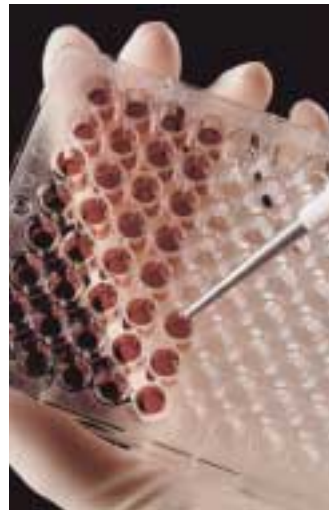


La nueva Biotecnología apuesta por la vinificación

PALOMA MANZANARES Y MARGARITA OREJAS. DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS, INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC). APARTADO DE CORREOS 73, 46.100 BURJASSOT. VALENCIA.



Se podría considerar que la elaboración del vino es simultánea a la aparición de la propia civilización. Los primeros testimonios del cultivo de viñedos parecen datar del año 7000 a.C., en la antigua Mesopotamia; existen también evidencias de la producción de vino, por egipcios y fenicios, hacia el año 5000 a.C., y se considera a griegos y romanos como los verdaderos impulsores de la viticultura en Occidente. El siglo XVII representa el comienzo de los métodos modernos del cultivo, producción y almacenamiento de vino, pero no es hasta mediados del

siglo XIX cuando Louis Pasteur demuestra que las levaduras son las responsables de la fermentación alcohólica del mosto de uva; si bien, como se muestra en este artículo, la conversión de mosto de uva en vino, en estos momentos, puede llegar a ser algo más controlado, que las fermentaciones espontáneas llevadas a cabo con anterioridad.

Desde el punto de vista microbiológico, la transformación del mosto de uva en vino o vinificación es un proceso complejo en el que intervienen distintos microorganismos, y donde las levaduras, principal-

mente *Saccharomyces cerevisiae*, juegan el papel más destacado. Durante la vinificación las levaduras utilizan los azúcares y otros componentes del mosto para su crecimiento, produciendo etanol, anhídrido carbónico, y en menor medida otros compuestos responsables de la composición química y las cualidades sensoriales del vino. Desde un punto de vista bioquímico, el vino puede considerarse como un producto de la transformación enzimática del mosto de uva. Un esquema del proceso de elaboración de vinos blancos y tintos aparece en la Figura 1.

En las últimas décadas, coincidiendo con el avance de la Biotecnología, se han desarrollado nuevas técnicas de vinificación, que incluyen, entre otras, la utilización de cepas seleccionadas de *S. cerevisiae* (para normalizar la microbiota inicial y dar lugar a fermentaciones homogéneas año tras año), y el empleo de enzimas (para solucionar problemas puntuales del proceso y mejorar la calidad del producto final). El uso de levaduras seleccionadas, capaces de conducir la fermentación alcohólica e imponerse al resto de levaduras presentes, abre la posibilidad de aplicar técnicas de ingeniería genética a la levadura vínica para obtener nuevas cepas capaces de producir, a lo largo de la fermentación, las enzimas de interés en enología cuya adición se realiza de forma regular. Asimismo, las técnicas de ADN recombinante se están aplicando a la vid, donde se están produciendo importantes avances (como por ejemplo la producción de plantas resistentes a ciertas enfermedades víricas y fúngicas) y a los microorganismos productores de los preparados enzimáticos comerciales de uso en enología (por ejemplo para conseguir mayores rendimientos y preparados más específicos).

Mientras que la utilización de levaduras seleccionadas, en forma de levaduras vínicas secas activas, y de preparados enzimáticos es una práctica generalizada en las bodegas desde la década de los 70, el empleo de vides o levaduras vínicas modificadas genéticamente se enfrenta al rechazo que existe en estos momentos, principalmente en la Unión Europea, hacia los alimentos modificados genéticamente. Aunque en algunos países ya se está evaluando la posibilidad de producir vinos transgénicos, la Organiza-

ción Internacional de la Viña y el Vino (O.I.V.) no ha aceptado, por el momento, ni las viñas de origen transgénico, ni tampoco el uso de microorganismos modificados para la vinificación. De hecho, las levaduras y las uvas transgénicas son, más que una realidad, una alternativa de futuro para mejorar el proceso de vinificación y conferir nuevas características a los vinos.

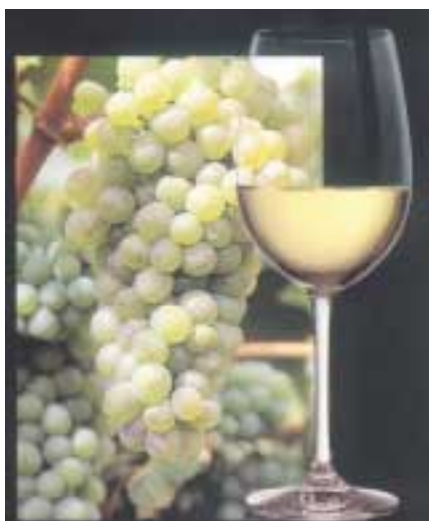
En el Departamento de Biotecnología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) se está realizando un importante esfuerzo en la selección y caracterización de levaduras vínicas y de enzimas de interés en enología, en la clonación de los genes que las codifican y en la construcción de nuevas cepas de levaduras vínicas que mientras llevan a cabo la fermentación del mosto secretan eficazmente las enzimas de interés; además se está trabajando en la construcción de hongos hiperproductores de dichas enzimas y en la ingeniería proteica de las mismas para mejorar sus ca-

racterísticas enológicas. Este artículo pretende dar una visión actualizada sobre el empleo de enzimas en enología, a la vez que revisa los avances conseguidos en la obtención de cepas de levaduras vínicas transgénicas.

La importancia de las enzimas en enología

Las enzimas juegan un papel fundamental en el proceso de obtención de vino a partir de mosto de uva, es por tanto fundamental entender la naturaleza y el comportamiento de las distintas enzimas que intervienen durante la vinificación, para poder así potenciar la actuación de las enzimas beneficiosas e inhibir aquellas cuya actuación pueda ir en detrimento de la calidad del vino. La mayoría de estas enzimas provienen de la uva y de su microbiota, así como del resto de microorganismos presentes durante la vinificación. Estas enzimas, llamadas endógenas, son, por lo general, poco abundantes y poco efectivas en las condicio-

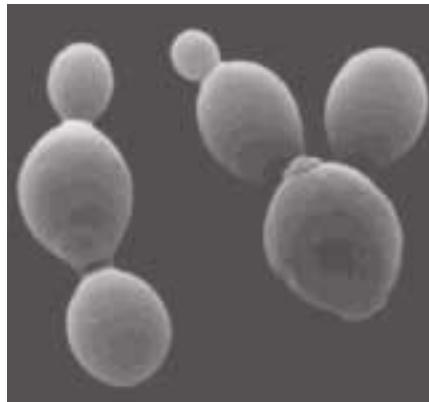
FIGURA 1: ESQUEMA DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE VINOS BLANCOS Y TINTOS



nes de vinificación por lo que en la actualidad es una práctica común en las bodegas la utilización de enzimas, llamadas exógenas, adicionadas en forma de preparados enzimáticos comerciales, principalmente de origen fúngico, que tratan de suplir las carencias y/o reforzar la acción de las primeras.

La utilización de preparados enzimáticos comerciales se justifica fundamentalmente por dos razones: (i) conseguir un incremento del rendimiento en mosto y a la vez mejorar la clarificación y procesado del vino, para lo que se utilizan pectinasas, glucanasas, xilanasas y proteasas, e (ii) incrementar la fracción aromática mediante la acción de glicosidasas. La reducción de la concentración de carbamato de etilo utilizando ureasas ácidas, y la reducción de los niveles de alcohol debido a la acción de glucosa oxidasa también aparecen documentadas en la bibliografía, si bien su relevancia tecnológica es más limitada.

Pectinasas, glucanasas y xilanasas, también llamadas de forma genérica "enzimas de maceración", sirven tanto para degradar los polisacáridos estructurales de las paredes celulares de las uvas que dificultan el procesado del mosto y del vino, como para mejorar la extracción de compuestos fenólicos y de precursores aromáticos.



El tratamiento del vino con proteasas pretende sustituir el tratamiento clásico de clarificación con bentonita, realizado para evitar la quiebra proteica. Ésta consiste en la aparición, en vino embotellado, de precipitados de proteínas asociados con compuestos fenólicos. Sin embargo, en estos momentos se duda de la eficacia de los tratamientos proteolíticos, debido, no a que las proteasas exógenas no sean activas en condiciones de vinificación, sino a la resistencia inherente de las proteínas responsables de la quiebra proteica a la proteólisis.

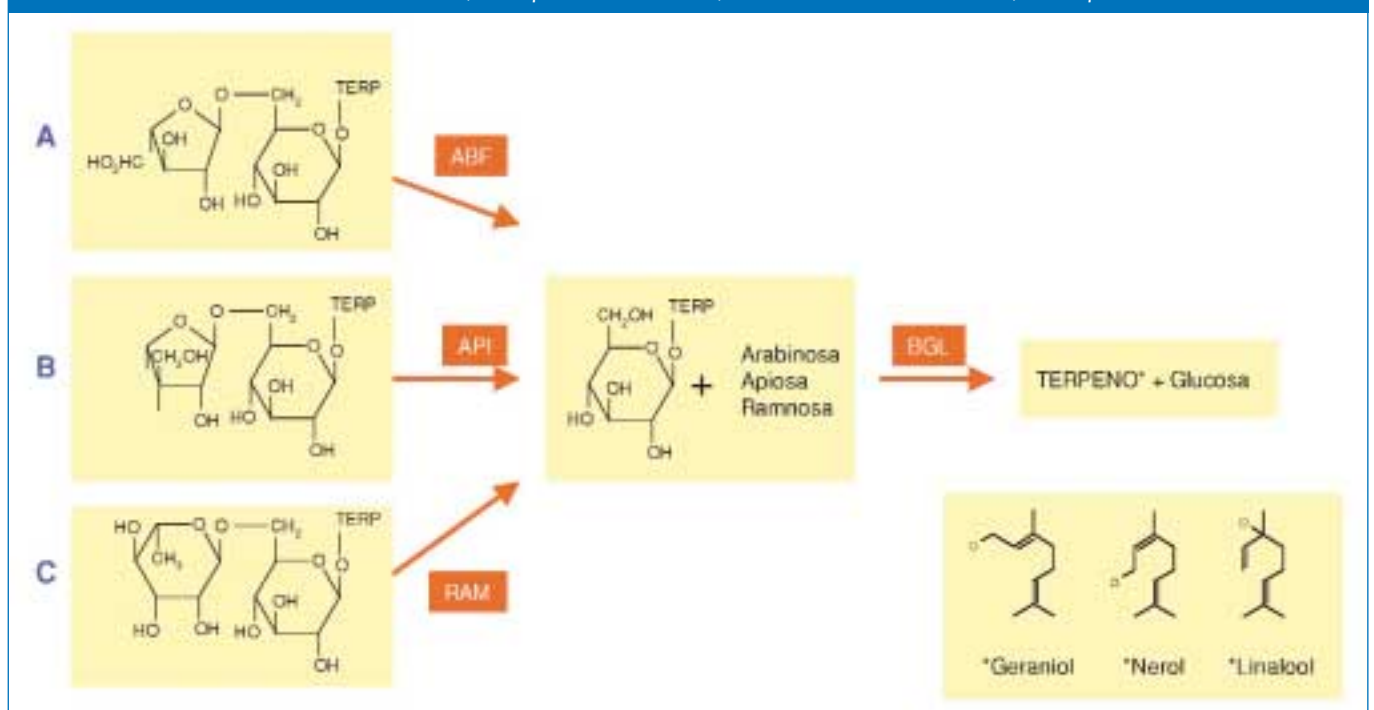
El incremento de la fracción aromática mediante la utilización de glicosidasas se basa en el hecho de que en la uva, ciertos componentes del aroma, entre los que destacan los terpenos (fundamentalmente

geraniol, nerol y linalool), además de en su forma libre se encuentran formando compuestos glicosídicos no volátiles. Estos complejos donde, en general, el componente aromático se encuentra unido a un disacárido, pueden ser hidrolizados en dos pasos mediante la acción primero de una α -arabinofuranosidasa, β -apiosidasa o α -ramnosidasa, y a continuación mediante la acción de una β -glucosidasa que hidrolizará el enlace entre la glucosa y el compuesto volátil (ver Figura 2).

Preparados enzimáticos comerciales

A principios de los años 50, se comercializó el primer preparado de carácter pectinolítico desarrollado específicamente para ser usado en vinificación. La ventaja de este preparado frente a los utilizados en la clarificación de zumos de manzana, era que producía muy poco metanol al degradar las pectinas de la uva, debido a que su actividad mayoritaria era una pectín liasa. Con el paso de los años se fueron comercializando nuevos preparados enzimáticos útiles no sólo para clarificar sino también para mejorar la extracción y filtración del mosto, aumentar la extracción de color y reducir la turbidez y el pardeamiento de los vinos. Esta eficacia mayor se debía a la presencia en estos preparados de niveles elevados de

FIGURA 2: HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PRECURSORES GLICOSILADOS. A: α -L-ARABINOFURANOSIL-(1,6)- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO; B: β -D-APIOSIL-(1,6)- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO; C: α -L-RAMNOPIRANOSIL-(1,6)- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO; ABF: α -L-ARABINOFURANOSIDASA; API: β -D-APIOSIDASA; RAM: α -L-RAMNOSIDASA; BGL: β -D-GLUCOSIDASA



otras actividades colaterales tales como celulasas, hemi-celulasas, proteasas y glucosa oxidasa.

Desde los años 70, cuando el uso de preparados pectinolíticos se convirtió en una práctica generalizada, hasta nuestros días, se han ido desarrollando nuevos y mejores preparados enzimáticos (Tabla 1). Actualmente se comercializan como “enzimas de maceración”, constituidos fundamentalmente por enzimas relacionadas con la degradación de paredes celulares vegetales y glicosidasas. Estas últimas, como ya se ha comentado, están relacionadas con el incremento de la fracción aromática de los vinos.

Sin embargo, estos preparados usados tradicionalmente en las bodegas pueden presentar una serie de inconvenientes, entre los que se han descrito tanto su falta de especificidad y su poca actividad en las condiciones de vinificación, como la presencia de actividades contaminantes que pueden tener efectos negativos sobre el producto final, tal es el caso

de la actividad cinamil esterasa, implicada en la formación de fenoles volátiles. Tanto las compañías productoras de enzimas como los laboratorios de investigación, están tratando de solucionar estos inconvenientes mediante la selección y caracterización de microorganismos productores y de enzimas específicas para aplicaciones enológicas. Asimismo, la adición de enzimas, aunque realizada de forma racional y juiciosa, no está exenta de cierta polémica, debido en parte a la tendencia cada vez más extendida por parte del consumidor de reclamar productos con la mínima cantidad de aditivos, así como ser considerada, por algunos puristas, como una práctica “artificial” y poco “natural” del enólogo.

Levaduras vínicas modificadas genéticamente: “Let the yeast do the work”

Las levaduras se han utilizado para producir alimentos y bebidas desde el Neolítico. Aunque su implicación en fermentación se reconoció entre los años



1836-1838, no es hasta los trabajos de Louis Pasteur cuando se demuestra su papel en la bioconversión del azúcar en etanol y anhídrido carbónico. En un principio, la mejora de cepas industriales se basaba tradicionalmente en técnicas de genética clásicas tales como mutagénesis, hibridación, fusión de protoplastos, etc. La mayor limitación de esas técnicas es la dificultad de añadir o quitar ciertas características sin modificar otras. Los avances en las técnicas de ADN recombinante han hecho posible introducir nuevas propiedades en cepas industriales de levadura. Las ventajas de la aplicación de las técnicas de ingeniería genética sobre las de genética clásica son precisamente especificidad, versatilidad y rapidez.

En los últimos 12 años se ha realizado un gran esfuerzo por mejorar varios aspectos en levaduras vínicas, principalmente tratando de conseguir: (i) que tengan una mayor capacidad fermentativa y, (ii) que rindan un producto de mayor calidad, bien sea en relación con sus características organolépticas, funcionales y/o

de seguridad. Hoy en día es posible conseguir levaduras que hiperproduzcan o dejen de producir una determinada enzima, que expresen *de novo* una, o más de una, determinada actividad enzimática y/o que expresen una enzima propia pero modificada para tener nuevas características más adecuadas al proceso de vinificación.

Levaduras vínicas productoras de enzimas de maceración

La importancia de las enzimas de maceración en el proceso de vinificación también se refleja en el hecho de que las primeras levaduras vínicas recombinantes fueron productoras de este tipo de enzimas. A principio de los noventa, dos grupos de investigación de diferentes laboratorios publicaron los primeros trabajos en los que se desarrollaron las primeras levaduras vínicas transgénicas: una levadura vínica endoglucanólítica en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC)

(Pérez-González, González, Querol, Sendra y Ramón, 1993) y otra levadura que mejoraba la degradación de pectinas, al coexpresar una pectato liasa y una poligalacturonasa, construida en la Universidad de Stellenbosch en Sudáfrica (Laing y Pretorius, 1993). Con posterioridad se han construido levaduras vínicas xilanolíticas y nuevas versiones de levaduras pectinolíticas y celulolíticas, por lo que en la actualidad se dispone de levaduras vínicas que expresan prácticamente todo el espectro de las llamadas “enzimas de maceración” (ver Tabla 2).

Levaduras vínicas productoras de glicosidasas y enzimas implicadas en la formación de ésteres afrutados

Dado que el aroma es una de las características más importantes que determinan la calidad de un vino, las glicosidasas, enzimas implicadas en liberación de terpenos y otros compuestos volátiles, y las alcohol acetiltransferasas, enzimas responsables de la producción de ésteres

de acetato, han sido objetivo de distintos grupos de investigación a la hora de construir levaduras vínicas recombinantes. En la actualidad se dispone de levaduras transgénicas que secretan de forma eficiente las enzimas α -arabinofuranosidasa, β -glucosidasa y α -ramnosidasa, y se ha demostrado que los vinos resultantes de fermentaciones llevadas a cabo conjuntamente por estas dos últimas levaduras recombinantes, presentaban un incremento en la concentración de terpenos. Asimismo, también se ha construido una levadura vínica que mediante la hiperproducción de una única enzima, una exoglucanasa propia de *S. cerevisiae*, incrementa la fracción térpénica de los vinos.

En cuanto a la mejora de la calidad aromática del vino mediante el incremento de ésteres afrutados, se ha construido una levadura vínica que, tras sobreexpresar un gen propio que controla la producción de ésteres de acetato, el gen *ATF1*, produce vinos con cantidades incrementadas de acetato de isoamilol (aroma a banana) y acetato de 2-feniletilol (aroma afrutado y floral con toque a miel). A pesar del inconveniente de una producción simultánea de acetato de etilo, que puede conferir al vino un carácter avinagrado, estos estudios abren las puertas a vinos embotellados que conserven el carácter afrutado durante más tiempo.

Levaduras vínicas productoras de glucosa oxidasa

La demanda por parte del consumidor de vinos con menor contenido alcohólico ha centrado el interés de los investigadores en la enzima glucosa oxidasa. La reducción del contenido alcohólico de los vinos puede conseguirse, como se indicó anteriormente, mediante la adición de glucosa oxidasa o mediante la utilización de una cepa de levadura vínica que exprese el gen que codifica dicha enzima. Ambas aproximaciones han resultado satisfactorias con la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, y los vinos resultantes de la fermentación con esta levadura recombinante presentan una reducción de aproximadamente un 2% en su contenido alcohólico.

Existen además otros ejemplos de levaduras vínicas recombinantes que, al igual que en el caso de la formación de ésteres de acetato, tampoco tienen su contrapartida en forma de enzimas exógenas. Así, ya se han realizado estudios acerca de la acidificación biológica de vinos utilizando cepas de *S. cerevisiae* productoras de ácido láctico mediante la expresión del gen *LDH* de *Lactobacillus casei*, que codifica la enzima lactato deshidrogenasa, o del aumento del contenido en glicerol, compuesto que proporciona cuerpo al vino, sobreexpresando el gen propio *GPD1*, que codifica la en-

zima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, lo que lleva a un incremento entre 1.5 y 2.5 veces del contenido en glicerol. Por otra parte es también factible obtener cepas malo-etánolicas de levadura vínica capaces de llevar a cabo también la fermentación maloláctica, realizada tradicionalmente por bacterias ácido-lácticas. Esta característica ya se ha conseguido coexpresando una permeasa de malato de *Schizosaccharomyces pombe* y la enzima maloláctica de *Lactococcus lactis* en una cepa de laboratorio de *S. cerevisiae*.

Otros ejemplos interesantes y de gran actualidad son el desarrollo de levaduras vínicas que puedan actuar también como agentes de biocontrol inhibiendo el crecimiento de microorganismos alterantes, lo que permitiría reducir las cantidades de sulfuroso que se adicionan al mosto y vino como agente antimicrobiano. De hecho la O.I.V. ha aprobado recientemente el uso de preparaciones comerciales de lisozima como agente antimicrobiano, con el fin de controlar la fermentación maloláctica. En este sentido, ya se han construido cepas bactericidas de levaduras de laboratorio que expresan el gen *pedA* de *Pediococcus acidilactici* (codifica una bacteriocina); resultado que abre las puertas a la construcción de cepas vínicas similares que aparte de la fermentación alcohólica, pudieran controlar las bacterias alterantes. En cuanto a la posible mejora de las características funcionales, se ha conseguido el aumento en los vinos del contenido en resveratrol, fenol relacionado con la prevención de ciertas enfermedades, tras expresar el gen *bglN*, que en *Candida molischiana* codifica una β -glucosidasa, en la cepa vínica *S. cerevisiae* T₇₃.

Perspectivas futuras

En nuestro país, contamos con una superficie de viñedo de más de un millón de hectáreas, que supone la tercera parte del total de la Unión Europea y casi un 15% de la mundial, con una producción superior a los 35 millones de hectolitros de vino. Estos datos, que reflejan la importancia del sector vitivinícola español, se enmarcan en un contexto de creciente globalización de la producción de vino, donde nuevos países productores con menor tradición como E.E.U.U., Alemania, Argentina, Sudáfrica, Australia y Chile han aumentado sus exportaciones durante la última década en un 137%. Ante este hecho, los países tra-

TABLA 1: ALGUNOS PREPARADOS ENZIMÁTICOS RECOMENDADOS PARA VINIFICACIÓN DISPONIBLES EN EL MERCADO

Preparado comercial	Fabricante Distribuidor	Actividades principales (según fabricante)
AR2000	DSM	Glucosidasas
Gama de Biopectinase	Quest International	Pectinasa, celulasa
Gama de Endozym	AEB Group	Pectinasa, β -glucosidasa, hemicelulasa, celulasa
Gama de Enovin	Agrovin	Enzimas pectolíticas
Gama de Lallzyme	Lallemand	Pectinasa, glicosidasa, galactanasa, celulasa
Gama de Progress	Esseco Group	Enzimas pectolíticas
Gama de Rapidase	DSM	Pectinasa, hemicelulasa, glucanasa
Gama de Rohavin	AB Enzymes	Pectinasa, celulasa, glucanasa, proteasa
Gama de Rohapect	AB Enzymes	Pectinasa, hemicelulasa, proteasa
Gama de Uvazym	Esseco Group	Enzimas pectolíticas
Gama de Vinoxym	Novozymes	Pectinasa, hemicelulasa, celulasa
Novarom	Novozymes	Glicosidasas
Novoclair FCE	Novozymes	Pectinasa
Ultrazym 100	Novozymes	Pectinasa

dicionalmente productores, entre los que se encuentra España, junto con Francia e Italia, deben, sin olvidar sus peculiaridades, admitir nuevos caminos de innovación que permitan una diferenciación y especialización de las bodegas y de los productos.

En este contexto, la biotecnología enológica podría proporcionar a los bodegueros nuevos desarrollos que permitieran elaborar “vinos a la carta”. Sin embargo, en estos momentos es bien sabido, como ya se ha indicado anteriormente, que la aplicación de la ingeniería genética en la alimentación plantea problemas de aceptación por parte del consumidor, fundamentalmente en la Unión Europea. Esta resistencia del consumidor podría ser incluso mayor en el caso del vino, ya que se trata de una bebida con un componente cultural importante. Es por ello que los estudios de tipo toxicológico, unidos a los de impacto ambiental, resultan imprescindibles para convencer al consumidor de la bondad de este tipo de alimentos.

Son tantos y tan diferentes los posibles beneficios que para la industria del vino supondría la aplicación de la ingeniería

genética y metabólica en levaduras vínicas, que este tipo de desarrollos son una de las principales líneas de investigación tanto en nuestro Instituto como en otros laboratorios punteros en enología como el Institute for Wine Biotechnology de la University of Stellenbosch en Sudáfrica o el Australian Wine Research Institute. Sin embargo, no hay que olvidar que todos estos posibles beneficios sólo se harán realidad si estas nuevas tecnologías se aplican de una manera racional y sistemática y sobre todo, respetando la naturaleza propia de un producto tan característico y único como el vino.

Agradecimientos

La información que las autoras aportan a esta revisión es fruto del desarrollo de varios proyectos financiados por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) entre los que se incluyen los proyectos en curso AGL2002-01906, AGL2003-01295/ALI y AGL2004-00978/ALI. Las autoras agradecen a todos los investigadores de los laboratorios de Biotecnología de Hongos, Enzimas Vínicas y Microbiología Molecular de Levaduras Industriales del De-

partamento de Biotecnología de Alimentos del IATA por su contribución a este trabajo. ■



CENTRO DEL CSIC: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos.

Web: <http://www.iata.csic.es>

Laboratorios: Biotecnología de Hongos (M. Orejas) y Enzimas Vínicas (P. Manzanares).

Departamento: Biotecnología de Alimentos.

Nombre Investigador: Margarita Orejas y Paloma Manzanares.

E-mail: morejas@iata.csic.es y pmanz@iata.csic.es

Objetivo general de la investigación:

- Enzimología enológica.
- Selección de levaduras vínicas no-*Saccharomyces*.
- Revalorización de subproductos de la vinificación: evaluación de compuestos bioactivos.
- Mejora genética de hongos filamentosos para la producción de enzimas de interés enológico.
- Ingeniería metabólica de levaduras vínicas.
- Ingeniería de proteínas para mejorar sus características enológicas.

TABLA 2: ALGUNAS LEVADURAS VÍNICAS RECOMBINANTES DISPONIBLES

Gen manipulado	Enzima(s) que hiperproducen	Laboratorio
<i>egl1 Trichoderma longibrachiatum</i>	β -(1,4)-Endoglucanasa	IATA-CSIC, Valencia. 1993
<i>pelE Erwinia chrysanthemi</i> <i>peh1 Erwinia carotovora</i>	Pectato liasa Poligalacturonasa	Universidad de Stellenbosch, Sudáfrica. 1993
<i>end1 Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>pelE E. chrysanthemi</i> <i>peh1 E. carotovora</i>	Endo- β -1,4-glucanasa, Pectato liasa Poligalacturonasa	Universidad de Stellenbosch, Sudáfrica. 1994
<i>peA Fusarium solani</i>	Pectato liasa	IATA (CSIC), Valencia. 1995
<i>abfB Aspergillus niger</i>	α -L-Arabinofuranosidasa	IATA (CSIC), Valencia. 1996
<i>bglIn Candida molischiana</i>	β -D-Glucosidasa	IATA (CSIC), Valencia. 1998
<i>xInA Aspergillus nidulans</i>	β -(1,4)-Endoxilanasas	IATA (CSIC), Valencia. 1999
<i>LDH Lactobacillus casei</i>	Lactato deshidrogenasa	INRA-IPV, Montpellier (Francia). 1999
<i>GPD1 Saccharomyces cerevisiae</i>	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	INRA-IPV, Montpellier (Francia). 1999
<i>PGU1 S. cerevisiae</i>	Poligalacturonasa	Universidad Santiago de Compostela. 2000
<i>ATF1 S. cerevisiae</i>	Alcohol acetiltransferasa	Universidad de Stellenbosch, Sudáfrica. 2000
<i>mae1 Schizosaccharomyces pombe</i> <i>mae2 Schiz. pombe*</i>	Permeasa de malato Enzima málica	Universidad de Stellenbosch, Sudáfrica. 2001
<i>rhaA Aspergillus aculeatus</i>	α -L-Ramnosidasa	IATA (CSIC), Valencia. 2003
<i>goxC A. niger*</i>	Glucosa oxidasa	Universidad de Stellenbosch, Sudáfrica. 2003
<i>EXG1 S. cerevisiae</i>	Exo-1,3- β -glucanasa	IATA (CSIC), Valencia. 2004

* Trabajo realizado sólo en cepas de laboratorio de *S. cerevisiae*, con posible aplicación en cepas vínicas.