

## 항버섯(*Sarcodon aspratus*)추출물의 항돌연변이성 및 DNA Topoisomerase I 저해 효과

배준태 · 이갑량<sup>†</sup>  
영남대학교 식품영양학과

### Antimutagenic and DNA Topoisomerase I Inhibition Effects of *Sarcodon aspratus* Extracts

Jun-Tae Bae and Kap-Rang Lee<sup>†</sup>

Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

#### Abstract

This study was carried out to investigate the effects on the mutagenicity and activity of DNA topoisomerase I of *Sarcodon aspratus*. Using an Ames mutagenicity test, which has been used to assess both mutagenic and antimutagenic effects of various molecules, it was observed that the methanol extracted fraction and other fractions (prepared in water or ethylacetate) of *Sarcodon aspratus* showed a significant antimutagenic activity against a mutagenicity induced by both a direct mutagenic agent such as MNNG and an indirect mutagenic agents such as B(a)P and AFB<sub>1</sub> in *Salmonella typhimurium* TA98, TA100. Also, the extract and fractions of *Sarcodon aspratus* were found to have an inhibitory activity on the relaxation process of DNA topoisomerase I.

**Key words:** *Sarcodon aspratus*, antimutagenicity, DNA topoisomerase I

#### 서 론

현대사회는 심각한 환경오염과 다양한 가공식품 및 식품의 오염등으로 인체가 변이원에 노출될 가능성이 높아지면서 암 발생률이 증가되고 있다. 현재까지 알려진 바에 의하면 발암물질의 85% 이상은 돌연변이원이며, 비발암성으로 알려진 물질의 10% 이하가 돌연변이원으로 작용하고 있어 발암과 돌연변이간에는 높은 상관관계가 있으며 돌연변이를 억제할 수 있는 물질이 항암물질로 작용한다는 보고들을 통해 암의 예방이나 치료를 목적으로 천연물 중 항돌연변이 물질을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(1) 또한 최근에는 DNA를 대상으로 하여 암세포의 비정상적인 증식을 막아보자는 데 기초를 둔 DNA topoisomerase를 저해하는 물질의 탐색이 진행되고 있다(2) DNA topoisomerase I 저해제는 DNA의 대사에서 중요한 역할을 수행하는 세포주기에 있어서 그 활성이 높을 것으로 예상되어지는 topoisomerase가 증식하는 것으로 알려져 암세포의 좋은 표적이 될 수 있다는 점을 이용한 항암물질로서 점차 약제개발 및 임상 치료 분야에도 적용되고 있다(3).

버섯은 독특한 맛과 향기를 지니고 있어 예로부터 식

용 및 약용으로 널리 이용되어 왔으며 자연식품, 저칼로리 식품 및 무공해 식품으로 진가가 인정되는 식품이다(4,5). 특히 버섯의 항암작용(6,7), 생체기능조절, 뇌졸중 및 심장병 등 성인병에 대한 예방과 개선효과가 보고됨에 따라 버섯에 대한 관심이 더욱 높아지게 되었다(8). 이 중 항버섯(*Sarcodon aspratus*)은 한국과 일본에서 자생하고 있으며, 9월 하순부터 10월 초순 활엽수림의 부석이 많은 산지에서 자라는 대형 버섯으로 맛이 뛰어나 궁중요리에 이용되어 왔으며 육류를 먹고 채웠을 때 한방탕제로 이용되어 왔다(9). 항버섯에 관한 연구로는 21종의 아미노산과 무기질이 많이 함유되어 있다는 식품분석학적인 연구만 되어 있는 실정이다(10-12). 따라서 본 연구에서는 항버섯의 항암 효과 검증을 위한 기본 단계로서 항버섯의 메탄올 추출물과 분획물들이 암의 initiation을 유도할 수 있는 돌연변이에 미치는 영향과 DNA 복제시 중요한 역할을 하는 DNA topoisomerase I의 활성억제 효과를 검토하였다.

#### 재료 및 방법

##### 재료

본 실험에 사용한 항버섯(*Sarcodon aspratus* (Berk.)

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

S. Ito)은 경상북도 황악산에서 채취하여 건조시킨 후 사용하였고, *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100 균주는 미국 캘리포니아 대학의 B.N. Ames 교수로부터 제공받아 사용하였다.

돌연변이 유발원인 aflatoxin B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>), benzo(a)pyrene (B(a)P), N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) 그리고 4-nitroquinoline-1-oxide(4-NQO)는 Sigma사로부터, 그리고 DNA topoisomerase I과 proteinase K는 Takara사(Japan)로부터 구입하였으며, 기타 시약들도 특급 또는 일급 시약을 사용하였다.

### 시료 조제

건조된 향버섯을 먼저 분쇄기로 분말화시킨 후 10배의 80% 메탄올을 첨가하여 환류 냉각기를 설치한 수욕상에서 8시간 동안 3회 반복 추출하여 여과하였다. 이 여액을 감압 농축하고 동결건조시킨 후 메탄올 추출물로 사용하였다.

메탄올 추출물은 에틸아세테이트와 증류수를 동량 혼합한 용액을 첨가하여 교반, 추출하여 에틸아세테이트층과 물층으로 분리한 후 각각 감압 여과하여, 이 여액을 다시 감압 농축하고 동결 건조시킨 후 에틸아세테이트 분획과 물 분획을 얻었다.

### 향버섯의 항변이원성 검사

Ames와 Maron(13)의 방법에 의해 실험하였다. 즉 멸균시킨 capped tube에 시료 50  $\mu$ L, 돌연변이원 50  $\mu$ L, S9 mix 500  $\mu$ L(직접변이원의 경우, 0.2 M phosphate buffer), 균주 100  $\mu$ L를 넣고 37°C에서 20분 동안 pre-incubation시켰다. 이것을 top agar 2 mL와 혼합한 후 최소 평판배지(minimal glucose agar plates)에 골고루 도말하였다. 37°C에서 48시간 배양한 후 배지위의 복귀변이주(revertant)의 colony 수를 계수하였다. 체내 대사 활성 체계인 microsomal fraction 즉 S9 mixture 제조는 Ames와 Maron(13)의 방법으로 제조하였다. 한 시료에 대하여 3개의 최소평판배지를 사용하였으며, 변이원에 대한 억제효과는 변이원 물질의 활성에 대한 시료의 억제율(inhibition%)로 나타내었다. 한편 시료와 변이원 물질의 농도는 예비 실험을 통하여 결정하였다.

### 향버섯의 DNA Topoisomerase I 저해효과

Ray 등(14)의 방법에 따라 plasmid pBR322 DNA의 초나선형이 이완된 형태로 전환되는 것을 관찰함으로써 결정하였다. 반응혼합액은 0.3  $\mu$ g 초나선형 pBR322 DNA에 10X 반응 완충액 2  $\mu$ L(40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA, 50  $\mu$ g/mL bovine serum albumin)를 가하고 버섯 분획물 100 mg/mL을 2  $\mu$ L, 4  $\mu$ L씩 각각 넣고

1 unit의 DNA topoisomerase I과 증류수를 혼합하여 총 반응용량을 20  $\mu$ L로 만들었다. 이 반응혼합액을 37°C 항온조에서 30분간 반응시킨 다음 10% SDS용액 2  $\mu$ L를 가하여 반응을 정지시켰다. Proteinase K 50  $\mu$ g/mL을 가하고 진탕한 후 원심분리하여 그 상정액에 모은 후 gel loading buffer(0.25% bromophenol blue, 40% glycerol, 2.5% SDS)를 첨가한 후 1% agarose gel에서 3시간(30 volts) 전기영동한 다음 0.5  $\mu$ g/mL의 ethidium bromide 용액에서 30분간 염색하고 다시 탈색한 후 UV하에서 band를 관찰하였다.

### 통계분석

대조군과 각 시료에 대한 실험결과는 SAS를 이용한 Duncan's multiple range test로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 향버섯의 항돌연변이 효과

향버섯 추출물 및 그 분획물 자체의 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100균주에 대한 돌연변이원성 유무를 확인한 결과, 그림으로는 나타내지 않았지만 본 실험에 사용한 시료농도에서는 농도의 증가에 따른 his<sup>+</sup> 복귀돌연변이수의 증감이 없는 것으로 보아 시료 자체에 의한 돌연변이원성은 존재하지 않았다.

B(a)P과 AFB<sub>1</sub>은 S9 mixture에 의해서 DNA와 반응성이 강한 물질로 변하여 돌연변이 활성을 나타내는 간접변이원으로 이들 변이원에 대한 향버섯 추출물 및 분획물의 돌연변이 억제효과를 검토하였다. 먼저 B(a)P에 대한 향버섯 추출물의 항돌연변이 효과는 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100균주에서 메탄올 추출물 10% 농도에서 80% 이상의 강한 저해효과를 나타내었고, 에틸아세테이트 분획물과 물 분획물에서도 76% 이상의 저해효과를 나타내었다(Table 1) 또한 AFB<sub>1</sub>에 대한 향버섯 추출물의 항돌연변이 효과는 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100균주에서 메탄올 추출물 10% 농도에서 90% 이상의 강한 저해효과를 나타내었고, 에틸아세테이트 분획물과 물 분획물에서도 87% 이상의 저해효과를 나타내었다(Table 2).

한편 세포내의 DNA에 직접적으로 손상을 주어 돌연변이를 유발하는 물질인 MNNG와 4-NQO에 대한 향버섯의 항돌연변이 효과를 살펴본 결과 *Salmonella typhimurium* TA100 균주에서 MNNG에 대한 향버섯의 항돌연변이 효과는 메탄올 추출물 5% 이상의 농도에서 90% 이상의 강한 저해효과를 나타내었고, 에틸아세테이트 분획물과 물 분획물에서도 5% 이상의 농도에서 80% 이상의 저해효과를 나타내었다(Table 3). 또한 4-NQO에 대한

Table 1. Antimutagenic effects of *Sarcodon aspratus* extract and fraction on the mutagenicity of benzo(a)pyrene in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 with S9 mixture

Treatment	Revertants/plate			
	TA98	Inhibition rate (%)	TA100	Inhibition rate (%)
Spontaneous	52.3 ± 2.8 <sup>1)(2)</sup>		130.0 ± 2.0 <sup>1)</sup>	
B(a)P	695.1 ± 1.4 <sup>a</sup>		799.7 ± 22.6 <sup>a</sup>	
B(a)P+MeOH ext.				
10 %	155.3 ± 5.7 <sup>c</sup>	84	264.0 ± 5.7 <sup>d</sup>	80
5 %	238.7 ± 11.3 <sup>d</sup>	71	304.2 ± 5.7 <sup>c</sup>	74
2.5 %	438.1 ± 2.8 <sup>b</sup>	40	545.1 ± 8.5 <sup>c</sup>	38
B(a)P+EtOAc fr.				
10 %	180.9 ± 1.4 <sup>e</sup>	80	291.3 ± 2.8 <sup>f</sup>	76
5 %	232.1 ± 5.7 <sup>d</sup>	72	337.3 ± 4.2 <sup>d</sup>	69
2.5 %	425.7 ± 8.5 <sup>b</sup>	42	665.0 ± 21.2 <sup>b</sup>	20
B(a)P+Water fr.				
10 %	174.7 ± 5.7 <sup>e</sup>	81	263.7 ± 0.7 <sup>e</sup>	80
5 %	258.1 ± 11.3 <sup>d</sup>	68	291.9 ± 11.3 <sup>f</sup>	76
2.5 %	316.3 ± 5.7 <sup>c</sup>	59	531.1 ± 8.5 <sup>c</sup>	40

<sup>1)</sup>The values are mean ± S.D. of 3 replications

<sup>2)</sup>Values with a common superscript letter within the same column are not significantly different (p<0.05)

Dose of B(a)P: Benzo(a)pyrene, 10 µg/plate.

Table 2. Antimutagenic effects of *Sarcodon aspratus* extract and fraction on the mutagenicity of aflatoxin B<sub>1</sub> in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 with S9 mixture

Treatment	Revertants/plate			
	TA98	Inhibition rate (%)	TA100	Inhibition rate (%)
Spontaneous	48.0 ± 4.3 <sup>1)(2)</sup>		116.2 ± 2.8 <sup>1)</sup>	
AFB <sub>1</sub>	946.7 ± 12.7 <sup>d</sup>		998.3 ± 12.7 <sup>d</sup>	
AFB <sub>1</sub> +MeOH ext.				
10 %	138.9 ± 4.2 <sup>b</sup>	90	178.0 ± 4.2 <sup>b</sup>	93
5 %	434.3 ± 5.7 <sup>c</sup>	57	398.0 ± 11.3 <sup>f</sup>	68
2.5 %	614.3 ± 8.5 <sup>d</sup>	37	566.7 ± 8.5 <sup>d</sup>	49
AFB <sub>1</sub> +EtOAc fr.				
10 %	165.0 ± 5.7 <sup>e</sup>	87	187.3 ± 9.9 <sup>h</sup>	92
5 %	389.3 ± 9.9 <sup>l</sup>	62	513.3 ± 5.7 <sup>c</sup>	35
2.5 %	896.1 ± 24.0 <sup>b</sup>	9	945.9 ± 12.7 <sup>b</sup>	6
AFB <sub>1</sub> +Water fr.				
10 %	146.9 ± 0.7 <sup>gh</sup>	89	231.9 ± 2.8 <sup>g</sup>	87
5 %	380.3 ± 15.6 <sup>f</sup>	63	416.2 ± 15.6 <sup>f</sup>	66
2.5 %	721.1 ± 8.5 <sup>c</sup>	25	910.7 ± 7.0 <sup>c</sup>	10

<sup>1)</sup>The values are mean ± S.D. of 3 replications

<sup>2)</sup>Values with a common superscript letter within the same column are not significantly different (p<0.05).

Dose of AFB<sub>1</sub>: aflatoxin B<sub>1</sub>, 0.5 µg/plate

항돌연변이 효과는 시료의 농도에 관계없이 40% 이하의 저해효과를 나타내었다(Table 4). 이는 짜리버섯 추출물과 분획물들이 직접 및 간접변이원에 대해서 유의성 있는 돌연변이 억제효과를 나타내었다는 보고(15)와 일치하였다. 이상의 결과로 보아 향미섯 추출물과 분획물들에서 나타난 항돌연변이 효과는 단일성분의 작용이 아니라 여러 성분들에 의한 복합작용에 의한 것으로 사료된다.

향미섯의 DNA Topoisomerase I 저해효과

향미섯의 DNA topoisomerase I에 대한 활성은 초나

선형 pBR322 DNA가 이완된 형태로 전환되는 것으로 결정하였고, 대조군으로는 DNA topoisomerase I의 작용을 억제하는 물질로서 사용되는 항암제로 camptothecin (CPT)을 사용하였다(16). Fig. 1에서와 같이 DNA topoisomerase I만을 처리하였을 경우에는 대부분의 초나선형 DNA가 nick을 형성시켜 이완된 형태로 전환되어 topoisomer들이 생성되었으며(lane 3), camptothecin을 처리한 경우에는 plasmid DNA의 topology 변환에는 아무런 영향을 주지 않았으며(lane 4) 또한 향미섯 메탄올 추출물(lane 5, 6) 및 분획물들(lane 7-10)은 camptothecin과 비

**Table 3. Antimutagenic effects of *Sarcodon aspratus* extract and fraction on the mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-nitroso-guanidine in *Salmonella typhimurium* TA100**

Treatment	Revertants/ plate	Inhibition rate (%)
Spontaneous	138.1 ± 6.2 <sup>1)2)</sup>	
MNNG	847.9 ± 11.8 <sup>a</sup>	
MNNG+MeOH ext.		
10 %	169.0 ± 10.8 <sup>h</sup>	95
5 %	189.7 ± 12.0 <sup>gh</sup>	92
2.5 %	210.3 ± 10.5 <sup>fr</sup>	89
MNNG+EtOAc fr.		
10 %	218.3 ± 25.2 <sup>ef</sup>	88
5 %	239.0 ± 10.1 <sup>cde</sup>	85
2.5 %	296.0 ± 11.3 <sup>b</sup>	77
MNNG+Water fr.		
10 %	210.1 ± 11.1 <sup>fr</sup>	89
5 %	225.9 ± 13.0 <sup>def</sup>	87
2.5 %	260.1 ± 12.5 <sup>c</sup>	82

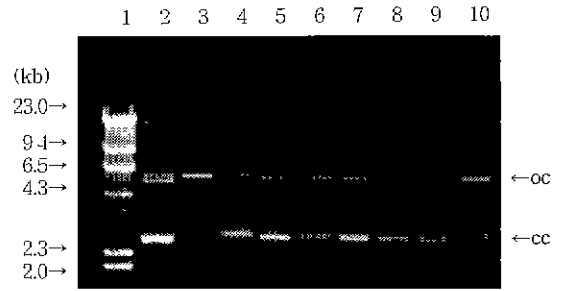
<sup>1)</sup>The values are mean ± S.D. of 3 replications.  
<sup>2)</sup>Values with a common superscript letter within the same column are not significantly different (p<0.05).  
 Dose of MNNG: N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine, 0.2 µg/plate.

**Table 4. Antimutagenic effects of *Sarcodon aspratus* extract and fraction on the mutagenicity of 4-nitroquinoline-1-oxide in *Salmonella typhimurium* TA100**

Treatment	Revertants/ plate	Inhibition rate (%)
Spontaneous	128.1 ± 2.0 <sup>1)2)</sup>	
4-NQO	1034.9 ± 25.5 <sup>a</sup>	
4-NQO+MeOH ext.		
10 %	671.3 ± 18.5 <sup>g</sup>	40
5 %	744.0 ± 9.5 <sup>e</sup>	32
2.5 %	816.0 ± 15.1 <sup>d</sup>	24
4-NQO+EtOAc fr.		
10 %	726.2 ± 15.4 <sup>ef</sup>	34
5 %	789.2 ± 8.5 <sup>d</sup>	27
2.5 %	916.3 ± 34.6 <sup>b</sup>	13
4-NQO+Water fr.		
10 %	807.7 ± 8.9 <sup>d</sup>	25
5 %	699.3 ± 14.8 <sup>fr</sup>	37
2.5 %	735.2 ± 16.1 <sup>c</sup>	33

<sup>1)</sup>The values are mean ± S.D. of 3 replications.  
<sup>2)</sup>Values with a common superscript letter within the same column are not significantly different (p<0.05).  
 Dose of 4-NQO: 4-nitroquinoline-1-oxide, 0.1 µg/plate

숫하게 DNA topoisomerase I의 작용을 억제하여 topoisomer들의 생성을 감소시켰다 그리고 메탄올 추출물과 에틸아세테이트분획물의 억제효과는 농도증가에 따른 변화가 크게 나타나지 않았으나 물 분획물의 경우는 농도가 증가함에 따라 억제효과가 다소 증가하는 경향을 보였다(lane 9, 10). 이것은 메탄올 추출물과 그 분획물들이



**Fig. 1. Inhibitory activity against DNA topoisomerase I.**  
 Lane 1 size marker  
 Lane 2 pBR322 DNA  
 Lane 3 pBR322 DNA+topo I  
 Lane 4 pBR322 DNA+topo I+camptothecin (50 µM)  
 Lane 5 pBR322 DNA+topo I+MeOH ext. (20 mg/mL)  
 Lane 6 pBR322 DNA+topo I+MeOH ext. (10 mg/mL)  
 Lane 7 pBR322 DNA+topo I+EtOAc ext. (20 mg/mL)  
 Lane 8 pBR322 DNA+topo I+EtOAc ext. (10 mg/mL)  
 Lane 9 pBR322 DNA+topo I+H<sub>2</sub>O ext. (20 mg/mL)  
 Lane 10 pBR322 DNA+topo I+H<sub>2</sub>O ext. (10 mg/mL)  
 The abbreviations oc and cc refer to open circular (nicked) and closed circular forms of duplex DNA, respectively

직접적으로 topoisomerase 작용 부위에 결합하여 DNA topoisomerase I 활성을 저해하였거나 DNA에 삽입함으로써 DNA 형태를 변화시킨 결과로 사료된다.

요 약

천연물로부터 항돌연변이 물질 및 항암물질 탐색의 일환으로 향버섯(*Sarcodon aspratus*)추출물 및 분획물의 항돌연변이 효과를 살펴본 결과, 직접변이원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine와 간접변이원인 Benzo-(a)pyrene, aflatoxin B<sub>1</sub>에 대하여 강한 돌연변이 억제효과를 나타내었다. 또한 항암물질 개발의 주요 표적으로 주목받고 있는 DNA topoisomerase I분석법을 이용하여 향버섯에 대한 활성 억제효과를 검토한 결과 향버섯 메탄올 추출물과 분획물 처리시 supercoiled form인 pBR322 DNA가 relaxed form으로 전환되지 않은 것으로 보아 향버섯 추출물과 분획물들에 의해 DNA topoisomerase I의 활성이 억제되었다

문 헌

- 1 Kimbll, R.F. : The development of ideas about the effect of DNA repair on the induction of gene mutation and chromosomal aberration by radiation and by chemicals *Mutation Research*, **186**, 1-6 (1987)
- 2 Gupta, M., Fujimori, A., Pommier, Y. : Eukaryotic DNA topoisomerase I. *Biochim Biophys Acta*, **1262**, 1-5 (1995)
- 3 Andoh, T., Ikeda, H. and Oguro, M. : Molecular biology of DNA topoisomerase and its application to chemotherapy

- py-Proceedings of the international symposium on DNA topoisomerases in chemotherapy Nagoya, Japan, November. CRC Press, Boca Raton, p.18-20 (1991)
4. Mori, K., Toyomasu, T., Nanba, H and Kuroda, H. · Antitumor activities of edible mushrooms by oral administration Proc. Int'l Sym Scientific and Technical Aspects of Cultivating Edible Fungi, p.1-6 (1986)
  5. Kim, B.K., Park, E.K and Shim, M.J. · Studies on the constituents of higher fungi of Korea (XXIII). Antineoplastic activities of *Coriolus versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* Arch. Pharm. Res, **2**, 145-149 (1979)
  6. Chung, K.S. : Studies on the constituents of the higher fungi of Korea ( II ) The antitumor components and culture of *Lentinus edodes*. Kor. J. Mycol., **10**, 33-40 (1982)
  7. Chihara, G., Hamuro, T., Maeda, Y. and Fukuoka, F. : Fractionation and purification of the polysaccharide with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes*. Cancer Res., **30**, 2776-2781 (1970)
  8. Kim, D.H., Bae, E.A., Jang, I.S and Han, M.J. · Anti-helicobacter pylori activity of mushrooms Arch. Pharm Res., **19**, 447-452 (1996)
  9. Eun, J.S, Yang, J.H., Cho, D.Y and Lee, T.K · Studies on higher fungi in Korea ( I ) Activity of proteolytic enzyme from *Sarcodon aspratus* (Berk) S Ito. J. Korean Pharmaceutical Sciences, **33**, 339-343 (1989)
  10. Lee, T.K : *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito : Studies on the primary structure of the alkaline protease in neungee (*Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito) 1. Amino acid composition, chemical modification and sequence of the N-terminal amino acid. J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr., **22**, 811-814 (1993)
  11. Park, W.H. · Studies on components of *Sarcodon aspratus* (I) Kor. J. Mycol, **11**, 85-91 (1983)
  12. Park, W.H : Studies on components of *Sarcodon aspratus* (II) Kor. J. Mycol, **11**, 159-165 (1983)
  13. Ames, B.N. and Maron, D.M. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test Mutat. Res, **113**, 173-215 (1983)
  14. Ray, S., Majumder, H.K., Chakravarty, A.K. and Mukhopadhyay, S. · Amarogentin, a naturally occurring secouridoid glycosides and a newly recognized inhibitor or topoisomerase I from *Leishmania donovani*. J. Nat. Prod., **59**, 27-29 (1996)
  15. Kim, H.J., Lee, I.S., Lee, K.R · Antimutagenic and anticancer effects of *Ramaria botrytis* (fr) rick extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., **28**, 1321-1325 (1999)
  16. Drlica, K and Franco, R.J. · Inhibitors of DNA topoisomerases. Biochemistry, **27**, 2253-2258 (1988)

(2000년 7월 27일 접수)