από τα μετασηματισμένα κύτταρα *E.coli* BL21. Στο διάγραμμα 1 απεικονίζεται η χρονική μεταβολή της κυτταρικής συγκέντρωσης συναρτήσει της συγκέντρωσης του επαγωγέα IPTG. Παρατηρείται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του επαγωγέα επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξη των μετασηματισμένων κυττάρων.



Σχήμα 2. Χρονική μεταβολή της κυτταρικής συγκέντρωσης συναρτήσει της συγκέντρωσης του IPTG.

Έχει βρεθεί ότι ο επαγωγέας IPTG αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων κατά την φάση επαγωγής λόγω του αυξημένου ενεργειακού φορτίου που υφίσταται το κύτταρο από την ύπαρξη των ξένων για αυτό γονιδίων [1,5]. Μετρήθηκε η ενεργότητα του ενζύμου β-γλυκοζιδάσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Η μέγιστη ενεργότητα του ενζύμου παρουσιάστηκε στις 11,5h για την καλλιέργεια που επάχθηκε με συγκέντρωση IPTG 5μM, ενώ μεγαλύτερο χρόνο για την παραγωγή της μέγιστης ενεργότητας χρειάστηκαν οι καλλιέργειες που επάχθησαν με 10,20 και 40μM IPTG.

Πίνακας 1. Παραγόμενο ένζυμο β-γλυκοζιδάση συναρτήσει της συγκέντρωσης του επαγωγέα

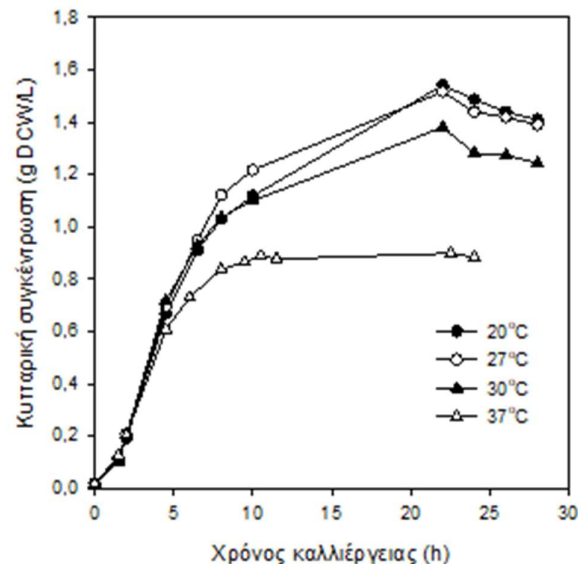
IPTG (μM)	B-γλυκοζιδάση	Χρόνος (h)
	Units/mL καλλιέργειας	μέγιστης ενζυμικής ενεργότητας

5	4,35	11,5
10	5,36	22,5
20	6,60	22,5
40	5,54	24,5

Καταγράφηκε σταδιακή αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου μέχρι τα 20μM IPTG, όπου μετρήθηκε και η μεγαλύτερη ενεργότητα δηλαδή 6,6 Units/mL καλλιέργειας. Η περαιτέρω αύξηση μέχρι τα 40μM επέφερε μείωση της παραγόμενης β-γλυκοζιδάσης. Ως βέλτιστη συγκέντρωση επαγωγέα επιλέχθηκε τα 20μM IPTG .

Επίδραση της θερμοκρασίας επαγωγής στην ανάπτυξη των μετασηματισμένων βακτηρίων

Διερευνήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας επαγωγής στην ανάπτυξη του βακτηρίου. Στο διάγραμμα 2 απεικονίζεται η ανάπτυξη του βακτηρίου σε συνάρτηση με την θερμοκρασία επαγωγής. Παρατηρήθηκε αύξηση της κυτταρικής συγκέντρωσης με μείωση της θερμοκρασίας επαγωγής. Η εφαρμογή θερμοκρασιών χαμηλότερων των 30°C μειώνει τις ανεπιθύμητες μεταβολικές αποκρίσεις του κυττάρου όταν σ' αυτό παράγεται εξαναγκασμένη μαζική παραγωγή πρωτεΐνης. Επομένως σε χαμηλότερες θερμοκρασίες παρατηρείται αυξημένη παραγωγή πρωτεΐνης στόχου ^[1].



Σχήμα 2. Χρονική μεταβολή της κυτταρικής συγκέντρωσης συναρτήσει της θερμοκρασίας επαγωγής..

Μετρήθηκε η ενεργότητα του ενζύμου β-γλυκοζιδάσης μετά την εφαρμογή των διαφορετικών θερμοκρασιών επαγωγής. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Παραγόμενη β γλυκοζιδάση συναρτήσει της θερμοκρασίας επαγωγής

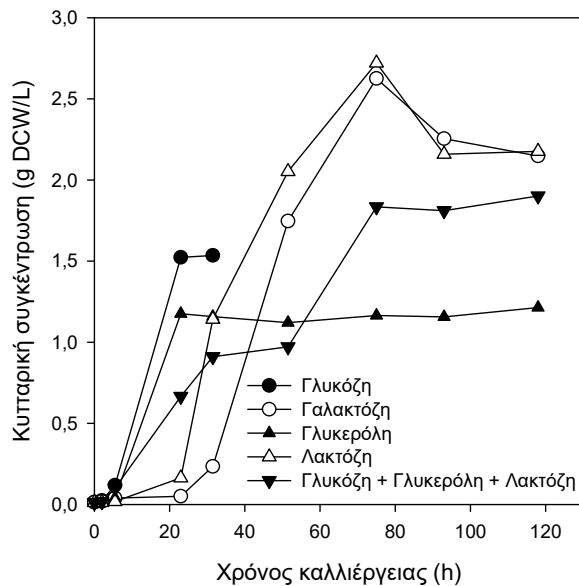
Θερμοκρασία Επαγωγής °C	Β-γλυκοζιδάση Units/mL καλλιέργειας
20	11,901
27	11,156
30	12,157
37	6,602

Υψηλότερες τιμές ενεργότητας ενζύμου καταγράφηκαν σε συνθήκες θερμοκρασίας επαγωγής

χαμηλότερων των 30°C. Η μέγιστη ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης παρουσιάστηκε όταν εφαρμόστηκε θερμοκρασία επαγωγής 20°C.

Συστήματα αυτεπαγωγής

Στα αυτεπαγώμενα συστήματα το ίδιο το θρεπτικό μέσο λειτουργεί ταυτόχρονα ως μέσο ανάπτυξης της καλλιέργειας και ως επαγωγέας του οπερονίου της λακτόζης. Μελετήθηκαν διαφορετικές πηγές άνθρακα (α) γλυκόζη, (β) λακτόζη, (γ) γαλακτόζη, (δ) γλυκερόλη και (ε) μίγμα γλυκόζης, λακτόζης, ως σύστημα αυτεπαγωγής. Μετρήθηκε η ανάπτυξη της βακτηριακής καλλιέργειας με τις διαφορετικές πηγές άνθρακα. (Σχήμα 3). Μεγαλύτερη κυτταρική ανάπτυξη παρουσιάστηκε όταν εφαρμόστηκε ως πηγή άνθρακα η λακτόζη, η γαλακτόζη και το μίγμα γλυκόζης, λακτόζης, γλυκερόλης.



Σχήμα 3. Χρονική μεταβολή της κυτταρικής συγκέντρωσης συναρτήσει της πηγής άνθρακα

Μετρήθηκε η παραγόμενη β-γλυκοζιδάση στα διαφορετικά αυτεπαγώμενα συστήματα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Η μεγαλύτερη ειδική ενεργότητα του ενζύμου καταγράφηκε όταν ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε το μίγμα γλυκόζης, γλυκερόλης και λακτόζης.

Πίνακας 3. Πηγή άνθρακα στα αυτεπαγώμενα συστήματα συναρτήσει του παραγόμενου ενζύμου

Πηγή C Επαγωγής	Β-γλυκοζιδάση Units/mg protein
Γλυκόζη	
Γαλακτόζη	96,45
Γλυκερόλη	32,22
Λακτόζη	59,88
Μίγμα	290,32
20μM IPTG 30°C, LB	460,38

Η γλυκόζη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα καθώς εκφράζεται η ετερόλογη πρωτεΐνη από τον *lac* υποκινητή όσο η συγκέντρωση της είναι χαμηλότερη από 0,1%w/v κατά την φάση επαγωγής. Η παρουσία της γλυκόζης επιλέγεται σε περιπτώσεις που η έκφραση της ετερόλογης πρωτεΐνης θέλουμε να περιοριστεί ^[1]. Αντίθετα, πετυχημένα μοντέλα αυτοεπαγωγής είναι η λακτόζη, η γαλακτόζη και η γλυκερόλη και το μίγμα γλυκόζης, λακτόζης και γλυκερόλης Έχει παρατηρηθεί ότι η προσθήκη στο θρεπτικό μέσο καζαμινοξέων, πεπτόνης, και εκχυλίσματος ζύμης, βελτιώνει την απόδοση παραγωγής ετερόλογων πρωτεϊνών. Μελέτες που στόχευαν στην ερμηνεία αυτού του φαινομένου κατέληξαν ότι μικροποσότητες γαλακτόζης ή λακτόζης στα παραπάνω συστατικά, λειτουργούν ως επαγωγείς μεταγραφής του *lac* οπερονίου ^[1].

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα ερευνητική μελέτη εξάχθησαν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Η βέλτιστη συγκέντρωση επαγωγέα IPTG για να επαχθούν τα τροποποιημένα κύτταρα *E.coli* BL21 είναι τα 20μM.
- Η εφαρμογή μεγαλύτερης συγκέντρωσης του επαγωγέα στα τροποποιημένα κύτταρα οδηγεί σε καταστολή αυτών συντελώντας σε μείωση της κυτταρικής ανάπτυξης καθώς και σε μειωμένη ενζυμική παραγωγή.
- Η βέλτιστη θερμοκρασία επαγωγής είναι 20°C με μέγιστη ενεργότητα ενζύμου 11,90Units/mL καλλιέργειας.
- Το βέλτιστο σύστημα αυτεπαγωγής είναι εκείνο που περιέχει ως πηγή άνθρακα μίγμα γλυκόζης, λακτόζης και γλυκερόλης με ειδική ενζυμική ενεργότητα 290,32 Units/mg protein. Το θρεπτικό μέσο LB με επαγωγέα IPTG κατέληξε σε μεγαλύτερη ειδική ενεργότητα 460,38 Units/mL καλλιέργειας. Τα αυτεπαγώμενα συστήματα είναι ακόμα σε πειραματικά στάδια και χρήζουν βελτίωσης.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία υλοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού έργου «Synthetic Biology: From Omics Technologies to Genomic Engineering», και συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνεΚ 2014-2020). Οι συγγραφείς εκφράζουν θερμές ευχαριστίες προς το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ για τη διεξαγωγή των μετρήσεων.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] RS. Donovan, CW. Robinson, BR Glick. *J. Ind. I Microbiol.* 16 (1996) 145-154.
- [2] J1 Xu, A Banerjee, SH Pan, ZJ Li. *Protein Expr Purif.* 83 (2012) 30-36.
- [3] D.R. Love, R. Fisher, P.L. Bergquis. *Mol Gen Genet.* 213 (1988) 84-92.
- [4] D. Barkley, A D. Riggs, A Jobe, S. Bourgeois. *Biochem.*14 (1975) 1700-1712.
- [5] Z. Li , M. Nimtz, U. Rinas. *Microb Cell Fact.*13 (2014) 45-47.