



Κατανομή των λιπαρών οξέων στις κατηγορίες λιπιδίων στο μυϊκό ιστό του γαύρου (*Engraulis encrasicolus*, Lineus 1758)

Ευαγγελία Αποστολίδη¹, Μυρσίνη Χαρικλέους², Αποστολία Τσιτσάκη³, Σωτήριος Ζερβέας⁴, Νικόλαος Σταμάτης⁵, Γρηγόριος Κρέη⁶

Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός-ΔΗΜΗΤΡΑ Ινστιτούτο Αλιευτικής Έρευνας

¹eviapostolidi@hotmail.com, ²mirsinich@gmail.com, ³apostolia.tsitsi@yahoo.com, ⁴sotzerveas@gmail.com, ⁵nikstam@elgo.gr, ⁶krey@elgo.gr

ABSTRACT

Evangelia Apostolidi, Mirsini Charikleous, Apostolia Tsitaki, Sotirios Zerveas, Nikolaos Stamatis, Grigorios Krey: Fatty acid profiles of the lipid classes from the filet of European anchovy (*Engraulis encrasicolus*, Lineus 1758)

The fatty acid profiles of the lipid classes in the polar and neutral fractions of the filet fat of day-fresh European anchovy (*Engraulis encrasicolus*, Lineus 1758) were determined by a combination of Thin Layer Chromatography and Gas Chromatography. The results show the polar fraction of the fat is rich in poly-unsaturated fatty acids with docosahexaenoic acid being the most abundant fatty acid. In contrast, saturated fatty acids dominate in the neutral fraction of the fat. The lipid classes within the polar and neutral fractions of the fat that were analyzed exhibited fatty acid profiles corresponding to those of the polar and neutral fractions. These results can contribute to assessing the effects of time and storage conditions on the integrity of the lipid classes in the muscle tissue of the unprocessed fish.

Keywords: European anchovy, lipid classes, fatty acids, thin layer chromatography, gas chromatography

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο γαύρος (*Engraulis encrasicolus*, Lineus 1758) μαζί με τη σαρδέλα (*Sardina pilchardus*, Walbaum, 1792) είναι τα σημαντικότερα, από οικονομικής άποψης, μικρά πελαγικά που αλιεύονται στη Μεσόγειο. Στην Ελλάδα η αλιεία του γαύρου αντιπροσωπεύει περίπου το 25% της συνολικής παραγωγής της μέσης αλιείας της χώρας με το Θρακικό Πέλαγος να αποτελεί το κύριο αλιευτικό πεδίο του γαύρου στην Ελλάδα και ένα από τα σημαντικότερα της Μεσογείου. Ο γαύρος είναι ένα άπαχο ψάρι με το ποσοστό του λίπους στο βρώσιμο μέρος (φιλέτο) να κυμαίνεται από 2-5%. Παρά τη χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος, αυτό είναι πολύ πλούσιο σε εικοσαπενταενοϊκό (20:5n3, EPA) και εικοσιδυοεξαενοϊκό (22:6n3, DHA) και συνεπώς έχει υψηλή διατροφική αξία. Προηγούμενες μελέτες μας (Σταμάτης *et al.*, 2016) έχουν δείξει ότι αθροιστικά το EPA και το DHA αποτελούν το 40 έως και 50% του συνόλου των λιπαρών οξέων του λίπους της σάρκας του γαύρου στη θαλάσσια περιοχή της Καβάλας, σημαντικά υψηλότερο από αυτό που παρατηρείται σε άλλες περιοχές της Μεσογείου ή της Μαύρης Θάλασσας όπου δεν ξεπερνά το 30% (Zlatanov & Laskaridis, 2007, Sanfilippo *et al.*, 2011, Kocatepe & Turan, 2012). Το αυξημένο αυτό ποσοστό πιθανόν να αντανάκλα σημαντικές διαφορές στα ποιοτικά χαρακτηριστικά της τροφής του σε σχέση με άλλες περιοχές της Μεσογείου. Παρά το γεγονός ότι η σύσταση σε λιπαρά οξέα του λίπους της σάρκας του γαύρου έχει εκτεταμένα μελετηθεί, δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με τη σύσταση σε λιπαρά οξέα των πολικών και ουδέτερων κλασμάτων του ολικού λίπους και συνεπώς ούτε για τη σύσταση των κατηγοριών των λιπιδίων που συνιστούν τα δύο αυτά κλάσματα. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το προφίλ των λιπαρών οξέων τόσο στα

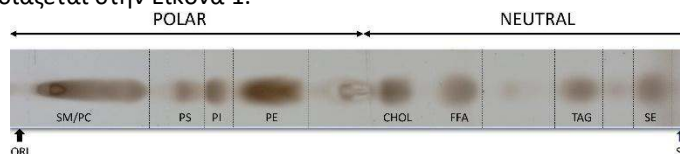
πολικά και ουδέτερα κλάσματα της σάρκας (φιλέτο) του γαύρου, όσο και στις κατηγορίες λιπιδίων που τα συνιστούν. Απώτερος στόχος αυτής της μελέτης είναι να διερευνηθεί κατά πόσο ο χρόνος και ο τρόπος διατήρησης του νωπού γαύρου μπορεί να αλλοιώσει τα χαρακτηριστικά του λίπους του και συγκεκριμένα το προφίλ των λιπαρών οξέων στις διάφορες κατηγορίες των λιπιδίων.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το δείγμα ψαριών (3 kg), συλλέχθηκε απευθείας από την καλάδα αλιευτικού σκάφους (γρι-γρι) που επιχειρούσε μέσα στον Κόλπο της Καβάλας στις 8 Σεπτεμβρίου 2020. Το δείγμα διατηρήθηκε στο σκάφος σε μείγμα πάγου (2 kg) και αλατισμένου νερού (3,5% NaCl, 1L) και αμέσως μετά τον ελλιμενισμό μεταφέρθηκε στο εργαστήριο όπου από τρία ψάρια αφαιρέθηκε το αριστερό φιλέτο το οποίο ψύχθηκε αμέσως σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκε στους -80°C μέχρι την ανάλυση. Για την ανάλυση, ο ιστός ομογενοποιήθηκε και το λίπος εκχυλίστηκε και ποσοτικοποιήθηκε όπως έχει περιγράψει προηγουμένως (Boukouvala *et al.*, 2012). Η ποιοτική σύσταση του λίπους προσδιορίστηκε με αέρια χρωματογραφία των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (για λεπτομέρειες σχετικά με τη μεθυλίωση των λιπαρών οξέων και μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας βλέπε Boukouvala *et al.*, 2012). Για την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) δύο διαλυτών ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της Junaidi (2019). Χρησιμοποιήθηκαν πλάκες 20X20 cm Silica Gel on TLC Al foils (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) στις οποίες, τόσο για το διαχωρισμό και απομόνωση των πολικών και ουδέτερων κλασμάτων, όσο και για το διαχωρισμό και απομόνωση των κατηγοριών των λιπιδίων, έγινε στην «αφετηρία» της πλάκας έγχυση 10 μg ολικού λίπους. Μετά το πέρας της χρωματογραφίας, από τις περιοχές της χρωματογραφικής πλάκας στις οποίες είχαν μετακινηθεί τα πολικά και ουδέτερα λίπη, όπως και οι κατηγορίες των λιπιδίων που τα συνιστούν, αφαιρέθηκε το στρώμα της λεπτής στοιβάδας και τοποθετήθηκε σε 20ml διαλύματος χλωροφορμίου: μεθανόλης (2:1). Μετά από 16 ώρες στους -20°C , έγινε διήθηση το διαλύματος για να αφαιρεθεί η γέλη σίλικας. Ακολούθησε η εξάτμιση του διαλύτη και η μεθυλίωση των λιπαρών οξέων και η αέρια χρωματογραφία (βλ. παραπάνω).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο διαχωρισμός των κατηγοριών των λιπιδίων που επιτεύχθηκε με την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Διαχωρισμός των κατηγοριών των λιπιδίων του φιλέτου του γαύρου με TLC και σύστημα δύο διαλυτών. Οι συντομογραφίες των κατηγοριών επεξηγούνται στο κείμενο. ORI: αφετηρία, SF: το μέτωπο του δευτέρου διαλύτη. Οι κάθετες γραμμές προσδιορίζουν την επιφάνεια της χρωματογραφικής πλάκας από την οποία εκχειλίστηκε η κάθε κατηγορία λιπιδίων. Οι κατηγορίες των λιπιδίων έγιναν ορατές μετά από χρώση με διάλυμα οξικού χαλκού (3%) σε φωσφορικό οξύ (8%).

Figure 1. Separation of the European anchovy's fillet lipid classes with the two solvent thin layer liquid chromatography system. SM/PC: sphingomyelin + phosphatidylcholine, PS: phosphatidylserine, PI: phosphatidylinositol, PE: phosphatidylethanolamine, CHOL: cholesterol, FFA: free fatty acids, TAG: triglycerides, SE: sterol esters. Ori is the origin and SF the solvent front of the second solvent. Vertical lines indicate the areas of the chromatography plate from where each of the lipid classes was extracted. Staining was performed with 3% cupric acetate in 8% phosphoric acid.

Όσον αφορά τα πολικά λιπίδια, έγινε καλός διαχωρισμός των φωσφολιπιδίων των κατηγοριών της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (PE), της φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI) και της φωσφατιδυλοσερίνης (PS), αλλά όχι μεταξύ της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) και της της σφιγγομυελίνης (SM). Συνεπώς, αυτές αναλύθηκαν ως μία κατηγορία και θα αναφέρονται ως SM-PC. Τα ουδέτερα λιπίδια διαχωρίστηκαν στις κατηγορίες της χοληστερόλης, των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA), των τριγλυκεριδίων (TGA), και των εστέρων των στερολών (SE). Καθώς στη χοληστερόλη δεν αναμένεται η παρουσία λιπαρών οξέων, αυτή η κατηγορία δε μελετήθηκε περαιτέρω.

Το προφίλ των λιπαρών οξέων (ΛΟ) του ολικού λίπους όπως και αυτό των πολικών και ουδέτερων λιπιδίων παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Αναφέρονται μόνο τα κυριότερα ΛΟ που

ανιχνεύτηκαν σε όλες τις κατηγορίες των λιπιδίων και τα οποία ποσοτικά αποτελούν >90% του συνόλου των ΛΟ στο ολικό λίπος. Συγκεκριμένα, αναφέρονται τα κορεσμένα μυριστικό (C14:0), δεκαπεντανοϊκό (C15:0), παλμιτικό (C16:0), δεκαεπτανοϊκό (C17:0) και στεατικό (C18:0), τα μονοακόρεστα παλμιτολεϊκό (C16:1), ελαϊκό (C18:1n9), cis-11 δεκαοκτενοϊκό (18:1n7) και cis-15 εικοσατετραενοϊκό (24:1n9) και τέλος τα πολυακόρεστα λινολεϊκό (18:2n6), αραχιδονικό (20:4n6), EPA και DHA. Το σύνολο των παραπάνω ΛΟ θεωρείται εδώ να αποτελεί το 100%. Στο συγκεκριμένο δείγμα, παρατηρείται ότι το ολικό λίπος (TOTAL FAT) περιέχει 48% DHA, ενώ το σύνολο των πολυακόρεστων ΛΟ (Total PUFA) είναι περίπου 56%, το σύνολο των κορεσμένων ΛΟ (Total SAT) 36,6% και το σύνολο των μονοακόρεστων (Total MUFA) περίπου 11%. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενες αναλύσεις μας σε δείγματα που συλλέχθηκαν το Σεπτέμβριο του 2010 (Σταμάτης *et al.*, 2016). Η ίδια σχεδόν σύσταση παρατηρείται και στο σύνολο των πολικών λιπιδίων (TOTAL POLAR). Στο σύνολο των ουδέτερων λιπιδίων (TOTAL NEUTRAL) το ποσοστό του DHA μειώνεται στο 20,4% και αυξάνεται σημαντικά το ποσοστό των Total SAT και των Total MUFA (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Προφίλ λιπαρών οξέων στο ολικό λίπος του φιλέτου του γαύρου (TOTAL FAT) και στα κλάσματα που περιέχουν τα πολικά (TOTAL POLAR) και ουδέτερα λιπίδια (TOTAL NEUTRAL). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο (%) ± την τυπική απόκλιση από τρία διαφορετικά φιλέτα γαύρου.

Table 1. The fatty acid profile in the total fat as well as in the polar and neutral fractions of the fat from the fillet of European anchovy. ΛΟ/FA is fatty acid. Values represent the average (%) ± standard deviation from the fillets of three different fish.

ΛΟ/FA	TOTAL FAT	TOTAL POLAR	TOTAL NEUTRAL
C14:0	1,58 ± 0,88	0,80 ± 0,43	6,89 ± 1,74
C15:0	0,40 ± 0,27	0,56 ± 0,09	1,78 ± 0,15
C16:0	23,07 ± 3,20	22,07 ± 1,88	30,52 ± 1,35
C16:1	1,05 ± 0,39	1,30 ± 0,67	6,59 ± 3,94
C17:0	1,13 ± 0,19	1,15 ± 0,06	1,79 ± 0,66
C18:0	7,44 ± 0,71	8,51 ± 0,72	13,28 ± 2,52
C18:1n9	4,88 ± 0,86	4,27 ± 0,64	7,50 ± 0,96
C18:1n7	2,95 ± 0,10	3,80 ± 0,16	1,51 ± 0,28
C18:2n6	1,36 ± 0,07	1,60 ± 0,20	1,26 ± 0,11
C20:4n6	1,74 ± 0,17	1,67 ± 0,19	1,80 ± 0,25
C20:5n3	4,82 ± 0,39	3,73 ± 0,55	4,73 ± 0,87
C24:1n9	1,69 ± 0,14	1,86 ± 0,09	1,44 ± 0,28
C22:6n3	47,91 ± 5,62	47,91 ± 4,55	20,39 ± 4,04
Total SAT	33,61 ± 4,63	33,09 ± 2,39	54,27 ± 1,24
Total MUFA	10,56 ± 1,07	11,23 ± 1,27	17,04 ± 3,38
Total PUFA	55,83 ± 5,44	54,29 ± 3,36	28,18 ± 5,03

Στα πολικά λιπίδια (Πίνακας 2) τα υψηλότερα ποσοστά των Total PUFA παρατηρούνται στις κατηγορίες SM-PC και PE, όπου επίσης καταγράφονται και τα υψηλότερα ποσοστά του DHA. Στην κατηγορία SM-PC παρατηρούνται επίσης και τα υψηλότερα ποσοστά του EPA (6,4 %), το οποίο βρίσκεται σε σχετικά χαμηλά ποσοστά στις υπόλοιπες κατηγορίες των φωσφολιπιδίων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η συγκέντρωση του στεατικού οξέος (C18:0) στις κατηγορίες PI και PS, όπου αποτελεί το κυριότερο κορεσμένο ΛΟ.

Πίνακας 2. Προφίλ λιπαρών οξέων στις κατηγορίες των πολικών λιπιδίων από το φιλέτο του γαύρου. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο (%) ± την τυπική απόκλιση από τρία διαφορετικά φιλέτα γαύρου.

Table 2. The fatty acid profile in the polar lipid classes from the fillet of European anchovy. ΛΟ/FA is fatty acid. Values represent the average (%) ± standard deviation from the fillets of three different fish. Lipid classes abbreviations as in Fig. 1.

ΛΟ/FA	SM-PC	PI	PS	PE
C14:0	1,57 ± 0,45	0,56 ± 0,14	0,53 ± 0,22	0,27 ± 0,12
C15:0	0,90 ± 0,21	0,51 ± 0,03	0,86 ± 0,14	0,21 ± 0,09
C16:0	29,92 ± 1,84	11,94 ± 0,04	18,31 ± 0,88	18,89 ± 1,20
C16:1	1,66 ± 0,17	3,25 ± 0,78	4,70 ± 2,79	0,81 ± 0,18
C17:0	0,65 ± 0,07	2,26 ± 0,19	1,99 ± 0,44	1,53 ± 0,03
C18:0	2,84 ± 0,40	34,01 ± 3,80	22,67 ± 4,25	9,42 ± 0,38
C18:1n9	5,21 ± 0,78	4,55 ± 0,25	5,26 ± 0,92	3,68 ± 0,59
C18:1n7	1,53 ± 0,10	4,21 ± 0,66	1,42 ± 0,23	4,89 ± 0,32

C18:2n6	0,70 ± 0,08	1,10 ± 0,07	0,72 ± 0,14	2,31 ± 0,03
C20:4n6	2,18 ± 0,12	2,16 ± 0,16	0,83 ± 0,32	1,05 ± 0,24
C20:5n3	6,44 ± 0,44	0,95 ± 0,17	1,02 ± 0,10	2,06 ± 0,12
C24:1n9	1,62 ± 0,22	0,48 ± 0,05	1,78 ± 0,07	2,10 ± 0,01
C22:6n3	44,79 ± 2,65	34,03 ± 3,92	36,84 ± 3,75	52,79 ± 3,15
Total SAT	35,87 ± 2,36	49,28 ± 3,49	44,36 ± 4,21	30,32 ± 1,75
Total MUFA	10,02 ± 0,60	12,49 ± 0,52	13,16 ± 1,97	11,47 ± 1,04
Total PUFA	54,11 ± 2,66	38,23 ± 3,62	40,32 ± 2,46	58,20 ± 2,77

Στις κατηγορίες των ουδέτερων λιπιδίων (Πίνακας 3) τα Total PUFA κυμαίνονται μεταξύ 22 και 24 %, με το DHA να σημειώνει το χαμηλότερο ποσοστό του (12.3, 15.5 και 17.3 % σε SE, TAG και FFA, αντίστοιχα). Κατά συνέπεια, το ποσοστό των Total SAT είναι ιδιαίτερα υψηλό και στις τρεις κατηγορίες των ουδέτερων λιπιδίων και κυμαίνεται από 42 % στους SE έως 58.% στα FFA. Παρότι το C16:0 είναι το κύριο κορεσμένο ΛΟ σ' αυτές τις κατηγορίες, υψηλά ποσοστά καταγράφονται επίσης και για το C18:0. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το παλμιτολεϊκό οξύ (C16:1) το οποίο καταγράφει πολύ υψηλές τιμές όντας το κυριότερο μονοακόρεστο ΛΟ στα FFA και SE. Αξιοσημείωτο είναι και το σχετικά υψηλό ποσοστό του EPA στην κατηγορία TAG, με τιμή συγκρίσιμη αυτής που παρατηρήθηκε στο ολικό λίπος (Πίνακας 1).

Πίνακας 3. Προφίλ λιπαρών οξέων στις κατηγορίες των ουδέτερων λιπιδίων από το φιλέτο του γαύρου. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο (%) ± την τυπική απόκλιση από τρία διαφορετικά φιλέτα γαύρου.

Table 3. The fatty acid profile in the neutral lipid classes from the fillet of European anchovy. ΛΟ/FA is fatty acid. Values represent the average (%) ± standard deviation from the fillets of three different fish. Lipid classes abbreviations as in Fig. 1.

ΛΟ/FA	FFA	TAG	SE
C14:0	2,20 ± 1,25	5,71 ± 3,34	3,83 ± 2,24
C15:0	0,92 ± 0,19	2,08 ± 0,29	2,58 ± 1,36
C16:0	32,44 ± 2,87	24,67 ± 3,48	21,03 ± 1,36
C16:1	10,30 ± 8,2	6,91 ± 4,22	13,34 ± 4,72
C17:0	1,62 ± 0,44	1,70 ± 0,57	1,16 ± 0,06
C18:0	21,01 ± 1,56	18,06 ± 12,11	13,14 ± 0,38
C18:1n9	6,35 ± 0,91	10,64 ± 1,52	8,51 ± 0,89
C18:1n7	1,78 ± 0,84	1,79 ± 0,39	1,92 ± 0,75
C18:2n6	1,34 ± 0,20	1,73 ± 0,26	1,64 ± 0,12
C20:4n6	1,21 ± 1,20	2,31 ± 1,34	0,90 ± 0,11
C20:5n3	2,46 ± 0,76	4,84 ± 0,57	2,94 ± 1,21
C24:1n9	1,09 ± 1,28	1,00 ± 0,71	3,43 ± 4,76
C22:6n3	17,27 ± 1,81	15,55 ± 3,76	12,29 ± 2,01
Total SAT	58,19 ± 3,21	51,45 ± 7,31	41,74 ± 3,72
Total MUFA	19,52 ± 5,21	20,63 ± 7,20	28,93 ± 4,55
Total PUFA	22,28 ± 2,11	23,91 ± 4,39	23,14 ± 1,45

Συμπερασματικά, μελετήθηκε η κατανομή των ΛΟ στις διάφορες κατηγορίες του λίπους στο φιλέτο του γαύρου το οποίο, καθώς αποτελεί το κυρίως βρώσιμο μέρος του ψαριού, παρουσιάζει και το μεγαλύτερο ενδιαφέρον από διατροφική άποψη. Η προσέγγιση αυτή αυτά θα επιτρέψει, εκτός των άλλων, και την εκτίμηση των πιθανών αλλοιώσεων των ποιοτικών χαρακτηριστικών του λίπους του νωπού ψαριού ως αποτέλεσμα του χρόνου και των συνθηκών διατήρησής του. Συνεπώς, αναμένεται να συμβάλει και στην εξέλιξη νέων μεθόδων και διαδικασιών επέκτασης της εμπορικής διάρκειας ζωής του νωπού γαύρου, όπως και άλλων ειδών ψαριών.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία υλοποιήθηκε στο πλαίσιο του έργου «Επέκταση εμπορικής διάρκειας ζωής του νωπού γαύρου σε πάγο με χρήση μικρο-νανο-φυσαλίδων όζοντος» (ΟΠΣ/MIS 5010351), που χρηματοδοτήθηκε από το Ε.Π.Α.Λ.Θ. (ΕΣΠΑ 2014-2020). Ευχαριστούμε επίσης το πλήρωμα του αλιευτικού σκάφους «Σ. ΜΑΝΙΟΣ» και ιδιαίτερα τον ιδιοκτήτη και καπετάνιο του κ. Ι. Μανιό.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Junaidi A (2019) Lipid Homeostasis in Farmed Fish: Role of Peroxisome-Proliferator Activated Receptor-Gamma (PPAR γ). Ph. D. Thesis, University of Stirling, URI <http://hdl.handle.net/1893/30009>.

Kocatepe D, Turan H (2012) Proximate and Fatty Acid Composition of Some Commercially Important Fish Species from the Sinop Region of the Black Sea. *Lipids* 47: 635–641

Sanfilippo M, Reale A, Ziino M, Romeo V, Lembo E, Manganaro A (2011) Chemical Composition and Nutritional Value of *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758) Caught by Driftnet “Menaide” along Sicilian Coast: a Natural Food for Mediterranean Diet. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 3: 44-50, 2011

Zlatanos S, Laskaridis K (2007) Seasonal variation in the fatty acid composition of three Mediterranean fish—sardine (*Sardina pilchardus*), anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and picarel (*Spicara smaris*). *Food Chemistry* 103: 725-728.

Στμάτης Ν, Ελευθεριάδης Ε, Κρέη Γ (2016) Συγκριτική, ποιοτική, ανάλυση των λιπαρών οξέων στο μυϊκό ιστό και στο στομαχικό περιεχόμενο του γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) από τον Κόλπο Καβάλας. Πρακτικά 16^{ου} ΠΣΙΔ, Σελ. 461-464.