

基于自适应罚函数的 QPSO 算法的代谢通量评估*

龙海侠, 张秀虹

(海南师范大学 信息科学技术学院, 海口 571158)

摘 要: 针对代谢通量评估问题属于带约束的优化问题,其目标函数是一个非线性、不可微的并且存在多个局部最小点的复杂函数,提出了使用自适应罚函数的量子粒子群优化算法来解决这个问题。通过自适应罚函数的方法解决约束条件,然后使用 QPSO 算法最小化内部代谢通量。用此算法评估谷氨酸棒杆菌的内部代谢通量并与传统的优化算法来比较,实验结果证明了该算法的可行性和有效性。

关键词: 代谢通量评估; 带约束优化; 量子粒子群优化算法; 自适应罚函数

中图分类号: TP301.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-3695(2012)04-1227-03

doi:10.3969/j.issn.1001-3695.2012.04.007

Metabolic flux estimation based on quantum-behaved particle swarm optimization with self-adaptive penalty function

LONG Hai-xia, ZHANG Xiu-hong

(School of Information Science & Technology, Hainan Normal University, Haikou 571158, China)

Abstract: Metabolic flux estimation corresponds to a constrained optimization problem, objective function of which is non-linear and non-differentiable and exists multiple local minima making this problem a special difficulty. This paper proposed quantum-behaved particle swarm optimization (QPSO) with self-adaptive penalty function to solve ^{13}C -based metabolic flux estimation problem. The method transformed the stoichiometric constraints to an unconstrained one, by penalizing the constraints and building a single objective function, which in turn was minimized using QPSO algorithm for flux quantification. The proposed algorithm was applied to estimate the central metabolic fluxes of corynebacterium glutamicu and compared with conventional optimization technique. Experimental results illustrate that this algorithm is feasibility and validity.

Key words: metabolic flux estimation; constrained optimization problem; quantum-behaved particle swarm optimization; self-adaptive penalty function

代谢通量分析 (metabolic flux analysis, MFA) 是指导代谢工程的重要方法,其目的是在给定的细胞代谢模型的条件下载化所有的细胞内代谢通量(代谢物的转换速率),可以表征细胞的代谢能力,洞察遗传修饰对细胞代谢状态的影响,从而为进一步更加合理的遗传改造提供理论依据。

代谢通量分析普遍的方法是基于系统的化学计量信息,化学计量矩阵描绘出了代谢通量在不同反应池之间的流动平衡^[1,2]。然而,当系统中存在平衡的反应或循环的路径,基于化学计量的分析方法就不再适用,比如考虑代谢系统中的 TCA (tricarboxylic acid cycle),基于化学计量的分析方法就阻碍了代谢通量的精确评估^[3]。

化学计量方法的缺点导致了以 ^{13}C 标记实验为基础的 ^{13}C MFA 方法的产生^[4],进行 ^{13}C MFA 包括以下几个步骤:定向细胞的培养和测量、构建 CLE 数学模型、代谢通量分布的评估、数学统计分析。在这些步骤中,最具挑战性的任务是代谢通量的评估,它实际上是一个高维解空间的非线性不可微的优化问题。到目前为止,已使用了多种优化技术来解决这个问题,如模拟退火^[4]、进化策略^[5,6]、遗传算法^[7]、基于空间分支和边界的优化技术^[8]。在代谢通量评估过程中,上面这些优化技术在算法的性能和健壮性方面都表现出了它们的优缺点。与数

学规划相比,由于进化算法在解决高维问题时具有强大的搜索能力,因此比较适合于解决代谢通量评估问题,但是此算法在计算效率和收敛性方面的性能比较低^[9]。本文使用 QPSO 算法^[10,11]和自适应罚函数^[12]来解决代谢通量的评估问题。QPSO 算法具有全局收敛性、控制参数少、收敛速度快、寻优能力强等特点,自适应罚函数的方法简单地解决了评估过程中的约束条件。该方法用在谷氨酸棒杆菌的主要代谢通量的评估上并与其他优化技术的结果作了比较。

1 以 ^{13}C 标记实验为基础的代谢通量评估模型

在构造模型之前,首先介绍下面符号的含义:

S 是一个 $m \times n$ 的化学计量矩阵, m 为中间代谢产物的个数, n 为反应或代谢流的个数。矩阵中的元素 S_{ij} 表示第 i 个反应第 j 个反应物的化学计量系数。

V^0 表示图 1 中所有的流; V 表示细胞内的流; $\bar{V}$ 表示细胞外的流; X^0 表示代谢网络中所有富集度的分值; X 表示代谢网络中所有代谢物的细胞内富集度的分值; $\bar{X}$ 表示代谢网络中所有代谢物的细胞外富集度的分值。

显然有下面的关系:

收稿日期: 2011-09-10; 修回日期: 2011-11-01 基金项目: 海南省自然科学基金资助项目(611131,610223)

作者简介: 龙海侠(1980-),女,江苏徐州人,副教授,博士,主要研究方向为生物信息(haixia_long@163.com);张秀虹(1968-),女,山东青岛人,教授,硕士,主要研究方向为人工智能。

$$V^0 = V \cup \tilde{V}, \quad X^0 = X \cup \tilde{X}$$

反应方程式给出了生物化学反应网络中的代谢物之间的关联,它定义了每一个反应中底物到产物的化学计量转换。在代谢系统中外部代谢流通常都是已知的,并且也会给出一些关于胞内路径的常识。根据热动力学,用式(1)表示化学计量约束条件:

$$SV = \Delta(\tilde{V}) \quad (1)$$

假设矩阵 S 的秩为 r ,那么胞内流的个数为 $n-r$ 。

通过气相色谱-质谱技术或核磁共振技术,根据细胞内代谢池中的同位素的测量值,CLE 能够提供大量的补充信息来量化细胞内的代谢流。用来模拟 CLE 的数学模型由整套的同位素的平衡组成,它刻画了细胞内代谢流和静止的同位素分布之间的相互关系:

$$\sum_{K \in \varphi_1} V_K T_{K>M} X_K = \sum_{L \in \varphi_2} V_L X_M \quad (2)$$

其中:流 V_K 表示从任意一个代谢物 K 到代谢物 M 的流,流 V_L 描绘了从代谢物 M 到任意代谢物 L 的流, V_K 和 V_L 向前的或者是向后的;集合 φ_1 包含了通过流 V_K 与代谢物 M 相连的每一个代谢物 K ,集合 φ_2 包含了所有从代谢物 M 流出的流; $T_{K>M}$ 是从碳 K 到碳 M 的碳原子映射向量; X_K 和 X_M 分别代表了代谢物 K 和 M 的胞内富集度分值。

上面的式(2)可以用下面简明的形式来表示:

$$f(V) = (\Omega(X)V - \Psi(\tilde{X}, \tilde{V}))^T \times \Sigma_m^{-1} (\Omega(X)V - \Psi(\tilde{X}, \tilde{V})) \quad (3)$$

subject to:

$$SV = \Delta V \text{ and } V \geq 0 \quad (4)$$

代谢流评估函数是平方残差的协方差加权和, Σ_m 表示以已测量的变量值为对角线的协方差矩阵。

2 基于 QPSO 算法和自适应罚函数的代谢通量评估

2.1 QPSO 算法

QPSO 算法是在粒子群优化 (particle swarm optimization, PSO) 算法基础上提出的,也采用“群体”和“进化”的概念,同样也是依据个体(微粒)的适应值大小进行操作。PSO 是基于种群的进化搜索技术,性能优于遗传算法。但是所有已开发的 PSO 算法不能保证算法的全局收敛。因为 PSO 的进化方程式使所有粒子在一个有限的样本空间中搜索。QPSO 算法不仅参数个数少,并且在搜索能力上优于所有已开发的 PSO 算法。在 QPSO 算法中, $x_i = (x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{id})$ 代表粒子的当前位置; $P_i = (P_{i1}, P_{i2}, \dots, P_{id})$ 代表粒子 i 的最佳适应值,即 $pbest$; $P_g = (P_{g1}, P_{g2}, \dots, P_{gd})$ 代表粒子群的最佳适应值,即 $gbest$ 。

在 QPSO 中,粒子群按照下面的三个公式移动:

$$mbest = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M P_i = \left(\frac{1}{M} \sum_{i=1}^M P_{i1}, \dots, \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M P_{id} \right) \quad (5)$$

$$p_{id} = (f_1 P_{id} + (1-f_1) P_{gd})$$

$$f_1 = \text{rand}(1, 1) \quad (6)$$

$$x_{id} = p_{id} \pm \alpha \times |mbest_d - x_{id}| \times \ln\left(\frac{1}{u}\right)$$

$$u = \text{rand}(1, 1) \quad (7)$$

这里的 $mbest$ 是粒子群 $pbest$ 的中间位置; p_{id} 为 P_{id} 和 P_{gd} 之间的随机点; α 为 QPSO 的收缩扩张系数,它是 QPSO 收敛的一个重要的参数,一般可取 $\alpha = (1.0 - 0.5) \times (\text{Maxiter} - T)/$

Maxiter + 0.5, 可以达到比较好的效果,其中 Maxiter 是迭代的最大次数。

2.2 自适应罚函数的方法

参照文献[12]中描述的自适应惩罚函数的方法,得到的适应性函数为

$$\text{fitness}(x) = f(x) + 10^{\alpha(1-\rho)} \times G(x) \quad (8)$$

其中: $f(x)$ 为原目标函数; $G(x)$ 为约束条件; α 是一个需要调整的常量参数,通常 $1 \leq \alpha \leq 10$; ρ 为惩罚函数^[12]。

2.3 基于 QPSO 和罚函数的代谢通量评估流程

- 随机初始化粒子群,每一个粒子代表一组可能的解;
- 对每一个粒子,根据式(8)计算目标函数的值;
- if $F(V_i) < F(P_i)$ then $P_i = V_i$;
- 找出所有粒子的个体最优位置的适应性值中最小的一个, $F(P_g) = \min(F(P_i))$;
- 找出最优的粒子,即最优的代谢通量的预测值 $P_g = \arg(\min(P_i))$;
- 使用式(5)计算中间位置,使用式(6)计算随机点的位置;
- 使用式(7)更新粒子的位置;
- 循环步骤 b) ~ f), 直到满足循环终止的条件。本文实验循环终止的条件为迭代的次数。

3 实验结果

3.1 谷氨酸棒杆菌中心代谢的代谢网络

本文提出的算法用于评估谷氨酸棒杆菌中的中心代谢通量^[14,15],部分富集度分数的数据通过 NMR 光谱学已经获得,其代谢网络如图 1 所示。反应 Gly1、Gly3、PPP2、PPP3、PPP4、CAC4 和 AC 假设是双向的^[14,15],除此之外所有其他的反应假设都是单向的。完整的化学反应列表和碳原子的转移去向可在参考文献[14]中获得。在图 1 的代谢网络共有 16 个代谢物,含有 64 个碳原子、17 个流,其中假设从 PEP/PYR 到 MAL/OAA^[15]的一个双向的反应路径代表所有的补缺的羧化反应。

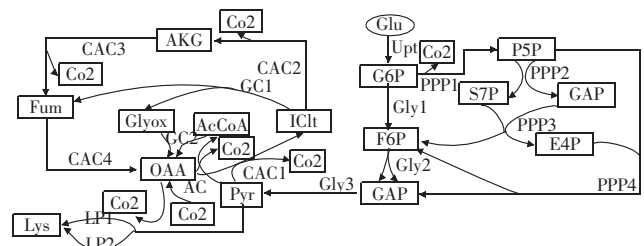


图1 C. glutamicum 主要代谢的网络模型

本文使用 C. glutamicum 的中心代谢来测试提出的算法的性能,把向前的代谢通量 $\tilde{V}$ 和向后的代谢通量 $\tilde{V}$ 通过下面的转换规则转换成净代谢通量 V^{net} 和交换代谢通量 V^{exch} :

$$V^{\text{net}} = \tilde{V} - \tilde{V} \quad (9)$$

$$V^{\text{exch}} = \min(\tilde{V}, \tilde{V}) \quad (10)$$

3.2 实验结果及分析

将本文使用的算法与 EA 算法^[14]和 Wiechert 等人^[15]提出的方法分别进行比较,得到的流的评估值和富集分数分别列于表 1 和 2 中。

表 1 中,第 1 列为流的名称,第 2 列为流的实际值,第 3 ~ 5

列分别为三种算法所测的评估值;表的最后一行为实际值与评估值之间的欧几里德几何距离。实测值与评估值之间的距离越小,说明评估值越接近实测值。从结果可以看出,QPSO + PF 算法得到的评估值比较接近实际值,此算法的寻优能力强。表 2 中,第 1 列 $M-i$ 代表代谢物 M 的第 i 个碳原子的富集度分数,第 2 列为实际值,第 3 ~ 5 列分别为三种算法所测的评估值。从表中最后一行的欧几里德几何距离可以看出,QPSO + PF 算法得到的结果是最优的。

表 1 不同算法在净代谢通量和交换代谢通量上的比较

flux	实际值(净流 交换流)	QPSO + PF	EA	Wiechert
Upt2	100.00	99.09	100.00	98.7
Gly1	32.50 313.20	32.49 313.20	30.7 627.1	32.1 313.20
Gly2	71.01	71.04	71.0	70.6
Gly3	159.72 14.60	159.72 14.60	160.6 132.9	158.9 14.60
PPP1	65.30	65.29	68.0	65.3
PPP2	20.40 84.20	20.38 84.20	21.3 24.3	20.40 84.20
PPP3	20.40 5.70	20.38 5.70	21.3 142.76	20.40 5.70
PPP4	18.60 11.00	18.49 11.00	19.5 10.02	18.60 11.00
CAC1	62.33	62.34	63.2	61.0
CAC2	61.13	60.19	62.6	59.8
CAC3	52.93	51.97	54.3	51.6
CAC4	54.13 3.20	54.02 3.20	55.0 38.5	52.8 3.20
GC1	1.20	1.20	0.64	1.20
GC2	1.20	1.20	0.64	1.20
AC	43.69 30.40	43.61 30.40	37.5 71.7	37.1 30.40
LP1	6.80	6.79	15.7	13.8
LP2	4.70	4.70	2.60	4.70
欧几里德几何距离		2.666 0	141.849 4	102.194 2

表 2 不同算法得到的碳原子的富集度分数的比较

$M-i$	实际值	QPSO + PF	EA	Wiechert
E4P-1	0.020	0.021	0.028	0.030
E4P-2	0.036	0.037	0.016	0.021
E4P-3	0.020	0.019	0.011	0.019
E4P-4	0.167	0.166	0.181	0.155
GAP-1	0.029	0.029	0.024	0.029
GAP-2	0.026	0.026	0.017	0.025
GAP-3	0.267	0.267	0.269	0.264
PYR-2	0.030	0.029	0.032	0.027
PYR-3	0.264	0.265	0.259	0.263
AKG-2	0.241	0.240	0.218	0.225
AKG-3	0.111	0.112	0.096	0.097
AKG-4	0.281	0.282	0.259	0.263
OAA-2	0.076	0.086	0.096	0.097
OAA-3	0.209	0.209	0.218	0.225
OAA-4	0.168	0.172	0.182	0.173
LYS-2	0.068	0.069	0.068	0.071
LYS-3	0.219	0.217	0.235	0.239
LYS-4	0.189	0.190	0.182	0.173
LYS-5	0.222	0.221	0.241	0.249
LYS-6	0.056	0.055	0.059	0.053
P5P-1	0.126	0.125	0.128	0.125
P5P-2	0.029	0.030	0.028	0.028
P5P-3	0.021	0.021	0.016	0.023
P5P-4	0.015	0.016	0.011	0.021
P5P-5	0.193	0.194	0.182	0.184
CO2-1	0.230	0.218	0.214	0.216
欧几里德几何距离		2.8100e - 004	0.003 9	0.003 7

QPSO + PF 算法和 EA 算法分别运行 50 次,每次的迭代次数分别为 200、300、400、500 次,得到的目标函数值的平均值与方差列于表 3 中。从平均值上可以看出,QPSO + PF 在每一个阶段都能得到最优的结果,从方差上可以看出,QPSO + PF 算法的性能也是最稳定的。

图 2 给出了 QPSO + PF 和 EA 两种算法在不同阶段的收

敛过程。QPSO + PF 算法在大约 90 代达到了最优值;而 EA 这时只发现了一些可行解,优化才刚刚开始。随着进化的发展,EA 找到的解越来越好,QPSO + PF 和 EA 性能之间的差距越来越小。QPSO + PF 算法并没有牺牲它的全局最优寻优能力来提高其收敛速度,它在这两者之间达到了一个很好的平衡。

表 3 QPSO + PF 和 EA 两种算法在不同阶段得到的结果的比较

迭代次数	EA		QPSO + PF	
	mean best	St. Dev.	mean best	St. Dev.
200	2.2492e + 004	8.1101e + 003	0.000 8	0.001 1
300	2.8509e + 003	1.9102e + 003	6.2548e - 008	2.4567e - 008
400	370.425 4	319.216 3	8.2541e - 011	2.1523e - 010
500	39.102 4	46.164 9	2.5872e - 012	4.5826e - 011

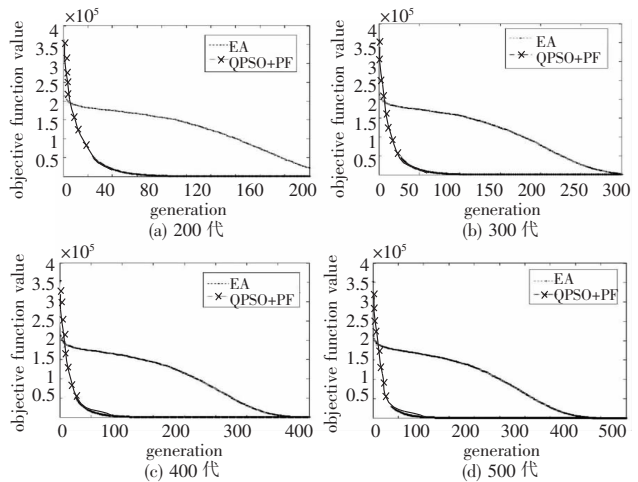


图 2 QPSO+PF 和 EA 算法在不同阶段的收敛过程

从表和图的结果可以得到,QPSO + PF 算法在解决代谢通量评估问题时具有很快的收敛速度、很好的优化能力和比较稳定的性能。

4 结束语

代谢系统中代谢通量的评估问题通过转换成带约束的非线性优化问题得到了解决。本文提出使用 QPO + PF 算法求得最优解,通过与 EA、文献[15] 的比较结果可以得出,所提出的算法能够达到很好的性能,评估的结果是健壮的和高效的,并且 QPSO-PF 的收敛速度是很快的。此外,代谢通量的评估对代谢网络的大小非常敏感,例如,基于数学模型的同位素的复杂性是随着网络中碳个数的增大而呈指数级的增长^[14],通常较大的网络模型超出了基于 CLE 的代谢通量的评估能力。对这个问题的有效解决方案是目前正在研究的热点之一,设计一种健壮的、高效的、强大的算法来评估代谢通量,对基于 CLE 的代谢通量的评估是至关重要的。

参考文献:

[1] IWATANI S,YAMADA Y,USUDA Y. Metabolic flux analysis in biotechnology processes [J]. *Biotechnology Letters*,2008,30(5):791-799.

[2] LLANERAS F,PICO J. Stoichiometric modelling of cell metabolism [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*,2008,105(1):1-11.

[3] MATSUOKA Y,SHIMIZU K. The relationships between the metabolic fluxes and ¹³C-labeled isotopomer distribution for the flux analysis of the main metabolic pathways [J]. *Biochemical Engineering Journal*,2010,49(3):326-336.

(下转第 1296 页)

言为 C++, 采用 IBM 数据生成器^[10]来生成测试数据集。数据集里的事务数为 20~100 K, 项集的平均长度为 12, 最大频繁项集的平均长度为 20。本文对每个项赋予两个属性, 即 cost 和 price, 属性值采用随机赋值。这里给出一个约束选择率的定义。所谓约束选择率, 是指数据集中的频繁项集不满足约束占全部频繁项集的百分比。实验结果如图 1~3 所示。图 1 是测试约束选择率和运行时间的对应关系, 事务数据为 80 K, 图 2 是测试事务大小与可扩展性的相互关系, 图 3 是支持度阈值大小和运行时间对应关系。

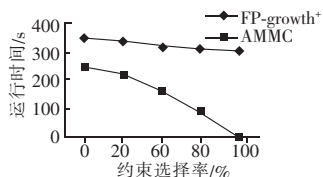


图 1 约束选择率运行结果

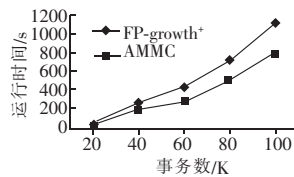


图 2 事务数与可扩展性的对应

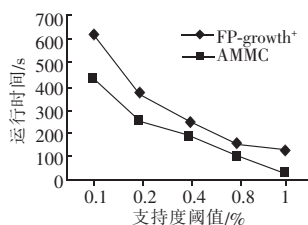


图 3 支持度阈值运行结果

从实验结果可以看出, AMMC 算法对多种约束关联是有效的, 且扩展性能较好, 充分将非单调性约束和单调性约束的性质及有效的剪枝技术相结合, 可以在很大程度上减少不必要的数据扫描次数, 从而使其无论是在运行时间还是在可扩展性方面均优于 FP-growth+ 算法。

4 结束语

约束关联挖掘最耗时的地方是在对约束点寻找和验证上, 采用多种有效的剪枝技术是关键。本文给出一个基于单调性约束和非单调性约束的多约束关联挖掘算法, 算法利用了这两类约束的性质, 采用有效的剪枝技术, 快速寻找约束点。通过

实验证明, 算法是有效的, 可扩展性能较好。当前面向动态、多关系、分布式数据挖掘是数据挖掘的一个主流方向之一, 面向此类数据的约束挖掘是笔者今后的一个研究方向。

参考文献:

- [1] SRIKANT R, VU Q, AGRAWAL R. Mining association rules with item constraints[C]//Proc of the 3rd International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining. Menlo Park, CA: AAAI Press, 1997:67-73.
- [2] LAKSHMANAN L V S, NG R, HAN Jia-wei, et al. Optimization of constrained frequent set queries with 2-variable constraints[C]//Proc of ACM SIGMOD International Conference on Management of Data. New York: ACM Press, 1999:157-168.
- [3] BONCHI F, GIANNOTTI F, MAZZANTI A, et al. ExAMiner: optimized level-wise frequent pattern mining with monotone constraints[C]//Proc of the 3rd IEEE International Conference on Data Mining. Washington DC: IEEE Computer Society, 2003:11-18.
- [4] BONCHI F, LUCCHESI C. On closed constrained frequent pattern mining[C]//Proc of the 4th IEEE International Conference on Data Mining. Washington DC: IEEE Computer Society, 2004:35-42.
- [5] BONCHI F, LUCCHESI C. Pushing tougher constraints in frequent pattern mining[C]//Proc of the 9th Pacific-Asia Conference on Knowledge Discovery and Data Mining. 2005:114-124.
- [6] LAKSHMANAN L V S, LEUNG C K, NG R T. Efficient dynamic mining of constrained frequent sets[J]. ACM Trans on Database Systems, 2003, 28(4):337-389.
- [7] 方刚. 一种快速挖掘约束性关联规则的算法[J]. 计算机应用与软件, 2009, 26(8):268-270, 280.
- [8] 李英杰. 项约束频繁项集挖掘的新方法[J]. 计算机工程与应用, 2009, 45(3):161-164.
- [9] LEE A J T, LIN Wan-chuen, WANG Chun-sheng. Mining association rules with multi-dimensional constraints[J]. Journal of Systems and Software, 2006, 79(1):79-92.
- [10] AGRAWAL R, SRIKANT R. Fast algorithms for mining association rules in large database[C]//Proc of the 20th International Conference on Very Large Data Bases. San Francisco: Morgan Kaufmann, 1994:487-489.
- [10] SUN Jun, FANG Wei, XU Wen-bo. A quantum-behaved particle swarm optimization with diversity-guided mutation for the design of two-dimensional IIR digital filters[J]. IEEE Trans on Circuits and Systems II: Express Briefs, 2010, 57(2):141-145.
- [11] 方伟, 孙俊, 谢振平, 等. 量子粒子群优化算法的收敛性分析及控制参数研究[J]. 物理学报, 2010, 59(6):3686-3694.
- [12] 甘敏, 鹏辉. 一种新的自适应惩罚函数算法求解约束优化问题[J]. 信息与控制, 2009, 38(1):24-28.
- [13] YANG Jing, WONGSA S, KADIRKAMANATHAN V, et al. Metabolic flux estimation: a self-adaptive evolutionary algorithm with singular value decomposition[J]. IEEE/ACM Trans on Computational Biology and Bioinformatics, 2007, 4(1):126-138.
- [14] KADIRKAMANATHAN V, YANG Jing, BILLINGS S A, et al. Markov chain Monte Carlo algorithm based metabolic flux distribution analysis on corynebacterium glutamicum[J]. Bioinformatics, 2006, 22(12):2681-2687.
- [15] WIECHERT W, SIEFKE C, De GRAAF A A, et al. Bidirectional reaction steps in metabolic networks, part II: flux estimation and statistical analysis[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1997, 55(1):118-135.

(上接第 1229 页)

- [4] WIECHERT W. ¹³C Metabolic flux analysis[J]. Metabolic Engineering, 2001, 3(3):195-206.
- [5] CHRISTENSEN B, NIELSEN J. Metabolic network analysis of Penicillium chrysogenum using ¹³C-labeled glucose[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2000, 68(6):652-659.
- [6] GOMBERT A K, Dos SANTOS M M, CHRISTENSEN B, et al. Network identification and flux quantification in the central metabolism of Saccharomyces cerevisiae under different conditions of glucose repression[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(4):1441-1451.
- [7] ZHAO Jiao, SHIMIZU K. Metabolic flux analysis of Escherichia coli K12 grown on ¹³C-labeled acetate and glucose using GC-MS and powerful flux calculation method[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 101(2):101-117.
- [8] RIASCOS C A M, GOMBERT A K, PINTO J M. A global optimization approach for metabolic flux analysis based on labeling balances[J]. Computers & Chemical Engineering, 2005, 29(3):447-458.
- [9] BHANDOHAL R K, SINGH M. Evolutionary programming method for optimization[J]. International Journal of Engineering and Information Technology, 2010, 2(1):48-54.