

Jolanta BRYJAK, Karol BIAŁOWAŚ, Agata KUCEWICZ

e-mail: jolanta.bryjak@pwr.wroc.pl

Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska, Wrocław

Kinetyka inaktywacji lakazy w obecności rozpuszczalników organicznych mieszających się z wodą

Wstęp

Enzymy, specyficzne katalizatory białkowe, wyewoluowały w środowisku wodnym, co jest jednoznaczne z ich niską stabilnością konformacyjną w obecności rozpuszczalników organicznych mieszających się i nie mieszających się z wodą. Stanowi to duże ograniczenie w stosowaniu białek w biokatalizie przemysłowej, która jest silnie ukierunkowana na chemoenzymatyczną syntezę związków trudno rozpuszczalnych lub niestabilnych w wodzie.

W katalizie enzymatycznej wyróżnia się 3 podstawowe systemy z rozpuszczalnikami organicznymi: (1) woda-rozpuszczalnik nie mieszający się z wodą; (2) woda-rozpuszczalnik mieszający się z wodą; (3) rozpuszczalniki organiczne z kontrolowaną zawartością wody i (4) odwrócone micelle [Iber i Ananthanarayan, 2008; Gupta, 1992]. Dużym zainteresowaniem cieszą się układy woda-rozpuszczalnik mieszający się z wodą, gdyż w systemie jednofazowym nie występują opory dyfuzyjne. Obecność w mieszaninie reakcyjnej odpowiednio dobranego rozpuszczalnika organicznego i w odpowiednim stężeniu, może znacznie zwiększyć rozpuszczalność substratu, hamować inhibicję substratem/produktem oraz stabilizować enzym. Dodatki te mogą również stabilizować pośrednie produkty reakcji [Seulek i Chaudhuri, 1999; Rodakiewicz-Nowak i Jarosz-Wilkolazka, 2007]. W ostatnich latach szczególnie dużo badań dotyczyło oksydoreduktaz przekształcających związki fenolowe w mieszaninach woda-rozpuszczalnik organiczny mieszający się z wodą. Szczególną uwagę zwraca się na lakazy, które nie wymagają stosowania kofaktorów. Potencjalne zastosowania lakaz obejmuje: oczyszczanie wód, remediację gruntów, obróbkę pulpy papierniczej, solubilizację węgla, degradację polimerów i ksenobiotyków, konstrukcję biosensorów, a także procesy syntezy chemoenzymatycznej czy oksydatywnej polimeryzacji [Rodakiewicz-Nowak i Jarosz-Wilkolazka, 2007; Riva, 2006]. Jednakże większość substratów jest trudno rozpuszczalna w wodzie, a powstające rodnikowe produkty reakcji zmniejszają stabilność enzymu, co powoduje duże zainteresowanie badaniami nad wpływem rozpuszczalników mieszających się z wodą na aktywność enzymatyczną, podczas gdy badania stabilności enzymu są rzadziej prezentowane. Dlatego celem niniejszych badań było zbadanie wpływu wybranych rozpuszczalników organicznych mieszających się z wodą na stabilność lakazy oraz dobranie modelu matematycznego, odpowiedniego do formalizacji obserwowanych spadków aktywności w czasie, co umożliwi dalsze obliczenia przy ograniczonej liczbie koniecznych do wykonania eksperymentów.

Materiały i metody

W badaniach wykorzystano lakazę produkowaną przez *Cerrena unicorn* (Bull.ex.Fr.) Murr, No 139. Szczep otrzymano z Wydziału Biochemii Uniwersytetu w Lublinie. Enzym, produkowany zewnątrzkomórkowo, był wstępnie oczyszczony technikami membranowymi, zgodnie z metodyką opisaną uprzednio [Bryjak J. i Rekuć, 2010]. W badaniach wykorzystano 2-propanol (PROP), acetonitryl (ACN), dimetyloformamid (DMF) oraz etanol (EtOH). Aktywność enzymu oznaczano w obecności 0,4 mM soli sodowej 2,2'-azino-bis(3-etylobenzotiazolo-lino-6-sulfonianu) zgodnie z metodyką opisaną uprzednio [Bryjak i Rekuć, 2010]. Za 1 jednostkę aktywności (U) przyjęto taką ilość enzymu, która w warunkach reakcji (0,1 M bufor fosforanowo-cytrynianowy, pH 5,2, 30°C) powoduje przyrost absorbancji w 420 nm o 1,0 w czasie 1 min.

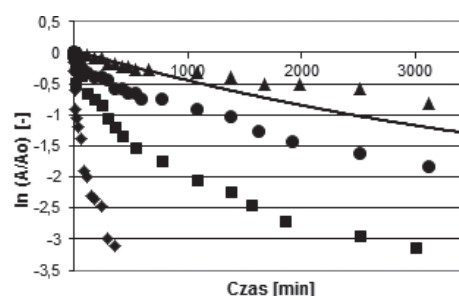
Badania stabilności enzymu prowadzono w mieszalnikowym (150 rpm), termostatowanym (30°C) reaktorze okresowym, do którego wprowadzono 50 mL 0,1 M buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 5,3, zawierającego od 0,0 do 80,0% PROP, EtOH, ACN lub DMF. Po preinkubacji do reaktora wprowadzono 100 µL skoncentrowanego roztworu enzymu, pobierano pierwszą próbkę do analiz i pozostawiano w 0–4°C do czasu wykonania analiz. Pozostałe próbki były pobierane w interwałach czasowych dostosowanych do szybkości spadku aktywności. Ze względu na możliwość wzrostu mikroorganizmów, prowadzone procesy przerywano po 48–72 godzinach.

W obliczeniach zastosowano pakiet *Matlab*. Do estymacji parametrów wykorzystano funkcje *lnifit* z algorytmem *Levenberga-Marquardta*.

Wyniki i dyskusja wyników

Badania inaktywacji lakazy

Badania inaktywacji lakazy objęły 4 rozpuszczalniki organiczne, mieszające się z wodą (EtOH, PROP, ACN, DMF), o różnych stężeniach. Przykładowe wyniki, otrzymane dla ACN, zamieszczono na rys. 1.



Rys. 1. Wykres półlogarytmiczny zmian aktywności lakazy w czasie inkubacji enzymu w buforze (linia ciągła) oraz w buforze zawierającym 10 (▲), 20 (●), 30 (■) i 60% (◆) acetonitrylu. Oznaczenia: A – aktywność w czasie; Ao – aktywność początkowa

Na podstawie wykresów, wykonanych również dla pozostałych trzech rozpuszczalników, stwierdzono, że w większości przypadków inaktywacja ma charakter dwufazowy, podobnie jak dla przykładowych serii pomiarowych, zamieszczonych na rys.1. Jest to zgodne z wcześniejszym doniesieniem [Michniewicz i inni, 2006], w którym wykazano, że badana lakaza jest produkowana w dwóch formach izoenzymatycznych, które różnią się właściwościami kinetycznymi oraz stabilnością termiczną. Poza tym we wszystkich badanych układach, zawierających 0, 5 i 10% rozpuszczalnika organicznego, zaobserwowano zbliżoną i powolną dynamikę spadku aktywności.

Ponieważ w doborze modelu matematycznego istotną rolę może odgrywać błąd analityczny, dlatego na wstępie obliczono błąd względny dla poszczególnych punktów pomiarowych, wykorzystując 4 serie kontrolne (brak rozpuszczalnika organicznego). Za rzeczywistą wartość aktywności dla danego czasu przyjmowano średnią arytmetyczną, a błąd względny (δ) obliczono ze wzoru (1):

$$\delta = \left| \frac{a - \bar{a}}{\bar{a}} \right| \cdot 100\% \quad (1)$$

gdzie:

a, \bar{a} – znormalizowana (A/Ao) aktywność enzymu i średnia arytmetyczna.

Z przykładowych danych, zamieszczonych w tab. 1, wynika, że maksymalny błąd względny wynosi mniej niż 2,5%, co oznacza, że dane eksperymentalne mogą posłużyć do wyjaśnienia mechanizmu inaktywacji lakazy w obecności rozpuszczalników organicznych.

Tab. 1. Przykładowe wartości błędu względnego pomiarów wykonanych dla reakcji kontrolnych, niezawierających rozpuszczalników organicznych

Seria	1	2	3	4
$\delta_{5 \text{ min}} [\%]$	0,51	1,43	0,73	0,19
$\delta_{30 \text{ min}} [\%]$	1,62	0,30	0,96	0,96
$\delta_{60 \text{ min}} [\%]$	1,35	0,40	0,90	0,05
$\delta_{180 \text{ min}} [\%]$	0,88	0,65	1,81	2,04
$\delta_{480 \text{ min}} [\%]$	0,09	0,80	1,37	2,26

Dobór modelu matematycznego

Inaktywacja enzymów jest procesem będącym wypadkową wielu różnych procesów jednostkowych, zachodzących w roztworze. W praktyce stosuje się uproszczenie zakładające reakcję chemiczną, w której substratem są aktywne cząsteczki enzymu (E), a produktem końcowym enzym nieodwracalnie zdenaturowany (nieaktywny, I) lub częściowo aktywny (E'). Opierając się o wstępną analizę danych wybrano 4 prawdopodobne modele o różnej złożoności (Tab. 2). Ponieważ wszystkie równania różniczkowe dla przedstawionych modeli są znane [Polakovic i Vrabel, 1996], poniżej przedstawiono jedynie końcowe równania, pozwalające przewidzieć przebiegi inaktywacji enzymów zgodnych z kinetyką reakcji I-rzędowej – równanie (2), kinetyką zakładającą mechanizm seryjny – równanie (3) lub izoenzymatyczny prosty – równanie (4) oraz mechanizm izoenzymatyczny, w którym jedna z izoform traci aktywność zgodnie z modelem seryjnym (5):

$$a(t) = e^{-kt} \quad (2)$$

$$a(t) = \left(\frac{k}{k' - k} \frac{\gamma'}{\gamma} + 1 \right) e^{-kt} - \frac{k}{k' - k} \frac{\gamma'}{\gamma} e^{-k't} \quad (3)$$

$$a(t) = b_1 e^{-k_1 t} - (1 - b_1) e^{-k_2 t} \quad (4)$$

$$a(t) = b_1 \left[\left(\frac{k_1}{k'_1 - k_1} \frac{\gamma'_1}{\gamma_1} + 1 \right) e^{-k_1 t} - \frac{k_1}{k'_1 - k_1} \frac{\gamma'_1}{\gamma_1} e^{-k'_1 t} \right] + (1 - b_1) e^{-k_2 t} \quad (5)$$

Tab. 2. Przykładowe wartości błędu względnego pomiarów wykonanych dla reakcji kontrolnych, niezawierających rozpuszczalników organicznych

Model	Parametry
Model 1 reakcji I rzędu – 1 parametr $E \xrightarrow{k} I$	k – stała szybkości inaktywacji
Model 2 seryjny – 3 parametry $E \xrightarrow{k} E' \xrightarrow{k'} I$	k, k' – stałe szybkości inaktywacji γ'/γ – stosunek współczynników aktywności formy wyjściowej i pośredniej enzymu
Model 3 izoenzymatyczny – 3 parametry $E_1 \xrightarrow{k_1} I, E_2 \xrightarrow{k_2} I$	k_1, k_2 – stałe szybkości inaktywacji b_1 – udział aktywności labilnej izoformy E_1 w całkowitej początkowej aktywności preparatu
Model 4 izoenzymatyczny – 5 parametrów $E_1 \xrightarrow{k_1} E'_1 \xrightarrow{k'_1} I$ $E_2 \xrightarrow{k_2} I$	k_1, k'_1, k_2 – stałe szybkości inaktywacji γ'_1/γ_1 – stosunek współczynników aktywności formy wyjściowej i pośredniej izoformy E_1 b_1 – udział aktywności labilnej izoformy E_1 w całkowitej początkowej aktywności preparatu

Wykorzystując dane doświadczalne wyznaczono parametry każdego z modeli oraz ich standardowe odchylenie stosując regresję nieliniową. Ponieważ dysponowano danymi dla 4 współrozpuszczalników, w niniejszej pracy przedstawiono jedynie wyniki otrzymane dla acetonitrylu (Tab. 3). W tabeli zamieszczono również wartości wariancji S^2 , obliczone zgodnie ze wzorem (6):

$$S^2 = \frac{\sum (a^{\text{exp}} - a^{\text{model}})^2}{n_{\text{pomiarów}} - n_{\text{parametrów}}} \quad (6)$$

oraz wartości obliczone testem statystycznym F (równ. 7) przy przyjętym poziomie istotności 0,05:

$$F = \frac{S^2_{\text{Model}}}{S^2_{\text{Rzeczywista}}} \quad (7)$$

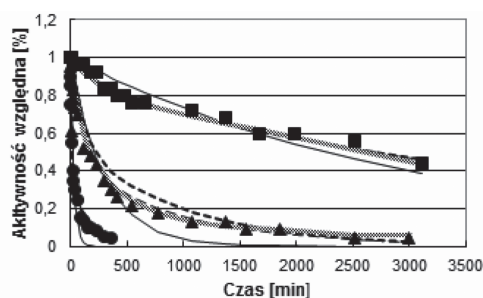
Dla danego poziomu istotności oraz liczby stopni swobody modelu i liczby stopni swobody wariancji rzeczywistej, z odpowiednich tablic [NIST/SEMATECH, 2012] odczytano wartości krytyczne testu F (F_{kryt}), które również zamieszczono w tab. 3.

Tab. 3. Wartości parametrów modeli inaktywacji wyznaczonych z poszczególnych serii pomiarowych, wykonanych w obecności różnych stężeń acetonitrylu, oraz wartości wariancji S^2 , parametru F oraz wartości krytyczne testu F (F_{kryt})

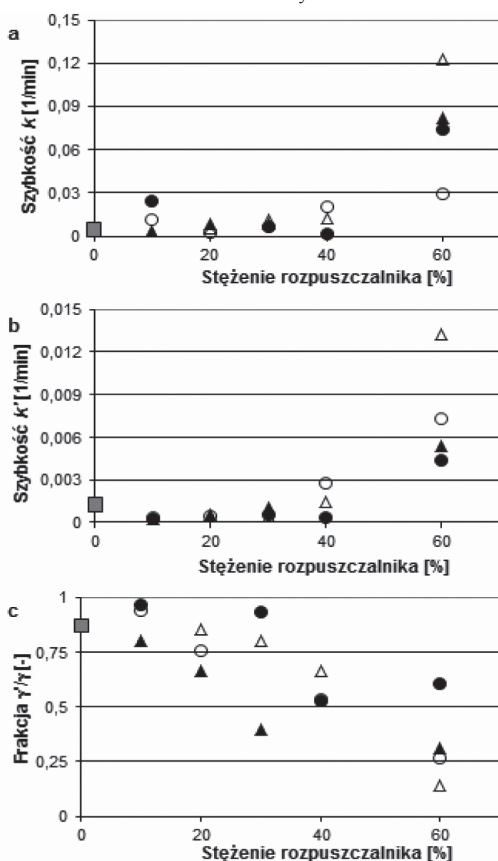
Model	Stała	0% ACN	10% ACN	30% ACN	60% ACN
1	k	$3,88^{\pm 4}, 4,45^{\pm 5}$	$3,07^{\pm 4}, 3,76^{\pm 5}$	$3,24^{\pm 3}, 4,94^{\pm 4}$	$3,23^{\pm 2}, 8,61^{\pm 3}$
	S^2	$1,19^{\pm 3}$	$2,41^{\pm 3}$	$4,99^{\pm 3}$	$8,53^{\pm 3}$
	F	9,96	20,1	41,6	71,1
	F_{kryt}	4,62	4,57	4,56	4,64
2	k	$3,41^{\pm 4}, 5,78^{\pm 3}$	$3,55^{\pm 3}, 2,45^{\pm 3}$	$8,51^{\pm 3}, 2,03^{\pm 3}$	$8,20^{\pm 2}, 1,07^{\pm 2}$
	k'	$5,82^{\pm 4}, 2,61^{\pm 4}$	$1,98^{\pm 4}, 1,8^{\pm 5}$	$1,03^{\pm 3}, 2,81^{\pm 4}$	$5,35^{\pm 3}, 1,10^{\pm 3}$
	γ'/γ	$9,88^{\pm 1}, 1,18^{\pm 1}$	$8,02^{\pm 1}, 8,64^{\pm 2}$	$3,95^{\pm 1}, 8,36^{\pm 2}$	$3,11^{\pm 1}, 3,84^{\pm 2}$
	S^2	$4,76^{\pm 4}$	$3,33^{\pm 4}$	$5,20^{\pm 4}$	$2,23^{\pm 4}$
	F	3,96	2,77	4,34	1,85
	F_{kryt}	4,66	4,59	4,59	4,68
3	k_1	$3,88^{\pm 4}, 8,19$	$1,98^{\pm 4}, 1,8^{\pm 5}$	$1,03^{\pm 3}, 2,81^{\pm 4}$	$5,35^{\pm 3}, 1,10^{\pm 3}$
	k_2	$3,88^{\pm 4}, 1,65^{\pm 2}$	$3,55^{\pm 3}, 2,45^{\pm 3}$	$8,51^{\pm 3}, 2,03^{\pm 3}$	$8,20^{\pm 2}, 1,07^{\pm 2}$
	b_1	$6,58^{\pm 1}, 1,03^{\pm 9}$	$8,49^{\pm 1}, 6,84^{\pm 2}$	$4,50^{\pm 1}, 9,65^{\pm 2}$	$3,33^{\pm 1}, 4,26^{\pm 2}$
	S^2	$1,38^{\pm 3}$	$3,33^{\pm 4}$	$5,20^{\pm 4}$	$2,23^{\pm 4}$
	F	11,49	2,77	4,34	1,85
	F_{kryt}	4,66	4,59	4,59	4,68
4	k_1	$3,66^{\pm 4}, 1,63^{\pm 1}$	$5,92^{\pm 4}, 4,78$	$1,90^{\pm 2}, 1,77^{\pm 2}$	$1,06^{\pm 1}, 3,55^{\pm 2}$
	k'_1	$2,50^{\pm 3}, 3,22^{\pm 1}$	$5,74^{\pm 4}, 4,81$	$3,25^{\pm 4}, 1,03^{\pm 3}$	$2,24^{\pm 2}, 6,67^{\pm 2}$
	k_2	$1,19^{\pm 3}, 5,83^{\pm 1}$	$1,55^{\pm 3}, 2,62^{\pm 2}$	$3,23^{\pm 3}, 2,59^{\pm 3}$	$3,22^{\pm 3}, 2,80^{\pm 3}$
	γ'_1/γ_1	$1,48^{\pm 1}, 1,18^{\pm 4}$	$2,39^{\pm 2}, 1,8^{\pm 5}$	$4,26^{\pm 1}, 6,21^{\pm 1}$	$2,89^{\pm 1}, 1,27^{\pm 1}$
	b_1	$1,83^{\pm 1}, 1,37^{\pm 2}$	$5,91^{\pm 2}, 7,45$	$3,77^{\pm 1}, 1,89^{\pm 1}$	$7,94^{\pm 1}, 1,64^{\pm 1}$
	S^2	$5,59^{\pm 4}$	$2,79^{\pm 4}$	$3,31^{\pm 4}$	$5,59^{\pm 4}$
	F	4,66	2,32	2,76	0,89
	F_{kryt}	4,70	4,62	4,62	4,74

Zastosowano 3 kryteria wyboru modelu matematycznego: sprawdzano dokładność odwzorowania punktów doświadczalnych oraz porównywano wartości wariancji i odchyłeń standardowych, obniżających się w miarę wzrostu komplikacji modelu. Natomiast test statystyczny F pozwalał weryfikować modele z wykorzystaniem wariancji. W teście wylicza się stosunek wariancji uzyskanej dla modelu do rzeczywistej wariancji, wyznaczonej na podstawie kilku powtórzonych pomiarów. Jeżeli wartość F była mniejsza od wartości krytycznej F_{kryt} model uznawano za statystycznie akceptowalny.

W niniejszej publikacji zamieszczono jedynie wybrane wyniki, otrzymane podczas doświadczeń z acetonitrylem, gdyż uznano je z jednej strony za reprezentatywne, a z drugiej strony za najbardziej skomplikowane. Znaczące podobieństwa zaobserwowano przede wszystkim podczas analizy krzywych modelowych (wybrane przykłady na rys. 2) oraz wyników testów F . Przede wszystkim stwierdzono, że model zakładający utratę aktywności zgodnie z kinetyką I rzędu nieprawidłowo przybliża przebieg eksperymentów, co dodatkowo potwierdzają najwyższe wartości wariancji. Z kolei model 4, 5-parametrowy, prawidłowo odzwierciedlał wszystkie procesy, jednak odchylenia standardowe wyznaczonych parametrów w większości przypadków były wyższe od wartości wyznaczonych. Natomiast krzywe modelowe z równań 3-parametrowych były identyczne lub zbliżone (Rys. 2). Wybór pomiędzy tymi modelami oparto o porównanie wartości γ'/γ i b_1 , które



Rys. 2. Względne zmiany aktywności lakazy w czasie inkubacji enzymu w buforze zawierającym 10 (■), 30 (▲) i 60% (●) acetonitrylu. Przebiegi modelowe wyliczono z równania (2) (linia ciągła), równania (3) (linia przerywana), równania (4) (linia kropkowana) i równania (5) (linia cieniowana) z wykorzystaniem wartości parametrów zamieszczonych w tab. 3



Rys. 3. Wartości wyznaczonych parametrów k (a), k' (b) i γ'/γ (c) dla modelu seryjnego dla lakazy w buforze zawierającym różne stężenia ACN (▲), DMF (●), EtOH (△) i PROP (○)

powinny maleć ze wzrostem stężenia rozpuszczalnika organicznego w modelu seryjnym i pozostawać niezmiennie w modelu izoenzymatycznym. W efekcie wybrano model seryjny, który był wystarczający do modelowania wszystkich przebiegów inaktywacji w obecności wszystkich zastosowanych stężeń rozpuszczalników organicznych. Ostateczną weryfikacją poczynionych założeń była analiza zmian wartości wyznaczonych parametrów w zależności od zmian stężeń rozpuszczalników organicznych (Rys. 3).

Otrzymane wyniki wykazały, że obecność rozpuszczalników organicznych nie wywołuje zmiany mechanizmu inaktywacji, natomiast szybkość utraty aktywności silnie zależy od zastosowanego rozpuszczalnika. Najsilniejszym destabilizatorem badanego enzymu w wyższych stężeniach jest EtOH, który jednocześnie jest jedynym rozpuszczalnikiem, który jest zachowawczy dla enzymu w stężeniu 20%. Z ko-

lei ACN wywoływał stabilizację enzymu do stężenia 10%, powyżej którego dochodziło do systematycznego obniżenia aktywności. Natomiast wszystkie rozpuszczalniki organiczne można stosować jako rozpuszczalniki do stężenia 10% bez zmniejszenia stabilności białka.

Wnioski

W badaniach nad stabilnością lakazy w obecności rozpuszczalników organicznych mieszających się z wodą wykorzystano ACN, 2-PROP, DMF i EtOH w stężeniach od 0 do 60% objętościowych. Pomiary aktywności w czasie prowadzono przez 3 dni, następnie dobrano model matematyczny, pozwalający prawidłowo odwzorować przebieg inaktywacji w pełnym zakresie stężeń wszystkich rozpuszczalników.

Wykazano, że wymagania te spełnia model seryjny i zgodnie z nim wyznaczono wartości 3 parametrów. Ostateczną weryfikacją poprawności założeń było wykreślenie zależności wartości parametrów od stężenia poszczególnych rozpuszczalników. Ponieważ nie zaobserwowano przypadkowego rozrzutu wyliczonych wartości, można przyjąć je jako prawidłowe.

Analiza otrzymanych wyników wykazała, że stałe k i k' modelu inaktywacji lakazy ulegają niewielkim zmianom do 30% stężenia wszystkich badanych rozpuszczalników. Natomiast wyższe stężenia rozpuszczalników wywołują wzrost szybkości inaktywacji, szczególnie dużą w obecności etanolu. Natomiast ograniczenie stosowania rozpuszczalników do 10% objętościowych wynika ze stopniowo zmniejszającej się aktywności frakcji pośredniej enzymu (E'). Wskazuje to na szybki proces częściowego rozkładania się struktury konformacyjnej białka w obecności rozpuszczalnika z jednoczesnym obniżeniem aktywności i wzrostem udziału tej frakcji w ogólnej puli enzymu. Należy przypuszczać, że techniki zwiększające stabilność konformacyjną lakazy, np. poprzez immobilizację, pozwolą zwiększyć tolerancję tego białka na obecność rozpuszczalników organicznych mieszających się z wodą.

LITERATURA

- Bryjak J., Rekuć A., 2010. Effective purification of *Cerrena unicolor* laccase using microfiltration, ultrafiltration and acetone precipitation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160, 2219-2235. DOI: 10.1007/s12010-009-8791-9
- Gupta M.N., 1992. Enzyme function in organic media. *Eur. J. Biochem.*, 203, 25-32. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb19823.x
- Iyer P.V., Ananthanarayan L., 2008. Enzyme stability and stabilization – Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochem.*, 43, 1019-1032. DOI: 10.1016/j.procbio.2008.06.004
- Michniewicz A., Ullrich R., Ledakowicz S., Hofrichter M., 2006. The white-rot fungus *Cerrena unicolor* strain 137 produces two laccase isoforms of different physico-chemical and catalytic properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69, 682-688. DOI: 10.1007/s00253-005-0015-9
- NIST/SEMATECH e-handbook of Statistical Methods (03.2012): <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/eda/section3/eda3673.htm>
- Polakovic M., Vrabel P., 1996. Analysis of the mechanism and kinetics of thermal inactivation of enzyme: Critical assessment of isothermal inactivation experiments. *Process Biochem.*, 31, 787-800. DOI: 10.1016/S0032-9592(96)00026-X
- Riva S., 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.*, 24, 219-226. DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.03.006
- Rodakiewicz-Nowak J., Jarosz-Wilkołazka A., 2007. Catalytic activity of *Cerrena unicolor* laccase in aqueous solutions of water-miscible organic solvents – Experimental and numerical description. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 44, 53-59. DOI: 10.1016/j.molcatb.2006.08.005
- Seulek G.A., Chaudhuri J.B., 1999. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzyme Mikrob. Technol.*, 25, 471-482. DOI: 10.1016/S0141-0229(99)00075-7

Badania były finansowane z projektu badawczego N N209 119337 (2009-2012).