



Área: Engenharia de Alimentos

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ÁCIDO MALTOBIÔNICO E MALTOBIONATO DE SÓDIO PRODUZIDOS POR *Zymomonas mobilis* IMOBILIZADA EM ESPUMA DE POLIURETANO

Bruna Sequenka*, Roberta Cristina de Souza, Leonardo Meirelles da Silva, Jamile Zeni, Eunice Valduga, Eloane Malvessi

Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS

*E-mail: brunasequenka@hotmail.com

RESUMO – O ácido maltobiônico, na forma de ácido ou sais, é produzido pela ação do complexo enzimático periplasmático glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) de *Zymomonas mobilis* e vêm se destacando na área biotecnológica, devido as diversas aplicações industriais. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante do ácido maltobiônico e do maltobionato de sódio produzidos pelo complexo enzimático GFOR/GL presentes em células de *Z. mobilis* imobilizadas em espuma de poliuretano flexível. Para isto, *Z. mobilis* e seu complexo enzimático foram imobilizados pela técnica *in situ* em espuma de poliuretano flexível, seguido de ensaios de bioconversão para a produção de maltobionato de sódio, precipitação, purificação e conversão do sal em ácido. A atividade antioxidante foi determinada pela capacidade antioxidante contra o radical DPPH, radical ABTS^{•+} e por habilidade quelante. O maltobionato de sódio apresentou atividade antioxidante expressa em habilidade quelante dos íons ferro (Fe⁺²), com habilidade de 50% nas maiores concentrações avaliadas (15 e 20 mg mL⁻¹), enquanto o ácido maltobiônico apresentou habilidade em torno de 21%. Todavia, a atividade antioxidante não foi manifestada nas demais técnicas propostas, sugerindo estudos adicionais. Este trabalho apresenta contribuições para os estudos de produção e aplicação de ácidos aldônicos e seus sais na área de alimentos.

Palavras-chave: ácidos aldônicos, imobilização, antioxidantes, habilidade quelante.

1 INTRODUÇÃO

A produção, via rotas biotecnológicas, de ácidos aldônicos, como ácido glicônico, ácido lactobiônico e ácido maltobiônico, assim como seus respectivos sais apresentam relevâncias tecnológicas, a partir de tecnologias limpas, menor consumo energético e reduzido resíduos de processo, quando comparadas com as via químicas, eletroquímicas ou catalíticas (NEOSTRATA COMPANY, 2010; NIELSEN, 2010; CAÑETE-RODRÍGUEZ et al., 2016; MINAL et al., 2017).

Estes ácidos aldônicos e seus sais podem ser produzidos pela ação enzimática do complexo enzimático periplasmático glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glicono-lactonase (GL) presentes em células de *Zymomonas mobilis*, responsável pela conversão de aldoses em ácidos aldônicos e frutose em sorbitol. Este micro-organismo é uma bactéria Gram negativa e não patogênica para seres humanos (MALVESSI et al., 2013; DELAGUSTIN et al., 2017; FOLLE et al., 2018; FLORES, 2019; CARRA et al., 2020).

Na área de alimentos, o ácido maltobiônico desperta atenção, sendo possível encontrar patentes com interesse de aplicação como agente acidificante, intensificador de sabor e estabilizante, devido a propriedades como antioxidante e de não toxicidade (YUEN, 1974; MIYAKE e SATO, 1975; NIELSEN, 2010). Adicionalmente, na literatura especializada são poucos os estudos referentes à bioprodução de ácido maltobiônico (STODOLA; LOCKWOOD, 1947; KLUYVER; DE LEY; RIJVEN, 1951; MEIBERG; BRUINENBERG; SLOOTS, 1990; MALVESSI, 2008; NIELSEN, 2010; GARIN, 2016; MAO et al., 2018; FLORES, 2019; OH et. al., 2020).

Neste sentido, o objetivo do estudo foi avaliar a atividade antioxidante do ácido maltobiônico e do maltobionato de sódio produzidos via ação do complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* imobilizados em espuma de poliuretano flexível.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção de células e enzimas

Para a produção de células de *Z. mobilis* e do complexo enzimático periplasmático GFOR/GL seguiu-se a metodologia descrita por Malvessi et al. (2006), envolvendo as etapas de ativação, preparo de inóculo e cultivo em reator encamisado de bancada (B. Braun Biotech International Biostat® B, Holanda). Posteriormente, o meio fermentado foi



centrifugado (Centrifuge MPW-351R, MPW® Med. Instruments, Polônia), por 10 min a 6000 rpm, e a massa seca determinada (Carra, 2012), fixando a concentração de 210 g_{célula_seca} L⁻¹ para os ensaios subsequentes.

2.2 Imobilização celular em espuma de poliuretano flexível

A imobilização da biomassa, contendo o complexo enzimático intracelular, em poliuretano flexível foi realizada pela técnica *in situ*, envolvendo a mistura de proporções de polioliol e isocianato para a formação da espuma, de acordo com as recomendações do fabricante (Dim Clay, Brasil) e do estudo de Mesquita et al. (2018), com adaptações, utilizando 6 g de biomassa concentrada a 210 g_{célula_seca} L⁻¹, 0,02 g de surfactante de silicone (Tasca Estofados e Cia, Brasil) e os reagentes na proporção de 2:1 (g_{polioliol}:g_{isocianato}).

Após 24 h de cura, as espumas foram fracionadas, com auxílio de mixer doméstico (Britânia, Brasil) e tratadas com glutaraldeído 0,5% (m/v), visando inibir o metabolismo celular, sem afetar a atividade enzimática (FOLLE et al., 2018). Para padronização da dimensão do imobilizado obtido, as espumas após fracionadas e tratadas com glutaraldeído passaram por peneiras, sendo utilizadas para o estudo apenas o sistema imobilizado com granulometria na faixa de 125 e 355 µm (peneiras de 115 e 42 mesh, Bertel Indústria Metalúrgica Ltda, Brasil).

2.3 Ensaios de bioconversão

Os ensaios de bioconversão foram realizadas em reator encamisado com 200 mL de volume de trabalho, agitação magnética, solução equimolar de maltose e frutose a 0,7 mol L⁻¹, 39 °C e pH 6,4, mantido com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 2,5 mol L⁻¹ (GARIN, 2016; FLORES, 2019), em meio reacional contendo 6,25 g_{célula_seca} L⁻¹ de biocatalisador imobilizado. As concentrações dos produtos da bioconversão e o consumo dos substratos foram estimadas pelo volume e concentração de NaOH utilizado para neutralizar o ácido formado e controlar o pH em 6,4 (PEDRUZZI et al., 2007), e a produtividade mássica e produtividade específica determinadas, conforme descrito por Flores (2019). A bioconversão foi cessada após um consumo de 90% dos substratos (maltose e frutose).

2.4 Separação e purificação do maltobionato de sódio

Para a separação e purificação do maltobionato de sódio foram realizadas três precipitações sucessivas utilizando metanol, com concentração final de solvente na solução de 80% (m/v), conforme descrito por Flores (2019). Após, o sal foi analisado em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo (Shimadzu Corporation, Japan, modelo LC-20AD) com controle CMB-20A, bomba isocrática LC-20AD, CTO-20A column oven e um detector de índice de refração (RID-20A), para avaliar a eficiência da purificação.

2.5 Conversão de maltobionato de sódio em ácido maltobiônico e cristalização

Para converter o maltobionato de sódio à ácido maltobiônico foi utilizada a metodologia proposta por Flores (2019), empregando o método de troca iônica com resina catiônica ácido forte Amberlite IRA-120 (Vetec Química Fina, Brasil). A cristalização foi realizada por liofilização (Edwards, Brasil), com vácuo de 500 mmHg, -45 °C e 36 h.

2.6 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada por três técnicas: (I) capacidade antioxidante contra o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina), (II) capacidade antioxidante contra o radical ABTS^{•+} ([2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico]) e (III) por habilidade quelante. O ácido maltobiônico e o maltobionato de sódio foram avaliados nas concentrações entre 0,01 e 20 mg mL⁻¹ e em triplicata.

Na determinação da atividade antioxidante por DPPH, 500 µL de uma solução etanólica de DPPH (0,1 mmol L⁻¹) com 500 µL de soluções contendo concentrações crescentes de ácido maltobiônico e maltobionato de sódio em etanol ou água milli-Q foram incubados por 30 min, sobre o abrigo de luz e em repouso, seguida de leitura da absorbância a 515 nm em espectrofotômetro (Pró-Análise, Modelo: UV-1600, Brasil), segundo Hamann et al. (2018).

Procedeu-se da mesma forma para a preparação da solução denominada “controle” (Abs.amostra), porém substituindo 500 µL da amostra por 500 µL de solvente etanol ou água milli-Q. As soluções denominadas “branco” (Abs.branco) foram preparadas usando diferentes concentrações do extrato em etanol ou água milli-Q, sem DPPH. O percentual de captação do radical DPPH foi calculado em termos da porcentagem de atividade antioxidante (AA%), conforme a Equação 1:

$$AA\% = 100 - \frac{(\text{Abs.amostra} - \text{Abs.branco})}{\text{Abs.controle}} * 100 \quad (1)$$

Na segunda técnica proposta foi realizado o preparo prévio (16 h antes da análise da amostra) da solução com o radical ABTS^{•+}, a partir da mistura de 1 mL de uma solução estoque de ABTS (7 mmol L⁻¹) com 17,6 µL de uma solução



estoque de persulfato de potássio (140 mmol L^{-1}), seguido de diluição com água destilada até uma absorção em espectrofotômetro (Pró-Análise, Modelo: UV-1600, Brasil) de $0,700 \text{ nm}$, no comprimento de onda de 734 nm (BOROSKI et al., 2015). As amostras de ácido maltobiônico e maltobionato de sódio foram diluídas em água destilada, $20 \text{ }\mu\text{L}$ de cada amostra foram adicionadas a 2 mL da solução do radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ e, após 6 min de repouso ao abrigo de luz, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 734 nm . O radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ forma um cromóforo verde e a adição de um antioxidante resulta na neutralização desse radical, causando o desaparecimento desta coloração. Assim, quanto menor a absorbância obtida, maior a capacidade antioxidante da amostra analisada.

Na técnica de habilidade quelante dos íons ferro (Fe^{2+}), $3,7 \text{ mL}$ de amostras diluídas em água destilada foram misturadas a $0,1 \text{ mL}$ de cloreto de ferro (FeCl_2 , 2 mmol L^{-1}), realizada leitura em espectrofotômetro (Pró-Análise, Modelo: UV-1600, Brasil) a 562 nm (A_0), seguido de posterior adição de $0,2 \text{ mL}$ ferrozina (5 mmol L^{-1}), agitação vigorosa por 1 min , repouso de 10 min ao abrigo de luz e nova leitura a 562 nm (A_1). Como branco foi utilizado água destilada ($\text{Abs}_{\text{branco}}$). A habilidade quelante (%) foi determinada segunda a Equação 2. O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, $50 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, massa molar $292,24 \text{ g mol}^{-1}$) foi utilizado como controle positivo (BOROSKI et al., 2015).

$$\text{Habilidade quelante} = \frac{[\text{Abs}_{\text{branco}} - (A_1 - A_0)]}{\text{Abs}_{\text{branco}}} * 100 \quad (2)$$

2.7 Análise estatística

Os resultados ($n=3$) foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tukey com 5% de significância, utilizando o software Statistica versão 5.0 (Statsoft Inc, USA).

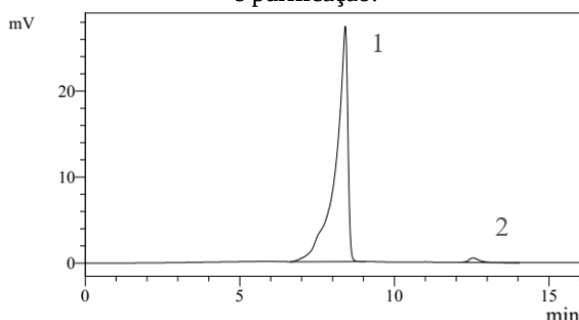
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção, separação e purificação de maltobionato de sódio e conversão em ácido maltobiônico

Na bioprodução do maltobionato de sódio e sorbitol, por células/enzimas de *Z. mobilis* imobilizadas em espuma de poliuretano flexível, houve um consumo de 90% dos substratos, maltose e frutose, em 72 h , com concentração máxima de $493,39 \text{ mmol L}^{-1}$ e produtividade específica de $1,37 \text{ mmol g}_{\text{celula_seca}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. O sorbitol foi produzido devido ao processo catalítico da glicose-frutose oxidoreductase, em função da redução da frutose, porém, por não ser o produto de interesse neste estudo, foi reduzido a concentrações mínimas durante a etapa de purificação.

Após etapas de separação e de purificação, obteve-se $98,1\%$ de maltobionato de sódio (sal do ácido maltobiônico) e $1,90\%$ de sorbitol, não sendo evidenciado picos de substratos residuais (Figura 1).

Figura 1 – Cromatograma (CLAE) de identificação do maltobionato de sódio (1) e sorbitol (2), após etapa de separação e purificação.



Resultados semelhantes foram observados por Garin (2016), utilizando etanol na purificação de maltobionato de sódio, obtendo pureza média de 90% , e por Flores (2019), obtendo maltobionato de cálcio com pureza superior a 99% e matobionato de sódio com pureza final de 98% , utilizando metanol 80% (v/v).

3.2 Atividade antioxidante

O ácido maltobiônico e o maltobionato de sódio apresentaram habilidade quelante (Tabela 1) nas concentrações mais altas avaliadas, sendo mais expressiva para o maltobionato de sódio, com valores próximos a 50% , nas concentrações de 15 e 20 mg mL^{-1} , não havendo diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre estas. O padrão EDTA ($50 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) apresentou $79,83 \pm 4,48\%$ de habilidade quelante.

Todavia, pelos métodos dos radicais DPPH e $\text{ABTS}^{\cdot+}$, ambos ácido maltobiônico e maltobionato de sódio nas concentrações de $0,01$ a 20 mg mL^{-1} não apresentaram atividade antioxidante. Ademais observou-se a precipitação destes produtos na presença da solução etanólica do DPPH.



Tabela 1 – Habilidade quelante do ácido maltobiônico e maltobionato de sódio em diferentes concentrações.

Concentração (mg mL ⁻¹)	Habilidade quelante (%)	
	Ácido maltobiônico	Maltobionato de sódio
20	20,71 ^a ± 0,33	49,42 ^a ± 1,53
15	15,55 ^b ± 0,42	45,47 ^a ± 2,44
10	14,14 ^b ± 0,47	31,92 ^b ± 2,34
5	12,48 ^c ± 0,15	16,11 ^c ± 3,21
1	6,95 ^d ± 0,97	10,96 ^c ± 0,40

Média ± desvio padrão; letras minúsculas diferentes na mesma coluna correspondem a diferença estatística ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Na área de cosmetologia, é relatado que o ácido maltobiônico é um antioxidante natural, ajudando a prevenir danos celulares de radicais livres, detém metais promotores de oxidação na pele, preserva a matriz dérmica, reduzindo a atividade das enzimas de metaloproteinase de matriz destrutivas e previne (antioxidante) e corrige os sinais de fotoenvelhecimento, além de formar um filme de gel transparente contendo água complexada com suas moléculas (GREEN; SCOTT; YU, 2010; NEOSTRATA COMPANY, 2010). Complementarmente, Brouda et al. (2010) afirma que o ácido maltobiônico é um ingrediente antienvhecimento poderoso, mas suave, que oferece benefício antioxidante. Os autores relatam que o ácido maltobiônico é um inibidor moderado da peroxidação lipídica induzida por radiação ultravioleta, podendo atuar como um antioxidante protetor na pele humana; além de inibir fortemente a atividade da metaloproteinase da matriz, podendo ajudar a prevenir a degradação do colágeno em pele humana.

Os resultados obtidos no presente estudo foram a partir de métodos comumente utilizados na área de alimentos. Porém, sugere-se que os efeitos antioxidantes do ácido maltobiônico e maltobionato de sódio possam ser melhores explorados por outras técnicas ou em maiores concentrações, visto que foi relatada um potencial antioxidante para estes produtos na literatura especializada.

4 CONCLUSÃO

O maltobionato de sódio, na concentração de 15 mg mL⁻¹, apresentou habilidade quelante de íons de ferro de aproximadamente 50% e o ácido maltobiônico de 21% (20 mg mL⁻¹). Desta maneira, o estudo forneceu informações relevantes e direcionadoras para futuras pesquisas e aplicações do ácido maltobiônico e maltobionato de sódio em alimentos ou embalagens.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, CNPq, FAPERGS, URI e UCS pela concessão de bolsas e apoio financeiro.

6 REFERÊNCIAS

- BROUDA, I. B.; EDISON, B. L.; WEINKAUF, R. L.; GREEN, B. A. Maltobionic acid, a powerful yet gentle skincare ingredient with multiple benefits to protect skin and reverse the visible signs of aging. In: **Summer Academy Meeting of the American Academy of Dermatology**, Chicago, 2010.
- BOROSKI, M.; VISENTAINER, J.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. **Antioxidantes: Princípios e métodos analíticos**, 1. ed., Curitiba: Appris, 2015.
- CAÑETE-RODRÍGUEZ, A. M.; SANTOS-DUENAS, I. M.; JIMÉNEZ-HORNERO, J. E.; EHRENREICH, A.; LIEBL, W.; GARCÍA-GARCÍA, I. Gluconic acid: Properties, production methods and applications - An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste bio-valorization. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 1891–1903, 2016.
- CARRA, S. **Estudo cinético da produção de ácido lactobiônico e sorbitol por enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2012.
- CARRA, S.; RODRIGUES, D. C.; BERALDO, N. M. C.; FOLLE, A. B.; DELAGUSTINI, M. G.; SOUZA, B. C.; REGINATTO, C.; POLIDORO, T. A.; SILVEIRA, M. M.; BASSANI, V. L.; MALVESSI, E. High lactobionic acid production by immobilized *Zymomonas mobilis* cells: a great step for large-scale process. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, p. 1265–1276, 2020.
- DELAGUSTIN, M. G. **Caracterização e Avaliação da Estabilidade do Ácido Lactobiônico e de Diferentes Lactobionatos Produzidos por *Zymomonas mobilis* Visando à Utilização na Área Farmacêutica**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2017.



- FOLLE, A. B.; BASCHERA, V. M.; CARRA, L. T. V. S.; POLIDORO, T. A.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Assessment of different systems for the production of aldonic acids and sorbitol by calcium alginate-immobilized *Zymomonas mobilis* cells. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 41, p. 185–194, 2018.
- FLORES, M. L. **Síntese biocatalítica, recuperação e caracterização físico-química do ácido maltobiônico**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2019.
- GARIN, D. L. **Uso do Sistema Enzimático de *Zymomonas mobilis* para a Produção de Ácidos Maltobiônico e Lactobiônico**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2016.
- GREEN, B. A.; SCOTT, E. J. V.; YU, R. J. **Clinical uses of hydroxyacids**. In: DRAELOS, Z. D., editor. *Cosmetic Dermatology: Products and Procedures*. Wiley-Blackwell, 327-334, 1 ed., 2010.
- HAMANN, D.; MARCO, M.; PAROUL, N.; WOLOSZYN, N.; SOUZA, R. C.; CANSIAN, R. L.; PALAVICINI, S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extrato etanólico de casca de banana da variedade caturra (*Musa* sp., subgrupo Cavendish) obtido por maceração na ausência e presença de ultrassom. **Perspectiva**, v. 42, n.159, p. 79-88, 2018.
- KLUYVER, A. J.; DE LEY, J.; RIJVEN, A. The Formation and Consumption of Lactobionic and Maltobionic Acids by *Pseudomonas* Species. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 1951.
- MALVESSI, E.; CONCATTO, K.; CARRA, S.; SILVEIRA, M. M. Formulation of medium for growth and production of ethanol and intracellular enzymes by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 39-144, 2006.
- MALVESSI, E. **Produção de Sorbitol e Ácidos Orgânicos por *Zymomonas mobilis***. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- MALVESSI, E.; CARRA, S.; PASQUALI, F. C.; KERN, D. B.; SILVEIRA, M. M.; AYUB, M. A. Z. Production of organic acids by periplasmic enzymes present in free and immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 1–10, 2013.
- MAO, S.; LIU, Y.; HOU, Y.; MA, X.; Yang, J.; Han, H.; Han, J.; Jia, L.; Qin, H.; Lu, F. Efficient production of sugar-derived aldonic acids by *Pseudomonas fragi* TCCC11892. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 8, p. 39897–39901, 2018.
- MEIBERG, J. B. M.; BRUINENBERG, P. M.; SLOOTS, B. E. A process for the fermentative oxidation of reducing disaccharides. **EP Patent application** 0384534 A1, 1990.
- MESQUITA, R. A.; HASSEMER, G.; MARCHIORI, V.; KIEDIS, J.; VALDUGA, E.; JUNGES, A.; MALVESSI, E.; CANSIAN, R. L.; ZENI, J. Synthesis of Xanthan Gum from *Xanthomonas campestris* Immobilized in Polyurethane. **Industrial Biotechnology**, v. 14, n. 5, p. 276-281, 2018.
- MINAL, N.; BHARWADE, S. B.; CHAUDHARY, N. N.; JAIN, A. K. Lactobionic Acid: Significance and Application in Food and Pharmaceutical. **International Journal Food of Fermented**, v. 6, n. 1, p. 25-33, 2017.
- MIYAKE, T.; SATO, Y. Process for the production of foods and drinks with the employment of maltobionc acid. **US Patent** 3.899.604, 1975.
- NEOSTRATA COMPANY. **Technical Information Bulletin: Maltobionic Acid**. Inc., 307 College Road East, Princeton, New Jersey, 2010.
- NIELSEN, P. M. Maltobionate as antioxidant in food products. **US Patent Application Publication** 2010/0173044 A, 2010.
- OH, Y. R.; JANG, Y. A.; HONG, S. H.; EOM, G. T. High-level production of maltobionic acid from high-maltose corn syrup by genetically engineered *Pseudomonas taetrolens*. **Biotechnology Reports**, v. 28, p. e00558, 2020.
- PEDRUZZI, I.; MALVESSI, E.; MATA, V. G.; SILVA, E. A. B.; SILVEIRA M. M.; RODRIGUES, A. E. Quantification of lactobionic acid and sorbitol from enzymatic reaction of fructose and lactose by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 1145, p. 128-132, 2007.
- STODOLA, F. H.; LOCKWOOD, L. B. The Oxidation of Lactose and Maltose to Bionic Acids by *Pseudomonas*. **Journal Biological Chemistry**, v. 171, p.213-221, 1947.
- YUEN, S. Mixture of maltobionic acid and monosodium glutamate as a food seasoning. **US Patent** 3.829.583, 1974.