

고추疫病菌(*Phytophthora capsici*)의 生物學的 防除

III. 抗菌物質의 構造分析

張胤喜 · 張相文 · 崔 煒* · 李東勳

慶北大學校 農科大學 農化學科

Biological Control of Phytophthora Blight of Red-pepper Caused by *Phytophthora capsici*.

III. Identification of the Antifungal Substances Produced by *Pseudomonas* sp. A-183.

Yoon-Hee Chang, Sang-Moon Chang, Jyung Choi and Dong-Hoon Lee (Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea)

Abstract : This study was carried out to identify the three antifungal substances isolated from the culture medium of *Pseudomonas* sp. A-183 which is antagonistic against *Phytophthora capsici*.

The substance A and B showed positive reactions at the Molish test and Anthrone test, but negative one at the Fehling test, strongly suggesting that both substance A and B had nonreducing sugar frameworks. The substance C only exhibited the phenomenon of the UV induced fluorescence.

From the qualitative analysis with the spectroscopic techniques such as UV, Mass, IR and NMR, the substance A and B were known to be composed to sugar and fatty acid, and showed a base peak of 171(m/e).

It was identified that substance A was (2-O-L-rhamnosyl- α -L-rhamnosyl- β -hydroxydecanoyle- β -hydroxy decanoic acid) and the substance B was (α -L-rhamnosyl- β -hydroxydecanoyle- β -hydroxydecanoic acid).

The substance C was identified as a phenazine from the results of qualitative analysis with the spectroscopic techniques such as UV, Mass, IR and NMR.

緒 論

拮抗菌에 의한 植物病原菌의 防除機作은 크게 3가지로 나누어 진다. 첫째 mycoparasite 혹은 hyperparasite라는 寄生과 溶菌에 의한 것이다. 真菌인 *Trichoderma* sp.나 *Gliocladium* sp.는 *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Phythium* sp. 等의 菌絲에 侵入하여 菌絲를 coiling하거나 α -1,3-glucose나 chitinase를 生産하여 溶菌시켜 버린다^{1~4)} 둘째 病原菌과 拮抗菌 사이에 競爭作用에 의한 것이다. 螢光 *Pseudomonas*屬菌 等은 土壤에서 철 chelate物質인 siderophore를 生產하여서 病原菌의 胞子發芽 時에 必要한 Fe³⁺를 이物質에 먼저 結合 또는 吸收시킴으로서 病菌의 發芽를 抑制한다^{5~9)}. 셋째 拮抗菌이 生產하는 抗菌物質에 의한 것이다. Gursiddaiah 등¹⁰⁾은 *P. fluorescens* 2-79로 부터 抗細菌物質인 phenazine carboxylic acid의 dimer을 分離하였으나, Brisbane 등¹¹⁾은同一한 菌株에서 分離된 phenazine carboxylic acid는 dimer가 아니며, 抗菌活性을 나타내기 위해서는 carboxylate 陰이온이 生成되지 않도록 pH 7이하의 環境이어야 한다고 報告하였다. 이밖에 *Pseudomonas*屬 細菌으로 부

터의 새로운 抗菌物質에 대한 探索은 계속 이루어지고 있다.

本研究에서는 前報(12,13)에서 고추疫病菌(*Full capsici*)의 生物學的 防除를 위한 目的으로 分離한 *Pseudomonas* sp. A-183의 培養液으로부터 分離, 精製된 3가지의 抗菌物質에 대한 分子構造式을 UV, IR, Mass, ¹H NMR 및 ¹³C NMR 等의 分光分析 結果에 의하여 同定하였다.

材料 및 方法

抗菌性 物質

Pseudomonas sp. A-183에 의하여 生產된 培養液 中의 抗菌物質을 前報^{12,13)}에 따라 세種類의 抗菌性物質을 순수 분리하여 分子構造式을 調査하는데 사용하였다.

糖 및 脂肪酸의 分析

試料 10mg에 2% H₂SO₄ 5ml을 넣고 恒溫 水槽(80°C)에서 2시간 加水分解한 後 2.5ml는 Ba(OH)₂로 中和하여 cysteine-carbazole方法을 變形하여 糖 分析을 하였고 나머지 2.5ml에는 methanol : conc.-H₂SO₄(10 : 1) 20ml를

*연락처자 : 최 정, 경북대 농대 농화학과

加하여 1시간 동안 methylation시킨 후 중류수 300ml를 넣고 petroleum ether 25ml로 fatty acid methyl ester를抽出濃縮하여 GC-MS로 脂肪酸分析을 하였다.

糖은 0.04% carbazole(70% H₂SO₄에 溶解) 5ml에 糖溶液 0.1ml를 넣고 發色시킨 後 spectrophotometer(Hitach U-2000)를 사용하여 600~450nm에서 吸光度를 测定하였다. 脂肪酸의 GC-MS分析은 capillary column(Hewlett Packard, 25×0.25mm, FFAP, 170~210°C, 5°C/min.)를 이용하여 EI mass(Hewlett Packard 5971, MSD)가 裝着된 GC(Hewlett Packard 5800)로 하였다.

構造分析

Mass Spectroscopy: 固體試料를 加熱 氧化시켜 direct probe방식으로 Mass spectrophotometer(Varian MAT212)로 测定하였다.

UV Spectroscopy: 용매는 chloroform을 사용하였으며 500~200nm 사이의 파장에서 spectrophotometer(Pye-Unicam 8800 UV/vis.)로 吸光度를 测定하였다.

IR Spectroscopy: 試料 1mg을 300mg의 KBr에 혼합하여 disk法에 의하여 4000~700nm 사이의 파장에서 IR spectrophotometer(Pye-Unicam SP3-300)를 사용하여 透光度를 测定하였다.

¹H 및 ¹³C NMR Spectroscopy: 試料를 (CD₃)₂CO 또는 CDCl₃에 溶解시키고 ¹H NMR은 300 MHz에서, ¹³C NMR은 75.5 MHz에서 NMR spectrophotometer(Bruker AM-300)로 测定하였으며, 이때 내부표준물질은 tetramethylsilane(TMS)를 사용하였다.

結果 및 考察

抗菌物質의 化學反應性

分離 精製한 抗菌物質의 몇 가지 化學反應性 및 UV感應性을 調査한 結果는 Table 1과 같았다.

Table 1. Chemical reactions of antifungal substances.

Reaction	A	B	C
Anthrone	+	+	+
Molish	+	+	-
Fehling	-	-	-
Enrlich	-	-	-
Burette	-	-	-
Ninhydrin	-	-	-
Liberman	-	-	-
0.5% KMnO ₄	brown	brown	-
UV induced color	-	-	green

+: positive

-: negative

3가지 物質 모두 아미노산 및 peptide性 物質의 定性反應인 Enrlich, Ninhydrin 및 Burett反應에 隱性으로

나타났다. A와 B物質은 糖이나 furfural構造의 存在를 나타내는 定性反應인 Molish反應과 Anthrone反應이 陽性으로 나타났으나 Fehling反應이 隱性으로 나타나 分子構造 中에 糖이 포함되어 있으며 糖의 anomer carbon의 OH는 glycoside結合을 하고 있을 것으로 추정되었다. 또한 0.5% KMnO₄를 噴霧하면 分紅色에서 褐色으로 發色한다. 한편 C物質은 위와 같은 呈色反應에 隱性을 나타내었다.

抗菌物質의 構造分析

分離 精製한 3가지 抗菌物質의 分子構造를 充明하기 위하여 Mass, IR, ¹H NMR, ¹³C NMR 및 UV spectrum을 测定하였다.

抗菌物質 A의 分子構造 同定: Mass spectrum에서 分子이온의 peak가 나타나지 않아 分子量을 確認할 수 없었으며 base peak는 171(m/e)로서 fragment ion인 decanoic acid (CH₃(CH₂)₇CH₂COOH)로 생각되었으며, 여기서 H₂O가 1分子 離脫한 153(m/e)의 peak가 나타났다. C_nH_{2n+1}의 分裂物인 43, 59, 71, 85(m/e)의 peak가 나타났다.

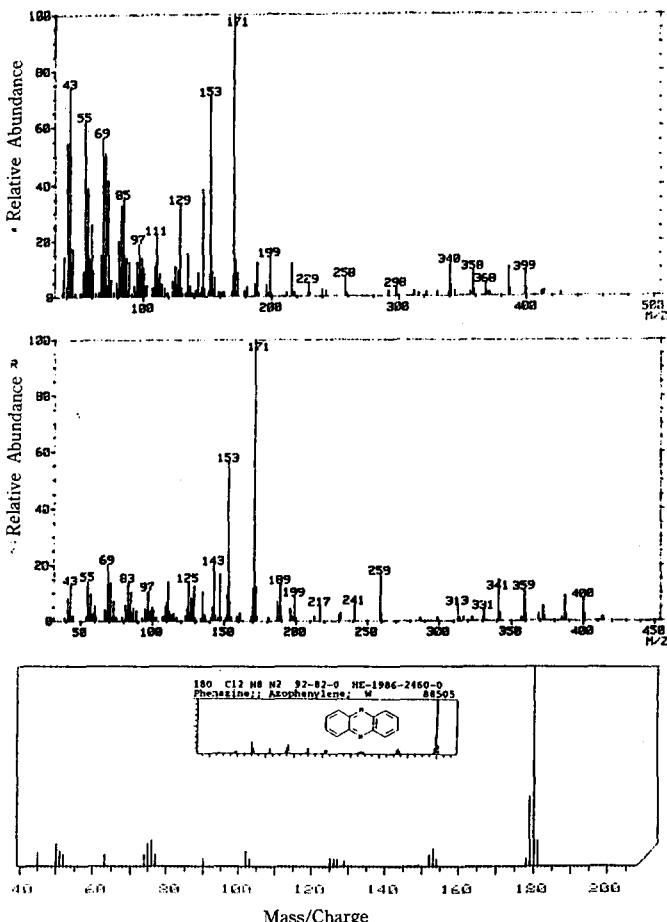


Fig. 1. Mass spectra of antifungal substances A, B and C produced by *Pseudomonas* sp. A-183.

으며 399(m/e)의 peak는 A物質의 構造 中 糖骨格의 分裂에 의해 糖分子의 一部가 離脫하고 남은 構造로 생각되었다. 399(m/e)에서 糖分裂部의 (CH-CHO)의 離脫로 358(m/e)의 peak가 生成되며 이는 hydroxy脂肪酸의 骨格으로 생각되었다. 여기서 hydroxyl基가 離脫하여 340(m/e)의 peak가 生成되며 이것으로 보아 A物質은 2分子의 decanoic acid가 ester結合을 하고 있는 構造로 생각되었다. 229(m/e)는 399(m/e)에서 1分子의 decanoic acid가 離脫한 構造로 추정되었으며 150~400(m/e)사이에서는 相互間에 H₂O가 離脫한 構造의 peak들이 관찰되었다.(Fig. 1)

IR spectrum에서는 3400~3200cm⁻¹ 사이에서 -OH stretching과 2900cm⁻¹에서 aliphatic C-H stretching이 관측되었다. 1720cm⁻¹에서 ester의 carbonyl(C=O)基로 생각되는 peak가 관측되었으며, 1600cm⁻¹부근의 carboxylate를 나타내는 peak로부터 이 物質이 salt形態의 物質임을 추정할 수 있었으며 1500nm~800nm 사이의

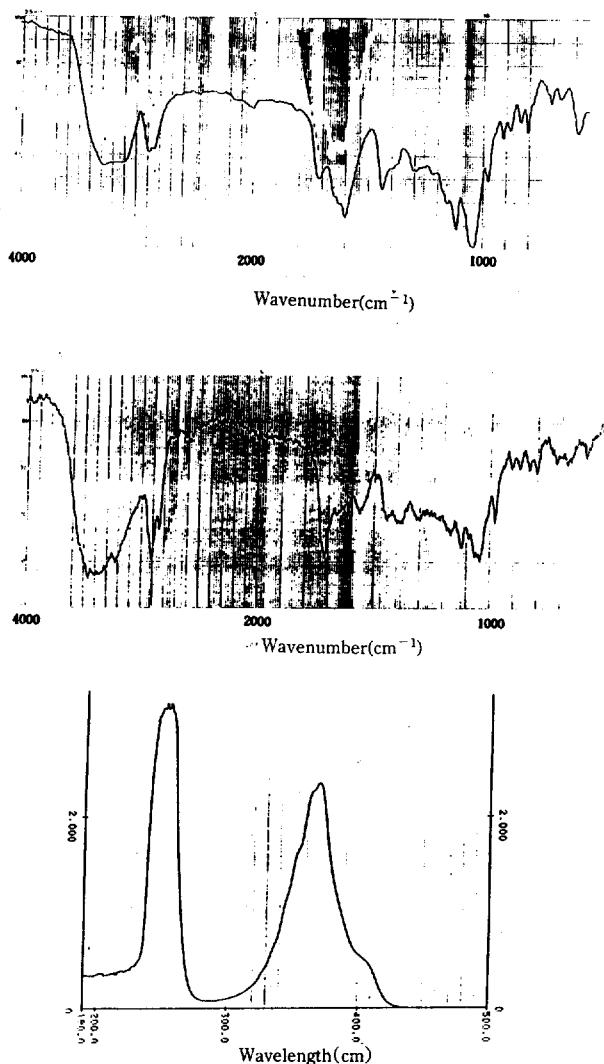


Fig. 2. IR spectra of antifungal substances A and B, and UV absorption spectrum of substance C produced by *Pseudomonas* sp. A-183.

spectrum은 대체로 糖構造에서 나타나는 樣相과 비슷하였다.(Fig. 2)

¹H NMR spectrum에서 0.9 ppm에 -CH₃의 signal이 나타났으며 1.2~3 ppm은 -CH₂의 signal로서 1개 이상

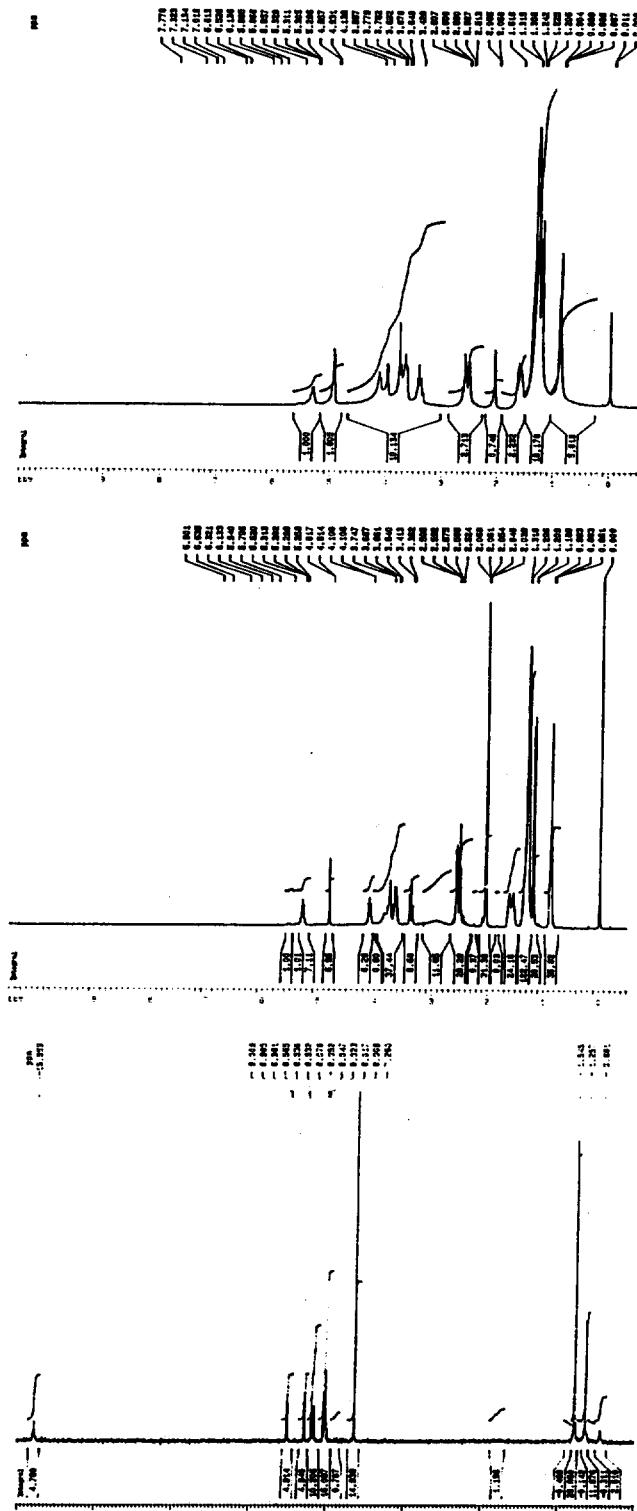


Fig. 3. ¹H NMR spectra of antifungal substances A, B and C produced by *Pseudomonas* sp. A-183 [300MHz, (CD₃)₂CO].

의 branch된構造를 가지고 있었다. 1.6 ppm과 2.0~2.5 ppm은 carbonyl에 대하여 α 및 β methylene proton들로 생각되었으며, 5.5 ppm 부근에 broad한 singlet와 4.9~5.3 ppm은 $-OH$ 의 signal이며 3.4~4.1 ppm에서 酸素에 인접한 $-CH-$ 의 signal과 糖構造에서 유래한 signal이 나타났다. 이것으로 보아 A物質은 hydrocarbon構造를 가지면서 糖을 포함하는 glycolipid계열의 物質로 판단되었다. (Fig. 3)

^{13}C NMR spectrum에서 14~40 ppm 사이에서 methylene의 signal들과 171 ppm과 173 ppm에서 carbonyl과 carbonyl ester의 signal이 나타났으므로 構造 中의 hydrocarbon은 2분자의 fatty acid가 carbonyl ester結合을 하고 있을 것으로 추정되었으며, 또한 69~74 ppm 부근의 signal은 糖骨格과 관련된 signal들이며 signal의 數로 보아 2分子의 糖을 포함할 것으로 생각되었다. 여기서 일반적인 糖構造에서 볼 수 있는 60 ppm부근에서 나타나야 할 糖의 C-6의 signal이 나타나지 않고 18.1 ppm, 79ppm의 $-CH_3$ signal 및 103 ppm의 anomeric carbon으로 보아 A物質을構成하는結合糖은 6-deoxyhexose인 α -L-rhamnose임을 알 수 있었다.

또한 94 ppm 부근에서 나타나야 할 糖의 anomeric carbon signal이 98.2 ppm으로 shift된 것으로 보아 이 위치에서 糖과 fatty acid 사이에 glycoside結合이 形成된構造로 생각되었다. 그러므로 A物質은 糖2分子가 glycoside結合을 한 糖部分과 carbonyl ester結合을 한 fatty acid部分間에 glycoside結合으로 이루어진構造로 추정되었다. (Fig. 4).

그리고 A物質의構成成分인 糖과脂肪酸의同定을 위해酸加水分解를하였다. 加水分解產物의 糖分剖은 HPLC上에서 한種類의單糖類의 peak만이 나타났으나 rhamnose, galactose 및 xylose의標準peak와 겹치는部分에 나타났기 때문에 HPLC分析으로는確認이 어려웠으므로糖分剖을 carbazole(70% - H_2SO_4)로發色시켜 spectrophotometer로 350~600nm에서吸光度를測定한結果,加水分解產物의 糖分剖은 526.5와 350nm에서吸收를나타내었으며標準糖인 rhamnose의吸收peak와 일치하고 있으므로 A物質의糖構成은 rhamnose임을確認하였다.

다시 A物質의酸加水分解產物을methylation하여petroleum ether로抽出된分剖을GC-MS로分析한結果, base ion peak는 103(m/e)으로 [HOCH₂CH₂COOCH₃]構造物을 나타내며 74(m/e)의peak는 McLafferty再配列過程에서 β -cleavage의開裂生成된[CH₂C(OH)OCH₃]의構造를가진物質로생각되었다. GC-MS의library research結果加水分解後抽出된物質은分子量이202인 β -hydroxydecanoic acid methylester로同定되었다. 이상의結果로부터A物質은2分子의 β -hydroxydecanoic acid가ester結合을하며 β 위치에서rhamnose와O-glycoside結合을한構造임을알수있었다.

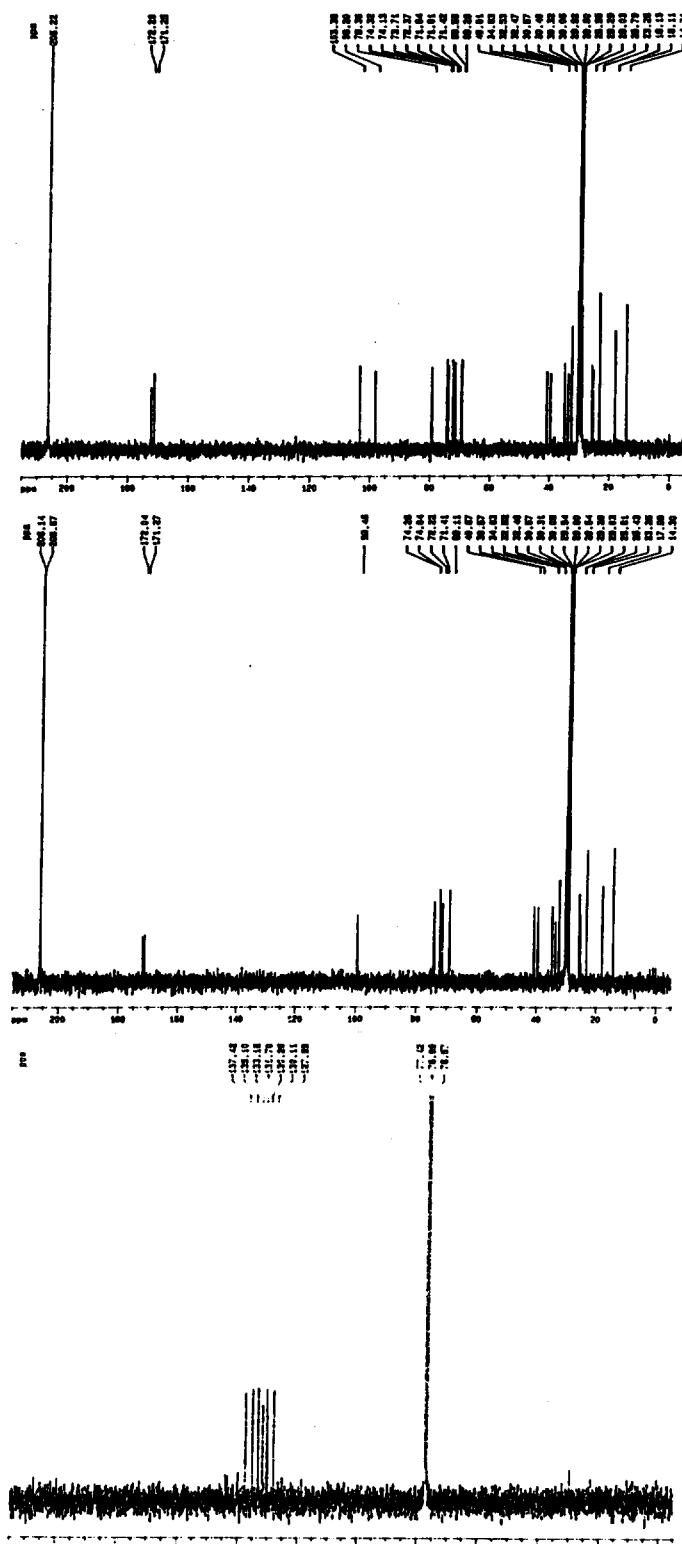
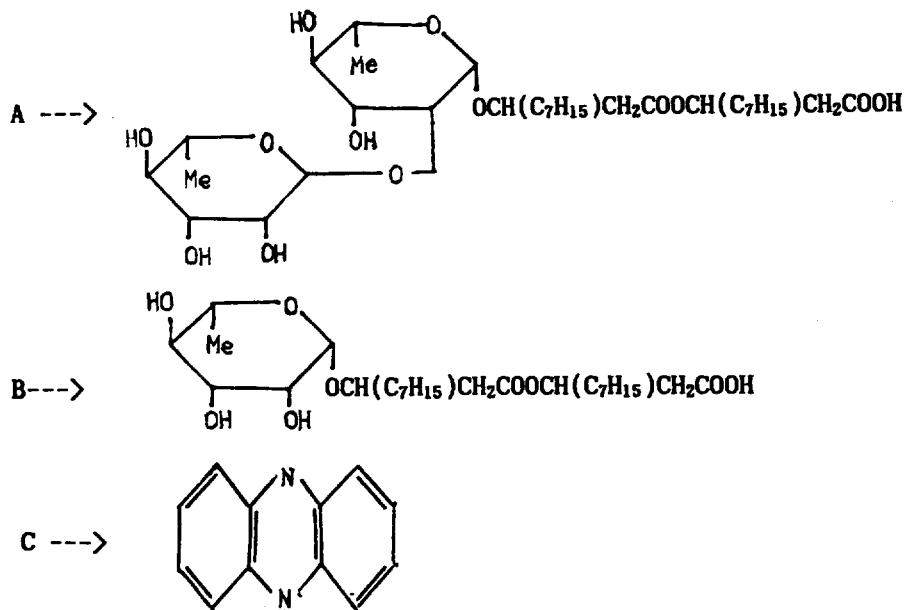


Fig. 4. ^{13}C NMR spectra of antifungal substances A, B and C produced by *Pseudomonas* sp. A-183 (75.5 MHz, $(CD_3)_2CO$).

이상의構造分析結果를綜合하여볼때,A物質은3-hydroxy-(3'-hydroxydecanoyl)-decanoic acid 3'-O- α -L-rhamnopyranosyl (1→2) rhamnopyranoside로동정되었으며(Fig. 5),이構造는Jarvis等¹³과Suzuki等¹⁴에

Fig. 5. Structure of substances A, B and C produced by *Pseudomonas* sp. A-183. A :

의하여 報告된 rhamnolipid인 glycolipid B의 酸 加水分解物質의 UV, GC-MS 및 NMR 分析結果와 동일한 것으로 確認되었다.

抗茵物質 B의 分子構造 同定 : Mass spectrum에서 A物質과 類似하였으며 basepeak가 171(m/e)로 나타났다. 200~400(m/e)사이의 peak를 보면 A物質 보다 水素이온 한개가 많은 構造를 나타내고 있다. IR spectrum은 A物質과 거의 類似하였으므로 이 物質은 A物質의 유도체로 생각되었다. 1600cm^{-1} 부근의 carboxylate를 나타내는 peak로부터 B物質도 salt形태를 하고 있는 것으로 생각되었다.(Fig. 1, 2)

^1H NMR spectrum도 A物質과 거의 類似하게 나타났으며 A物質에는 없던 2.9 ppm 부근의 broad한 signal이 더 存在하고 있다. ^{13}C NMR spectrum 또한 A物質과 類似하였으나 69~74 ppm 부근의 糖構造와 관련된 signal이 A物質에 비하여 減少하였으며 79와 103 ppm의 signal이 나타나지 않았다.(Fig. 3, 4)

이것으로 보아 B物質은 A物質에서 糖과 糖間의 glycoside結合이 分離되어 糖이 1분자 떨어져 나간 구조인 3-hydroxy-(3-hydroxydecanosyl)-decanoic acid 3-O- α -L-rhamnopyranoside로 構造決定을 하였다(Fig. 5).

이상의 呈色反應 및 UV, IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR등의 기기분석結果는 Jarvis 등¹⁴⁾과 Suzuki 등¹⁵⁾에 의하여 報告된 glycolipid 및 그의 酸 加水分解物質과 같았으므로同一한 物質로 確認되었다.

現在 *Pseudomonas*屬 菌株가 生產하는 糖과 지방족 탄화수소를 포함하는 化合物로는 glycolipid A, B 이외에 pseudomonic acid I, II가 報告되어 있다¹⁶⁾. Glycoli-

pid A와 B는 抗細菌性, 抗바이러스性을 가진다고 報告되어 있으나¹⁶⁾, 本研究에서 分離된 A와 B物質의 抗真菌性活性을 밝힌 것은 이번이 처음이다.

抗茵物質 C의 分子構造 同定 : C物質의 UV 및 Mass spectroscopy分析結果, UV의吸收peak가 254 nm와 369 nm에 나타났으며 이는 phenazine계열의 化合物과 類似하였다¹⁷⁾. Mass spectrum에서 보면 base ion peak는 180 (m/e)이며 이것은 分子이온인 것으로 추정되었다. 152 (m/e)는 分子이온에서 2개 N이 離脫하여 생긴 biphenylene構造를 나타낸다. 이 biphenylene의 fragmentation에 의한 전형적인 分裂物로서 C_6H_5^+ (76)의 離脫로 C_6H_4^+ (76)의 分裂物이 나타나며, C_2H_2^+ 의 離脫로 126(m/e)의 分裂物等이 나타났다. 51, 90, 103(m/e)의 分裂物은 benzene ring의 開裂에 의한 $\text{C}_n\text{H}_{n-1}^+$ 의 分裂物이다. 이상의結果로 부터 C物質은 置換基를 가지지 않는phenazine으로 생각되었다(Fig. 1).

^1H NMR에서 8.0~9.0ppm의 multiplet chemical shift值로 미루어 볼 때, N을 포함하는 heteroaromatic atom으로 된 ring의 proton을 나타내며 1.3~1.6 ppm은 D_2O 를 處理하면 나타나지 않아 불순물의 exchangeable proton 때문으로 추정되었다. ^{13}C NMR에서도 128~137 ppm에서 heteroaromatic carbon構造가 確認되었으며, 이미 報告된 UV 및 Mass spectrum 等이 phenazine과 일치하였으므로^{17,18)} C物質은 分子量이 180인 $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ 의 phenazine으로 同定되었다.

Phenazine은 주로 *Pseudomonas*에 의해서 phenazine 혹은 그 유도체로서 생성되며 N를 포함하는 heterocyclic化合物의 中間體로 부터 유래하거나 방향족아미노산 합성경로의 최종 生成物로 合成되며^{19~23)}, 이들은 세균과

真菌에 의한 植物의 病을 효과적으로 防除한다고 報告되어 있다^{22,23)}.

要 約

고추 疫病菌(*P. capsici*)에 優秀한 抗菌活性을 가진 3 가지의 抗菌物質을 *Pseudomonas* sp. A-183 培養液으로 부터 分離 精製하였다. 分離된 3 가지의 抗菌物質에 대한 分子構造式을 究明하기 위하여 UV, IR, ¹H NMR, ¹³C NMR Spectroscopy法으로 解析하였다.

A와 B物質은 Molisch 및 Anthrone反應에 陽性으로, Fehlings反應에는 陰性으로 나타났으므로 nonreducing sugar構造를 含有하고 있는 것으로 판단되었다. C物質은 위의 試藥에서 呈色反應을 나타내지 않고 단지 UV吸收만을 나타내었다.

Mass, NMR 및 IR 分光分析에 의해 A와 B物質은 糖으로는 deoxyhexose인 rhamnose를 포함하고 지방산으로는 β-hydroxydecanoic acid를 포함하였다. 또 이들 사이에는 O-glycoside結合이 形成되어 있었으며 A와 B物質 사이에는 糖 한分子의 差異가 나타났다.

綜合的으로 A物質은 glycolipid B인 3-hydroxy-(3-hydroxydecanoyl)-decanoic acid 3-O-α-L-rhamnopyranosyl (1→2)rhamnopyranoside, B物質은 glycolipid A인 3-hydroxy-(3'-hydroxydecanoyl)decanoic acid 3-O-α-L-rhamnopyranoside로 同定되었으며, C物質은 phenazine으로 確認되었다.

參 考 文 獻

1. Sneh, B. (1990). Use of rhizosphere chitinolic bacteria for biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi in carnation, *Phytopathol. Z.*, 100, 251~256.
2. Lifshitz, R., Windham, M.Y. and R. Baker (1986). Mechanism of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp., *Phytopathol.*, 76, 720~725.
3. Sivan, A. and I. Chet (1989). Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*, *J. Gen. Microbiol.*, 135, 675~682.
4. Cook, R.J. and F.K. Baker (1986). The nature and practice of biological control of plant pathogen, *Am. Phytopathol. Soc. St. Paul. Minn.*, pp. 539.
5. Teintze, M., M.B. Hossain, C.L. Barnes, J. Leong and D. van der Helm (1981). Structure of ferric pseudobactin, siderophore from a plant growth promoting *Pseudomonas*, *Biochemistry*, 20, 6446~6457.
6. Leong, J. (1986). Siderophore: their biochemistry and possible role in biocontrol of plant pathogens, *Ann. Rev. Phytopathol.*, 24, 187~209.
7. Semple, K.M. and D.W.S. Westlake (1987). Characterization of iron-reducing *Alteromonas putrefaciens* strain from oil field fluids, *Can. J. Microbiol.*, 33, 366~371.
8. Misaghi, I.J., L.J. Stowell, R.G. Grogan and L.C. Spearman (1982). Fungistatic activity of water-soluble fluorescent pigments of *Pseudomonas* sp. *Phytopathol.*, 72(1), 33~36.
9. Scher, F.M. and R. Baker (1982). Effect of *Pseudomonas putida* and synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens, *Phytopathol.*, 72, 1567~1573.
10. Gurussiddaiah, S., M. Weller, A. Sarkar and R.J. Cook (1986). Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium* spp., *Antim. Ag. Chem.*, 29, 488~495.
11. Brisbane, P.G., L.J. Janik, M.E. Tate and R.F.O. Warren (1987). Revised structure for the phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* 2-81(NRRLB-15132), *Antimicrob. Agents Chemother*, 31, 1967~1971.
12. 張胤喜, 張相文, 崔 嶽 (1996). 고추 疫病菌(*Phytophthora capsici*)의 生物學的 防除, I. 고추 疫病拮抗菌의 選拔, 韓國環境農學會誌, 15(3) : 289~295.
13. 張胤喜, 張相文, 崔 嶽, 朴炳允 (1996). 고추疫病菌(*Phytophthora capsici*)의 生物學的 防除, II. 抗菌物質의 分離 精製 및 抗菌活性, 韓國環境農學會誌, 15(4) : 399~405.
14. Jarvis, F.G. and M.S. Jonson (1949). A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 4124~4126.
15. Suzuki, T. and S. Itoh (1970). Glycolipid A and B by fermentation with *Pseudomonas* strains, *Ger. offen. 2,350,375, Japan. Appl.*, 89, 843.
16. Bank, G.T., K.D. Barrow and M. Woolford (1971). Pseudomonic acid: an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*, *Nature*, 234, 416~417.
17. Mandava, N.B. (1985). Ultraviolet spectroscopy, pp. 165~189, In Mandava N.B.(ed.) Washington D.C.
18. NBS Registry of mass spectral data, Volume 1, Molecular weight, 2-198, p. 73.
19. Brisbane, P.G. and A.D. Rovira (1988). Mechanisms of inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by fluorescent *Pseudomonas* sp., *Plant Pathol.*, 37, 104~111.
20. Taraz, K., E.M. Schaffner and G. Pulverer (1990). Bacteriocides, 2,3,9-trihydroxyphenazin-1-carboxylic acid. A new phenazine derivative from *Pseudomonas fluorescens* grown under beryllium stress, *Z. Naturforsch., B : Chem. SCI.*, 45, 552~556.
21. Leisinger, T. and R. Margraff (1979). Secondary metabolites of the fluorescent *Pseudomonas* sp., *Microbial Reviews*, 43, 422~442.
22. Turner, J.M. and A.J. Messenger (1986). Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production, *Adv. Microbiol. Physiol.*, 27, 211~275.
23. Shankelingam, T., R.V. Usha and V. Thirupathaiah (1983) Effect of phenazine derivates on four bacterial plant disease, *Compar. Physiol. Ecol.*, 8, 237~240.