

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y PROTEOLÍTICA *IN SITU* EN EXTRACTOS HIDROSOLUBLES DE QUESO ASADERO DE GUANAJUATO, MÉXICO

Servando Rojas-González, Daliana Carbajal-Padilla, Natalia Aguilar-Ruiz y Gabriela Rodríguez-Hernández

RESUMEN

La leche y sus derivados impactan positivamente la salud de los consumidores debido a diversos compuestos bioactivos y nutricionales. El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad antioxidante y proteolítica *in situ* en extractos hidrosolubles de queso asadero comercial. Los quesos seleccionados fueron de seis diferentes marcas comercializadas en el Estado de Guanajuato, y luego analizados mediante técnicas espectrofotométricas. Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre las muestras de queso para am-

bas variables determinadas. En todas las muestras se presentó inhibición del radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), variando desde $30,7 \pm 3,7$ hasta $86,6 \pm 2,9\%$. Así también, se observó una correlación significativa entre ambas variables determinadas de $-0,6125$ ($p < 0,01$), lo cual sugiere que en gran medida la actividad antioxidante se relaciona con la proteólisis presente en los extractos hidrosolubles obtenidos. Se puede deducir que el queso asadero es un alimento con potencial actividad antioxidante.

Introducción

La leche y los productos lácteos son fuentes de energía de alto valor nutritivo, y ofrecen aportes funcionales a la salud (Carbajal-Padilla *et al.*, 2020). La leche de vaca contiene minerales, vitaminas y proteínas, de estas últimas posee alrededor de 3,5 % (que son proteínas de alto valor biológico), de las cuales el 80 % son caseínas y el resto son proteínas del suero (alfa-lactoglobulina, beta-lactoalbúmina,

seroalbúmina y proteínas minoritarias) (Jauhainen *et al.*, 2010). Las proteínas son macromoléculas primordiales para el funcionamiento celular con múltiples funciones vitales en el organismo (Vioque *et al.*, 2000), su hidrólisis, específicamente llamada proteólisis (de alta relevancia en los quesos en sus características sensoriales y tecnológicas), genera péptidos con aportes nutricionales y determinadas funciones biológicas benéficas, llamados péptidos

bioactivos o biopéptidos (Kumar y Bhalla, 2005), y son de entre 2 a 20 aminoácidos (Korhonen y Philanto, 2006). El término "bioactivo" es comúnmente utilizado para describir diversas moléculas con diversos tipos de actividad biológica (Hernández-Sánchez, *et al.*, 2021), de los cuales la leche y sus derivados, son fuentes ricas en péptidos bioactivos (Giromini *et al.*, 2018), en múltiples biofuncionalidades, como las antioxidantes, antimicrobianas, opioides,

metabólico-reguladoras, inmunomoduladoras, antitrombóticas y de transporte de minerales (FitzGerald *et al.*, 2004; Giromini *et al.*, 2018). La bioactividad de los péptidos depende de su tamaño y secuencia (Korhonen y Philanto, 2006) y actúan sujetos a su biodisponibilidad y bioaccesibilidad (Giromini *et al.*, 2018). Se generan por hidrólisis enzimática, de tres formas principalmente: a) con enzimas digestivas, b) por microorganismos

PALABRAS CLAVE / Bioactividades / Biopéptidos / Lácteos / Proteólisis / Radical DPPH /

Recibido: 05/09/2022. Modificado: 27/09/2022. Aceptado: 03/10/2022.

Servando Rojas-González. Médico Veterinario Zootecnista, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, México. Estudiante, Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH), México. Profesor, Universidad de Guanajuato (UGTO), Campus Irapuato-Salamanca, México.

Daliana Carbajal-Padilla. Ingeniera en Alimentos y estudiante maestría en Biociencias UGTO, México.

Natalia Aguilar-Ruiz. Ingeniera en Alimentos UGTO, México. Analista en B&G Foods Manufacturing Mexico, S. de R.L. de C.V., México.

Gabriela Rodríguez-Hernández. (Autora de correspondencia) PhD en Tecnología de Productos de Origen Animal, Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Licenciada en Química Bacterióloga Parasitóloga, UACH, México. Profesora UGTO, México. Dirección:

Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca. Ex-Hacienda El Copal km 9 Carretera Irapuato-Silao. C.P. 36500. Ciudad Irapuato, Guanajuato, México. e-mail: gabriela.rodriguez@ugto.mx

IN SITU ANTIOXIDANT AND PROTEOLYTIC ACTIVITY IN HYDROSOLUBLE EXTRACTS OF ASADERO CHEESE FROM GUANAJUATO, MÉXICO

Servando Rojas-González, Daliana Carbajal-Padilla, Natalia Aguilar-Ruiz and Gabriela Rodríguez-Hernández

SUMMARY

Milk and its derivatives, impact positively the health of consumers due to various bioactive and nutritional compounds. The objective of study was to determine the antioxidant and proteolytic activity in situ in water-soluble extracts of commercial grill cheese. The selected cheeses were from six different brands marketed in the State of Guanajuato. The results showed significant differences ($p < 0.01$) between the cheese samples for both determined variables. In all the samples there

was inhibition of the DPPH radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) were recorded from 30.7 ± 3.7 to $86.6 \pm 2.9\%$. Additionally, a significant correlation was observed between both determined variables of -0.6125 ($p < 0.01$), which suggests that to a large extent the antioxidant activity is related to the proteolysis present in the water-soluble extracts obtained. Therefore, it can be deduced that asadero cheese is a food with potential antioxidant activity.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E PROTEOLÍTICA IN SITU EM EXTRATOS SOLUVEIS EM ÁGUA DO QUEIJO ASADERO DO GUANAJUATO, MÉXICO

Servando Rojas-González, Daliana Carbajal-Padilla, Natalia Aguilar-Ruiz e Gabriela Rodríguez-Hernández

RESUMO

O leite e seus derivados impactam positivamente a saúde dos consumidores devido a diversos compostos bioativos e nutricionais. O objetivo deste trabalho foi determinar a atividade antioxidante e proteolítica in situ em extratos solúveis em água de queijo grelhado comercial. Os queijos selecionados eram de seis marcas diferentes comercializadas no Estado de Guanajuato e, em seguida, analisados por técnicas espectrofotométricas. Os resultados mostraram diferenças significativas ($p < 0,01$) entre as amostras de queijo para ambas as

variáveis determinadas. Em todas as amostras, foi apresentada a inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidzil), variando de $30,7 \pm 3,7$ a $86,6 \pm 2,9\%$. Também foi observada correlação significativa entre ambas as variáveis determinadas de $-0,6125$ ($p < 0,01$), o que sugere que, em grande parte, a atividade antioxidante está relacionada à proteólise presente nos extratos solúveis em água obtidos. Portanto, pode-se deduzir que o queijo grelhado é um alimento com potencial atividade antioxidante.

proteolíticos y c) con enzimas proteolíticas derivadas de microorganismos o plantas (Pritchard *et al.*, 2010). Recientemente, en la leche y sus derivados se han identificado múltiples compuestos con actividades antioxidantes (Kariyawasam *et al.*, 2019), los cuales son capaces de inhibir o retardar la oxidación por efecto de radicales libres. Se han clasificado por su estructura química y función biológica como endógenos y exógenos, siendo estos últimos los que se adquieren en la dieta (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2016). Su mecanismo de acción se puede deber a la transferencia de hidrógenos o electrones, o por medio de la reducción-inhibición-desactivación de radicales libres o sus precursores y/o generadores, o bien mediante la reparación de daños oxidativos (Guangqing *et al.*, 2018; Carbajal-Padilla *et*

al., 2020). Diversas investigaciones en péptidos bioactivos derivados de proteínas lácteas han sido reportadas desde hace tiempo (Schanbacher *et al.*, 1997) y hasta la actualidad se siguen descubriendo nuevas secuencias peptídicas con diferentes bioactividades (Baba *et al.*, 2021), con un interés especial en la caracterización de quesos de origen latinoamericano (Van Hekken y Farkye, 2003).

El queso asadero es un queso fresco típico mexicano de pasta hilada, con un alto contenido de agua y proteínas, y en la Huasteca Noreste de México, su producción es una importante actividad económica (Carrillo-Inungaray y Mondragón-Hernández, 2011; Carbajal-Padilla *et al.*, 2020). Aunado a esto, no existe información de identificación de biofuncionalidades y/o

compuestos bioactivos antioxidantes en estos tipos de quesos, por tanto, es un campo de investigación por explorar. El objetivo del presente proyecto fue evaluar la actividad proteolítica y antioxidante en extractos hidrosolubles de quesos asaderos comercializados en el estado de Guanajuato.

Materiales y Métodos

Muestras de queso asadero

Las muestras de los quesos de un mismo lote (elaboradas en enero de 2019), se recolectaron siguiendo el procedimiento establecido en la norma PROY-NOM-109-SSA1-1994, con un peso de 0,5 kilogramos cada una y se transportaron a una temperatura controlada de 4°C a 8°C, con la finalidad de preservar su envase original.

Preparación de los extractos hidrosolubles de los quesos

Con el objetivo de concentrar los compuestos bioactivos de los quesos, todas las muestras de los quesos se trataron según lo descrito por Donkor *et al.*, (2007), con algunas modificaciones, para lo cual, se maceraron 7,5g de cada queso con 30mL de ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich) al 0,75 %, pasándose la mezcla a través del papel filtro (Whatman no. 1 de 150 mm), obteniéndose los extractos hidrosolubles de los quesos (EHQ), mismos que fueron congelados (-20 °C) hasta su análisis.

Actividad proteolítica

Se determinó según el método de Church *et al.*, (1983), donde a partir de proteínas hidrolizadas, tras liberar sus aminas primarias, se forma un

compuesto con los reactivos o-ftalaldehído (Sigma-Aldrich) y β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich). El reactivo se preparó y usó de manera inmediata, de la siguiente manera: 25mL de tetraborato de sodio (Fisher-Scientific) 100mM, 2,5mL de sodio dodecilsulfato (Sigma-Aldrich) al 20%, 40mg de o-ftalaldehído en 1 mL de metanol (Merck Millipore), 100 μ L de β -mercaptoetanol, y se aforó a 50 mL con agua grado HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (Tedea). Para ajustar los blancos se usó agua grado HPLC y todas las mediciones se realizaron por triplicado con dos mL del reactivo preparado más 1000 μ L de cada EHQ o agua grado HPLC para los controles negativos. Finalmente se leyó la absorbancia a 340nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Visible, Thermo, USA), con retardo de dos minutos de incubación a temperatura ambiente (evitando la exposición a la luz).

Actividad antioxidante

Se realizó acorde a Pritchard *et al.*, (2010), con algunas modificaciones acorde a Carbajal-Padilla *et al.*, (2020), empleando el radical libre DPPH (Sigma-Aldrich) disuelto en etanol (Merck Millipore), agua grado HPLC y los respectivos EHQ trabajándose con dos concentraciones: C1 de 0,04mM y C2 de 0,06mM, y para los controles usados correspondieron a las mismas dos concentraciones, solo que sin la adición de los EHQ. Acto seguido todas las soluciones se centrifugaron a 9470g por dos minutos (Spectrafuge 16M, Labnet, USA) y se midió la absorbancia a 517nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Visible, Thermo, USA). Todas las muestras y controles se determinaron por triplicado y se calcularon los porcentajes de inhibición del radical DPPH acorde a la Ecuación 1:

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{extracto}}}{A_{\text{control}}} \right) * 100 \quad (1)$$

donde: *A*control: absorbancia del control a la concentración

correspondiente a 517nm; y *A*extracto: absorbancia del EHQ a 517nm.

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico SAS® OnDemand for Academics (2021). En el cual, se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson con el procedimiento CORR (*correlations*), para observar la relación entre las dos variables analizadas (Actividad proteolítica y actividad antioxidante). Adicionalmente se realizó un análisis de varianza por cada variable con el procedimiento GLM (*general linear model*) y para la comparación de medias entre muestras se utilizó la prueba de Tukey (Ecuación 2).

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij} \quad (2)$$

donde: *y_{ij}*: variable de respuesta en la *j*-ésima repetición de la *i*-ésima muestra de queso; μ : media general; τ_i : efecto fijo de la *i*-ésima muestra de queso; y ϵ_{ij} : error aleatorio distribuido en forma normal con media cero y varianza donde $\epsilon_{ij} \sim (0, \sigma^2)$.

Resultados y Discusión

Actividad proteolítica

De acuerdo con los datos obtenidos (Figura 1), existen diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los EHQ con relación a su actividad proteolítica, donde las muestras número tres y cinco presentaron los valores más elevados para esta variable. Comparando los resultados obtenidos con otros estudios similares, Masotti *et al.*, (2017), trabajaron con queso italiano fermentado con un cultivo mixto de bacterias y mohos, e identificaron que existió una amplia variabilidad entre las 10 diferentes muestras de quesos analizadas en sus porcentajes de proteólisis (reportándose en baja proporción comparada con otros quesos de su tipo). Por otra parte, Ayyash y Shah (2011), detectaron relación entre las sustituciones parciales de sales sobre la proteólisis y la bioactividad de inhibición de la enzima convertidora

de angiotensina (ECA), en queso Mozzarella, lo cual afirma que los cambios en el procesamiento de los quesos repercuten directamente sobre la actividad proteolítica, resaltando a su vez que es la ruta bioquímica más importante ocurrida en los quesos y que influye directamente sobre la textura y las propiedades funcionales.

Actividad antioxidante

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla I, donde se puede apreciar que todas las muestras analizadas presentaron capacidad antioxidante, con diferencias significativas entre las marcas de quesos evaluados ($p < 0,01$), pero sin diferencias significativas entre concen-

traciones usadas del reactivo DPPH ($p > 0,01$) y con un porcentaje de inhibición del radical DPPH de 26,98% a 89,63%, para los análisis realizados de las muestras tratadas. En comparaciones con el estudio de Songisepp *et al.*, (2004) en un nuevo queso estoniano elaborado con *Lactobacillus fermentarium* como cultivo iniciador en el cual, se observaron bioactividades antimicrobianas y antioxidantes y se registró que la capacidad antioxidante total para este tipo de queso fue de $29 \pm 1\%$. Por otra parte, en un estudio más reciente realizado por Kariyawasam *et al.*, (2019), se detectó actividad antioxidante en queso cottage, observando incremento constante en esta bioactividad a medida que

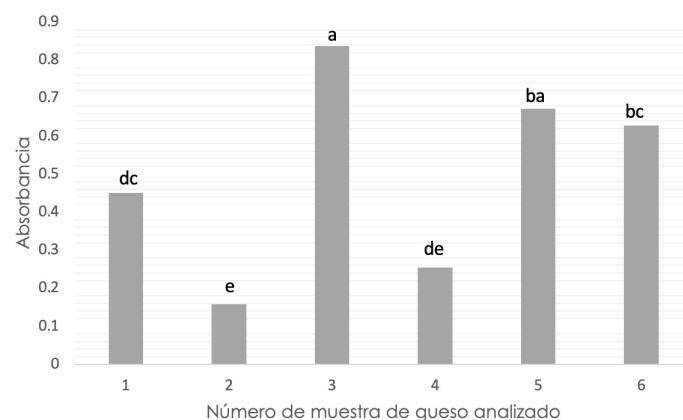


Figura 1: Actividad proteolítica medida en extractos hidrosolubles de muestras de queso asadero comercial. ^{abcde} Literales indican diferencias significativas entre muestras de quesos. Prueba de Tukey ($p < 0,01$).

TABLA I
PORCENTAJES DE INHIBICIÓN DEL RADICAL DPPH EN EXTRACTOS HIDROSOLUBLES DE MUESTRAS DE QUESO ASADERO COMERCIAL

Muestra de queso analizado	DPPH 0,04 mM	DPPH 0,06 mM
1	67,702 \pm 1,42b %	46,049 \pm 3,26b %
2	86,646 \pm 2,99a %	83,651 \pm 0,00a %
3	30,745 \pm 3,76b %	68,392 \pm 1,88b %
4	59,627 \pm 2,84ba %	70,300 \pm 1,70ba %
5	81,366 \pm 1,86ba %	38,147 \pm 1,70ba %
6	47,826 \pm 2,46b %	43,324 \pm 2,62b %

^{a,b}Literales diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre muestras, prueba de Tukey ($p < 0,01$). No se detectaron diferencias significativas entre concentraciones usadas del reactivo DPPH. Prueba de Tukey ($p < 0,01$).

avanzó su vida en anaquel y a su vez se detectaron porcentajes aproximados del 15 al 45% de inhibición del radical DPPH realizada en los extractos hidrosolubles de los quesos analizados. Así bien, la leche y sus derivados son alimentos que presentan actividad antioxidante, misma que se debe a la presencia de diferentes compuestos bioactivos como lo son compuestos fenólicos y/o péptidos bioactivos (FitzGerald *et al.*, 2004) dichos compuestos pueden responder de diferente manera dependiendo de las condiciones de reacción (Ames *et al.*, 1993), por esta razón en el presente estudio, se probaron dos concentraciones del radical DPPH, aunque las dos concentraciones usadas no presentaron efecto diferente, se logró identificar inhibición en todas las muestras analizadas.

Correlaciones entre las variables analizadas

De los resultados obtenidos en el análisis de correlación de Pearson, se logró observar una relación alta e inversamente proporcional, estadísticamente significativa entre ambas variables, actividad antioxidante y actividad proteolítica de $-0,6125$ ($p < 0,01$). Detalladamente se puede observar que los valores de absorbancia más bajos registrados para actividad proteolítica correspondientes a las muestras de quesos números dos y cuatro, también presentan actividad antioxidante con mayores porcentajes de inhibición del radical DPPH (número dos, cuatro y cinco). En este sentido, se puede inferir y profundizar la relación entre las actividades proteolíticas y antioxidantes en queso asadero, mismas que se han estudiado en otros tipos de quesos (Girromini *et al.*, 2018), como el cottage, del cual Kariyawasam *et al.*, (2019), resaltan que al hidrolizarse sus proteínas (proteólisis), se generan péptidos con bioactividades antioxidantes, ejercidas por la inhibición de radicales libres.

Por los resultados obtenidos en este estudio, se observó que

el queso asadero tiene propiedades antioxidantes que varían dependiendo de su procedencia y procesamiento, lo cual abre la pauta para que puedan realizarse futuros estudios donde se identifiquen y caractericen los compuestos antioxidantes propios de queso asadero, ya que los estudios publicados hasta el momento solo son en otros tipos de quesos.

Conclusión

Del presente estudio se puede concluir que existen diferencias significativas, para las actividades proteolíticas y antioxidantes entre los diferentes extractos hidrosolubles de los quesos asaderos analizados destacando la fuerte correlación entre ambas variables. Adicionalmente los quesos presentaron porcentajes de inhibición del radical DPPH de 26.98 a 89.63 %, por tanto, se puede decir que los quesos asaderos contienen compuestos bioactivos con funciones antioxidantes evaluadas *in situ*, y que este tipo de queso representa un interesante campo de investigación por explorar.

REFERENCIAS

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 7915–7922.

Ayyash MM, Shah NP (2011) Proteolysis of low-moisture Mozzarella cheese as affected by substitution of NaCl with KCl. *Journal of Dairy Science* 94: 3769–3777.

Baba WN, Mudgil P, Baby B, Vijayan R, Gan CY, Maqsood S (2021) New insights into the cholesterol esterase- and lipase-inhibiting potential of bioactive peptides from camel whey hydrolysates: Identification, characterization, and molecular interaction. *Journal of Dairy Science* 104: 7393–7405.

Carbajal-Padilla D, Rojas-González S, Rodríguez-Hernández G. (2020) Evaluación de la actividad antioxidante en quesos asaderos de marcas comerciales de Guanajuato. Memoria del Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Congreso Internacional sobre

Innovación y Tendencias en procesamiento de alimentos, en *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos* 5: 332–334.

Carrillo-Inungaray ML, Mondragón-Hernández FM (2011) Estudio de vida útil del queso asadero. *Revista salud pública y nutrición* 12: 1–8.

Church FC, Swaisgood HE, Porter DH, Catignani GL (1983) Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science* 66: 1219–1227.

Donkor ON, Henriksson A, Singh TK, Vasiljevic T, Shah NP (2007) ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal* 17: 1321–1331.

FitzGerald RJ, Murray BA, Walsh DJ (2004) The emerging role of dairy proteins and bioactive peptides in nutrition and health. *Journal of Nutrition* 134: 980S–988S.

Girromini C, Cheli F, Rebucci R, Baldi A (2018) Invited review: Dairy proteins and bioactive peptides: Modeling digestion and the intestinal barrier. *Journal of Dairy Science* 102: 929–942.

Guangqing M, Gao Y, Tuo Y, Li H, Zhang Y, Qian F, Jiang S (2018) Assessing and comparing antioxidant activities of lactobacilli strains by using different chemical and cellular antioxidant methods. *Journal of Dairy Science* 101: 10792–10806.

Hernández-Sánchez B, Santacruz-Juárez E, Moore D, Sánchez C (2021) Compuestos bioactivos de hongos con actividades antivirales: Mecanismos de acción y rutas biosintéticas. *Mexican Journal of Biotechnology* 6: 165–189.

Jauhiainen T, Ronnback M, Vapaatalo H, Wuolle K, Kautiainen H, Groop PH, Korpela R (2010) Long-term intervention with *Lactobacillus helveticus* fermented milk reduces augmentation index in hypertensive subjects. *European Journal of Clinical Nutrition* 64: 424–431.

Kariyawasam KMGMM, Jeewanthi, RKC, Lee NK, Paik HD (2019) Characterization of cottage cheese using Weissella cibaria D30: Physicochemical, antioxidant, and antilisterial properties. *Journal of Dairy Science* 102: 3887–3893.

Korhonen H, Pihlanto A (2006) Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal* 16: 945–960.

Kumar D, Bhalla TC (2005) Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68: 726–736.

Masotti F, Cattaneo S, Stuknytė M, Battelli G, Vallone L, De Noni I (2017) Composition, proteolysis, and volatile profile of Strachitunt cheese. *Journal of Dairy Science* 100: 1679–1687.

Mendoza-Rodríguez MN, González-Barraza L, Argüelles-Martínez L, Hernández-Ramírez I, Cervantes-Rodríguez M, Rodríguez-Salazar O, Aguilar-Paredes OM, Méndez-Iturbide D (2016) Antioxidant capacity of the wild fruit pipisco (*Jaltomata procumbens*), and its application in the preparation of a sauce. *Mexican Journal of Biotechnology* 1: 83–96.

Pritchard SR, Phillips M, Kailasapathy K (2010) Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International* 43(5): 1545–1548.

PROY-NOM-109-SSA1-1994. Proyecto de Norma – Norma Oficial Mexicana. Bienes y Servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. México D.F. 23 de mayo de 1994. Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

SAS, Statistical Analysis System (2021) Version 9.04.01 SAS® OnDemand for Academics. SAS Institute Inc. Cary, Carolina del Norte, EE.UU.

Schanbacher FL, Talhouk RS, Murray FA (1997) Biology and origin of bioactive peptides in milk. *Livestock Production Science* 50: 105–123.

Songisepp E, Kullisaar T, Hutt P, Elias P, Brilene T, Zilmer M, Mikelsaar M (2004) A New Probiotic Cheese with Antioxidative and Antimicrobial Activity. *Journal of Dairy Science* 87: 2017–2023

Van Hekken D, Farkye NY (2003) Hispanic cheese: the request for Queso. *Food Technology* 57: 32–38.

Vioque JR, Sánchez-Vioque A, Clemente A, Pedroche J, Yust MM, Millán F (2000) Péptidos bioactivos en proteínas de reserva. *Grasas y Aceites* 51: 361–3.