

发芽对大豆分离蛋白功能性质的影响

王素雅, 赵甲慧, 杨玉玲, 鞠兴荣

(南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏省粮油食品检测与深加工重点实验室, 江苏 南京 210046)

摘要: 研究发芽对大豆分离蛋白(SPI)功能性质的影响。采用碱提酸沉法制备不同发芽阶段的 SPI, 研究大豆蛋白功能性质变化。结果表明: 发芽使大豆 SPI 溶解性、吸水性、起泡性和乳化性均有所增加, 其中芽长 1cm 大豆 SPI 具有最佳的蛋白功能性质。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果表明: 大豆发芽过程中 7S 球蛋白更易受蛋白酶影响而发生降解, 使其内部疏水性氨基酸残基暴露, 从而使大豆 SPI 的功能性质不能持续改善。

关键词: 发芽; 大豆分离蛋白(SPI); 功能性质; 分子质量

Effect of Germination on Functional Properties of Soybean Protein Isolate

WANG Su-ya, ZHAO Jia-hui, YANG Yu-ling, JU Xing-rong

(Jiangsu Key Laboratory of Quality Control and Further Processing on Grain and Oil, School of Food Science and Technology, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210046, China)

Abstract: In this paper, we report the results of experiments intended to reveal the effect of germination on functional properties of soybean protein isolate (SPI). SPI from germinated soybean seeds at different stages of germination was prepared using the method of alkaline extraction and subsequent acid precipitation, and then determined for functional properties. Our results showed that solubility, foaming properties, emulsifying properties and water-holding capacity of SPI extracted from germinated soybean seeds were all better than those of SPI extracted from non-germinated ones. Furthermore, SPI from germinated soybean seeds with 1 cm long sprouts was observed to have the best functional properties. The results from SDS-PAGE indicated that most hydrophobic amino acids of 7S globulin were exposed on the surface due to being easily hydrolyzed by endogenous protease, improving functional properties of SPI.

Key words: germination; soy protein isolate (SPI); functional property; molecular weight

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)23-0064-05

大豆是我国重要的油料作物之一, 具有丰富的营养价值。大豆经适当发芽处理以后, 水溶性维生素、大豆异黄酮、 γ -氨基丁酸等含量增加, 抗营养因子含量减少, 营养价值和口感得到提高和改善^[1]。因此, 有研究者利用发芽大豆制备豆乳饮料^[2], 也有研究者利用发芽大豆制备具有抗氧化性的豆腐^[3]。这些研究重点关注发芽大豆营养改变与产品的加工工艺, 而对发芽大豆主要成分变化对其加工性能的影响研究尚属空白, 这就严重制约了营养增值发芽大豆的深加工及其产品推广。

大豆中蛋白质含量约 40%, 是最重要的组成成分, 其功能性质直接影响大豆的加工性能。大豆发芽后内源蛋白酶活性改变, 直接影响蛋白质的组成和结构, 进而影响大豆蛋白质的功能性质。蛋白质的功能性质主要有溶解性、胶凝性、乳化性、起泡性、持水性等^[4], 这些性能的变化直接影响大豆产品的加工品质。此外, 蛋白质分子间的相互作用、电荷分布、空间构象, 以

及环境如 pH 值、温度及食品其他组分等都会对其功能性质产生影响^[4]。

本实验以发芽大豆为原料, 研究发芽过程中大豆分离蛋白(soy protein isolate, SPI)溶解性、起泡性、乳化性等功能性质的变化。采用 SDS-PAGE 法分析不同芽长大豆 SPI 的亚基组成和相对比例变化, 探讨 SPI 变化对大豆蛋白质功能性质的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆: 产自东北穆丰山, 购自南京原粮市场; 大豆油: 由中储油镇江油库提供。

三羟甲基氨基甲烷(Tris)、四甲基乙二胺(TEMED)、十二烷基硫酸钠(SDS)、过硫酸铵、氢氧化钠、硫酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠等均为分析纯; 标准蛋白

收稿日期: 2011-05-18

作者简介: 王素雅(1969—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: wsy_wangsy@sina.com

Marker 美国 California Bioscience 公司; 丙烯酰胺、 N,N' - 甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、 β - 巯基乙醇、考马斯亮蓝 R250 等为生化试剂。

1.2 仪器与设备

HG75-3 型电热恒温两用箱 南京实验仪器厂; FW100 型高速万能粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司; PHS-25 型 pH 计 上海精密科学仪器有限公司; HH-6 型数码恒温水浴锅 常州市国华电器有限公司; AIPHAI-4LDpluo 真空冷冻干燥机 德国 Marin Chris 公司; TDL-80-2B 型离心分离机 上海安亭科学仪器厂; FJ200-S 型数显高速分散均质机 上海标本模型厂; UV-PC2401 型紫外-可见分光光度计 日本 Shimadzu 公司; DYY-12 型电泳仪 北京六一仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 大豆籽粒发芽

挑选大小均一、无虫蛀、无霉变、未破损的饱满大豆籽粒, 用清水清洗 3 次后在 25℃、料液比 1:2 的条件下浸泡 10h, 每 2h 换一次水。将浸泡后的大豆籽粒置于 25℃ 恒温培养箱中发芽, 观察并测量大豆发芽情况。随机取出 10 粒发芽大豆, 用直尺测定其中长度并计算平均值, 根据实验取不同长度样品, 并以浸泡 10h 的大豆籽粒(芽长 0.0cm)作为对照。

1.3.2 大豆分离蛋白的制备^[5]

发芽大豆 → 40℃ 烘干 → 磨粉 → 脱脂 → 烘干 → 碱提酸沉法提取 SPI → 冷冻干燥

1.3.3 大豆分离蛋白溶解性的测定

配制质量浓度为 5.0g/100mL 的 SPI 溶液, 取等量溶液并分别调 pH 值至 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0, 25℃ 搅拌 1h 后在 4470 × g 条件下离心 15min, 取 5.0mL 上清液微量凯氏定氮法测定蛋白含量。以蛋白质分散指数 (protein dispersibility index, PDI) 表示蛋白质溶解性^[4]。

$$PDI/\% = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad (1)$$

式中: m_1 为上清液蛋白含量/g; m_2 为总蛋白含量/g。

1.3.4 大豆分离蛋白吸水性及吸油性的测定^[6]

将 0.50g SPI(m_1)置于已知质量的 10.0mL 离心管内, 加 5.0mL 去离子水, 25℃ 振荡 1h 后在相对离心力 4470 × g 条件下离心 20min, 倾去上层水后称质量记为 m_2 , 计算每克 SPI 的吸水性。吸油性测定以大豆油代替去离子水, 计算每克 SPI 的吸油性。

$$\text{吸水(油)性} = \frac{m_2 - m_1 - m_0}{m_1} \quad (2)$$

式中: m_0 为离心管质量/g。

1.3.5 大豆分离蛋白起泡性与泡沫稳定性的测定^[7]

取 25.0mL 用 pH7.0 磷酸缓冲液配制的质量浓度为 1.0g/100mL 的 SPI 溶液, 室温搅拌 30min。以 10000r/min 均质分散 2min, 立即转移至 100mL 量筒中, 记录此时的泡沫体积(V_1)。将量筒置于 25℃ 水浴保温, 记录不同时间量筒中泡沫的体积(V_2), 计算 SPI 泡沫稳定性。

$$\text{起泡性}/\% = \frac{V_1}{25} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{泡沫稳定性}/\% = \frac{V_2}{V_1} \times 100 \quad (4)$$

1.3.6 大豆分离蛋白乳化性与乳化稳定性的测定^[8]

用不同 pH 值缓冲溶液配制质量浓度为 1.0g/100mL 的 SPI 溶液, 室温搅拌溶解 30min。加入 6.0mL 大豆油, 以 10000r/min 均质分散 2min 后, 立即从底部吸取 100μL 乳浊液与 10.0mL 0.1g/100mL SDS 溶液混匀, 2min 后测定其在波长 500nm 处吸光度 A_1 , 该值即为 SPI 乳化活性 (emulsifying activity, EA)。12min 后再从底部吸取乳浊液, 与 10.0mL 0.1g/100mL SDS 溶液混匀后测定吸光度 A_t 。按式(5)计算乳化稳定性(emulsion stability, ES)。

$$ES/\text{min} = \frac{A_1}{A_1 - A_t} \times \Delta t \quad (5)$$

式中: Δt 为两次测定乳化活性的时间间隔/min。

1.3.7 发芽前后大豆分离蛋白分子质量的测定

SDS-PAGE 法^[9]: 采用 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶, 电泳电压 200V, 电流 100mA, 功率 50W。待溴酚蓝刚刚迁移出凝胶底部时终止电泳, 凝胶经考马斯亮蓝 R250 染色, 脱色液中漂洗脱色, 固定液处理后拍照。

2 结果与分析

2.1 发芽对大豆分离蛋白溶解性的影响

溶解性是蛋白质水化作用的重要体现, 也是蛋白质应用性的一个良好指标, 决定和影响着蛋白质其他功能特性, 如起泡性、乳化性、吸水性等^[10]。

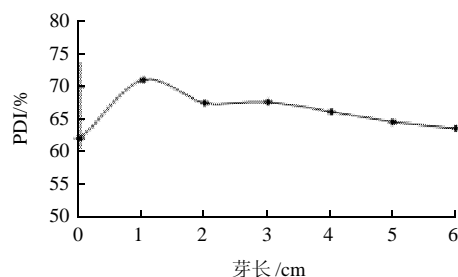


图1 pH7.0 时发芽大豆 SPI 的溶解性

Fig.1 Solubility at pH 7.0 of SPI from germinated soybean seeds at different stages of germination

由图1可见,在pH7.0的缓冲溶液中,芽长1cm大豆SPI的PDI最高为71.2%,然后,大豆SPI的PDI随芽长增加而降低,芽长5cm大豆SPI的PDI为64.7%,仅略高于未发芽大豆的62.2%。发芽大豆SPI溶解性提高的原因可能是内源蛋白酶活性提高^[11]并作用于大豆SPI,部分7S球蛋白和11S球蛋白被水解,使蛋白质分子部分展开,游离氨基与羧基增多,分子表面的电荷增多,离子相互作用增强,溶解度提高^[10,12]。随着内源蛋白酶不断作用,原本包含于蛋白分子内部的疏水基团暴露,疏水相互作用也随之增强,离子相互作用与疏水相互作用互有消长,从而表现出大豆SPI溶解度不再继续提高。

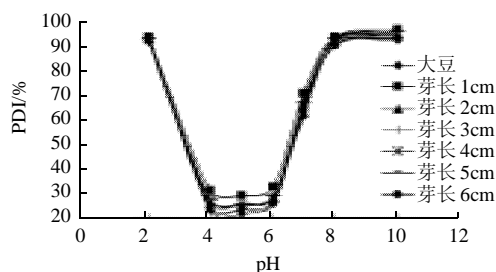


图2 pH值对不同芽长大豆SPI溶解性的影响

Fig.2 Effect of pH on the solubility of SPI from germinated soybean seeds at different stages of germination

图2反映出不同芽长大豆SPI溶解性随pH值的变化趋势相同,在pH4.0~6.0时,大豆SPI的PDI最低。这是由于大豆SPI主要是由11S蛋白和7S蛋白组成,它们的等电点为pH4.5~4.8。当环境pH值在等电点附近时,蛋白质分子所带静电荷几乎为零,分子间缺乏静电排斥作用,导致大豆SPI聚集沉淀,溶解度最低,呈现出U型曲线。

2.2 发芽对大豆分离蛋白吸水性和吸油性的影响

大豆蛋白多肽链上含有极性基团,可与水分子相互作用而发生蛋白质水化作用,表现为蛋白质的吸水性和持水性^[4]。其受大豆蛋白溶解性的影响,与大豆蛋白的其他功能性质如凝胶性、乳化性等有关。吸油性是蛋白吸附油脂的能力,大豆蛋白与甘油三酯可以形成蛋白-酯络合物,从而产生吸油性^[13],反映出蛋白疏水能力的强弱。

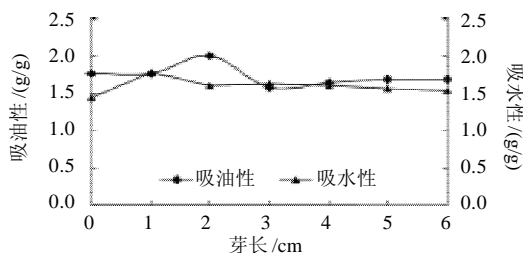


图3 不同芽长大豆SPI的吸水性和吸油性

Fig.3 Water absorption capacity and oil absorption capacity of SPI from germinated soybean seeds at different stages of germination

由图3可知,发芽大豆SPI吸水性变化趋势与其溶解性变化趋势一致,而吸油性变化趋势则相反。发芽大豆SPI的吸水能力均较未发芽大豆(1.44g/g)高,其中芽长1cm大豆SPI吸水能力最强为1.78g/g,其后随芽长增加SPI吸水能力逐渐降低,芽长6cm时SPI吸水能力为1.55g/g。SPI吸水性与吸油性变化的原因可能是发芽初期内源蛋白酶水解使SPI游离氨基与游离羧基增加,亲水性增强而疏水性降低。但内源蛋白酶不断作用又使原本包埋于蛋白分子内部的疏水基团大量暴露, SPI吸水性随之降低而吸油性升高。

2.3 发芽对大豆分离蛋白起泡性和泡沫稳定性的影响

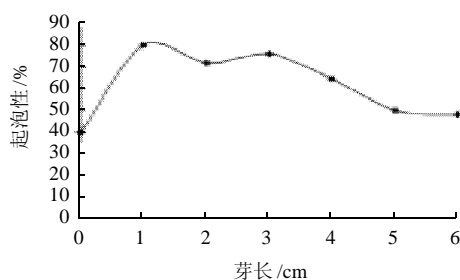


图4 不同芽长大豆SPI的起泡性

Fig.4 Foaming capacity of SPI from germinated soybean seeds at different stages of germination

起泡性和泡沫稳定性属于蛋白质的界面性质,也是影响许多食品口感和质构的重要因素。由图4可知,大豆发芽后SPI起泡性先增加,然后又逐渐降低。其中芽长1cm大豆SPI的起泡性最高为80.0%,比未发芽大豆提高近1倍。蛋白质的起泡性主要是可溶性蛋白质吸附于气-水界面而降低界面张力的结果^[4,14]。大豆发芽后,蛋白质被部分降解使其溶解度提高。降解的蛋白多肽链展开,易于快速吸附在气-液界面上^[15],形成较稳定的交联网络结构,使发芽SPI起泡性提高。但随着蛋白质进一步降解,疏水性基团不断暴露,蛋白多肽溶解性降低, SPI起泡性又降低。

表1 不同芽长大豆SPI的泡沫稳定性

Table 1 Foam stability of SPI from germinated soybean seeds at different stages of germination

芽长/cm	泡沫稳定性/%					
	2min	5min	10min	20min	30min	60min
0	90.0	90.0	86.0	80.0	80.0	77.0
1	83.3	75.0	66.7	65.6	58.3	58.3
2	88.5	85.8	78.9	70.9	68.6	66.6
3	86.7	82.7	73.3	66.7	63.0	60.3
4	87.5	84.2	75.0	68.7	66.7	65.3
5	89.5	86.8	80.9	72.9	69.3	67.6
6	90.0	90.0	85.0	75.0	72.0	71.0

表1则反映出发芽大豆SPI的泡沫稳定性较未发芽大

豆低。这是由于蛋白质起泡性和泡沫稳定性由不同的分子性质所决定,导致它们之间的关系一般是互逆的,呈现良好起泡性能的蛋白质泡沫稳定性通常较差。起泡性主要由蛋白质的溶解性、蛋白质分子在界面扩散的速度及界面张力等性质决定,而泡沫稳定性与蛋白质的水合、分子间相互作用有关^[4]。

2.4 发芽对大豆分离蛋白乳化活性和乳化稳定性的影响

大豆 SPI 同时含有疏水基团和亲水基团,亲水基团具有向油水界面扩散并吸附于界面的能力,能够降低油水界面的表面张力,利于形成乳浊液体系;而疏水性基团对稳定乳浊液起着一定作用^[14],因此 SPI 具有良好的乳化性质。

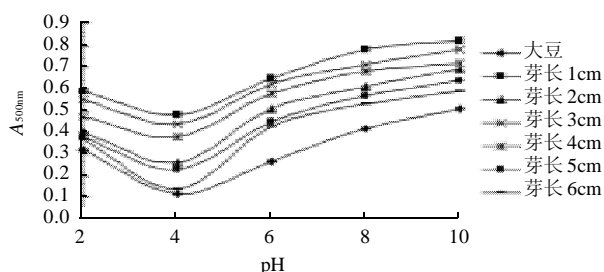


图5 不同芽长大豆 SPI 的乳化性

Fig.5 Emulsifying capacity of SPI from germinated soybean seeds at different stages of germination

由图 5 可见,发芽大豆 SPI 的乳化活性高于未发芽大豆,其中芽长 1cm 发芽大豆 SPI 的乳化性最高。这是由于大豆发芽后蛋白质被部分降解,游离氨基与羧基增多使蛋白质溶解度提高,向油水界面扩散与吸附能力增强,界面张力降低,乳化活性提高。不同芽长大豆 SPI 的乳化活性随环境 pH 值的变化趋势与其溶解性随 pH 值的变化趋势一致,说明大豆 SPI 乳化性与其溶解性正相关。

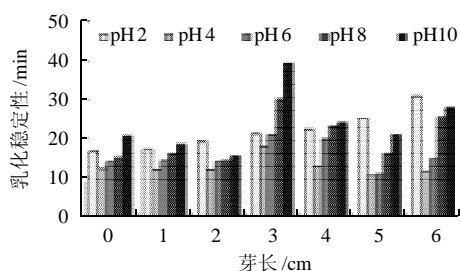
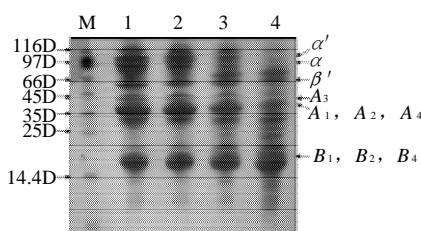


图6 不同芽长大豆 SPI 的乳化稳定性

Fig.6 Emulsion stability of SPI from germinated soybean seeds at different stages of germination

由图 6 可见,发芽大豆 SPI 的乳化稳定性随豆芽长度的增加先降低,然后又有所提高。分析认为该结果与内源蛋白酶的水解使蛋白质内疏水性基团不断暴露有关,也与蛋白质乳化性和乳化稳定性一般不存在相关性一致^[4]。

2.5 发芽前后大豆分离蛋白分子的变化



M标准蛋白; 1.大豆; 2.芽长 1.0cm;
3.芽长 4.0cm; 4.芽长 7.0cm。

图7 发芽大豆分离蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.7 SDS-PAGE patterns of SPI from germinated soybean seeds at different stages of germination

为了明确大豆发芽前后大豆 SPI 变化对其功能性质的影响,采用 SDS-PAGE 法分析了不同芽长大豆 SPI 亚基分子质量变化。由图 7 可见,大豆 SPI 电泳图谱区带清晰,而发芽后 SPI 电泳区带密度逐渐降低。分子质量较大的 SPI 亚基迅速减少甚至消失,而分子质量较小的区带出现或密度增加,表明发芽大豆 SPI 发生降解。

大豆 SPI 根据超速离心时沉降系数不同,分为 2S、7S、11S 和 15S 蛋白,其中主要由 7S 和 11S 球蛋白组成,两者之和占 SPI 70% 以上。7S 球蛋白分为 β -大豆伴球蛋白、 γ -大豆伴球蛋白和碱性 7S 球蛋白,其中 β -大豆伴球蛋白是主要成分,所以通常又将 7S 球蛋白称为 β -伴大豆球蛋白或伴大豆球蛋白^[16]。7S 球蛋白是三聚体,分子质量约为 180kD,由 α' 、 α 、 β 3 个亚基组成^[17],各亚基的分子质量约为 α' 78000D、 α 75000D、 β 47000D^[18],各亚基之间几乎无二硫键连接。11S 球蛋白是单一球蛋白^[16],由 6 个亚基聚集而成,分子质量约为 320~380kD,其各亚基的分子质量分别为 A_3 37kD, A_1 、 A_2 34000D, A_4 35000D, B_3 23000D, B_1 、 B_2 、 B_4 22000D^[18]。每个亚基由一条酸性多肽链 A 和一条碱性多肽链 B 通过二硫键连接而成^[18-19]。

对比图 7 电泳区带发现,大豆发芽后 7S 球蛋白的 β 亚基与 11S 球蛋白的碱性亚基 B 等没有明显变化。7S 球蛋白的 α' 、 α 亚基和 11S 球蛋白的酸性亚基 A_3 区带在发芽 1cm 时没有明显变化,芽长 4cm 时电泳区带逐渐变细,芽长 7cm 时亚基区带几乎消失。而 11S 球蛋白碱性亚基 B_3 随着发芽时间的延长条带逐渐清晰。因此可推知大豆发芽使 7S 球蛋白的 α' 、 α 亚基和 11S 的酸性亚基 A_3 明显降解,而分子质量较小的 B_3 和 B 亚基的电泳区带蛋白质有明显的增加,并且大豆 11S 球蛋白比 7S 球蛋白变化小,这可能与它们的结构有关。7S 球蛋白由 3 个亚基组成,容易受到外界影响而发生聚合和解聚;11S 球蛋白由酸性亚基和碱性亚基构成两个环状六角形结构,具有一定的刚性,受外界影响较小^[9]。

SDS-PAGE 图谱显示, 发芽大豆中蛋白质受内源蛋白酶作用明显。一方面, 发芽使 SPI 发生部分降解, 极性基团如游离氨基与羧基增多, SPI 溶解性提高。另一方面, 7S 球蛋白和 11S 球蛋白组成结构存在差异, 7S 球蛋白较 11S 球蛋白更容易发生解聚, 由于 7S 球蛋白含有较多疏水氨基酸, 蛋白降解使更多疏水性基团暴露, 从而使 SPI 的溶解性、起泡性和乳化性等有所降低。

3 结 论

采用碱提酸沉法分离了不同芽长大豆的 SPI 并研究了它们的功能性质。结果发现发芽大豆的溶解性、吸水性、起泡性和乳化性等均较未发芽大豆高, 其中芽长 1cm 大豆 SPI 的功能性质最佳, 说明发芽可以部分改善大豆蛋白的功能性质。通过 SDS-PAGE 电泳法分析不同芽长大豆 SPI 的相对分子质量变化, 可以发现发芽大豆 SPI 中 7S 球蛋白的 α' , α 亚基和 11S 球蛋白的酸性亚基 A_3 、 A 明显降解, 而 11S 球蛋白的碱性亚基 B 、 B_3 变化较小, 说明 7S 球蛋白更易被大豆内源蛋白酶水解。由于 7S 球蛋白含有更多的疏水性氨基酸, 其水解的结果使疏水性基团暴露, SPI 的溶解性随其不断降解而降低, 从而导致大豆 SPI 功能性质不能持续提高。从大豆加工的角度看, 适度发芽不仅可以改善大豆的营养结构, 而且可以提高大豆的加工性能, 是大豆加工中值得推广的一种工艺技术。

参考文献:

- [1] 朱新荣, 胡筱波, 潘思轶, 等. 大豆发芽期间多种营养成分变化的研究[J]. 中国酿造, 2008, 189(12): 64-66.
- [2] 廖明星, 顾振新, 麻浩, 等. 发芽大豆的营养价值及其复合乳生产技术[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(8): 36-39.
- [3] 景岚, 鲁战会, 胡代欣, 等. 发芽大豆及其豆腐制品的抗氧化性研究[J]. 食品科技, 2007(9): 69-71.
- [4] 赵新淮, 徐红华, 姜毓君. 食品蛋白质: 结构、性质与功能[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [5] 陈莉, 钟芳, 王璋. 凝固剂及凝固条件对大豆蛋白胶凝性质的影响[J]. 中国乳品工业, 2004, 32(9): 23-27.
- [6] SINHA R, RADHA C, PRAKASH J, et al. Whey protein hydrolysate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation[J]. Food Chem, 2007, 101: 1484-1491.
- [7] PEDROCHE J, YUST M M, LQARI H, et al. *Brassica carinata* protein isolates: chemical composition, protein characterization and improvement of functional properties by protein hydrolysis[J]. Food Chem, 2004, 88: 337-346.
- [8] PEARCE K N, KINSELLA J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique[J]. J Agric Food Chem, 1978, 26(3): 716-723.
- [9] 高丽, 张声华. 大豆蛋白凝胶前后 SDS-PAGE 图谱比较分析[J]. 粮油食品科技, 2009, 17(3): 25-27.
- [10] 苏丹, 李树君, 赵凤敏. 超高压对大豆蛋白结构和功能性质影响研究进展[J]. 包装与食品机械, 2009, 27(5): 111-115.
- [11] 付红岩, 马莺. 大豆发芽过程中内源酶对蛋白水解的研究[J]. 食品工业科技, 2003(增刊 1): 32-34.
- [12] 李迎秋, 陈正行. 高压脉冲电场对大豆分离蛋白功能性质的影响[J]. 农业工程学报, 2006, 22(8): 194-198.
- [13] 张钟, 王华. 不同干燥方法对大豆分离蛋白功能性质的影响[J]. 食品与机械, 2003(2): 11-13.
- [14] 黄友如, 华欲飞, 裘爱泳. 大豆分离蛋白功能性质及其影响因素[J]. 粮食与油脂, 2003(5): 12-15.
- [15] WAGNER J R. Thermal and electrophoretic behavior, hydrophobicity, and some functional properties of acid treated soy protein isolates[J]. J Agric Food Chem, 1996, 44(7): 1881-1889.
- [16] 王丽, 张英华. 大豆分离蛋白的凝胶性及其应用的研究进展[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(4): 96-99.
- [17] MARUYAMA N, FUKUDA T, SAKA S, et al. Molecular and structural analysis of electrophoretic variants of soybean seed storage proteins[J]. Phytochemistry, 2003, 64: 701-708.
- [18] ZARKADAS C G, GAGNON C, GLEDDIE S, et al. Assessment of the protein quality of fourteen soybean [*Glycine max*(L.) Merr.] cultivars using amino acid analysis and two-dimensional electrophoresis[J]. Food Res Inter, 2007, 40: 129-146.
- [19] ZARKADAS C G, GAGNON C, POYSA V, et al. Protein quality and identification of the storage protein subunits of tofu and null soybean genotypes, using amino acid analysis, one and two-dimensional gel electrophoresis, and tandem mass spectrometry[J]. Food Res Inter, 2007, 40: 111-128.