

Monascus purpureus P-57 변이주가 생산하는 홍국색소의 항산화효과

박치덕 · 정혁준 · 이항우¹ · 김현수 · 유대식*

계명대학교 미생물학과, ¹전통미생물자원 개발 및 산업화 연구센터

Monascus purpureus KCCM 60016으로부터 색소생성이 우수한 변이주 P-57이 생성한 홍국색소의 항산화 활성을 조사하였다. 홍국색소는 chloroform에 아주 잘 추출되며, 특히 hexane에서는 황색색소가 특이적으로 높게 추출되었다. DPPH radical 소거 효과는 hexane 분획, chloroform 분획, ethyl acetate 분획, butanol 분획, water 분획의 순으로 높게 나타났다. Xanthine oxidase 저해효과는 hexane 분획, chloroform 분획, ethyl acetate 분획의 순으로 높게 나타났으며, hexane 분획물의 경우 5 ppm에서 41.2%, 50 ppm에서 82.4%로 높은 저해율을 보였으며, 저해기작은 비경쟁적 저해였다.

Key words □ antioxidant activity, microbial pigment, monascus pigment, *Monascus purpureus*, xanthine oxidase inhibition

*Monascus*속은 진정균문(Eumycota)중의 자낭균아문(Ascomycotina), 부정자낭균강(Plectomycetes), 완전자낭균목(Eurotiales), Monascaceae 과에 속하는 사상균으로서 *Monascus*속 균주는 적색, 오렌지색, 황색 등 10여가지 이상의 색소 혼합물을 생성하며, 이를 polyketide pigment라 하기도 한다(12, 18).

지금까지 구조가 밝혀진 monascus색소는 적색색소인 rubropunctatin, monascorubrin, 오렌지색색소인 rubropunctamine, monascorubramine 그리고 황색색소인 monascin, ankaflavin이 있다(16, 19).

홍국은 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 등 동아시아권 국가에서 홍주, 홍색두부 등 전통발효 식품에 많이 이용되어 왔다. 그리고 현재 일본에서는 인체에 무해한 천연색소로서 각종 식품의 착색제로 널리 사용되고 있다. 1992년 통계에 따르면 연간 약 600 ton 정도가 소비되고 있으며 그 사용량이 서서히 증가되고 있다(12).

홍국색소는 최근에 동물실험을 통하여 안정성이 확인되었으며(11), 약리적인 특성에 대한 연구가 수행되고 있다. 특히 cholesterol 합성 저해제인 monacolin K의 생산과 생리적 효과가 입증되면서 이 부분에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

활성산소(reactive oxygen species)는 세포막이나 지질의 과산화로 세포 상해를 유발하며, 활성산소에 의해 여러 종류의 암과 심장 질환이 야기되고, 노화의 원인이 되기도 한다(3). 이러한 활성산소는 hydrogen peroxide (H₂O₂), superoxide anion (O₂⁻), hydroxyl radical (OH·)과 singlet oxygen (¹O₂) 등이 있다(6, 7). 특히, 생체 내에는 활성산소를 해독하기 위한 항산화 방어계가 존재하는데, glutathione, selenium, vitamin E, tocopherol과

rivoflavin 등의 항산화 물질과 ceruloplasmin, transferrin, ferrin, lactoferrin과 metallothionein 등의 항산화력을 가지는 철청 단백질, 그리고 superoxide dismutase, catalase와 glutathione peroxidase등의 항산화 효소 등은 세포내 여러 구획에서 특이적으로 작용하여 활성산소 해독에 관여하는 것으로 알려져 있다(9, 14).

홍국색소의 기능성에 대한 연구는 색소의 항균 및 항진균 효과와 면역 억제효과 등이 규명된 바 있으나, 항산화 활성에 대한 연구는 미흡한 실정이다(10). 최근에 홍국의 수용성 추출물을 이용하여 홍국색소의 항산화 활성에 관한 연구를 수행한 바 있으나(1, 2), 홍국색소는 대부분이 지용성으로 수용성 추출물을 얻는 데는 한계가 있다.

본 연구에서는 *Monascus purpureus* KCCM 60016의 변이주 P-57이 생성하는 홍국색소를 유기용매로 추출하고 각 추출분획물을 대상으로 항산화 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용기기 및 시약

본 실험에 사용한 배지는 potato dextrose agar (PDA, Difco) 배지를 구입 사용했다. 그리고 사용된 시약으로 butylated hydroxytoluene (BHT), 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH), trichloro-acetate (TCA), xanthine, xanthine oxidase, uric acid 등은 Sigma Co. (USA) 제품을 사용하였다. 그리고 홍국색소를 용매분획법으로 추출하기 위하여 사용한 methanol, hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 등의 용매는 J. T. Baker (USA) 제품을 사용하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 053-580-5252, Fax: 053-580-5164
E-mail: tsyu@kmu.ac.kr

공시균주

공시균주는 *Monascus purpureus* KCCM 60016으로부터 UV조사를 통해 얻은 홍국의 제조가 가능하고 색소생산이 우수한 P-57 변이주(15)를 선발, 사용하였다.

기본배지

공시균주의 배양을 위하여 PDA배지(20% Potatoes, infusion from, 2% glucose, 1.5% agar, pH 5.6±0.2)를 사용했으며, 고체 배양을 위한 백미는 시중에서 구입한 안계미를 사용하였다.

포자현탁액 조제

포자현탁액의 조제는 공시균주를 PDA배지의 시험관에 1백금이 접종하여 28°C에서 사면 배양하여 포자를 충분히 형성시킨 후, 멸균된 0.1% Tween 80 용액 5ml를 넣어 멸균된 백금으로 서서히 교반시켜 균사로부터 포자를 분리시켰다. 같은 방법으로 2회 포자를 분리시킨 후, 약간의 균사가 함유된 포자 현탁액을 격렬하게 진탕시켜 균사와 포자를 완전히 유리시켰다. 이 현탁액을 멸균된 탈지면으로 여과하여 균사를 제거했다. 이 포자 현탁액을 10000×g에서 15분간 원심분리하여 포자를 침전시킨 다음, 침전된 포자를 멸균수로 세척하여 20% glycerol 용액으로 포자수가 2×10^6 spores/ml되게 포자현탁액을 조제했다. 포자 현탁액은 -70°C에서 보관하면서 사용했다.

고체배양

백미를 이용하여 홍국을 제조하기 위해 먼저 250 ml 삼각 플라스크에 깨끗하게 씻은 백미 50 g을 넣어 수돗물에 하룻밤 침지시킨 후, 수분을 제거하고, 121°C에서 15분간 멸균하여 전분을 호화시켰다. 증자한 백미에 포자현탁액 3 ml를 접종하여 항온 항습기(두리과학, DF-964HC-M)에서 30°C, 90%의 배양습도를 유지하면서 15일간 배양하였다(14).

색소의 용매 분획

건조된 홍국을 mixer를 이용하여 분말로 만든 후, 홍국 분말 100 g을 2 L삼각플라스크에 넣고, 80% methanol 1 L를 가하여 6시간 진탕 추출하고 여과지(Toyo No.2)로 여과한 후 60°C에서 rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan)로 농축하였다. 총 4회 반복하여 methanol 추출물을 얻고, methanol 추출물을 증류수에 현탁시킨 후, 분획 깔대기에 용매와 1:1의 비율로 혼합하여 5시간 추출하였다. 용매 분획은 육안으로 용매층에 색소가 추출되지 않을 때까지 수 회 반복하여 추출하였으며, 회수한 용매층은 용매가 완전히 제거 될 때까지 농축하여 시료로 사용하였다. 용매 분획은 극성이 낮은 hexane부터 chloroform, ethyl acetate, butanol 순서로 순차적으로 실시하였다.

DPPH radical 소거효과

DPPH는 안정한 상태에서 자색을 띠지만 환원되어 라디칼이 소거되면 자체의 정색성을 상실하게 되므로 이를 이용하여 517 nm에서 흡광도의 감소 정도를 측정함으로써 free radical 소거

효과를 측정할 수가 있다. DPPH radical 소거 효과는 Blois(4)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 각기 다른 농도의 시료 100 µl에 methanol에 녹인 DPPH 용액(1.5×10^{-4} M) 900 µl를 첨가하여 5분간 반응시킨 후의 흡광도의 감소 정도를 산출하여 free radical 소거 효과를 측정하였다.

Xanthine oxidase활성 저해

Xanthine oxidase(E.C 1.2.3.2)는 생체 내 purine 대사에 관여하는 효소로 기질인 xanthine 혹은 hypoxanthine과 반응하여 uric acid를 생성하며 반응의 중간산물로 superoxide(O₂⁻)와 hydrogen peroxide (H₂O₂)를 생성하는 효소이다(8, 17). 따라서 xanthine oxidase의 저해 활성은 반응결과 생성되는 uric acid의 양을 비교하여 나타내었다. 실험구의 경우는 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 xanthine oxidase (Sigma Co. X-1875)를 0.025 unit/ml가 되도록 희석하여, 이 효소액 990 µl에 각각 5, 50, 100 ppm으로 농도를 조정된 methanol에 녹인 시료 10 µl를 첨가하여 실온에서 15분간 preincubation시키고, 기질인 0.5 mM xanthine을 100 µl 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시켰다. 반응 후 20% TCA 1 ml를 첨가하여 효소 반응을 종료시키고, 반응액을 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 292 nm에서 흡광도를 측정하여 표준검량선에 따라 생성 uric acid의 양을 측정하였다. 시료를 methanol에 용해시켜 효소와 반응시키기 때문에 시료를 고농도로 제조하여 첨가되는 methanol의 양을 효소에 큰 영향을 주지 않는 범위인 1%로 하였다(5). 시료의 특성상 시료 자체가 가지는 색도가 흡광도에 영향을 주는 것을 배제시키기 위해서 대조구는 효소액과 시료를 혼합하고 preincubation시킨 후, 20% TCA를 첨가하고 곧바로 기질 100 µl를 첨가하여 효소반응이 일어나지 않게 하였다. 각각의 시료에 대해 대조구를 함께 측정하여 실험구와 대조구의 흡광도 차이를 비교하여 생성 uric acid의 양을 측정하였다. 그리고 시료를 첨가하지 않은 공시험은 시료대신 methanol 10 µl를 첨가하여 생성 uric acid의 양을 측정하였고, 효소의 저해활성은 공시험에서 생성된 uric acid의 양과 각 시료 첨가에 따른 uric acid의 생성량을 비교하여 백분율로 나타내었다.

결과 및 고찰

분획물의 추출 수율

용매에 따른 홍국의 분획물을 제조한 결과, 각 분획물의 추출 수율은 Table 1에 나타낸 바와 같이 물 분획물에서 가장 높은 추출율을 나타내었고, ethyl acetate에서는 추출율이 0.65 g으로 아주 낮게 나타났다. 이는 기질에 존재하는 당류들의 대부분이 물 분획물에서 추출되었기 때문인 것으로 보인다. 그리고 색소 성분들은 hexane과 chloroform 분획물에서 대부분 추출되는 것을 육안으로도 확인할 수 있었는데, 이는 홍국색소가 지용성이기 때문에 비극성 용매인 hexane과 chloroform에 쉽게 추출된 것으로 생각된다.

Table 1. Yield of red rice koji in organic solvent extracts

Solvent fractions	Total methanol extraction	Hexane fraction	Chloroform fraction	Ethyl acetate fraction	Butanol fraction	Water fraction
Yield (g)	32	2.1	6.92	0.65	7.03	11.89

분획물의 TLC pattern 및 UV-Vis spectrum

홍국을 용매 분획 한 결과, 대부분의 색소가 hexane과 chloroform에서 추출됨을 알 수 있었다. 이는 기존에 알려진 것처럼 홍국색소가 지용성이므로 당연한 결과로 보이며, butanol과 물 분획물은 용매를 완전히 제거 한 후에도 점성이 아주 높게 나타난 것으로 보아 기질에 존재하는 각 종 당류들이 추출된 것으로 보인다.

전개 용매로 chloroform:methanol:acetic acid = 28.7:2.4:1을 사용하여 각 분획물의 TLC pattern을 확인해 본 결과 Fig. 1에 나타난 바와 같이 hexane 분획물에서는 특이적으로 황색색소가 많이 추출되었고, 나머지 대부분의 색소는 chloroform에서 추출되었다. 그리고 butanol과 물 분획물에는 색소가 거의 추출되지 않았음을 확인할 수 있었다. 이 결과로 홍국색소가 chloroform에 잘 용해된다는 사실을 알 수 있었다.

그리고 각 분획물의 UV-Vis spectrum을 확인한 결과, Fig. 2와 같이 total methanol 추출물과 chloroform 분획물은 유사한 흡수대를 나타내었고, hexane 분획물은 황색색소의 최대 흡수과장인 400 nm에서 흡수 최대치를 나타내는 것을 확인하였다. 이 결과로 hexane 분획물에서는 황색색소가 대부분 추출되었고, chloroform에서는 적색, 오렌지색, 황색색소의 대부분이 추출되었다는 것을 다시 한 번 확인할 수 있었다.

DPPH radical 소거효과

DPPH radical 소거 효과의 측정은 각 분획물의 농도를 total reaction mixture인 1 ml를 기준으로 5, 25, 50, 75, 100 ppm으로 조정하여 측정하였다. 용매 분획물 자체의 색도가 활성측정에

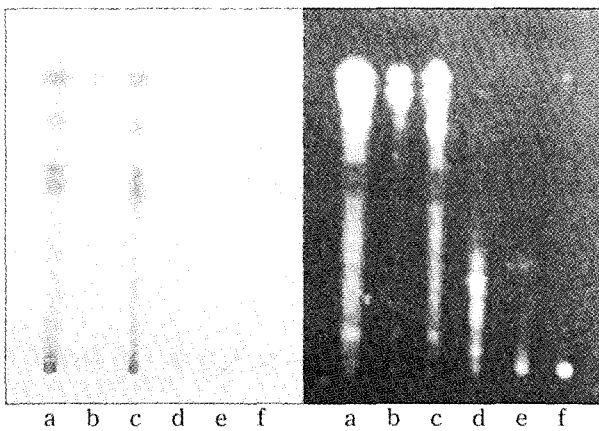


Fig. 1. The TLC pattern of the solvent fractions. Left : naked eye, Right : UV at 254 nm, a : Total Methanol extraction, b : Hexane fraction, c : Chloroform fraction, d : Ethyl acetate fraction, e : Butanol fr., f : Water fr.

주는 영향을 배제하기 위하여 시료 100 µl에 DPPH 용액 900 µl를 첨가함과 동시에 흡광도를 측정하고, 이로부터 반응 5분 후에 측정된 흡광도 값을 감하여 517 nm에서의 흡광도 감소정도를 산출하여 DPPH radical 소거능을 확인하였다.

합성 항산화제인 BHT를 시료와 같은 농도로 하여 각 시료들과 비교한 결과 Fig. 3에 나타난 것과 같이 methanol 추출물과 chloroform 분획물은 BHT와 유사한 경향을 나타내었고, hexane 분획물은 BHT보다 흡광도의 감소폭이 크게 나타났다. 따라서 hexane 분획물이 가장 강한 DPPH radical 소거능을 나타내었으며, 이는 BHT보다 우수하였다.

대부분의 색소가 추출된 hexane과 chloroform 분획물에서 DPPH radical 소거능이 높게 나타난 것으로 볼 때 홍국색소가 우수한 free radical 소거능을 지니는 것으로 사료된다.

Xanthine oxidase 저해활성

홍국의 각 분획물 농도를 5, 50, 100 ppm으로 하여 xanthine oxidase저해 효과를 확인 한 결과, hexane 분획물과 chloroform 분획물에서 시료의 농도가 증가할수록 생성 uric acid가 현저하게 감소되는 것으로 나타났다.

Hexane 분획물에서 시료의 농도가 5 ppm일 때 41.2%, 50 ppm일 때 82.4%로 가장 높은 저해효과를 나타내었으며, chloroform 분획물 역시 5 ppm에서 23.5%, 50 ppm에서 77.6%로 비교적

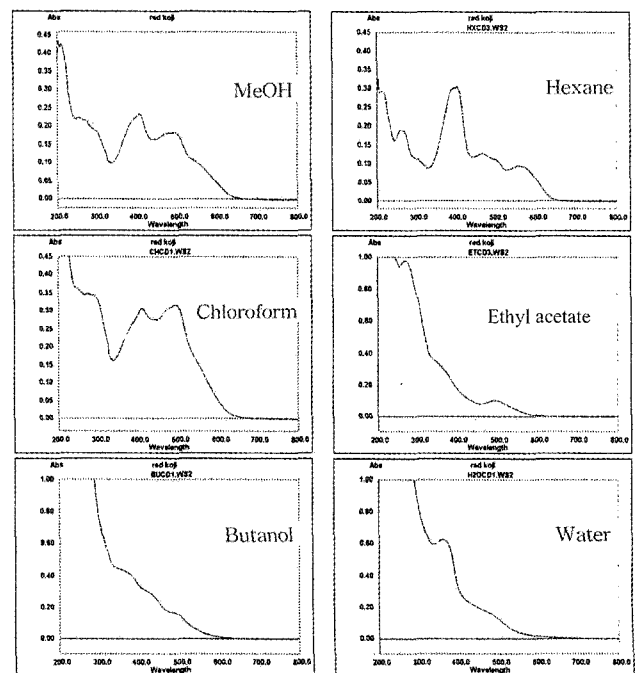


Fig. 2. UV-Vis absorption spectra of red rice koji extracts.

Table 2. Xanthine oxidase inhibitory activity of the organic solvent extracts of red rice koji produced by P-57 mutant

Sample	Concentration (µg/ml)	Uric acid (µmole)	Inhibition (%)
Methanol	0	17.0	0
	5	13.5	20.6
	50	4.9	71.2
	100	3.0	82.4
Hexane	0	17.0	0
	5	10.0	41.2
	50	3.0	82.4
	100	2.5	85.3
Chloroform	0	17.0	0
	5	13.0	23.5
	50	3.8	77.6
	100	2.7	84.1
Ethyl acetate	0	17.0	0
	5	14.8	12.9
	50	14.8	12.9
	100	12.6	25.9
Butanol	0	17.0	0
	5	17.0	0
	50	16.5	3
	100	16.5	3
Water	0	19.5	0
	5	19.5	0
	50	19.5	0
	100	19.5	0

높은 저해율을 나타내었다. 그리고 색소의 추출이 극히 저조한 ethyl acetate 분획물에서는 100 ppm에서 29.6%의 저해율을 나타내었고, butanol과 물 분획물에서는 100 ppm에서도 uric acid의 양이 감소하지 않는 것으로 나타났다(Table 2).

Hexane 분획물이 가장 높은 저해율을 나타낸 것은 홍국색소

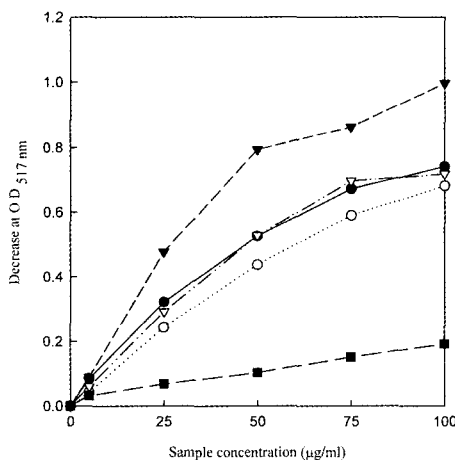


Fig. 3. Electron donating ability of the red rice koji extracts. Symbols : ●, BHT; ○, methanol extract; ▼, hexane fraction; ▽, chloroform fraction; ■, ethyl acetate fraction.

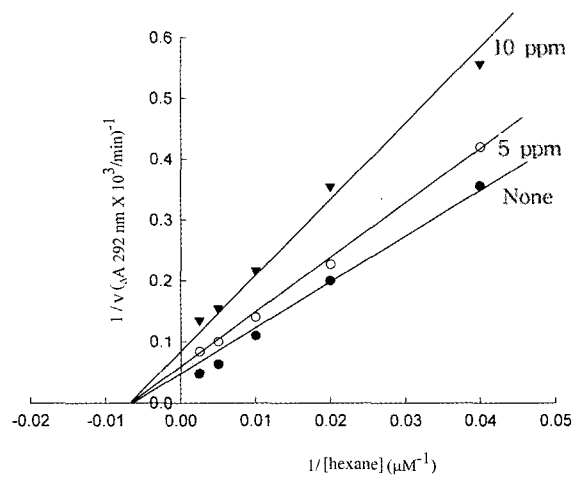


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot of xanthine oxidase in the presence of hexane fraction.

중 황색색소가 xanthine oxidase활성의 저해작용이 우수하기 때문으로 해석되었다. 그리고 전체 색소가 hexane과 chloroform에 대부분 추출되었고, xanthine oxidase활성의 저해 역시 hexane과 chloroform 분획물에 집중되어 있는 것으로 보아 홍국색소 성분에 의해 효소가 저해되는 것으로 생각되며 이는 홍국의 hexane 및 chloroform 분획물이 xanthine oxidase활성을 억제시킴으로서 O₂ 생성 억제 효과가 있을 것으로 생각된다.

DPPH radical 소거효과와 xanthine oxidase 저해율을 알아본 결과, 두 경우 모두에서 황색색소가 대부분 추출된 hexane 분획물에서 가장 우수한 활성을 나타냈으며, chloroform에서도 비교적 높은 활성을 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때 홍국색소가 비교적 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 생각되며 홍국색소 중 특히 황색색소가 우수한 항산화 활성을 갖는 것으로 추측된다. 황색색소는 ankaflavin과 monascin으로 구분되는데 어느 물질이 주요한 작용을 하는가에 대해서는 좀 더 깊은 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

Xanthine oxidase 저해 기작

홍국색소의 xanthine oxidase활성에 대한 저해 기작을 알아보기 위해 가장 높은 저해율을 나타낸 hexane 분획물을 이용하여 저해 기작을 살펴보았다. 효소의 양은 일정하게 하고 기질의 농도를 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 mM로 달리하여 Lineweaver-burk plot (13)을 작성한 결과 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 K_m값은 변화가 없었으며, 저해제로 작용하는 hexane 분획물의 농도가 증가할수록 V_{max}가 감소되는 것으로 보아 홍국의 hexane 분획물은 비경쟁적으로 효소를 저해한다는 것을 확인 할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부의 지역혁신 인력양성사업과 과학기술부, 한국과학재단 지정 계명대학교 전통미생물자원 개발 및 산업화 연구센터의 지원에 의한 연구 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Aniya, Y., I.I. Othani, T. Higa, C. Miyagi, H. Gibo, M. Shimabukuro, H. Nakanishi, and J. Taira. 2000. Dimerumic acid as an antioxidant of the mold *Monascus anka*. *Free Radical Biol. Med.* 28, 999-1004.
- Aniya, Y., T. Yokomakura, M. Yonamine, K. Shimada, T. Nagamine, M. Shimabukuro, and H. Gibo. 1999. Screening of antioxidant action of various molds and protection of *Monascus anka* against experimentally induced liver injuries of rats. *General Pharmacology* 32, 225-231.
- Aruoma, O. I., J.P.E. Spencer, D. Warren, P. Jenner, J. Butler, and B. Halliwell. 1997. Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. *Food Chem.* 60, 149-156.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 181, 1199-1202.
- Choi, C.W., S.C. Kim, S.S. Hwang, B.K. Choi, H.J. Ahn, M.Y. Lee, S.H. Park, and S. K. Kim. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science.* 163, 1161-1168.
- Gao, R., Z. Yuan, Z. Zhao, and X. Gao. 1998. Mechanism of pyrrolol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 45, 41-45.
- Groussard, C., I. Morel, M. Chevanne, M. Monnier, J. Cillard, and A. Delamarche. 2000. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion : An in vitro study. *J. Appl. Physiol.* 89, 169-175.
- Hodges, G.R., M.J. Young, T. Paul, and K.U. Ingold. 2000. How should xanthine oxidase-generated superoxide yields be measured. *Free Radical Biol. Med.* 29, 434-441.
- Jeon, S.M., S.H. Bok, M.K. Jang, M.K. Lee, K.T. Nam, Y.B. Park, S.J. Rhee, and M.S. Choi. 2001. Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits. *Life Sciences.* 69, 2855-2866.
- Jázlová, P., L. Martínková, and V. Křen. 1996. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. *J. Ind. Microbiol.* 16, 163-168.
- Kim, S.Y., and J.K. Kim. 1990. Pigment production in *Monascus anka*. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 3, 239-246.
- Lee, Y. K., D.C. Chen, S. Chauvatcharin, T. Seki, and T. Yoshida. 1995. Production of *Monascus* pigments by a solid-liquid state culture method. *J. Ferment. Bio.* 79, 516-518.
- Lineweaver, H. and D. Burk. 1934 The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56, 658-666.
- Moon, S.H., M.K. Lee, and K.S. Chae. 2001. Inhibitory effects of the solvent fractions from persimmon leaves on xanthine oxidase activity. *Kor. J. Food and Nutr.* 14, 120-125.
- Park, C.D., H.J. Jung, and T.S. Yu. 2005. Isolation of pigment overproducing mutant from *Monascus purpureus* and optimization of pigment production. *Kor. J. Microbiol.* 41, - .
- Park, H.E., C.H. Kim, and K.H. Min. 1991. Isolation of pigment-producing mutants from *Monascus* sp. KS2 and optimization of cultural conditions. *Kor. J. Mycol.* 19, 120-127.
- Ra, K.S., S.H. Chung, H.J. Suh, J.Y. Son, and H.K. Lee. 1998. Inhibitor of xanthine oxidase from onion skin. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 30, 697-701.
- Yu, T.S. 1999. Hong-ju and pigments produced by filamentous fungus *Monascus*. *J. Inst. Nat. Sci. Keimyung University.* 18, 87-92.
- Yuan, C.S. 1983. Fermentative production of anka-pigments. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bieng.* 11, 325-337.

(Received January 28, 2005/Accepted March 17, 2005)

ABSTRACT: Antioxidant Activity of Monascus Pigment of *Monascus purpureus* P-57 Mutant
Chi Duck Park, Hyuck Jun Jung, Hang Woo Lee¹, Hyun Soo Kim, and Tae Shick Yu*
 (Department of Microbiology, Keimyung University, Taegu, 701-704 Korea, ¹Traditional Micro-organism Resources Center, Keimyung University, Taegu, 701-704 Korea)

Antioxidant activity of monascus pigment of *Monascus purpureus* P-57 mutant was studied. Methanol extract from monascus pigment was separated into five organic solvent fractions; hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol and water fractions. Hexane fraction showed the highest free radical scavenging effect on 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH), and the strongest inhibitory effect against xanthine oxidase, followed by chloroform fraction. But butanol and water fraction did not show inhibitory effect against the enzyme. Lineweaver-Burk plot showed that hexane fraction inhibited xanthine oxidase by non-competitive mode.