

BÓKA BEÁTA<sup>1</sup>, ADÁNYINÉ KISBOCSKÓI NÓRA<sup>2</sup>, BALLAGÓ  
KRISZTINA<sup>1</sup>, KISS ATTILA<sup>1</sup>

## SAJTOK BIOGÉN AMIN TARTALMÁNAK MEGHATÁROZÁSA DIAMIN OXIDÁZ ENZIM ALAPÚ AMPEROMETRIÁS BIOSZENZORRAL \*

**Abstract:** Biogenic amines are nitrogen-containing compounds of biological importance in vegetable, microbial and animal cells. Cheeses are among those high-protein-containing foodstuffs in which enzymatic and microbial activities cause the formation of amino acids and biogenic amines. During cheese ripening, degradation of casein occurs leading to the accumulation of free amino acids that can be converted into biogenic amines by the activity of bacterial decarboxylases. Although biogenic amines are essential to living organisms, consumption of food containing high amounts of them may have toxicological effects.

The aim of our work was to develop a diamine oxidase based biosensor method for determination of biogenic amines in cheese samples. The amine content of cheese samples need to be extracted with 100mM phosphate buffer, pH=7.0 for biosensor analysis. This extract can be measured after centrifugation and dilution. The method was applied for analysis of 9 different cheese samples.

### Bevezetés és célkitűzés

A biogén aminok kis molekulatömegű, nitrogéntartalmú szerves bázisok, amelyek biológiai aktivitással rendelkeznek, és baktériumok, növényi és állati sejtek természetes összetevői. Biogén aminok minden olyan élelmiszerben előfordulhatnak, amely fehérjét, vagy szabad aminosavat tartalmaz, és ki van téve mikrobiális vagy biokémiai aktivitást lehetővé tevő körülményeknek, mivel főként az aminosavak bakteriális dekarboxileződése illetve aldehidek és ketonok transzaminálódása során keletkeznek (Silla-Santos 1996). A sajtok a magas proteintartalmú élelmiszerek közé tartoznak, amelyekben enzimek és mikrobák hatására aminosavak és biogén aminok képződhetnek (Laleye et al. 1987). A sajt érése során a kazein degradációja szabad aminosavak felhalmozódását eredményezi, melyeket a bakteriális dekarboxiláz enzimek biogén aminokká alakíthatnak (Halász et al 1994). Bár a biogén aminokra szüksége van az élő szervezet-

---

<sup>1</sup> Eszterházy Károly Főiskola, 3300, Eger, Leányka u. 6.

<sup>2</sup> Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet, 1022, Budapest, Herman Ottó u. 15.

\* Kutatásainkat az EGERFOOD Regionális Tudásközpont keretében végeztük.

nek, nagy mennyiségben azonban toxikus hatásúak, allergiás reakciókat okozhatnak. (Silla Santos 1996). Egyes szerzők szerint biogén amint 1000 mg/kg feletti koncentrációban tartalmazó sajt okoz mérgezést (Roig-Sagues et al 1998), míg mások már 300 mg/kg koncentrációnál jeleznék a mérgezés veszélyét. (Spanjer, Van Roode 1991).

Önal (2007) összefoglalta az élelmiszerek biogén amin tartalmának meghatározására alkalmas módszereket. A tanulmány szerint a különféle kromatográfias technikák közül a HPLC módszer alkalmazása a legelterjedtebb. A biogén aminok többsége nem tartalmaz kromofórt, ezért gyakori a kromatográfias elválasztás előtti, vagy utáni származékképzés, amelyet o-ftál-aldehid (OPA) származékok esetén fluorimetriás detektálás (Smělá et al 2003, Vidal-Carou et al 2003, Lavizzari et al 2006), míg danzil-klorid származékok esetén spektrofotometriás detektálás követ (Innocente et al. 2007; Moret et Conte 1996; Moret et al. 2005).

A felsorolt drága és hosszadalmas minta előkészítést igénylő módszerekkel szemben a bioszenzorok alkalmazása gyors és olcsó alternatívát jelenthet az élelmiszeranalitika ezen területén. Biogén aminok bioszenzoros vizsgálata során a legelterjedtebb a diamin oxidázok használata, előnyük a megfelelő stabilitás, nagy enzimaktivitás, viszonylag egyszerű és olcsó izolálhatóság, emellett széles szubsztrátspecifitásuk miatt többféle amin kimutatására alkalmasak. Diamin oxidáz enzim alapú bioszenzorokra vonatkozó számos publikáció látott napvilágot (Wimmerová, Macholán (1999), Tombelli, Mascini (1998), Niculescu et al. 2000b, Niculescu et al. 2001). Néhány példát találunk halak frissességének meghatározására (Carsol; Mascini 1999; Draisci et al. 1998, Lange, Wittmann 2002; Frébort et al. 2000, Niculescu et al., 2000a). Sajtok vizsgálatára Compagnone és munkatársai (2001) használtak FIA rendszerű bioszenzort, a lencséből (*Lens culináris*) kivont diamin oxidáz enzim katalizálta reakcióban képződő hidrogén peroxidot platina elektródon +650mV-on mérték.

Az Eszterházy Károly Főiskolán az EGERFOOD Regionális Tudásközpont keretében zajló élelmiszeranalitikai kutatások egyik fontos területe az élelmiszerminőséget jellemző enzim alapú amperometriás bioszenzorok fejlesztése. Ezen belül az egyik fő cél a biogén aminok összmennyiségét mérő szenzor létrehozása, amely az élelmiszer vizsgálatok során romlásindikátorként is használható. Erre a célra alkalmas a sárgaborsóból (*Pisum sativum*) izolált diamin oxidáz (EC 1.4.3.6) enzimet felhasználó amperometriás bioszenzor. A kutatás során meghatároztuk a diamin oxidáz alapú biogén amin bioszenzor optimális működési körülményeit. Megállapítottuk, hogy -50mV potenciál és 0,45 ml/perc foszfát puffer áramlási sebesség (100mM, pH= 7,0) alkalmazása a legmegfelelőbb az amperometriás mérés során. Ezek után a kifejlesztett szenzorral megkezdjük valós élelmiszerminták vizsgálatát.

E közleményben a biogén amin bioszenzor sajtminták vizsgálatára történő adaptálásának eredményeit foglaljuk össze. A diamin oxidáz alapú ampero-

metriás bioszenzorral különféle sajtok hisztamin ekvivalensben megadott össz biogén amin tartalmát határoztuk meg.

### **Alkalmazott kísérleti körülmények, vizsgálati módszerek**

#### **A kísérletekhez felhasznált anyagok és vegyszerek**

A kísérletekhez felhasznált analitikai tisztaságú hisztamint a Sigma-Aldrich cégtől vásároltuk. A vizsgálatok során Milli-Q-készülékkel (Millipore, Bedford, MA, USA) ioncserélt, desztillált vizet használtunk. A foszfát puffert (100 mM, pH 7,0, illetve 66 mM, pH=8,0) kálium-dihidrogén-foszfát és dinátrium-hidrogén-foszfát 12-hidrát vegyszerekből készítettük, mindkettőt a Spektrum 3D Kft.-től szereztük be.

Az elektród felszínére felvitt torna peroxidáz (P6782, type: VI-A, 1500 U/mg) a Sigma-Aldrich cégtől, míg a keresztköti (poli(etilén-glikol)(400) diglicidil éter, 08210) a Polysciences Inc. cégtől származik, az ozmium mediátort pedig a Lundi Egyetem (Svédország) bocsátotta rendelkezésünkre.

A diamin oxidáz (EC 1.4.3.6) enzimet az EGERFOOD és a Palaczky Egyetem (Olmütz, Csehország) együttműködésének keretén belül a Palaczky Egyetem laboratóriumában izoláltuk sárgaborsó (*Pisum sativum*) csíranövényből (Marek Sebel et al., 1998).

#### **A vizsgált sajtok**

A diamin oxidáz bioszenzorral 9 sajtmintát (gouda, mozzarella, füstölt paranyica, camembert, pannónia, parmezán, karaván, trappista, márványsajt) vizsgáltunk, melyeket élelmiszerüzletben vásároltuk, majd a vizsgálatig 4°C-on tároltuk.

#### **Sajt minták előkészítése**

A sajtokat lereszeltük, majd 100 mM, pH=7,0, illetve egy sajt esetén 66 mM 8,0-as pH-jú foszfát pufferrel feltártuk. 50 ml-es centrifugacsőben 10,0 g darált sajtához 20 ml feltároló oldatot adtunk, két percig ICA Ultra Turrax T25 basic típusú készülékkel maximális fordulatszámon homogenizáltuk, majd centrifugáltuk (6000 g, 5 perc). A vizes fázist gyűjtöttük, majd a homogenizálást illetve a centrifugálást megismételtük. A két vizes fázist egyesítettük, szűrtük, majd mérőlombikban 50 ml-re egészítettük ki.

#### **Elektródkészítés**

A bioszenzoros mérések során diamin oxidáz enzimmel módosított grafit elektródot használtunk, melyet az alábbiak szerint készítettünk. A csiszolópapírral

lecsiszolt, kétszer ioncserélt vízzel lemosott, megszáritott elektród felszínén redox hidrogélbe ágyazva rögzítjük az enzimet (3,9 µg/elektród) torna peroxidázzal (12,6 µg/elektród), ozmium mediátorral (10 µg/elektród) és poli(etilén-glikol)(400) diglicidil éter (PEGDGE) keresztkötővel (4,9 µg/elektród) együtt. Beszáradást követően az elektródokat lefedve egy éjszakán át 4 °C-on tároltuk. Tapasztalataink szerint egy elektród több napig is használható, az elektródot a méréssorozatok között pufferoldatban tároljuk.

### **A biogén amin bioszenzor működési körülményei**

A fentiek szerint elkészített enzimelektródot FIA (flow injection analysis) rendszerbe illesztjük. Az állandó pufferáramot a Minipuls 3 típusú (Gilson, Franciaország) perisztaltikus pumpa biztosítja. A mintát 20 µl-es mintahurokkal ellátott (7725i, RHEODYNE, USA) manuális injektoron keresztül juttatjuk a rendszerbe. Az injektált minta wall-jet típusú elektrokémiai cellába jut, amely az enzimmel módosított grafit munkaelektródot, Ag/AgCl referencia elektródot és platina segédelektródot tartalmazza. Az amperometriás mérés során a potenciosztát (QuadStat 164, eDAQ, USA) által biztosított állandó potenciálon mért áramerősséget az e-corder A/D konverter (eDAQ, USA) segítségével számítógépen rögzítjük. A mérést követően a kapott adatokat a Chart program segítségével értékeljük ki.

A diamín oxidáz bioszenzor fejlesztése során megállapítottuk az optimális mérési körülményeket, és ezeket alkalmaztuk a mérés során, azaz -50 mV potenciált és 0,45 ml/perc foszfát puffer áramlási sebességet (100 mM, pH=7,0). A mérések szobahőmérsékleten történtek.

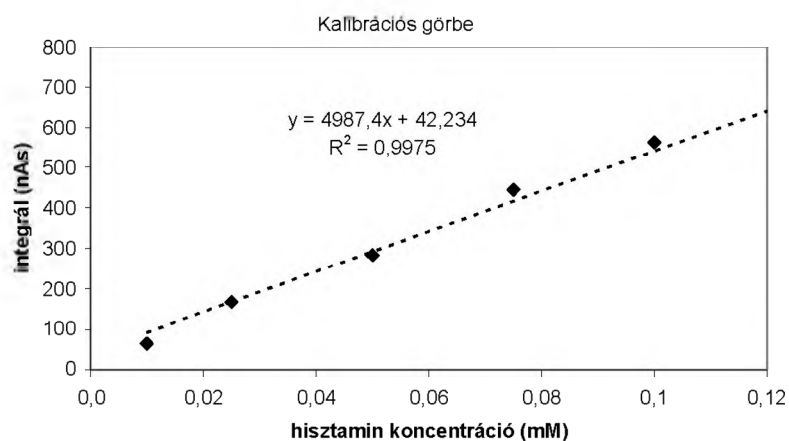
A standardok és valós élelmiszerminták esetében is mintánként három-öt párhuzamos injektálást végeztünk, és az eredményeket átlagoltuk. Minden mérési nap elején 0,010–0,500 mM koncentrációjú hisztamin oldat segítségével kalibrációs görbét készítettünk. A sajtok biogén amin tartalmát egyrészt a kalibrációs egyenes alapján határoztuk meg, másrészt standard addíciós méréseket végeztünk hisztaminnal spikolt mintákkal. A kapott pontokra illesztett egyenes egyenletéből számoltuk a hígított minta koncentrációját, majd ebből a sajt kivonat, illetve a sajt biogén amin tartalmát. Mindkét módszer esetén a biogén amin tartalmat hisztamin ekvivalensben adtuk meg.

### **Eredmények**

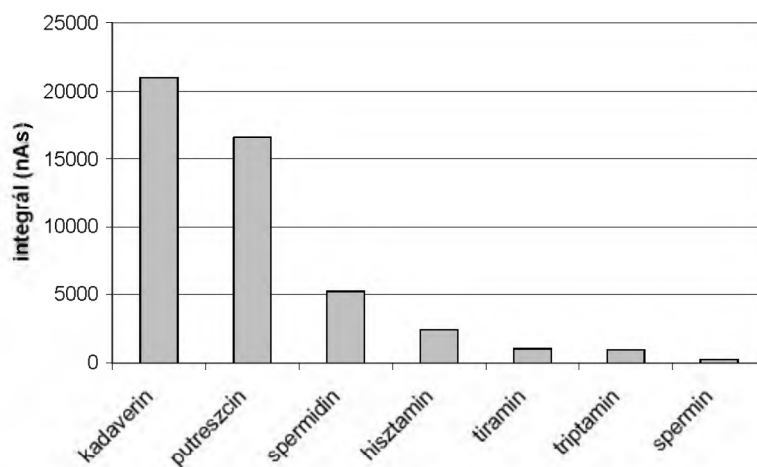
#### **A DAO szenzor alkalmazása**

A korábban kifejlesztett szenzorral standard oldatokat mérve kalibrációs egyenest készítettünk (1. ábra), majd vizsgáltuk a különböző szubsztrátok mérésekor az enzim aktivitását (2. ábra). Megállapítható, hogy a legnagyobb jeleket a

kadaverin és putreszcín mérésekor kaptunk, a spermidin és a hisztamin mérésekor közepes, míg a tiramin, triptamin és a spermin injektálásakor igen kis jeleket kaptunk.



1. ábra Kalibrációs görbe



2. ábra DAO bioszenzor szubsztrátspecifitása

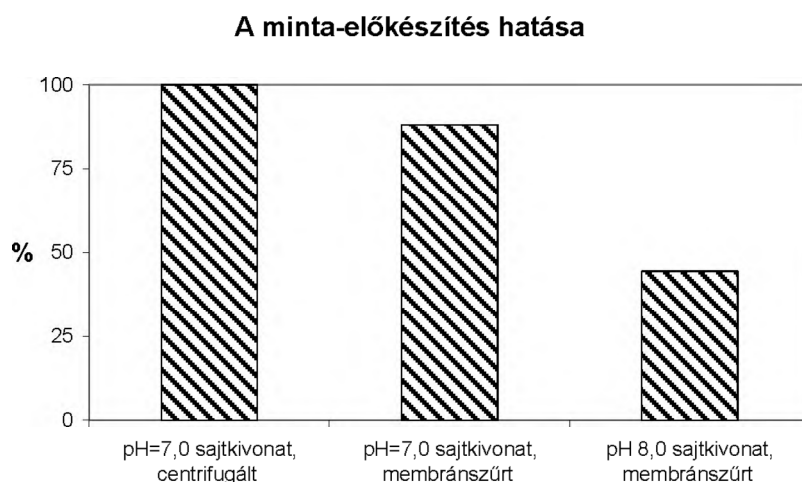
A szenzor jele különböző biogén aminok 0,5mM koncentrációjú oldatára

## Sajtminta előkészítés kidolgozása

### Sajtkivonat készítése

Az elsőként vizsgált sajt esetén 100 mM koncentrációjú pH=7,0, valamint 66 mM, pH=8,0 foszfát pufferrel készítettünk kivonatokat, amelyeket a bioszen-

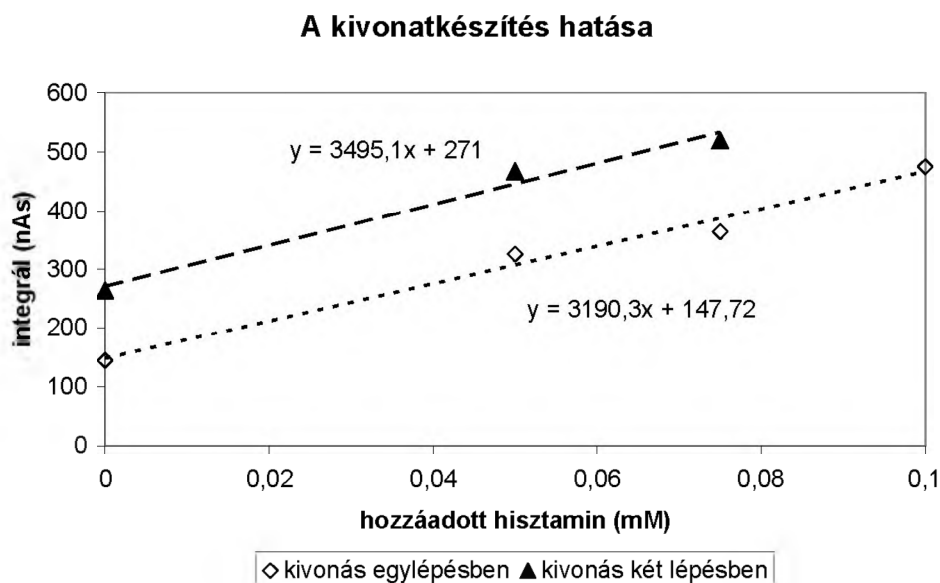
zoros mérés előtt a megfelelő foszfát pufferrel tovább hígítottunk. A kapott jel jóval nagyobb (kb. kétszeres) volt, ha a biogén aminok kivonása során pH=7,0 puffert használtunk (3. ábra). Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy 100 mM pH=7,0 pufferrel nagyobb mennyiségű amin nyerhetünk ki a sajtból, azaz előbbi oldat a 66 mM, pH=8,0 puffernél hatékonyabb kivonószer. A többi sajt esetén ezért csak a 100 mM, pH=7,0 foszfát pufferrel készített kivonatokot vizsgáltuk.



3. ábra Különböző módon készített gouda sajt kivonatok jele DAO bioszenzorral

A mintában található szilárd szemcsék zavarhatják a bioszenzoros mérést, ezért az elsőként vizsgált gouda sajt esetén többféle módszert is kipróbáltunk tiszta oldat nyelésére: a kivonat egy részét 0,45 µm membránszűrővel szűrtük, míg egy másik részleténél centrifugálást (15000 g, 15 perc) használtunk az előkészítés során. Az 3. ábrán a pH=7,0 pufferrel készült kivonatra az előkészítést, majd tízszeres hígítást követően kapott jeleket összevetve megállapíthatjuk, hogy a két módszerrel közel azonos jelet kaptunk, ezért a későbbiekben az egyszerűbben kivitelezhető centrifugálást alkalmaztuk a mintakészítés során.

Egy sajt minta (trappista) esetén a 100 mM, pH=7,0 foszfát pufferrel kétféle módon készítettünk 10 g reszelt sajtból 50 ml kivonatot. Az 1. minta esetén egy lépéses extrakciót alkalmaztunk, a sajtot 20 ml pufferrel homogenizáltunk, majd centrifugálást követően a felülúszót mérőlombikban 50 ml-re hígítottuk. A 2. minta készítése során az extrakciót két lépésben (2x20 ml pufferrel) végeztük, majd a centrifugálást követően a két felülúszót egyesítettük és mérőlombikban 50 ml-re egészítettük ki.



4. ábra A trappista sajt kivonatokból készített minták jelei a DAO bioszenzorral

A 4. ábrán a két kivonatból további hígítással készült, különböző koncentrációban hozzáadott hisztamint tartalmazó minták jelei láthatók a hozzáadott hisztamin koncentráció függvényében. Mindkét kivonat esetén a kísérleti pontokra illesztett egyenesek meredeksége közel azonos, azaz a bioszenzor jele a hisztamin koncentráció változására azonos módon reagál. Az eredmények közötti különbség a kétféle sajt kivonat eltérő biogén amin tartalmából adódik. A 2x extrahált mintára kb. kétszeres koncentrációt mértünk, azaz ismételt extrakcióval a biogén aminok kioldódása teljesebb, a kétlépéses extrakció hatásosabb kivonást tesz lehetővé. A többi sajt esetén kétlépéses extrakcióval készítettünk kivonatot.

A korábban leírt módon elkészített sajt kivonatokot 10x, 20x, illetve 40x hígítottuk és hisztamint adagoltunk különböző koncentrációban (0, 0,01, 0,025, 0,05, 0,075 illetve 0,1mM).

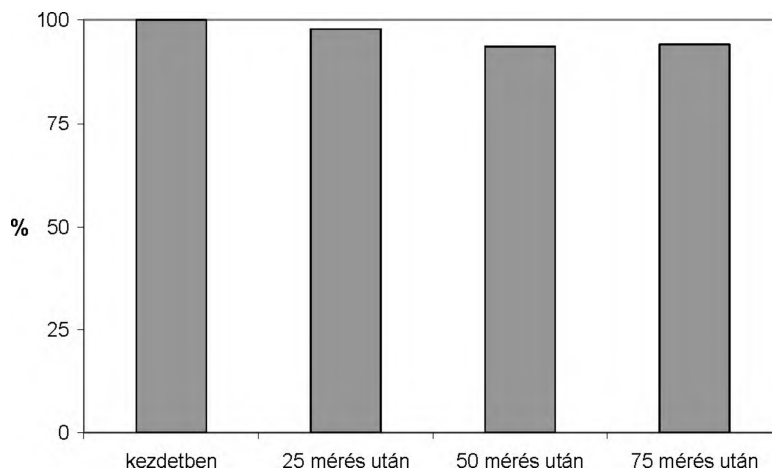
A különböző hígítású minták esetén a mért biogén amin tartalom közel azonosnak adódott.

Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a DAO enzimelektródos vizsgálathoz a pH=7 foszfát pufferrel készített kivonatot elegendő 10x hígítani.

### A mért jelek reprodukálhatósága

Az elektród állapotának ellenőrzése, a reprodukálhatóság tesztelése céljából a mérés során az egyes sajt minták között minden oldatsorozat után ismételten lemértük a kalibráló oldatsor egyik tagját, egy közepes koncentrációjú standard

hisztamin mintát. Az 5. ábrán látható a jel fokozatos csökkenése, amit a számítás során figyelembe vettünk.



5. ábra: 0,1 mM koncentrációjú hisztamin oldat jelének változása

### A vizsgált sajtok össz biogén amin tartalma

Vizsgáltuk, hogy a standard addícióval és a közvetlenül mért minták eredményei mennyire felelnek meg egymásnak. Megállapítottuk, hogy a standard addícióval és közvetlenül a kalibrációs egyenes alapján számolt értékek jó egyezést mutatnak, ezért elegendő, ha a mintákat csak közvetlenül mérjük.

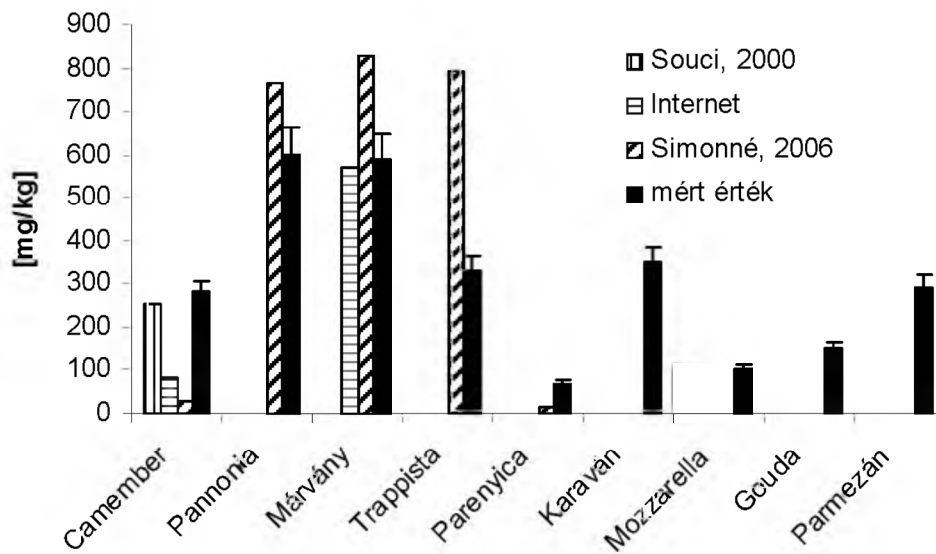
Az I. táblázat a különböző sajtminták esetén az össz biogén amin tartalomra mért értékeket foglalja össze hisztamin ekvivalensben.

I. táblázat: Különböző sajtok számított össz biogén amin tartalma hisztamin ekvivalensben

sajt fajta	spikolt mintákból (mg/kg)	hígított minta jele alapján (mg/kg)
camembert	313,10	285,80
trappista	527,26	539,37
gouda	157,40	129,06

A vizsgált sajtok közül a legkisebb biogén amin tartalmat a panyica, mozzarella és gouda sajtok esetén, a legnagyobbat pedig a pannónia és márványsajt esetében mértük. Az általunk mért eredményeket összehasonlítottuk az irodalomban talált értékekkel (hisztamin ekvivalensre átszámítva), és megállapítottuk, hogy a mért értékek alapján a vizsgált sajtok nem tartalmaznak egészségre káros mennyiségben biogén amint.





6. ábra: Sajtok biogén amin tartalmának összehasonlítása

## Összefoglalás

Sajtok össz biogén amin tartalmának meghatározására alkalmas bioszenzoros módszert dolgoztunk ki. Ennek során a sajt biogén amin tartalmának kivonása 100mM, pH=7,0 foszfát pufferes extrakcióval kétlépésben történik, a kapott kivonat centrifugálást követően tízszeres hígításban vizsgálható a diamín oxidáz alapú bioszenzorral. A bioszenzoros módszer sajtminták gyorsanalitikai módszereként jól alkalmazható, segítségével a magas biogén amin tartalmú sajtok kiválaszthatók, a szelektált, kisszámú minta vegyszer és időigényes HPLC analízisével szükség esetén az egyes aminok (pl. hisztamin, tiramin) mennyisége külön-külön számítható. Diamín oxidáz alapú szenzorunkkal meghatároztuk kilenc sajtminta (gouda, trappista, mozzarella, füstölt parenyica, camembert, karaván, pannónia, márványsajt) hisztamin ekvivalensben megadott biogén amin tartalmát. Említést érdemel, hogy egyik vizsgált sajt sem tartalmazott egészségre káros mennyiségben biogén amint.

## Irodalom:

- Carsol M. A, Mascini M. (1999): Diamine oxidase and putrescine oxidase immobilized reactors in flow injection analysis: a comparison in substrate specificity, *Talanta*, **50** (1), 141–148
- Compagnone D., Isoldi G., Moscone D., Palleschi G. (2001): Amperometric detection of biogenic amines in cheese using immobilised diamine oxidase, *Analytical letters*, **34** (6), 841–854

- Draisci R., Volpe G., Lucentini L., Cecilia A., Federico R., Palleschi G. (1998) Determination of biogenic amines with an electrochemical biosensor and its application to salted anchovies, *Food Chemistry*, **62**, 225–232
- Frébort I., Skoupá L. and Peč P. (2000): Amine oxidase-based flow biosensor for assessment of fish freshness, *Food Control*, **11**(1), 13–18.
- Halász A., Baráth A., Simon-Sarkadi L., Holzhaeupel W. (1994): Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*, **5**, 42–46.
- Innocente, N., Biasutti, M., Padovese, M., Moret, S. (2007): Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatisation of acid extract, *Food Chemistry*, **101**, 1285–1289.
- <http://www.tankonyvtar.hu/main.php?objectID=5341777> Tankönyvtár, Tej és tejtermékek a táplálkozásban 4.3.1. Az érés hatása a sajt összetételére
- Laleye L. C., Simatd R. E., Gosselin C., Lee B. H., Giroux, R. N. (1987): Assessment of cheddar cheese quality by chromatographic analysis of free amino acids and biogenic amines. *Journal of Food Science*, **52**, 303–307.
- Lange J, Wittmann C. (2002): Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples, *Anal Bioanal Chem.*, **372** (2) 276–283.
- Lavizzari T., Veciana-Nogue's M. T., Bover-Cid S., Marine'-Font A., Vidal-Carou M. C. (2006): Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, **1129**, 67–72.
- Moret, S., Conte, L. (1996): High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods, An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics, *Journal of Chromatography A*, **729**, 363–369.
- Moret, S., Smela, D., Populin, T., Conte, L.S. (2005): A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables, *Food Chemistry*, **89**, 355–361.
- Niculescu M., Frébort I., Peč P., Galuszka P., Mattiasson B., Csöregi E. (2000a): Amine oxidase based amperometric biosensors for histamine detection, *Electroanalysis*, **12**, 369-375, 2000
- Niculescu M., Ruzgas T., Nistor C., Frébort I., Sebela M., Peč P., Csöregi E. (2000b): Electrooxidation Mechanism of Biogenic Amines at Amine Oxidase Modified Graphite Electrode, *Anal. Chem.* **72**, 5988–5993.
- Niculescu M., Nistor C., Ruzgas T., Frébort I., Sebela M., Peč P., Csöregi E. (2001): Detection of histamine and other biogenic amines using biosensors based on amine oxidase, *Inflamm. res.* **50**, Supplement 2, S146–S148.
- Önal, A. (2007): A review: Current analytical methods for determination of biogenic amines in foods, *Food Chemistry*, **103**, 1475–1486.
- Roig-Sagues A. X., Hernandez-Herrero M. M., Rodriguez-Jerez J. J., Quinto-Fernandez E. J., Mora-Ventura M. T. (1998): Aminas biogenas en queso: riesgo toxicologico y factores que influyen en su formacion. *Alimentaria*, **294**, 59–66.
- Sebela M., Luhová L., Frébort I., Faulhammer H. G., Hirota S., Zajoncová L., Stůžka V. and Peč P. (1998): Analysis of the Active Sites of Copper/Topa Quinone-containing Amine Oxidases from *Lathyrus odoratus* and *L. sativus* Seedlings, *Phytochem. Anal.*, **9**, 211–222

- Silla Santos, M. H. (1996): Biogenic amines: their importance in foods, *International Journal Food Microbiology*, **29**, 213–231.
- Simonné Sarkadi L., Kiss K. (2006) Sajtok biogén amin tartalmának összehasonlító vizsgálata, *Élelmészeti Ipar* **6-7**, 168–172.
- Smělá D., Pechová, P., Komprda T., Klejdus B., Kubàň V. (2003): Liquid chromatographic determination of biogenic amines in a meat product during fermentation and long-term storage. *Czech Journal of Food Science*, **21**, 167–175.
- Souci S.W., Fachmann W., Kraut H. (2000): Food Composition and nutrition tables, CRC Press.
- Spanjer M. C. and Van Roode B. A. S. W. (1991): Towards a regulatory limit for biogenic amines in fish, cheese, and sauerkraut, *De Ware(n)-Chemicus*, **21**, 139–167.
- Tombelli S., Mascini M. (1998): Electrochemical biosensors for biogenic amines: a comparison between different approaches, *Analytica Chimica Acta*, **358**, 277–284.
- Vidal-Carou M. C., Lahoz-Portole's F., Bover-Cid S., Marine'-Font A. (2003): Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines and polyamines in wine and other alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, **998**, 235–241.
- Wimmerová M., Macholán L. (1999) Sensitive amperometric biosensor for the determination of biogenic and synthetic amines using pea seedlings amine oxidase: a novel approach for enzyme immobilisation, *Biosensors & Bioelectronics*, **14**, 695–702.