

金属离子对地衣芽孢杆菌合成多聚 γ -谷氨酸的影响

杨 革^{1,2} 陈 坚^{1*} 曲音波² 伦世仪¹

¹(江南大学工业生物技术教育部重点实验室,无锡 214036)

²(山东大学微生物技术国家重点实验室,济南 250100)

关键词 金属离子, 地衣芽孢杆菌, 多聚 γ -谷氨酸

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)06-0706-04

多聚 γ -谷氨酸 [γ -Poly(glutamic acid), γ -PGA] 是由某些杆菌 (*Bacillus*) 合成的一种细胞外水溶性高分子氨基酸聚合物, 是由 L-谷氨酸、D-谷氨酸两种构型的单体通过 γ -酰胺键聚合形成的^[1]。 γ -PGA 具有极佳的成膜性、成纤维性、阻氧性、可塑性、粘结性、保湿性和可生物降解等许多独特的理化和生物学特性^[2,3]。因此, γ -PGA 可以被广泛用于医药制造, 食品加工, 蔬菜、水果、海产品防冻、保鲜, 化妆品工业, 烟草、皮革制造工业和植物种子保护等许多领域, 是一种有极大开发价值和前景的多功能新型生物制品^[4-6]。国外如日本、美国等国家自 20 世纪 90 年代初开展了一些利用深层发酵生产多聚 γ -谷氨酸的研究^[5-7], 国内还未见文献报道。

金属离子是微生物正常代谢必不可少的一类营养物质^[8], 因此, 本文对培养基中金属离子对菌体生长及 γ -PGA 代谢的影响情况进行研究, 以期了解不同金属元素对 γ -PGA 合成及其结构组成的调控作用。

1 材料与方法

1.1 菌种

地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) WBL-3, 为本实验室选育的菌株。

1.2 培养基与培养方法

1.2.1 斜面培养基: Tartof-Hobbs 培养基^[9]。

1.2.2 发酵培养基 (g/L): 柠檬酸 10, 谷氨酸 20, 氯化铵 4, K_2HPO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.02, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05, pH 7.5, 去离子水配制。

1.2.3 细菌培养: 取新鲜斜面菌种一环, 接种于种子瓶, 37℃, 200r/min 培养 48h, 然后按 5% 接种量, 将种子培养液转到发酵摇瓶内, 200r/min, 37℃ 培养。

1.3 分析方法

1.3.1 生物量的测定: 540nm 光密度和使用干重法。

1.3.2 金属离子含量的测定: 用原子吸收分光光度法^[10], 仪

器为日本 HITACHI 180-80。

1.3.3 γ -PGA 的测定: 采用 Goto 等法^[5]。

1.3.4 1% γ -PGA 溶液粘度测定: 用“Brook field”LVTD 型粘度计, 22℃, 0# 转子, 60r/min 测定。

1.3.5 γ -PGA 中 D-谷氨酸含量的测定: 采用 Birrer 等法^[7]。

2 结果与讨论

2.1 地衣芽孢杆菌 WBL-3 生产多聚 γ -谷氨酸的发酵过程

在发酵培养基中加入 $CaCl_2$ 0.2g/L, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 0.1g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03g/L, $CoCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02g/L, 研究 γ -PGA 的生产过程及金属离子的消耗。图 1 中列出了产氨基酸聚合物过程中, 菌体生长、多聚 γ -谷氨酸和 pH 值随时间的变化情况。实验结果表明: 培养液中的 γ -PGA 合成量第 1 天很低, 而生物量增加很快, 说明第 1 天主要是菌体细胞的生长。从第 2 天开始, pH 值下降到最低点 5.58, 多聚 γ -谷氨酸开始不断大量合成, 随着 pH 的上升, 生物量有所下降, 而 γ -PGA 在培养液中的浓度不断增高。在发酵的第 2~3 天, γ -PGA 合成量有较大幅度的提高, 由 3.21g/L 上升至 8.11g/L。

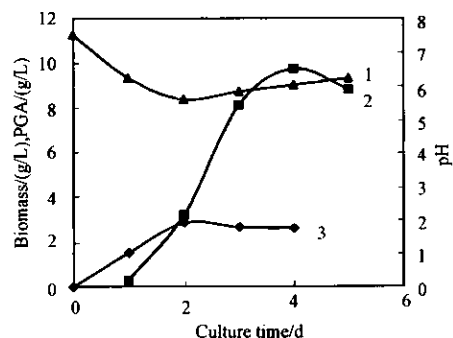


图 1 地衣芽孢杆菌 WBL-3 产 γ -PGA 历程

Fig.1 Kinetic course of γ -PGA production by

Bacillus licheniformis WBL-3

1. pH; 2. γ -PGA; 3. Biomass

收稿日期: 2001-04-18, 修回日期: 2001-08-20。

基金项目: 教育部高等学校重点实验室访问学者基金资助项目 (Y66002)。

* 通讯作者。 Tel: 86-510-5888301; Fax: 86-510-5888301; E-mail: jchen@mailbox.wxuli.edu.cn

γ -PGA 合成量与生物量增加并不同步,在产 γ -PGA 第 2 天,生物量达到最大值 2.84g/L,而 γ -PGA 达到最大值 9.73g/L 的时间是发酵培养的第 4 天。

2.2 多聚 γ -谷氨酸发酵过程中金属离子的消耗

在菌体细胞生长及多聚 γ -谷氨酸合成过程中,一些金属离子消耗随时间变化的情况见表 1。 K^+ 是细胞中的重要阳离子之一,它能参与细胞内许多物质的运输系统的组成^[8],所以多聚物发酵前 2 天的利用较多,分别为 5.88mg/d 和 6.13mg/d。 K^+ 也是多种酶的激活剂,故在后几天也有相当数量的利用。

菌体生长期间(第 1 天)对 Ca^{2+} 有较大的吸收利用,达到 0.87mg/d。 Ca^{2+} 存在于细胞中,控制细胞的生理状态,调节质膜的通透性,维持细胞体内的渗透压等。^[8] 因此,在菌体生长的旺盛期消耗较多。同时 Ca^{2+} 也是一些酶的激活剂对它的利用在第 3 天也达到 0.55mg/d,随后有所下降。结合图 1 可知,第 3 天 γ -PGA 合成量有较大幅度的增加,从 3.21g/L 增至 8.11g/L,而生物量没有大的变化,说明在此期间,利用的 Ca^{2+} 可能主要用于合成 γ -PGA 合成酶系。

Mg^{2+} 能促进碳源的分解,加速菌体能量代谢,另外 Mg^{2+} 有助于细胞维持有氧氧化,因此在菌体生长旺盛期内 Mg^{2+} 的吸收达到最大值 3.13mg/d,同时 Mg^{2+} 又是 K^+ 、 Ca^{2+} 进出细胞所必需。在发酵后期,由于发酵液粘度增大,造成供氧不足,无氧酵解途径使乳酸生成,适量的 Mg^{2+} 浓度有助于减少乳酸的产生,所以在随后的发酵过程中,还是利用相当数量的 Mg^{2+} 。结合图 1 可知, Mg^{2+} 对菌体生长、 γ -PGA 的合成均有一定的影响。

对 Fe^{3+} 的利用在第一天的吸收利用程度较高,达到 0.32mg/d。因为 Fe^{3+} 是微生物细胞内过氧化氢酶等一系列酶的组成元素^[8],所在菌体细胞生长旺盛期内吸收得较多。在产 γ -PGA 第 3 天,对 Fe^{3+} 的利用达到最大值 0.38mg/d。结合图 1 可知, Fe^{3+} 对 γ -PGA 合成酶系的合成有很大的影响。

菌体生长及 γ -PGA 合成过程中对 Mn^{2+} 的利用规律与对 Mg^{2+} 利用的规律较相似,对 Mn^{2+} 的利用在产 γ -PGA 第二天达 1.06mg/d,第三天达到最大值为 1.54mg/d。在微生物细胞内的许多酶反应中, Mn^{2+} 是激活剂,其激活作用可部分地替代 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 共同促进激活酶的反应以弥补 Mg^{2+} 的不足。从图 1 中可以看出, Mn^{2+} 对 γ -PGA 合成的影响很大。

对 Co^{2+} 的利用在前 2 天内较少,均为 0.04mg/d,由此可知, Co^{2+} 对菌体的生长没有太大的促进作用。 Co^{2+} 是肽酶的辅因子,也能使许多酶活化^[8],因此 γ -PGA 合成量大幅度上升的时间(产 γ -PGA 第 3~4 天),对 Co^{2+} 有较大幅度的利用,说明 Co^{2+} 离子对 γ -PGA 的合成有一定的作用。

Zn^{2+} 与 Co^{2+} 消耗规律相似,又因为 Zn^{2+} 是细胞中碱性磷酸酶、脱氢酶、肽酶和脱羧酶的辅因子^[8],所以在产 γ -PGA 的每一天都有一定量的利用。

Mo^{6+} 作为微生物代谢过程中必需的微量元素之一,在构建一些特殊分子结构时起着关键作用^[8],在产 γ -PGA 的第

3 天,对 Mo^{6+} 利用达到最大值 23.76mg/d,结合图 1 可知, Mo^{6+} 对 γ -PGA 的合成有很大影响。

表 1 产 γ -PGA 培养液中金属离子消耗随时间的变化(mg/100mL)
Table 1 Changes of consumption of metal ions in the medium

Metal ion	1st day	2nd day	3rd day	4th day
K	5.88	6.13	4.01	3.10
Ca	0.87	0.60	0.55	0.24
Mg	0.18	3.13	2.91	1.16
Fe	0.32	0.06	0.38	0.07
Mn	0.02	1.06	1.54	1.12
Co	0.04	0.04	0.30	0.46
Zn	0.06	0.06	0.37	0.55
Mo	0.08	0.19	23.76	19.48

2.3 不同金属离子浓度对地衣芽孢杆菌的生长、 γ -PGA 的合成及其结构组成的影响

2.3.1 Mn^{2+} 离子对 γ -PGA 发酵的影响:以发酵培养基为基础,分别添加不同浓度的 Mn^{2+} 进行 γ -PGA 发酵实验。结果表明(见表 2),在不含有 Mn^{2+} 的培养基中,没有 γ -PGA 的产生,随着 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 在培养基中的浓度从 0.02g/L 增至 0.12g/L, γ -PGA 的产量也从 1.58g/L 增至 8.79g/L,但对生物量没有显著的影响。另外,值得注意的是 Mn^{2+} 离子浓度变化明显影响着 γ -PGA 的结构组成,随着 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 浓度从 0.02g/L 增至 0.40g/L,D-谷氨酸在 γ -PGA 的比例也从 32% 增至 88%。当 Mn^{2+} 浓度大于 0.6g/L 时,对菌体的生长和 γ -PGA 的合成起抑制作用趋于明显。

表 2 Mn^{2+} 对地衣芽孢杆菌合成 γ -PGA 的影响
Table 2 Effect of Mn^{2+} on γ -PGA synthesis by *Bacillus licheniformis*

$MnSO_4 \cdot H_2O/(g/L)$	Biomass/(g/L)	γ -PGA/(g/L)	D-Glu/%
0	1.53	0	—
0.02	2.13	1.58	32
0.04	2.37	7.44	38
0.06	2.35	7.37	43
0.08	2.44	7.49	44
0.10	2.48	8.17	49
0.12	2.46	8.79	52
0.14	2.51	7.43	75
0.20	2.48	6.25	84
0.40	2.36	7.84	88
0.60	1.07	3.34	88

2.3.2 Ca^{2+} 离子对 γ -PGA 发酵的影响: $MnSO_4 \cdot H_2O$ 在基础发酵培养基中的浓度为 0.12g/L 的情况下,考察了不同 Ca^{2+} 浓度对发酵的影响。表 3 表明,在培养基中缺乏 Ca^{2+} 时,即使 Mn^{2+} 浓度适宜,也得不到最大产量的 γ -PGA,只有 $CaCl_2$ 在培养基中的浓度达到 0.20g/L 时, γ -PGA 产量才能较高。 $CaCl_2$ 浓度过高过低对 D-谷氨酸在 γ -PGA 中的比例和菌体生物量影响不大,其 D-谷氨酸在 γ -PGA 的比例始终处于 50% 左右。

表 3 Ca^{2+} 对地衣芽孢杆菌合成 γ -PGA 的影响

Table 3 Effect of Ca^{2+} on γ -PGA synthesis by *Bacillus licheniformis*

$\text{CaCl}_2/(g/L)$	Biomass/(g/L)	γ -PGA/(g/L)	D-Glu/%
0	2.461	8.27	48
0.1	2.55	9.14	51
0.2	2.64	12.34	51
0.6	2.60	12.18	49
1.0	2.58	12.42	50
2.0	2.50	12.34	48

2.3.3 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 对 γ -PGA 发酵的影响:表 4、表 5 分别为 Zn^{2+} 和 Co^{2+} 对地衣芽孢杆菌合成 γ -PGA 的影响。实验结果表明: Zn^{2+} 和 Co^{2+} 浓度的变化对生物量和 γ -PGA 合成量没有明显的影响,在影响 D-谷氨酸在 γ -PGA 中的比例方面与 Mn^{2+} 有相似的功能效率,即随着 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 浓度在培养液中的不断增加,D-谷氨酸在 γ -PGA 中的比例从约 50% 增至约 88%。培养基中高浓度的 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 也不能使 D-谷氨酸在 γ -PGA 中的含量超过 88%,实验还发现,高浓度的 Co^{2+} 和 Mn^{2+} 对 γ -PGA 发酵也有同样的效应。由此说明,培养基中 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 的同时存在并不能引起 γ -PGA 发酵的累加效应。

表 4 Zn^{2+} 对地衣芽孢杆菌合成 γ -PGA 的影响

Table 4 Effect of Zn^{2+} on γ -PGA synthesis by *Bacillus licheniformis*

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /(g/L)	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /(g/L)	Biomass /(g/L)	γ -PGA	D-Glu/%
0	0.12	2.64	8.83	51
0.0006	0.12	2.66	8.90	55
0.003	0.12	2.66	8.80	64
0.024	0.12	2.70	9.10	76
0.048	0.12	2.68	9.27	85
0.096	0.12	2.54	9.05	86
0	0.48	2.68	8.11	86
0.048	0.48	2.57	8.10	87

表 5 Co^{2+} 对地衣芽孢杆菌合成 γ -PGA 的影响

Table 5 Effect of Co^{2+} on γ -PGA synthesis by *Bacillus licheniformis*

$\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /(g/L)	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /(g/L)	CaCl_2 /(g/L)	Biomass /(g/L)	γ -PGA /(g/L)	γ -Glu /%
0.0002	0	0	2.53	8.32	45
0.002	0	0	2.68	8.54	64
0.02	0	0	2.55	9.18	73
0	0.12	0.20	2.65	9.48	48
0.0002	0.12	0.20	2.61	8.71	50
0.004	0.12	0.20	2.66	8.51	54
0.02	0.12	0.20	2.58	8.55	67
0.08	0.12	0.20	2.60	9.01	85
0.32	0.12	0.20	2.47	8.89	88
0.08	0.48	0.20	2.50	10.33	88

2.3.4 Mo^{6+} 离子对 γ -PGA 发酵的影响:在前期研究氮源对 γ -PGA 发酵的影响时,首先发现钼酸铵对 γ -PGA 合成有显著的促进作用。表 6 表明, Mo^{6+} 利于 γ -PGA 合成,但随着 Mo^{6+} 浓度的增加,发酵液粘度有明显的下降,钼酸铵浓度为 0.25g/L 时,发酵液粘度最高,所合成的 γ -PGA 也较多,由此说明适量添加 Mo^{6+} 既利于合成大分子的 γ -PGA,又利于 γ -PGA 在发酵液中的积累。然而 Mo^{6+} 的浓度变化对生物量和 D-谷氨酸在 γ -PGA 中的比例影响不明显,另外, Mo^{6+} 和 Mn^{2+} 在促进 γ -PGA 合成方面具有一定的协同作用,但发酵液中没有 Mn^{2+} 存在时,即使在高浓度的 Mo^{6+} 条件下,也几乎检测不到 γ -PGA。

表 6 Mo^{6+} 对地衣芽孢杆菌合成 γ -PGA 的影响

Table 6 Effect of Mo^{6+} on γ -PGA synthesis by *Bacillus licheniformis*

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ /(g/L)	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /(g/L)	Biomass /(g/L)	Viscosity /cp*	γ -PGA /(g/L)	D-Glu /%
0	0.12	2.54	77.7	8.43	51
0.05	0.12	2.48	77.6	8.87	48
0.10	0.12	2.57	77.6	8.89	48
0.15	0.12	2.52	77.9	9.03	49
0.20	0.12	2.60	86.6	10.15	52
0.25	0.12	2.61	89.7	11.74	51
0.30	0.12	2.58	81.3	12.01	49
0.35	0.12	2.64	80.9	12.23	52
0.40	0.12	2.61	72.8	13.74	52
2.00	0	2.50	51.3	—	—
4.00	0.48	2.81	44.4	17.13	87

* 0 spindle

2.3.5 其它一些无机金属离子对 γ -PGA 发酵的影响:在基础发酵培养基中分别加入不同浓度的 K^+ 、 Mg^{2+} 和 Fe^{3+} ,实验表明,它们对菌体的生长及 γ -PGA 的合成是必需的,但浓度过高或过低都对菌体的生长、 γ -PGA 的合成有抑制作用,并且三种金属离子不能引起 D-谷氨酸在 γ -PGA 中的比例变化,这一点与 Ca^{2+} 影响效应类似。实验表明, K_2HPO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 适宜菌体生长及 γ -PGA 合成的浓度分别为 0.8、0.60 及 0.06g/L。

3 结 论

通过以上研究表明, Mn^{2+} 、 K^+ 、 Fe^{3+} 和 Mg^{2+} 对地衣芽孢杆菌的生长及 γ -PGA 的合成是必需的营养物质。 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 能促进 γ -PGA 的生物合成,并可提高 γ -PGA 中 D-谷氨酸含量的组成。因此, Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 很可能是 γ -PGA 合成酶的活性成分或激活剂。但 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 的组合在影响 γ -PGA 生物合成及其结构组成方面,并不能产生累加效应,因此,从经济的角度考虑,在培养基中只添加 Mn^{2+} 就可以了。

当固定 Mn^{2+} 浓度时,只要适当增大 Ca^{2+} 、 Mo^{6+} 离子浓度就能较大幅度地提高 γ -PGA 的产量。改变 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 在培养基中的浓度(从 0.02g/L 到 0.48g/L),可以得到不同 D-谷

氨酸含量的 γ -PGA。据文献报道,D 型氨基酸已被广泛应用半合成抗生素、激素、活性多肽及化学杀虫剂等方面^[11],因此,研究 Mn^{2+} 的影响效应是很有意义的。

通过以上试验可以得出一种改良培养基,此培养基只是在基础发酵培养基上添加了 Ca^{2+} 、 Mo^{6+} 和改变了原有各离子浓度,其金属离子成分为(g/L): K_2HPO_4 0.80、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6、 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.06、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.20、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.12、 $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 0.25。固定 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 浓度,用两种培养基分别进行发酵实验,结果表明,改良后的培养基更有利于菌体的生长及 γ -PGA 的合成。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Perez-Camero G, Congregado F. Biosynthesis and ultrasonic degradation of bacterial poly (γ -glutamic acid). *J. Bio Biotech Bioeng*, 1999, 63(1):110 ~ 115
- [2] XIE Q L(谢秋玲), GUO Y(郭勇). *Natto*-a kind of activable food. *Science and Technology of Food Industry*(食品工业科技), 1999, 20(1):71 ~ 72
- [3] GUITIANYINGJUN, NANBUYANGZI, YUANTENGANG. Properties of γ -(glutamic acid) produced by microbiology. *Chemistry and Ad-hesien*, 1994, 4:244 ~ 246
- [4] XU F H(徐风华), JIANG X T(蒋雪涛). Preparation and in vitro activity of monoclonal antibody-pharmorubicin immunoconjugates. *Acta Pharmacologica Sinica*(药学报), 1996, 31(8):632 ~ 636
- [5] Atsuo G, Masaok Biosynthesis and hydrolysis of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335. *Biosci Biotech Biochem*, 1992, 56(7):1031 ~ 1035
- [6] Masata M, Akinori M. Relationship between the antifreeze activities and the chemical structures of oligo-and poly (glutamic acid). *J. Agric Food Chem*, 1991, 46, 891 ~ 895
- [7] Birrer G A, Cromwick A - M. γ -Poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis*: physiological and biochemical studies. *Int J Biol Macromol*, 1994, 16:265 ~ 275
- [8] ZHOU D Q(周德庆). *Microbiology*(微生物学教程), Beijing: Higher Education Press, 1996, pp.104 ~ 106
- [9] Sombrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed*, Cold Spring harbor Lab. Press, 1989, p.909
- [10] Lvov B V. *Atomil Assorption Spectrochemical Analysis*. American Elsevier Publishing Company Zne, 1970, pp.243 ~ 369
- [11] Tripathi C K M, Vinod Bihari, Tyagi R D. Microbial production of D-amino acids. *Process Biochem*, 2000, 35:1247 ~ 1251

Effects of Metal Ions on γ -Poly (Glutamic acid) Synthesis by *Bacillus licheniformis*

YANG Ge^{1,2} CHEN Jian^{1*} QU Yin-Bo² LUN Shi-Yi¹

¹(The Key lab. of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yantze University, Wuxi 214036, China)

²(State Key Lab. of Microbial Technology, Shandong University, Ji'nan 250100, China)

Abstract In the course of γ -poly (glutamic acid) γ -PGA fermentation, metal ions K^+ , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mo^{6+} , Mn^{2+} , Co^{2+} and Zn^{2+} in the medium have certain effects on the synthesis of γ -poly(glutamic acid). Excess or lack of K^+ , Mg^{2+} and Fe^{3+} results in reduced yield of γ -PGA. It was found that the γ -PGA synthesis by *Bacillus licheniformis* was promoted obviously by Ca^{2+} and Mo^{6+} . Synthesis and stereochemical composition of γ -PGA was greatly regulated by Mn^{2+} . γ -PGA was not produced without Mn^{2+} in medium, and with the increase of Zn^{2+} concentration the yield of γ -PGA and the proportion of D-glutamic acid in the peptide increase. Regulative effect of Co^{2+} and Zn^{2+} was almost the same as that of Mn^{2+} , thus the combination of Mn^{2+} , Co^{2+} can't enhance γ -PGA synthesis and affect stereochemical composition of γ -PGA. Based on the experimental date, an appropriate formulation of metal ions in the medium for γ -PGA production was obtained.

Key words metal ions, *Bacillus licheniformis*, γ -poly(glutamic acid)

Received: April 18, 2001

This work was supported by Grant from Visiting Scholar Foundation of Key Laboratory in University, Ministry of Education of China (Y66002)

* Corresponding author. Tel: 86-510-5888301; Fax: 86-510-5888301; E-mail: jchen@mailbox.wxuli.edu.cn