

초임계 이산화탄소와 보조용매를 이용한 주목 앞에서의 Taxol과 Baccatin III의 추출

신혜원·전문균·†이훈
한국과학기술원 화학공학과

Extraction of Taxol and Baccatin III from Needles of *Taxus Cuspidata* by Using Supercritical Carbon Dioxide with Cosolvents

Hye-Won Shin, Moon-Kyoon Chun, and Huen Lee[†]

Department of Chemical Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, 373-1,
Kusung-dong, Yuseong-gu, Taejeon 305-701, Korea

ABSTRACT

The extraction of taxol and baccatin III from the ground needles of *Taxus cuspidata* were carried out by using supercritical carbon dioxide with and without cosolvents such as ethylacetate and methanol at 300 bar and 313K. Taxol is a promising anticancer agent and baccatin III is a precursor of semisynthesis of taxol. The taxol and baccatin III contents in the extracts were determined by a HPLC. The highest yields of taxol and baccatin III could be obtained by the supercritical extraction with 3wt% methanol and ethylacetate, respectively, as cosolvents. It was also found that the selectivities of taxol and baccatin III were 0.117 and 1.245wt%, respectively, with 0.7wt% ethylacetate, which demonstrated that the selectivities of taxol and baccatin III were increased about 1.8 and 19 times than those of conventional organic solvent extraction.

서 론

Taxol은 20개 이상의 비대칭 중심을 가지고 있는
극히 복잡한 diterpene분자로서 백혈병과 고형암 치
료에 상당한 효능을 보이는 taxane고리를 가진 최
초의 화합물이다. Taxol은 1971년 미국 북서부
에서 식하는 태평양주목(*Taxus brevifolia*)의 껍질로
부터 처음으로 분리되었으며(1), 그 이후로 *Taxus*
종의 다른 나무들로부터도 분리되어졌다고 보고되어
왔다(2,3). 기존의 항암제인 colchicine과 vinca

alkaloid가 비이상적으로 급속하게 성장하는 미세관
을 분해하여 항암작용을 하는 것과는 달리 taxol은
불안정한 미세관의 합성을 유도하여 극히 안정되어
진 암세포의 기능이 전혀 없는 미세관을 형성하여
항암작용을 하게된다(4). 현재 미국의 NCI (Na-
tional Cancer Institute)의 임상 실험 결과를 보면
탁솔은 난소암 30%, 유방암 50%, 폐암 20% 정도
의 치유율을 보이고 있다고 발표되었다(5,6).

현재 taxol을 생산하는 방법은 baccatin III 등의
전구체로부터 반합성 및 화학적 전환성법과 식물체
포배양과 같은 생물학적 방법이 있고 탁솔의 공급원
으로 나무껍질 대신 잎이나 가지를 이용하여 추출하

† Corresponding Author

는 방법 등이 있다. 현재까지 taxol을 분리하기 위하여 대부분 유기용매 추출법을 이용하고 있다. 그러나, 유기용매 추출법은 일반적으로 공정이 매우 복잡하고 특정 성분의 선택성이 상당히 떨어질 뿐 아니라 잔존용매의 처리도 문제점으로 지적되고 있다. 최근 taxol의 전합성에 성공한 사례가 발표되었지만 거의 삼십단계 정도의 반응과정을 거쳐야 하는 복잡성으로 수율 및 선택성이 크게 저하되어 공정상 경제성이 없다(7). 이런 이유로 새로운 효과적인 추출 기술의 개발이 시급히 요구되고 있다. 최근 관심을 끌고 있는 초임계유체 분리기술이 천연식물로부터 유효성분의 추출에 효과적이라고 알려져 있다. 초임계유체 추출법이 효과적인 이유는 초임계유체의 점도가 기체와 비슷하게 낮아 추출체 내부로 쉽게 침투해 유효성분을 빠르게 추출할 수 있으며, 밀도는 액체와 비슷하여 용해력이 크다는 것이다. 또한 초임계유체로 임계온도와 임계압력이 비교적 낮은 이산화탄소를 사용할 경우 인체에 무해하며, 안정된 구조이기 때문에 인화성이 없어 누출되어도 폭발의 위험성이 없다. 이러한 장점을 이용하여 달맞이꽃 씨로부터 유지추출, 콩으로부터 유지추출, 커피 원두로부터 카페인추출, canola로부터 유지추출 등, 천연식물로부터 유효성분의 추출에 널리 이용되고 있다(8). Jennings 등(9)이 태평양주목의 껍질에서 초임계 이산화탄소를 이용하여 taxol을 추출하였지만 나무껍질 이외의 새로운 재생가능한 원료로서 주목의 잎을 이용한 taxol과 관련물질의 추출은 아직 널리 연구되지 못하고 있다.

본 연구에서는 주목의 잎으로부터 초임계 이산화탄소에 농도가 다른 여러 가지 보조용매를 함께 사용하여 taxol과 반합성의 주재료로 사용되는 baccatin III 등의 관련물질의 추출에 관한 실험을 하였다. Chun 등이 수행한 연구에서 보면 여러 실험 조건 중에서 300bar, 313K의 압력, 온도 조건에서 초임계이산화탄소와 보조용매로 에탄올을 사용했을 때 선택성과 추출수율면에서 가장 좋은 실험결과를 얻었다(10). 따라서 본 실험에서는 300bar, 313K의 실험조건에서 에틸아세테이트와 메탄올을 보조용매로 사용하였을 때 탁솔과 바카틴 III의 추출성능에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 탁솔은 물에는 불용이지만 메탄올, 에탄올, 벤젠, 클로로포름 등에 잘 녹기 때문에 분자량이 853.9로 상대적으로 크지만 보조용매가 첨가된 초임계 이산화탄소에 충분히 용해되어 추출될 것으로 기대되었다. 추출물에 대한 정량분석은 HPLC를 이용하였다. 본 연구에서는 n-

hexane 용액을 이용하여 잎에서 비극성 물질을 제거하는 전처리 과정을 거친 시료와 그렇지 않은 시료에 대한 초임계유체 추출실험의 결과를 비교하였다.

재료 및 방법

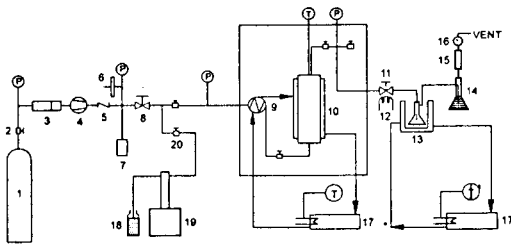
유기용매 추출

유기용매를 이용한 추출실험은 시료에 원래 들어 있는 taxol과 baccatin III의 양을 알기위해 수행하며 이 때 시료는 주목의 잎을 수확하여 그늘에서 건조시켜서 볼밀(Ball-Mill)에 넣고 같이 분말로 만들어 사용하였다. 위와 같이 준비된 시료를 메틸렌 클로라이드와 메탄올을 1:1의 부피비로 섞은 용액을 이용하여 3시간동안 313K로 유지되는 음과중탕기 안에 넣고 3회 추출을 한다. 3회에 걸쳐 추출된 추출용액을 모아서 여과시킨 후 무게를 측정된 둥근 플라스크에 넣어 저압의 회전식 증발기를 이용해 용매를 증발시킨다. 증발시키고 난 뒤 플라스크 무게를 측정하여 빈 플라스크와의 무게 차를 구하여 전체추출무게를 계산하였다. 증발되고 남은 부분을 1:1의 부피비로 된 메틸렌 클로라이드와 물에서 3회에 걸쳐 분배시킨 후 메틸렌 클로라이드상을 받아서 15,000rpm, 298K에서 2회 원심분리한다. 다시 회전식 증발기로 용매를 날려보내고 메탄올에 녹여서 TLC(Thin Layer Chromatography)를 한 후 HPLC로 분석한다.

초임계유체 추출

본 실험에서는 한국과학기술원 내에 자생하는 주목(*Taxus cuspidata*)의 잎을 수확하여 그늘에서 건조시켜서 볼밀(Ball-Mill)에 넣고 같이 분말이 된 시료를 사용하였는데 초임계 유체와 시료 입자 간의 물질 전달 효과를 높이기 위해 입자 크기는 300 μ m 이하로 하였다. 사용한 이산화탄소의 순도는 99.99%이고 보조용매로는 각각 MERCK의 순도 99.8% HPLC용 에틸아세테이트와 메탄올을 사용하였다.

본 실험에 사용된 실험장치는 연속흐름식 추출장치로 Fig. 1에 나타내었다. 본 실험은 24시간 정도 연속공정식으로 행하였으며 이산화탄소의 유속은 표준상태에서 0.5 μ l/min 정도로 가스 실린더(gas cylinder)에서 다이아프램형 가압기(diaphragm-type compressor, NOVA model 554-2121)를 통해 공급된다. 이 정도의 이산화탄소 유속으로 공급하면 추출조내는 항상 평형상태를 유지하게 된다. 이 때 이산화탄소의 누출방지를 위하여 실린더간의 금속



1. Carbon dioxide cylinder 2. High pressure valve 3. Filter 4. Compressor
5. Check valve 6. Rupture disk 7. Damper 8. Regulator 9. Preheater
10. Extractor 11. Sampling valve 12. Heater 13. Collector 14. Removal
15. Rotameter 16. Wet test meter 17. Constant temp. circulator
18. Cosolvent reservoir 19. Micropump 20. Cosolvent injection valve

Fig. 1. Schematic diagram of supercritical extraction system used in this experiment.

부분간 접촉면은 테플론을 이용하여 봉했으며 실린더와 실험장치의 연결은 탄력성 있는 연결 호스 (NOVA model 510.3174-2)를 사용하였고 이산화탄소 중 포함될 수 있는 불순물을 제거하기 위하여 도입부에 여과기(line filter, NOVA model 520.5332-1)을 설치하였다. 이산화탄소를 가압하는 압축기의 작동은 압력계의 최대압력점과 최소압력점을 설정하여 이 값들 사이에서 수행된다. 이 압축기에 달린 조절부위의 고장으로 인한 위험성은 파열판(Rupture disc, NOVA model 521.9542)으로 보완되며 추출기로부터 이산화탄소의 역류로 인한 위험성은 체크 밸브(Check valve, NOVA model 520.3333)로 보완된다. 실제로 압축기에 달린 압력계를 가지고 추출조의 압력을 조절 할 수 없으므로 이산화탄소 가압부에서 추출조간의 압력조정기(Pressure regulator, Tescom model 26-1700)를 설치하였으며 이 압력조정기는 20~700bar 범위에서 조절이 가능하다. 보조용매는 보조용매 공급용 밸브를 열어서 공급하는데(8-9) 일정 유속으로 보내기 위해 LC-500 micro flow syringe pump(ISCO model 1240-018)을 사용하였다. 에틸아세테이트와 메탄올을 각각 전체 실험시간동안 흐른 이산화탄소 총량의 0.7wt%와 3wt%의 농도(에틸아세테이트에 대해서는 각각 6 μ l/min와 25 μ l/min에 해당되며 메탄올에 대해서는 각각 6.89 μ l/min와 31.7 μ l/min에 해당됨)로 보내는 실험을 300bar와 313K에서 수행하였다. 시료는 5g씩 정량하여 고체시료용 추출조에 직경 0.3cm의 유리구슬과 번갈아 넣었으며 추출조 상하에 금속 여과기(Metal filter)를 설치하여 시료로

부터 유효성분의 분리를 효과적으로 할 수 있도록 하였다. 추출조로부터 나온 고압의 이산화탄소가 분리기로 들어갈 때 단열 팽창에 의한 Joule-Thomson 효과로 추출물이 냉각되면서 밸브가 막힐 위험이 있으므로 이것을 방지하기 위해 추출조 출구의 밸브 부분에 보온 장치를 달았다. 분리기에는 메탄올을 넣어서 이산화탄소와 분리되어지는 추출물을 녹여내고 실험이 끝난 후에 분리기에 포집된 추출물을 무게를 알고있는 등근 플라스크에 모아 저압의 회전식 증발기로 용매를 날려 보낸 후 전체추출무게를 측정하여 실제로 추출된 양을 구하였다. 실제 추출에 관여한 이산화탄소의 양은 유량계(Wet test meter)로 측정하며 배출관을 통해 대기로 방출하였다. 실험장치에 관한 더 자세한 내용은 Lee 등과 Song 등이 행한 연구에 나타나 있다(11,12).

추출물에 함유된 taxol과 baccatin III의 정량분석은 HITACHI사의 HPLC를 이용하였다. 초임계유체 추출을 통해 얻은 추출물을 메탄올에 녹인 후 0.5 μ m FH형 미세여과기(FH-type Millipore filter)로 여과시켜서 역상의 Lichrosorb RP-18(5 μ m) pre-packed column(250 \times 4mm)에 주입하였다. 용출액은 메탄올과 물을 부피비로 68:32로 혼합하여 사용하였으며, 유속은 0.5ml/min이었다. 각 성분의 정량은 UV를 이용하여 230nm의 검색파장에서 얻은 피크면적을 검량을 통하여 얻은 식으로 환산하여 구하였다.

초임계유체 추출을 통해 얻은 추출물의 수율의 백분율은 유기용매 추출법에 의해 추출된 taxol과 baccatin III의 총량을 기준으로 계산하였으며 선택성은 초임계유체 추출을 통해 추출된 전체추출무게를 기준으로 추출된 목적물질의 양의 백분율을 구하였다.

결과 및 고찰

유기용매 추출

한국과학기술원 내의 주목나무(*Taxus cuspidata*) 잎에 들어있는 taxol과 baccatin III, 10-deacetyl-baccatin III의 함량은 Fig. 2에 나타내었다. 가루 시료 1g당 들어있는 양은 다섯개의 시료를 평균해서 taxol이 약 0.029mass%, 10-deacetyl-baccatin III는 0.035mass%, 그리고 baccatin III는 0.027mass% 이었다. Taxol이 가장 많이 포함되어 있다고 보고되어진 태평양주목(*Taxus brevifolia*)의 껍질에 들어있는 양은 0.01~0.02mass%였으며(6), K. M.

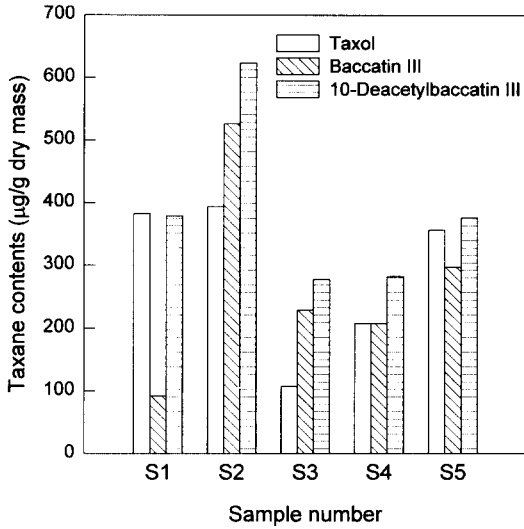


Fig. 2. Taxane contents in the needles of native Korean yew in KAIST.

Witherup 등이 동일한 *Taxus cuspidata*의 잎으로부터 추출하여 얻은 taxol의 양은 0.008mass%이었다 (2). 국내 주목에 대한 함량분석 결과 가장 많다고 보고되어진 울릉도 주목의 잎에 들어있는 양은 0.015mass%로 이러한 결과는 주목의 성장 조건이 다르기 때문인 것으로 추측된다(13). 이것은 taxol과 그 전구체의 함량이 집단, 개체, 부위, 채집시기 등에 따라 달라질 수 있다고 한 Wheeler 등의 보고와 일치한다(14). 그러나 선택성은 TLC공정을 거쳤음에도 불구하고 taxol의 경우 0.067mass%, baccatin III의 경우 0.067mass% 정도로 유기용매 추출을 하면 다른 성분이 상당히 많이 추출되어지며, taxol과 baccatin III에 대한 선택성이 낮아 정제와 분석에 어려움을 준다는 것을 알 수 있다. Table 1은 비극성 물질을 제거하기 위해 n-hexane으로 녹여내는 전처리를 한 시료와 그렇지 않은 시료에 대한 유기용매 추출실험 결과를 나타낸 것이다. n-hexane으로 처리하면 비극성 물질을 상당량 제거할 수 있었으나 baccatin III의 대부분이 소실되었다. 또한 선택성도 taxol의 경우 n-hexane으로 처리한 시료와 그렇지 않은 시료가 큰 차이를 보이지 않았다.

초임계유체 추출

300bar와 313K에서 초임계 이산화탄소만을 이용하여 한국과학기술원 내의 주목나무 (*Taxus cuspi-*

Table 1. Contents and Selectivity of Taxol and Baccatin III in Needles of *Taxus cuspidata* using Organic Solvent Extraction.

	Taxol		Baccatin III	
	Contents (mass%)	Selectivity (mass %)	Contents (mass %)	Selectivity (mass %)
Without n-hexane treatment	0.029	0.067	0.027	0.067
With n-hexane treatment	0.022	0.070	0.002	0.006

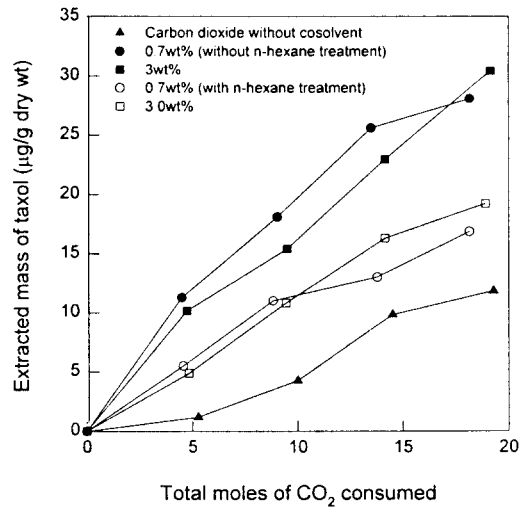


Fig. 3. Taxol amount extracted from needle using CO₂ with and without ethylacetate at 300bar and 313K.

data) 잎으로부터 추출실험을 한 결과 수율은 taxol이 5.834%이었고, baccatin III는 0.564%였으며, 선택성은 taxol의 경우 0.042mass% 정도였고 baccatin III는 0.011mass% 정도였다. 동일 온도와 압력에서 전체 흐른 이산화탄소의 총량에 대해 에틸아세테이트와 메탄올의 농도를 각각 0.7wt%와 3wt%로 변화시켜서 추출 실험을 하여 시료의 단위 질량 당 추출되어진 taxol과 baccatin III의 전체추출량을 이산화탄소가 흐른 몰 수, 즉 시간을 변수로 하여 Fig. 3~Fig. 6에 나타내었다. 총 실험 시간은 16시간으로 각 4시간마다 시료채취를 하여 수율과 선택성을 계산하여 Table 2에 나타내었다. Fig. 3과 Fig. 5에서 보여지듯이 추출되어지는 taxol의 양은 보조용매로 사용된 에틸아세테이트의 농도에는 영향을 받지 않았으며 3wt%의 메탄올을 사용했을

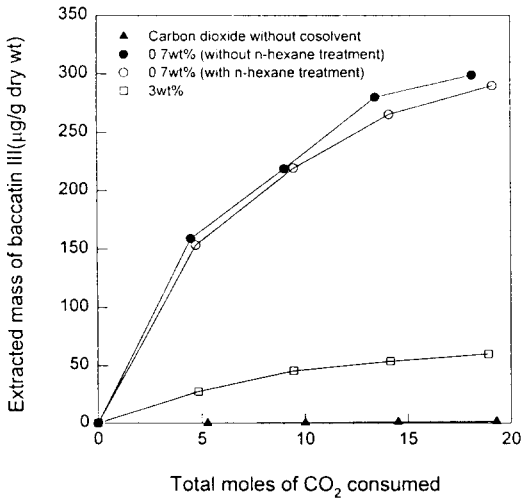


Fig. 4. Baccatin III amount extracted from needle using CO₂ with and without ethylacetate at 300bar and 313K.

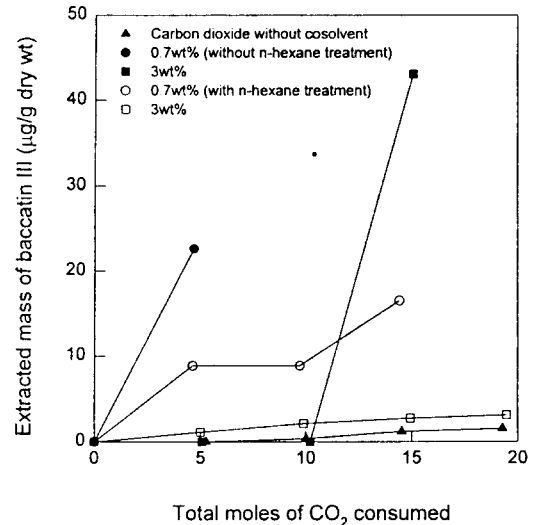


Fig. 6. Baccatin III amount extracted from needle using CO₂ with and without methanol at 300bar and 313K.

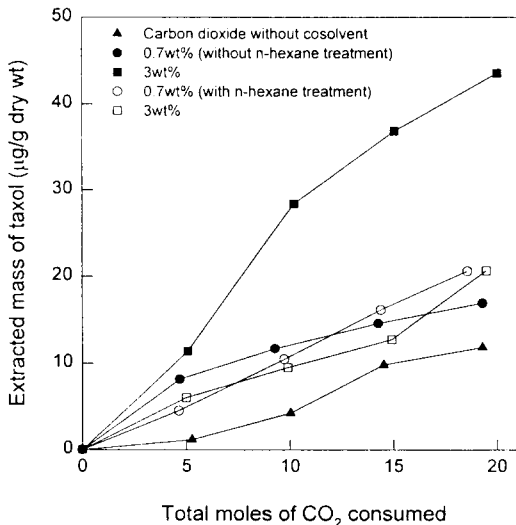


Fig. 5. Taxol amount extracted from needle using CO₂ with and without methanol at 300bar and 313K.

때 가장 많은 양이 추출되었는데, 단위 건조 질량 당 43.55µg으로 유기용매 추출의 15%가 얻어졌다. Taxol의 선택성은 보조용매로 에틸아세테이트를 사용했을 때 0.117mass%로 가장 높게 나타났으며 이것은 초임계 이산화탄소만을 사용했을 때에 비하면 3배, 유기용매 추출에 비하면 1.8배 증가한 것이다.

또한 보조용매로 메탄올을 사용했을 때의 taxol의 선택성은 초임계 이산화탄소만을 사용했을 때에 비하면 1.5~2.5배, 유기용매 추출에 비하면 1.6배 증가하였다. Fig. 4와 Fig. 6에 나타난 baccatin III의 추출량은 0.7wt% 에틸아세테이트를 사용하면 단위 건조 질량 당 298.789µg, 3wt% 에틸아세테이트를 사용하면 289.773µg으로 유기용매 추출량과 거의 같다. 이 때의 baccatin III의 선택성은 0.7wt% 에틸아세테이트에서 1.245wt%, 3.0wt% 에틸아세테이트에서 1.115wt%로 유기용매 추출에 비해 19배까지 크게 증가하였으며 3wt%의 메탄올을 사용했을 때에는 약 6.4배 증가하였다. 여기서 에틸아세테이트는 baccatin III를 추출하는데 있어 수율과 선택성에서 상당히 효과적인 보조용매라는 것을 알 수 있다. 이러한 결과로부터 초임계 이산화탄소에 보조용매로 에틸아세테이트와 메탄올을 사용하면 추출되어지는 taxol과 baccatin III의 양은 순수한 이산화탄소만을 사용했을 때 보다 크게 증가하며 특히 선택성은 유기용매 추출에 비해 taxol의 경우 최고 1.8배, baccatin III의 경우 최고 19배 까지 증가하여 초임계유체 추출이 주목나무로부터 특정성분을 추출하는데 효과적이라는 것을 알 수 있다. 또한 Table 2에서 시료를 n-hexane으로 전처리한 경우 추출되어지는 taxol과 baccatin III의 추출량 및 선택성이 그렇지 않은 경우에 비해 떨어지는 것을 알

Table 2. Extracted Mass and Selectivity of Taxol and Baccatin III using Supercritical Carbon Dioxide with Ethylacetate and Methanol as Cosolvents at 300bar and 313K.

Cosolvent	Taxol		Baccatin III	
	Extracted Mass (mass %)	Selectivity (mass %)	Extracted Mass (mass %)	Selectivity (mass %)
Ethyl acetate 0.7wt% (without n-hexane treatment)	0.0028	0.117	0.0299	1.245
Ethyl acetate 0.7wt% (with n-hexane treatment)	0.0017	0.105		
Ethyl acetate 3.0wt% (without n-hexane treatment)	0.0030	0.117	0.0290	1.115
Ethyl acetate 3.0wt% (with n-hexane treatment)	0.0019	0.107	0.0060	0.299
Methanol 0.7wt% (without n-hexane treatment)	0.0017	0.065	0.0023	0.189
Methanol 0.7wt% (with n-hexane treatment)	0.0021	0.103	0.0017	0.138
Methanol 3.0wt% (without n-hexane treatment)	0.0044	0.104	0.0043	0.431
Methanol 3.0wt% (with n-hexane treatment)	0.0021	0.103	0.0003	0.015

수 있다. 즉, 시료의 n-hexane 처리는 비극성 물질을 제거하는 데에는 효과가 있으나 비극성 물질만 제거하는 것이 아니라 taxol과 baccatin III도 상당량 같이 제거하여 초임계추출성능에 좋은 영향을 미치지 못함을 알 수 있다.

요 약

300bar와 313K에서 초임계 이산화탄소에 에틸아세테이트와 메탄올을 보조용매로 사용하여 주목나무로부터 taxol과 baccatin III를 추출하는 실험을 한 결과 추출되어지는 taxol의 추출량은 보조용매로 사용된 에틸아세테이트의 농도에는 영향을 받지 않았으며 3wt%의 메탄올을 사용했을 때 가장 많은 양이 추출되었고 taxol의 선택성은 보조용매로 에틸아세테이트를 사용했을 때 0.117mass%로 가장 높게 나타났다. Baccatin III는 보조용매로 에틸아세테이트를 사용하면 유기용매 추출량과 거의 같은 양이 추출되어지며 이 때의 선택성은 0.7wt% 에틸아세

테이트에서 1.245wt%, 3.0wt% 에틸아세테이트에서 1.115wt%로 유기용매 추출에 비해 19배 까지 크게 증가하였으며 3wt%의 메탄올을 사용했을 때에는 약 6.4배 증가하였다. 여기서 에틸아세테이트는 baccatin III를 추출하는데 있어 수율과 선택성 면에서 가장 효과적인 보조용매라는 것을 알 수 있다. 또한 시료를 n-hexane으로 처리하면 비극성 물질은 상당히 제거되나 그 과정에서 많은 양의 taxol과 baccatin III가 손실될 뿐만 아니라 선택성도 증가하지 않으므로 공정상 불필요하며 보조용매를 사용한 초임계유체 추출이 주목나무로부터 특정성분을 추출하는데 아주 효과적이라는 것을 알 수 있다.

감 사

본 연구는 과기처와 한국과학재단의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, and A. T. McPhail (1971), *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 2325.
2. K. M. Witherup, S. A. Look, M. W. Stasko, T. J. Ghiorzi, and G. M. Muschik (1990), *J. Nat. Prod.*, 53, 5, 1249.
3. N. Vidensek, P. Lim, A. Campbell, and C. Carlson (1990), *J. Nat. Prod.*, 53, 6, 1609.
4. E. K. Rowinsky, L. A. Cazenave, and R. C. Donehower (1990), *J. of the National Cancer Institute*, 82, 15, 1247.
5. Stu Borman (1991), C&EN Washington, September 2.
6. G. M. Cragg, S. A. Schepartz, M. Suffness, and M. R. Grever (1993), *J. Nat. Prod.*, 56, 10, 1657.
7. K. C. Nicolaou, Z. Yang, J. J. Liu, H. Ueno, P. G. Nantermet, R. K. Guy, C. F. Clalborne, J. Renaud, E. A. Couladouros, K. Paulvannan and E. J. Sorensen (1994), *Nature*, 367, 630.
8. M. A. Mchugh, V. J. Krukoni (1994), *Supercritical Fluid Extraction*, 2nd ed., Phasex Corporation.
9. D. W. Jennings, H. M. Deutsch, L. H. Zalkow, and A. S. Teja (1992), *J. Super. Fluids.*, 5, 1.

10. M.-K. Chun, H.-W. Shin, and H. Lee (1994), *Biothch. Tech.*, **8**, 8, 547.
11. H. Lee, W. H. Hong, J. H. Yoon, K. M. Song, S. S. Kwak, and J. R. Liu (1992), *Biothch. Tech.*, **6**, 127.
12. K. M. Song, S. W. Park, W. H. Hong, H. Lee, S. S. Kwak, and J. R. Liu (1992), *Biotech. Prog.*, **8**, 127.
13. 이민경(1993), 한국산 주목(*Taxus* spp.)의 Taxol 및 관련물질의 함량분석과 성계알을 이용한 Bioassay, 원광대 대학원 약학과 석사학위논문.
14. N. C. Wheeler, K. Jech and S. Masters (1992), *J. Nat. Prod.*, **55**, 432.