

## 원적외선 조사에 따른 가래나무 잎의 항산화 활성 변화

엄석현\*<sup>1</sup> · 박형재\*<sup>1</sup> · 김성무\* · 박승문\*\*\* · 김명조\*\* · 유창연\*\* · 조동하\*<sup>†</sup>

\*강원대학교 BT특성화학부대학, \*\*강원대학교 한방바이오센터, \*\*\*전북대학교 생리활성 물질연구소

### Changes of Antioxidant Activity in *Juglans mandshrica* Maxim. Leaves by Far Infrared Ray Irradiation

Seok Hyun Eom\*<sup>1</sup>, Hyoung Jae Park\*<sup>1</sup>, Cheng Wu Jin\*, Seung Moon Park\*\*\*, Myong Jo Kim\*\*, Chang Yeon Yu\*\*, and Dong Ha Cho\*<sup>†</sup>

\*Plant Biotechnology, School of Bioscience & Biotechnology, Kangwon Natl. Univ. Chuncheon 200-701, Korea.

\*\*Bioherb Research Institute of Kangwon Natl. Univ. Chuncheon 200-701, Korea

\*\*\*Research Center of Bioactive Materials, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea.

**ABSTRACT :** This research was conducted to investigate antioxidant activities of *Juglans mandshrica* forages by the irradiation of far infrared ray during leaf drying processes before compound extraction, with its potential use for activating antioxidants. The contents of total phenolics and flavonoids in the basis of a gram leaf dry weight were maximized in 20 min at 30 V of far infrared irradiation. Total phenolic content was 25.43 mg/g in the FIR treatment, while it was 21.12 mg/g in the non-FIR treatment control. Total flavonoid content was 39.38 mg/g in the FIR treatment, while it was 32.78 mg/g in the non-FIR treatment control. The contents were decreased when the condition of far infrared ray irradiation was higher voltage and longer treatment time, exhibiting 16.93 mg/g of total phenolics and 23.78 mg/g of total flavonoids in 30 min at 50 V of far infrared irradiation. The antioxidant activities were shown to positive relationships with the contents of total phenolics and total flavonoids. In this study, we concluded that content of bioactive molecules relating antioxidant activity in *Juglans mandshrica* forages is optimized in 20 min at 30 V of far infrared irradiation for leaf drying process.

**Key Words :** *Juglans mandshrica*, far infrared ray, phenolics, flavonoids, antioxidant activity

## 서 언

가래나무 (*Juglans mandshurica* Maximowicz)는 가래나무과 (Juglandaceae)에 속하는 낙엽교목으로 중국, 시베리아, 우리나라 중부 이북 해발 100~1,500 m 사이에 자생하며 추자목이라고도 하고 열매를 추자라고 한다 (이, 1997). 한방에서는 추피라 하여 수렴과 해열, 항염증, 약창, 두창, 옹종 등 피부병에 사용하였고, 잎은 살충제 및 포도당의 섭취 능력을 높여주는 작용이 있어 당뇨병에 이용하였다 (임, 1999; 문, 1999). 지금까지 가래나무는 근피에 관한 연구가 대부분인 (Son, 1995; Joe *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003) 반면에, 가래나무 잎에 관한 연구는 거의 이루어지지 않은 상태이다.

플라보노이드를 포함한 페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량

을 가지며, 이들은 phenolic hydroxyl 기를 가지고 있기 때문에 단백질 등의 거대분자들과 결합하는 성질을 가지며, 항산화 효과 등의 생리활성 기능을 가진다는 보고가 있다 (Lee *et al.*, 2005). 폴리페놀들은 식물체 내에서 다양한 형태의 결합산물로 함유되어 있어, 이들에 따라 항산화 활성이 다르게 나타나는 경향이 있다 (Niwa & Miyachi, 1986). 유용물질의 최적 용출은 식물 재료, 특히 약용작물을 한방재료로 이용할 때, 가공 과정이 식물 자체의 유용성분 함량과 더불어 중요한 과정의 하나이다. 식물재료의 가공 또는 건조 시 감압 열처리 는 유용물질의 용출을 쉽게 하여 항산화 활성을 높이며 (Kim *et al.*, 2007), 새로운 형태의 유용물질 (예, 인삼에서 홍삼으로 전환 시 Rg3의 생성) 또한 생성되는 것으로 일반적으로 알려져 있다.

원적외선은 약 3.0~1,000 μm의 파장을 가지고 있으며, 가열과 비가열의 방법으로 이용되며, 식품의 숙성, 식품의 풍미향

<sup>1</sup>These two authors are equally contributed as the first authors.

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-82-33-250-6475 (E-mail) chodh@kangwon.ac.kr

Received July 5, 2007 / Accepted August 2, 2007

상 등에 적용되고 있다. 원적외선은 생물적으로 활성이 있으며, 물질의 중심까지 고르게 열을 전달하는 특성을 가지고 있고 (Inoue & Kabaya, 1989), 이러한 특성으로 인해 가열시간을 단축시킴으로서 에너지 절감 등의 효과를 가져 올 수 있으며, 또한, 열분해에 의한 영양물질 또는 생리활성물질의 손실을 최소화할 수 있다. 천연 항산화 물질들은 중합체인 polyphenol, tocopherol, flavonoid 등의 고분자를 가지고 있는데 원적외선 처리가 이들을 저분자로 유리시킨다고 보고가 있으며 (Niwa & Miyachi, 1986), 또한 원적외선 처리에 의하여 왕겨의 고분자 polyphenol들이 유리되어 항산화능이 증가되었다는 보고 (Lee *et al.*, 2003)도 있다.

따라서, 본 실험에서는 가래나무 잎을 원적외선 건조기를 이용하여 처리 voltage제기와 처리시간을 변화시킴으로써 잎의 항산화 물질의 함량의 변화와 그 활성차이를 알아보고, 원적외선 처리에 따른 가래나무 잎의 이용성과 그 활용방안을 모색하기 위한 자료를 얻고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시재료

강원도 춘천시 강원대학교 캠퍼스에 식재되어 있는 가래나무 잎을 2007년 6월 15일에 채취하여  $-80^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하여 실험에 사용하였다.

### 2. 원적외선 처리 및 추출물 제조

가래나무 잎을 원적외선 건조기 (한국에너지기술, Seoul, Korea)를 이용하여 30 ( $60^{\circ}\text{C}$ ), 40 ( $80^{\circ}\text{C}$ ) 및 50 ( $100^{\circ}\text{C}$ ) voltages 에서 각각 10, 20, 그리고 30분 동안 원적외선을 조사하였다. 그리고 대조구는 음건한 잎을 사용하였다. 각각 처리된 가래나무 잎을 마쇄하여 0.1 g에 80% 메탄올 20 ml를 첨가하여 초음파 세정기 (JAC Ultrasonic)에  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 추출하였다. 각각의 추출물을 여과지 (Whatman No. 2)에 감압여과한 후 최종 추출물을 25 ml로 적정하였다. 각각 처리된 가래나무 잎의 추출은 모두 3반복으로 실시하였다.

### 3. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 화합물의 함량은 페놀성 물질이 phosphomolybdate와 반응하여 청색을 나타내는 현상을 이용한 Folin-Denis 법을 약간 변형시켜 측정하였다. 즉, 위 추출액 0.2 ml를 시험관에 취하여 증류수 (1.8 ml)를 첨가하여 2 ml로 만든 후, 여기에 0.2 ml Folin-ciocalteau phenol reagent를 첨가하여 잘 혼합하고 3분간 실온에서 방치하였다. 정확히 3분 반응시킨 후,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 포화용액 0.4 ml를 첨가하여 혼합하고 증류수 (1.4 ml)를 첨가하여 총 4 ml로 만든 후, 실온에서 1시간 방치하여 상층액을 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 폴

리페놀 화합물은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다 (Hagerman *et al.*, 2000).

### 4. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 위 추출액 0.5 ml에 10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  용액 0.1 ml와 1M potassium acetate 용액 0.1 ml를 첨가하고, 증류수 4.3 ml를 더 첨가하였다. 실온에서 40분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준검량곡선은 quercetin를 이용하여 작성하였다 (Park *et al.*, 1997).

### 5. Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical 소거 활성 측정

DPPH에 의한 항산화활성 측정은 위 추출액 1 ml를 취하여 0.15 mM DPPH 메탄올 용액 4 ml를 가하여 vortexing하여 균일하게 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능 (%)은 시료 첨가구와 무 첨가구의 흡광도 차를 백분율 (%)로 표시하였다 (Braca, 2001).

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [(1 - A/B) \times 100\%]$$

A: 시료의 흡광도, B: 대조구의 흡광도

## 결과 및 고찰

### 1. 원적외선에 따른 가래나무 잎의 총 폴리페놀 함량 차이

식물체에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나인 페놀 화합물은 식물체에 특수한 색깔을 부여하고 산화 환원 반응 시 기질로 작용하며, 미생물의 공격을 막아 식물자체를 보호하는 것으로 알려져 있다. 가래나무 잎에 대한 원적외선 조사 시간과 voltage에 따른 총 폴리페놀 함량 변화의 차이를 보면, 음건한 가래나무 잎의 총 폴리페놀 함량은 21.12 mg/g으로 나타나, 원적외선 30 v에서 10분간 처리구, 40 v에서 30분간 처리구 및 50 v에서 10분간 처리구의 수치와 비슷하였다. 반면에 원적외선 50 v에서 30분간 처리구의 총 폴리페놀 함량은 16.93 mg/g으로 가장 낮았다. 그러나 원적외선 30 v에서 20분간 처리했을 경우엔 총 폴리페놀 함량이 25.43 mg/g으로 가장 높게 나타났다 (Table 1). 전체적으로, 원적외선 처리구에서 무 처리구인 음건한 잎에 비해 총 폴리페놀 함량이 비슷하거나 높게 나타났다. Voltage제기와 처리시간에 따른 원적외선 처리구의 차이를 보면, 30 v에서 20분과 30분간 처리구가 다른 처리구에 비해 높게 나타난 것을 알 수 있었다. 식물체에는 많은 종류의 페놀 화합물이 존재하며, hydroxycinnamic acid를 비롯한 대부분의 페놀 화합물은 세포벽 다당류, 리그닌 등과 ester 결합되어 있거나 중합체로 존재한다 (Herrmann, 1989). 따라서 상기 결과는 식물에 존재하는 페놀 화합물은 다양한 결합 형태로 존재하고, 이들은 물리화학적 처리 조건에 의해

**Table 1.** Total phenolic contents of *Juglans mandshurica* leaves under far-infrared irradiation treatments

Degree of voltage	Time of far infrared ray irradiation (min.)	Total phenolic contents (mg/g D.W.)**
Control	0	21.12 ± 0.12*
	10	21.73 ± 0.12
	20	25.43 ± 0.66
30 v	30	24.34 ± 0.36
	10	23.97 ± 0.18
	20	22.27 ± 0.18
40 v	30	21.27 ± 0.29
	10	21.24 ± 0.55
	20	23.37 ± 0.73
50 v	30	16.93 ± 0.18

\* Values represent mean of three determinations with the standard deviations.

\*\* Milligrams of total phenolic content in one gram of dried leaves based on gallic acid as a standard.

유리될 수 있음을 의미한다. 원적외선 50v에서 30분간 처리구에서 총폴리페놀 함량이 감소되는 것은 시간에 따른 100℃ 이상의 고온 노출로 인해 페놀 화합물이 불안정하기 때문인 것으로 사료된다.

## 2. 원적외선에 따른 가래나무 잎의 총플라보노이드 함량 차이

플라보노이드는 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 기본 골격을 가지는 페놀계 화합물의 총칭으로, 채소류와 유관부 식물의 꽃, 과일, 줄기, 잎, 뿌리 등 거의 모든 부위에 분포하고 있다 (Riccardo *et al.*, 1995). 플라보노이드는 주로 anthocyanidin, flavonol, flavone, catechin 및 flavanone으로 구성되어 있으며, 그 구조에 따라 특정 플라보노이드는 항산화 및 항균성을 갖고 있는 것으로 보고 되고 있다 (Lam *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1994). 항암성과 항돌연변이성을 갖는 플라보노이드로는 flavonol계의 quercetin, kaempferol, myricetin, flavone계의 apigenin, luteolin 그리고 limonin, nomilin 등이 알려져 있다 (Hertog & Hollman, 1996). 가래나무 잎에 대한 원적외선 조사시간과 voltage에 따른 총 플라보노이드 함량 변화의 차이를 확인한 결과, 음건한 가래나무 잎의 총 플라보노이드 함량은 32.78 mg/g으로 나타나, 원적외선 40v에서 20분간, 30분간 처리구 및 50v에서 10분간 처리구와 비슷하였으며, 원적외선 50v에서 30분간 처리구에서는 23.37 mg/g으로 나타나 가장 낮게 나타났다. 잎의 총 플라보노이드 함량도 총 폴리페놀 함량과 마찬가지로 원적외선 30v에서 20분간 처리했을 때, 39.38 mg/g으로 가장 높게 나타났다 (Table 2). 전체적으로 보면, 원적외선 처리구에서 무처리구인 음건한 잎에 비해 총 폴리페놀 함량이 비슷하거나 높게 나타났다. Voltage세기와 처리시간에 따

**Table 2.** Total flavonoid contents of *Juglans mandshurica* leaves under far infrared ray irradiation treatments

Degree of voltage	Time of far infrared ray irradiation (min.)	Total flavonoid contents* (mg/g D.W.**)
Control	0	32.78 ± 0.38
	10	34.77 ± 0.57
	20	39.38 ± 2.75
30 v	30	37.84 ± 3.00
	10	36.88 ± 1.53
	20	32.33 ± 0.06
40 v	30	32.91 ± 0.38
	10	32.78 ± 0.64
	20	34.98 ± 0.70
50 v	30	23.37 ± 0.06

\* Values represent mean of three determinations with the standard deviations.

\*\* Milligrams of total flavonoid content in one gram of dried leaves based on quercetin as standard.

른 원적외선 처리구의 차이를 보면, 30v에서 20분간, 30분간 처리구와 40v에서 10분간 처리구가 다른 처리구에 비해 높게 나타난 것을 알 수 있었다.

## 3. 원적외선 처리에 따른 가래나무 잎의 추출물 DPPH radical 소거활성 차이

천연 항산화제와 항산화 효소는 유용물질로서 부가가치가 높을 뿐만 아니라 환경스트레스에 대한 방어기구를 이해하는 데도 중요한 역할을 한다. 인체 내에서 특히 지방질의 산화과정에서 생성되는 free radical들은 세포의 노화를 촉진시키고 생체세포의 방어기전을 저하시키는 것을 비롯하여 세포활성을 저해하므로 이들 free radical의 생성을 근본적으로 억제하거나 이미 생성된 free radical들의 안정화를 통해 생체세포를 보호할 필요가 있는데, 전자공여작용은 이러한 생물활성 free radical에 전자를 공여하여 세포 성분의 산화를 억제하게 된다 (Park and Chang, 2003). 원적외선 조사시간과 voltage세기에 따른 가래나무 잎의 추출물의 DPPH radical 소거활성을 차이를 보면, 원액에서는 모두 82.36~85.67%로 나타나, 무처리구인 음건한 잎의 추출물과 거의 차이가 보이지 않았다. 그러나, 1/2 희석액에서는 원적외선 30v와 40v에서 20분과 30분간 처리구에서 78% 이상의 높은 DPPH radical 소거활성을 나타낸 반면에, 무처리구인 음건한 잎의 추출물에서는 무려 10%나 하락한 66.88%로 나타난 것을 알 수 있었다. 1/4 희석액에서는 원적외선 50v에서 30분간 처리구를 제외하고 모든 원적외선 처리구에서 무처리구 음건한 잎의 추출물에 비해 DPPH radical 활성이 높게 나타났는데, 특히 30v에서 20분간 처리구에서 잎 추출물의 DPPH radical 소거활성이 51.49%로

**Table 3.** DPPH radical scavenging activities of *Juglans mandshurica* leaves extracted by the treatments of far infrared ray irradiation

Degree of voltage	Time of far-infrared irradiation (min.)	DPPH radical scavenging activity (%) <sup>*</sup>		
		1/4 diluted solution	1/2 diluted solution	undiluted** solution
Control	0	39.20 ± 0.68	66.88 ± 1.44	83.60 ± 0.49
	10	39.78 ± 0.72	69.77 ± 2.62	83.02 ± 0.63
30 v	20	51.49 ± 2.34	80.96 ± 1.35	82.36 ± 1.57
	30	47.16 ± 2.07	78.02 ± 2.39	82.48 ± 1.98
40 v	10	48.11 ± 0.59	78.16 ± 0.90	82.97 ± 1.48
	20	44.82 ± 1.53	80.23 ± 2.53	84.32 ± 0.85
	30	40.91 ± 0.95	69.86 ± 1.81	83.33 ± 0.76
50 v	10	41.27 ± 0.95	69.49 ± 1.71	83.51 ± 0.76
	20	46.40 ± 1.67	76.94 ± 2.30	83.29 ± 0.90
	30	36.54 ± 0.54	62.55 ± 0.54	85.67 ± 0.31

\* Values represent mean of three determinations ± the standard deviations.

\*\* Sample concentration in undiluted solution was determined that 0.1 g dried leaf tissues were dissolved in 25 ml of 80% methanol.

로 가장 높게 나타났다 (Table 3). 탈지대두박 원적외선 처리구는 무처리구에 비해 항산화능을 향상시켰는데 150°C에서 15분간 처리한 조사구는 무처리구에 비해 4.5배 높은 소거능을 나타낸다고 보고하였다 (Rim *et al.*, 2005). 이상의 결과로부터 가래나무 잎 추출액의 라디칼 소거능은 페놀 화합물과 밀접한 관계가 있으며, 원적외선 처리에 의한 페놀 화합물 추출 증가로 항산화능을 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다.

### 적 요

가래나무 잎을 원적외선 30, 40 및 50 v에서 각각 10, 20 및 30분을 처리하였다. 원적외선을 조사한 잎의 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, 잎 추출물의 DPPH radical 소거 활성 등을 분석한 결과, 원적외선 30 v에서 20분간 조사한 처리구에서 총 폴리페놀 함량은 25.43 mg/g로, 총 플라보노이드 함량은 39.38 mg/g으로 가장 높게 나타났다. 그 반면에, 원적외선 50 v에서 30분간 조사한 처리구에서 총 폴리페놀 함량은 16.93 mg/g으로, 총 플라보노이드 함량은 23.78 mg/g으로 가장 낮게 나타났다. 전체적으로 원적외선 처리에 의해 잎에 함유한 항산화 물질의 함량의 증가는 물론, 그 추출물의 항산화 활성도 증가하는 것을 알 수 있었다. 하지만 원적외선 처리가 가래나무에 함유한 어떠한 특정한 물질들의 증가에 관하여서는 추후에 더욱 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

### 사 사

본 연구는 중소기업청 Unibiz 연구비와 강원대학교 생명공학연구소의 지원에 의하여 이루어진 것으로 감사를 드리며 또한 원적외선기기를 지원해준 한국에너지기술에 감사드립니다.

### LITERATURE CITED

- Braca A, Tommasi ND, Bari LD, Pizza C, Politi M, Morelli I (2001) Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. *J. Nat. Prod.* 64:892-895.
- Hagerman A, Harvey-Mueller I, Makkar HPS (2000) Quantification of tannins in tree folige a laboratory manual. FAO/IAEA. Vienna.
- Herrmann K (1989) Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit. Ref. Food Sci. Nutr.* 28:315-347.
- Hertog MGL, Hollman PCH (1996) Potential health effects of dietary flavonol quercetin. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50:63-71
- Inoue S, Kabaya M (1989) Biological activities caused by far-infrared radiation. *Int. J. Biometeorol.* 33:145-150.
- Joe YK, Son JK, Park SH, Lee IJ, Moon DC (1996) New naphthalenyl glucosides from the roots of *Juglans mandshurica*. *J. Nat. Prod.* 59:159-160.
- Kim KT, Yoo KM, Lee JW, Eom SH, Hwang IK, Lee CY (2007) Protective effect of steamed American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) on V79-4 cells induced by oxidative stress. *J. Ethnopharm.* 111:443-45.
- Kim SH, Lee KS, Son JK, Je GH, Lee JS, Lee CH, Cheong CJ (1998) Cytotoxic compounds from the roots of *Juglans mandshurica*. *J. Nat. Prod.* 61:643-645.
- Lam LKT, Zhang J, Hasegawa S (1994) Citrus limonoid reduction of chemically induced tumorigenesis. *Food Technol.* 48:104-109.
- Lee KS, Li G, Kim SH, Lee CS, Woo MH, Lee SH, Jhang YD, Son JK (2002) Cytotoxic diarylheptanoids from the roots of *Juglans mandshurica*. *J. Nat. Prod.* 65:1707-1708.
- Lee SC, Kim JH, Jeong SM, Kim DR (2003) Effect of far-infrared radiation on the antioxidant activity of rice hulls. *J. Agric. Food Chem.* 51:4400-4403.
- Lee SY, Hwang EJ, Kim GH, Choi YB, Lim CY, Kim SM (2005) Antifungal and antioxidant activities of extracts from

- leaves and flowers of *Camellia japonica* L. Korean J. Medicinal Crop Sci. 13(3):93-100.
- Li G, Lee SY, Lee KS, Lee SW, Kim SH, Lee SH, Lee CS, Woo MH, Son JK** (2003) DNA topoisomerase I and II inhibitory activity of constituents isolated from *Juglans mandshurica*. Arch. Pharm. Res. 26(6):466-470.
- Miller EG, Gonzales-Sanders AP, Couvillion AM, Binnie WH, Hasegawa S, Lam LKL** (1994) Citrus limonoids as inhibitors of oral carcinogenesis. Food Technol. 48:110-114.
- Niwa Y, Miyachi Y** (1986) Antioxidant action of natural health products and Chinese herbs. Inflammation 10:79-91.
- Park YK, Koo MH, Ikegaki M, Contado JL** (1997) Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. Arquivos de Biologia e Tecnologia 40(1):97-106.
- Park YS, Chang HG** (2003) Lactic acid fermentation and biological activities of *Rubus coreanus*. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 46(4):367-375.
- Solimani R, Bayon F, Domini I, Pifferi PG, Todesco PE, Marconi G, Somori B** (1995) Flavonoid-DNA interaction studied with flow linear dichroism technique. J. Agric. Food Chem. 43:876-882.
- Rim AR, Jung ES, Kim SY, Lee SC** (2005) Effect of far-infrared irradiation and heat treatment on the antioxidant activity of extracts from defatted soybean meal. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 48(4):400-403.
- Son JK** (1995) Isolation and structure determination of a new tetralone glucoside from the roots of *Juglans mandshurica*. Arch. Pharm. Res. 18(3):203-205.
- 문관심 (1999) 약초의 성분과 이용. 과학백과사전출판사. p. 166-167.
- 임재록 (1999) 조선약용식물지 I. 농업출판사. p. 82-83.
- 이유미 (1997) 우리가 정말 알아야 할 우리나라 백가지. 현암사. p. 465-468.