

“VALOR BIOLÓGICO DE LA PROTEÍNA DE CARTAMO” (*) (**)

por

A. MURILLO, DOLORES F. VEGA, CONCEPCION VIDAL y G. VARELA

Ars Pharm. IX, 3-4 (1968)

OBJETO

El cártamo (*Carthamus tinctorius*) es una planta que ha empezado a ser cultivada con bastante extensión en nuestro país. Según es sabido, de la misma se obtiene un aceite de utilización comestible y queda como residuo de la extracción una torta que se emplea en alimenatóicin animal.

Nos ha parecido de interés estudiar las posibilidades de aplicación de la harina de cártamo en las distintas especies explotadas. En este sentido hemos publicado ya un trabajo (3) en que ensayamos la digestibilidad de la harina sin decorticar, en óvidos.

Pero la principal aplicación de esta torta es como fuente de proteínas. Por tanto, nos parece que sería necesario conocer cuál es la calidad nutritiva de esta proteína al objeto de ver las posibilidades de utilización de la misma como única fuente proteica, o, en caso de que su composición en aminoácidos así lo hiciera aconsejable, ver la posibilidad de complementarla con otras fuentes proteicas.

La técnica que nos indica de una manera más fisiológica la utilización de una proteína es la del valor biológico de THOMAS-MITCHELL basada, según es sabido, en el balance de nitrógeno en ratas en crecimiento. Por ello esta es la técnica elegida para nuestro trabajo. Pero también nos parece necesario conocer la composición de aminoácidos, aminograma, al objeto de calcular el índice de OSER (17) y ver si dicho índice, obtenido de técnica química, está en la línea de los datos encontrados por la técnica biológica de MITCHELL.

Nuestro trabajo lo realizamos pues con ambos métodos y con una harina de cártamo sin decorticar procedente del comercio.

SITUACION BIBLIOGRAFICA

Aunque conocido de antiguo, el cártamo no ha sido utilizado industrialmente para la obtención de grasa hasta hace relativamente poco tiempo. Más reciente

(*) Expresamos nuestro agradecimiento al Central Institute, Food Nutrition and for Research TNO. Zeist (Holanda), donde uno de nosotros realizó las determinaciones con el analizador automático de aminoácidos.

(**) Este trabajo ha sido realizado dentro del Programa de Ayuda a la Investigación en la Universidad, que tiene concedido este Laboratorio. Am. y D. F. V. disfrutaron Becas de Investigación del P. I. O.

aún es el empleo nutritivo de la torta de semilla de cártamo por su aporte proteico, debido a lo cual la bibliografía sobre el valor nutritivo de la proteína de cártamo es relativamente escasa.

La composición de la harina de cártamo varía con la región y el suelo en que se cultiva. Para la harina de cártamo completo, no decorticado, desengrasado por expresión, GOSS y OTAGAKI (7) nos dan la siguiente composición:

Sustancia seca	92,0 %
Proteína bruta	19,0 %
Grasa	6,0 %
Fibra	33,0 %
Cenizas	4,0 %
M. E. L. N.	30,0 %

(M. E. L. N.: Materias extractivas libres de nitrógeno).

Otros autores, como MORRISON (14), SCHARREN y SCHREIBER (20), RABAK (18) y KHAN (9), etc., obtienen resultados que difieren poco de los arriba citados.

Desde que la utilización de la harina de cártamo como fuente proteica es una buena posibilidad, su contenido en aminoácidos ha interesado a diversos autores. Tomamos de ALTSCHUL (1) un resumen de los datos obtenidos por diversos investigadores sobre la composición de la proteína de cártamo expresando el contenido en aminoácidos en gramos por 16 g de nitrógeno de la muestra. Arginina: 7,8 - 8,5; Histidina: 2,0 - 2,1; Isoleucina: 3,8 - 4,7; Leucina: 5,5 - 7,3; Lisina: 2,7 - 2,9; Metionina: 1,5 - 1,1; Fenilalanina: 5,2 - 3,7; Treonina: 2,9 - 3,5; Triptófano: 1,2 - 1,0; Valina: 4,9 - 6,0; (los primeros valores corresponden a una harina con 22,1 % de proteína y los segundos a otra con 18,0 % de proteína). Los datos de un análisis más reciente han sido publicados por ASBURY (2).

Sobre la digestibilidad de la proteína de cártamo existe ya una consistente información bibliográfica. GOSS y OTAGAKI (7) obtuvieron un coeficiente de digestibilidad de 80 % para la proteína de cártamo en rumiantes; para SCHNEIDER (21) este valor es de 86 %, también en rumiantes. DAMMERS y HAM (5) han determinado la digestibilidad de la proteína de cártamo en corderos y cerdos empleando lotes de tres animales. Los resultados fueron 80,3 % en los óvidos y 82,1 % en los cerdos.

BOZA, VARELA y FONOLLA (3) en el estudio a que nos hemos referido sobre el valor nutritivo de la harina de cártamo en óvidos, han encontrado una digestibilidad para la proteína de 77 %, algo inferior a la encontrada por los otros autores.

FAULKNER (6) ha determinado el aumento de peso de ovejas alimentadas con cártamo y con soja y ha encontrado un valor de 0,32 a 0,35 libras por cabeza y día, sin grandes diferencias entre el lote que comía cártamo y el que comió soja. Este dato es de gran interés porque aun cuando en la época en que se hicieron estas experiencias la dieta de cártamo fue más cara en términos de coste por libra de peso ganada, los precios a partir de 1955 suponen una mayor economía en el empleo de cártamo.

En aves, el cártamo parece ofrecer perspectivas menos halagüeñas. MUSSEHL y HORN (15) alimentaron pollos con dietas al 34 % de cártamo y pusieron de manifiesto una falta de eficacia para el crecimiento.

KRATZER (11), también en pollos, utilizando cártamo como única fuente proteica, puso de manifiesto deficiencias de arginina, lisina y metionina. En trabajos posteriores (12) en los que se emplearon mezclas de soja y cártamo como fuente proteica también se evidenciaron ligeras deficiencias en lisina y metionina. En cambio, VALADEZ y col. (22) han obtenido buenos resultados con pollos broiler alimentados con harina de cártamo y de soja a partes iguales como fuente proteica.

Mejores resultados se obtuvieron empleando mezclas de cártamo con harinas de pescado.

GRAU y ZWEIGART (8) sustituyeron en gallinas ponedoras alimentadas con soja, parte de la soja por cártamo y no encontraron diferencias significativas en la puesta de huevos, ni inmediatamente ni durante los seis meses de duración del ensayo.

La harina de cártamo se ha ensayado tímidamente y al parecer con buenos resultados en la alimentación de chinchillas y conejos y, en ratas, KORLER (10) ha comprobado una muy aceptable eficacia para el crecimiento de dietas con harina de cártamo como fuente proteica.

NARAYANARAO y col. (16) han encontrado un PER de 1,3, siendo el tiempo de duración de la experiencia de 56 días.

Otro problema que ha interesado en relación con la utilización de la harina de cártamo en alimentación ganadera es el de la palatabilidad de las dietas en los distintos animales.

MEAD y col. (13) pensaron que la harina de cártamo no era palatable para vacas lecheras, pero esto solo fue cierto cuando la dieta era exclusivamente, o en gran parte, harina de cártamo. Cuando contiene un 25 % de harina de cártamo, la aceptabilidad por los animales fue buena y además la leche recogida durante los 27 días de experiencia no mostró alteración alguna de sabor o aroma que pudiera achacarse al cártamo.

Otros investigadores (19) han comprobado que el cártamo completo puede ser usado en la alimentación de vacas lecheras si se asocia con una adecuada proporción de heno de alfalfa de buena calidad.

La palatabilidad en ovejas es igualmente buena (3) CRAPLER (4) recomienda su empleo en cerdos y rumiantes en cebo, así como en la fabricación de piensos compuestos, aunque por su escaso aporte calórico debe ser complementada con otros alimentos.

METODICA EXPERIMENTAL

En nuestras experiencias hemos empleado una harina comercial de semilla de cártamo completa, no decorticada, extraída con disolvente. La composición de esta harina, referida a sustancia seca a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ es:

Sustancia seca	93,5 %
Proteína bruta	20,5 %
Grasa	1,2 %
Fibra bruta	39,6 %
M. E. L. N.	34,3 %
Cenizas	4,4 %

(M. E. L. N.: Materias extractivas libres de nitrógeno).

Dado que al ajustar las dietas con esta harina al 12 % de proteína suministramos una cantidad de fibra que no es la habitualmente empleada en experiencias de valor biológico en ratas, hemos molido y tamizado cuidadosamente la harina, con lo que una gran parte del material más rico en fibra quede en el tamiz. Después de este proceso, obtuvimos una harina con el 30,96 % de proteína y 24,2 % de fibra bruta, en sustancia seca. Con esta harina hemos preparado las dietas para las pruebas biológicas y en ella se han efectuado los análisis de aminoácidos.

Las pruebas biológicas realizadas han sido la determinación de los coeficientes de digestibilidad aparente (C.D.A.) y verdadero (C.D.V.) valor biológico (V.B.)

y coeficiente de utilización neta de la proteína (N.P.U.), siguiendo para ello la técnica de THOMAS-MITCHELL, repetidamente descrita por nosotros en publicaciones anteriores.

Hemos utilizado lotes de diez ratas en crecimiento, de raza Nestlé, de la cepa de nuestro laboratorio, introducidas en jaulas individuales de metabolismo, en plástico, con comedero y bebedero externos y un perfecto sistema de separación de orina y heces. El período experimental ha sido de diez días, los tres primeros de adaptación del animal al alimento y los otros siete de control de ingesta y excretas.

La dieta empleada ha sido preparada con la harina de cártamo como única fuente proteica y su composición es la siguiente:

	<u>% Sustancia húmeda</u>	<u>% Sustancia seca</u>
Cártamo	48,28	38,75
Aceite de oliva	4,00	4,00
Fibra	—	—
Corrector mineral	5,00	5,00
Corrector vitamínico	5,00	5,00
Almidón	26,28	23,62
Azúcar	23,63	23,63
TOTAL	106,19	100,00

Esta dieta contiene 12,89 % de proteína en sustancia seca, determinada por el método de Kjeldahl, empleando 6,25 como factor de conversión de nitrógeno en proteína.

Previamente al período de ensayo del problema se ha determinado para cada animal la eliminación urinaria y fecal de nitrógeno de origen endógeno. Con este fin hemos empleado una dieta que proporciona un mínimo proteico (4 %), y cuya composición es la siguiente:

	<u>% Sustancia húmeda</u>	<u>% Sustancia seca</u>
Caseína + DL Metionina (5%)	4,56 + 0,2	4,26 + 0,2
Aceite de oliva	4,00	4,00
Polvo de celulosa	8,51	8,00
Almidón de trigo	41,05	36,77
Azúcar	36,77	36,77
Corrector mineral	5,00	5,00
Corrector vitamínico	5,00	5,00
TOTAL	105,00	100,00

Los animales ingieren esta dieta durante seis días, los tres primeros de acostumbramiento y los tres siguientes de control.

Durante ambos períodos, endógeno y de ensayo del problema, se controla el peso de los animales y el alimento ingerido y se recogen diariamente las excretas.

Para la determinación de aminoácidos se ha procedido como sigue:

Se realiza una hidrólisis ácida (200 ml de ClH 6N para 200 mg de muestra) y el hidrolizado se evapora a sequedad, a 50°C y a vacío. El residuo seco se disuelve en buffer de pH = 2,2 y se introduce en el analizador automático de aminoácidos.

Las condiciones de la determinación han sido:

Para aminoácidos ácidos y neutros		Para aminoácidos básicos	
Longitud de la columna:	52,5 cm.	Longitud de la columna:	5,2 cm.
Resina	Aminex 4	Resina	AA ₂₇
Temperatura	55°C	Temperatura	55°C
1.º Buffer	pH = 3,25	Buffer	5,28
Cambio de Buffer	72 minutos	Flujo Buffer	60 ml/h
2.º Buffer	pH = 4,26	Flujo Buffer y ninhi- drina	90 ml/h
Flujo de Buffer	60 ml/h	Duración del análisis	90 minutos
Flujo de Buffer y ninhi- drina	90 ml/h		
Duración del análisis	190 minutos		

La cistina y la metionina se han determinado, siguiendo la técnica de MOORE, con una oxidación previa a la hidrólisis.

Para la determinación del triptófano se ha realizado una hidrólisis alcalina con hidróxido bórico en autoclave a 110°C durante diez horas. El exceso de hidróxido bórico se precipita con SO_4H_2 10 N y se ajusta el pH a 4. Se filtra, y el filtrado se hace pasar por el analizador de aminoácidos, empleando una columna de 55 cm. con Sephadex G25 (fine) con buffer de pH 5,28 y ajustando el flujo a 60 ml por hora.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

TABLA I.—Determinación de nitrógeno urinario y fecal de origen endógeno

Rata	Peso medio g	Sustancia seca ingerida por rata y día	O R I N A		H E C E S	
			mg de N por rata y día	Mg de N por 100 g de peso de rata	mg de N por rata y día	mg de N por lg de sustan- cia seca ingerida
1	50	4,88	32,3	64,6	13,4	2,75
2	49	4,27	31,3	63,8	10,1	2,37
3	52	4,27	25,3	48,6	8,4	1,97
4	51	4,27	30,3	59,0	10,0	2,34
5	50	4,57	30,7	61,4	7,5	1,64
6	55	5,18	24,3	44,1	5,7	1,10
7	51	4,57	32,3	63,3	7,3	1,60
8	49	3,96	23,7	48,3	9,2	2,32
9	51	4,27	37,6	73,7	12,6	2,96
10	49	3,96	31,3	63,8	8,5	2,15

TABLA II.—*Determinación del valor biológico de la proteína de cártamo*
Técnica de Thomas-Mitchell

Rata	Peso medio g	Aumento de peso por rata y día	Sustancia seca ingerida por rata y día	mg de N ingerido por rata y día
1	59	2,29	8,97	184,8
2	61	2,00	8,83	181,9
3	61	1,86	8,83	181,9
4	62	2,00	8,57	176,5
5	62	1,86	8,57	176,5
6	61	1,21	6,86	141,3
7	60	2,14	8,97	184,8
8	59	1,71	9,23	190,1
9	62	1,86	9,23	190,1
10	57	1,57	7,64	157,4

mg de N por rata y día	O R I N A		mg de N por rata y día	H E C E S	
	mg de N en- dógeno calculado	N proceden- te del alimento		mg de N en- dógeno calculado	N proceden- te del alimento
91,5	43,9	47,6	41,1	24,7	16,4
83,9	42,7	41,1	44,3	20,9	23,3
96,4	32,6	61,9	39,0	17,4	21,6
85,8	38,3	47,4	42,0	20,0	21,9
96,5	39,9	56,6	31,9	14,0	17,9
75,5	22,9	52,6	31,1	9,7	21,3
95,0	43,0	52,0	38,1	14,3	23,8
96,1	33,8	42,3	43,0	21,4	21,6
99,2	51,6	47,6	40,2	27,3	12,9
86,2	37,0	49,2	29,4	16,4	12,9

mg de N ab- sorbido aparente	mg de N absorbido verdadero	mg de N retenido	C. D. A.	C. D. V.	V. B.	N. P. U.
143,7	168,4	112,5	77,8	91,1	70,3	64,0
137,6	158,6	119,9	75,6	87,2	74,5	65,0
142,9	160,3	102,6	78,6	88,1	62,4	55,0
134,5	154,6	109,1	76,2	87,6	69,7	61,1
144,6	158,6	105,9	81,9	89,8	65,2	58,5
110,2	120,0	79,0	78,0	84,9	60,0	59,9
146,7	161,0	118,5	79,3	87,1	69,5	60,5
147,1	168,5	106,4	77,4	88,6	63,1	55,9
149,9	177,2	115,2	78,9	93,2	70,8	66,0
128,0	144,5	91,8	81,3	91,8	65,1	59,8
Media			78,5	88,9	67,1	60,0

TABLA III.—Aminograma de la proteína de cártamo

	<u>g/16 g de N</u>
Lisina	3,0
Histidina	2,3
Amoníaco	2,7
Arginina	8,2
Triptófano	0,3
Cistina	1,5
Acido aspático	9,5
Metionina (met. SO ₂)	1,7
Treonina	3,4
Serina	4,6
Acido aspártico	18,7
Prolina	4,0
Glicocola	5,8
Alanina	4,2
Valina	5,7
Boleucina	3,9
Leucina	6,3
Tirosina	2,8
Fenil-alanina	4,4

TABLA IV.—Cálculo del índice AAE de Oser para la proteína de cártamo

	<u>g/16 N</u> <u>en el huevo</u>	<u>g/16gN</u> <u>en el cártamo</u>	<u>relación</u> <u>huevo</u>
Lisina	7,2	3,07	42,6
Triptófano	1,5	0,35	20,0
Isoleucina	8,0	3,94	49,2
Valina	7,3	5,72	78,3
Arginina	6,4	8,25	128,9
Metionina + cistina	6,2	3,26	50,1
Treonina	4,9	3,44	69,3
Leucina	9,2	6,34	68,9
Fenil-alanina	6,3	4,47	70,9
Histidina	2,1	2,36	112,3

$$\text{Índice AAE} = \sqrt[10]{\frac{100 a}{a_e} + \frac{100 b}{b_e} + \dots + \frac{100 j}{j_e}}$$

Siendo a, b... j los porcentajes (g/16g de N) de aminoácidos esenciales en la proteína del alimento ensayado y ae, be... je los porcentajes correspondientes a la proteína del huevo completo.

Índice de aminoácidos esenciales (AAE) de Oser para la proteína de cártamo: 61,75.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

En rumiantes, el C.D. aparente de la proteína de cártamo es de 80 %, según Goss y OTAGAKI y 86 % según SCHNEIDER. DAMMERS y HAM encuentran que este C.D. es 80,3 % en óvidos y 82,1 % en cerdos. BOZA, VARELA y FONOLLA, en óvidos, han comunicado una digestibilidad aparente para la proteína del 77 %. Como vemos, los valores obtenidos por nosotros, en ratas, están de acuerdo con los datos de la bibliografía.

El elevado V.B. de la proteína de cártamo en rata no difiere demasiado del determinado por el índice de Oser de los aminoácidos esenciales y se ve ratificado por la buena eficacia para el crecimiento que hemos observado en nuestras experiencias. En ovejas, FAULKNER ha encontrado buenos resultados de aumento de peso, cuando la proteína ingerida fue de harina de cártamo. Aunque en pollos MUSSEHL y HORM han observado una falta de eficacia para el crecimiento de la proteína de cártamo, y las observaciones de KRATZER confirman este punto de vista, en otras especies animales, varios autores han comprobado la buena calidad de esta proteína, y concretamente en ratas, KOHLER ha encontrado unos valores elevados de aumento de peso empleando dietas con proteína de cártamo. NARAYANARAO y col. han establecido que el PER de la proteína de cártamo es 1,3.

En nuestras experiencias hemos podido comprobar la elevada ingesta de las dietas preparadas con harina de cártamo, lo que nos habla de la buena palatabilidad de este alimento. MEAD y col. en vacas de leche, BOZA, VARELA y FONOLLA, en ovejas, y otros autores en diversas especies de mamíferos han encontrado también una buena aceptación por los animales de los piensos que contienen harina de cártamo.

Encontramos, por último, en nuestro aminograma de la proteína de cártamo, una deficiencia en triptófano, lisina y metionina, que concuerda con los resultados de pruebas biológicas y químicas realizadas por otros autores. En cambio, observamos un elevado contenido en arginina, coincidiendo en esto con los valores que nos da ALTSCHUL, que no concuerda con la deficiencia de arginina que ha descrito KRATZER en pollos alimentados con harina de cártamo.

Queremos significar que, como se ha dicho, la harina de cártamo empleada por nosotros ha sido enriquecida por tamización, lo que ha supuesto una disminución marcada de su fibra bruta y, por tanto, un aumento de los otros nutrientes. Este hecho debe ser tenido en cuenta al juzgar nuestros resultados, ya que en ellos aparecerán disminuídos los efectos debidos al alto contenido en fibra de este alimento.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se estudia la calidad nutritiva de la proteína de harina de semilla de cártamo (*Carthamus tinctorius*) completa, tamizada al objeto de disminuir su contenido de fibra bruta hasta un 24,2 %. Para ello empleamos la técnica de Thomas-Mitchell que nos permite conocer el coeficiente de digestibilidad y el valor biológico de la proteína. Paralelamente hemos determinado el contenido en aminoácidos (aminograma) proteinogénicos de dicha proteína, utilizando un analizador automático de aminoácidos, y con estos datos calculamos el índice de aminoácidos esenciales (AAE) de Oser.

De nuestras experiencias concluimos:

- 1.—El coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína es $78,5 \pm 1,9$ % y el verdadero $88,9 \pm 2,5$ %.
- 2.—El valor biológico de la misma proteína es de $67,1 \pm 4,5$ % y el coeficiente de utilización neta (NPU) $60,6 \pm 3,6$ %.
- 3.—El índice de Oser (AAE) calculado del aminograma es 61,8 %.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

A study is made of the nutritive value of the protein of whole safflower seed flour (*Carthamus tinctorius*, sifted with the object of reducing its fibre content to 24.2 %. We employed the method of Thomas-Mitchell for the which enabled us to determine the coefficient of digestibility and also the biological value of the protein. At the same time, we have determined the protein-genetic amino acid (aminogram) content of this protein, using an automatic amino acid analyser, and with these results we have calculated the essential amino acid index (AAE) of Oser.

From our experiments, we draw the following conclusions:

- 1.—The apparent coefficient of digestibility of the protein is 78.5 ± 1.9 %, and the true coefficient is 88.9 ± 2.5 %.
- 2.—The biological value of the protein is 67.1 ± 4.5 % and the coefficient of net utilizable protein (NPU) is 60.6 ± 3.6 %.
- 3.—The index of Oser (AAE) calculated from the aminogram is 61.8 %.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—ALTSCHUL, A. M., "Processed Plant Protein foodstuff. 1958. P. 620-629. Academic Press Inc. New-York.
- 2.—ASBURY, A. C., J. Amer. Vet. Med. Assoc. 1962, 141, 703.
- 3.—BOZA, J., VARELA, G. y FONOLLA, J. Revista de Nutrición animal. (En prensa).
- 4.—CRAPLET, C. Aliments et alimentation des animaux domestiques. 1955. 10.^a ed. Vigot freres editeur. Paris.
- 5.—DAMMERS, J. y HAMM, G., Veeteelt Zuirelbericht, 1963, 6, 473.
- 6.—FAULKNER, E. K. Wyoming Agr. Expt. Sta. Circ. 1952, 12.
- 7.—GOSS, H. y OTAGAKI, K. K. Calif. Agr. 1954, 8 (5), 15.
- 8.—GRAU, C. R. y ZWERIGART, P. A. Calif. Agr. 1953, 7 (12), 8.
- 9.—KHAN, A. Oil and Oilseeds J. (India) 1951, 4 (4), 17.
- 10.—KOHLE, G. O. (Advan. Chem. Ser. 1966, 57, 243.
- 11.—KRATZER, F. H. Poultry Sci. 1947, 26, 623.
- 12.—KRATZER, F. H. Poultry Sci. 1951, 30, 417.
- 13.—MEAD, S. W. DUNKLEY, N. L. y HUBBARD, B. E. Univ. Calif. Agr. Ext. Service. News Release. Mayo 7. 1954.
- 14.—MORRISON, F. B., "Feeds and Feeding". 21st ed.; p. 1127. Morrison. Ithaca, New York 1951.
- 15.—MUSSEHL y HORN (1944). Nebraska Rpt. (citados por Morrison en 1951).
- 16.—NARAYANARAO, M., SWAMINATHAN, M. y SUBRAHMANYAN, V. Bull, Central Food Technol. Res. Inst. Mysore (India), 1954, 3, 158.
- 17.—OSER, J. Amer. Dietetic Assn. 1951, 27, 396.
- 17.—RABAK, T. U.S. Dept. Agr. Circ. 1935, 366.
- 19.—"Safflower Feeding Trial". Univ. Idaho Caldwell Brach Sta News Release. Mayo 6, 1953.
- 20.—SCHARRER, K. y SCHREIBER, R. Biedermanns Zentr. B. Tierernähr, 1942, 14, 355.
- 21.—SCHNEIDER, B. H. Feeds of the world. Their digestibility and composition, Agr. Experimental Station West Virginia University. Morgantow.
- 22.—VALADEZ, S., FEATHERSTON, W. R. y DICKETT, R. A. Poultry Sci., 1965, 44, 909.