

2
3 **Efecto de pectinasas de *Aspergillus niger* en la extracción fenólica durante**
4 **la maceración de uva**
5

6 Daniel Jafet Valle-Ortiz^{1,2*}

7 Enrique Durán-Páramo¹

8 Luis Carlos Fernández-Linares¹

9 Gustavo Valencia-del Toro¹

10 Luis Mario Akyala-Guerrero²

11
12
13 ¹Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Ave.
14 Acueducto s/n, Col. Barrio La Laguna Ticomán, C. P. 07340, Gustavo A. Madero, Ciudad de
15 México. México.

16 ²Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Ex-Hacienda San Juan Molino, Carretera
17 Estatal Tecuexcomac-Tepetitla, km 1.5, Tlaxcala C. P. 90700, México.

18
19
20 *Corresponding author: djafet9205@gmail.com

21
22 **Cite this article as follows:**

23 Daniel Jafet Valle-Ortiz, Enrique Durán-Páramo, Luis Carlos Fernández-Linares, Gustavo
24 Valencia-del Toro, Luis Mario Akyala-Guerrero. Effect of pectinases from *Aspergillus niger* on
25 phenolic extraction during grape maceration. 5(5) <https://doi.org/10.5154/r.ctasci.2024.04.05>

26

27 **Fecha de recibido:** 4 septiembre, 2024

Fecha de aceptado: 28 noviembre, 2024

28

29

30 **Abstract**

31 **Effect of pectinases from *Aspergillus niger* on phenolic extraction during grape maceration**

32 **Keywords:** Enzymes; submerged fermentation; process optimization; microbial biotechnology.

33

34 **Resumen**

35 La calidad sensorial de los vinos tintos se caracteriza, entre otros parámetros, por el color y el sabor
36 que dependen de compuestos fenólicos como antocianinas y taninos. Debido a que estos
37 compuestos son los responsables de las características sensoriales del vino, es necesario emplear
38 técnicas que permitan extraerlos de forma eficaz y óptima. En este estudio se analiza la eficiencia
39 de extracción de compuestos fenólicos utilizando pectinasas de hongos. Se produjeron pectinasas
40 con *Aspergillus niger* NRRL 332 en fermentación sumergida, analizando diferentes temperaturas
41 (22, 25, 30, 35 y 38 °C), pH inicial (3.1, 3.5, 4.5, 5.5, y 6.1) y se hicieron cinéticas de crecimiento
42 durante 120 horas. Se encontró que los puntos óptimos de producción de pectinasas fueron a una
43 temperatura de 30 °C, pH de 5.5 y un tiempo de incubación de 72 h, con un máximo de 9.6 U·mL⁻¹.
44 Posteriormente, las enzimas producidas se aplicaron en el proceso de maceración del vino. Con
45 el uso de pectinasas se incrementó significativamente la concentración de fenoles solubles totales,
46 favoreciendo atributos de color como ángulo de tono y cromaticidad.

47 **Palabras clave:** Enzimas; fermentación en estado sumergido; optimización de proceso,
48 biotecnología microbiana.

49

50

51

Introducción

52

53

54 El vino contiene compuestos fenólicos como las antocianinas y los taninos que influyen en su color,
55 aroma y sabor, contribuyendo a la complejidad y la estabilidad del producto final. Además, tienen
56 un impacto significativo en su valor comercial, ya que son determinantes en la calidad sensorial
57 del vino y se utilizan como marcadores de autenticidad en la industria vinícola (Gutiérrez-Escobar
58 et al., 2021). Estos metabolitos secundarios se localizan principalmente en la vacuola, y su
59 liberación depende de la ruptura de la pared celular durante la etapa de maceración (Gao et al.,
60 2016). Su concentración y perfil pueden ser modulados durante el proceso de producción para
61 obtener características deseadas que aporten singularidad al vino (Gutiérrez-Escobar et al., 2021;
62 Merkyte et al., 2020). La extracción de compuestos fenólicos en las uvas se ha probado con
63 sonicación (Osete-Alcaraz et al., 2019), aplicación de microondas (Caldas et al., 2018; Wang et al.,
64 2019) y la incorporación de enzimas (Gao et al., 2019).

65 En esta última alternativa, se ha demostrado que el uso de pectinasas puede ayudar a romper las
66 cadenas poliméricas que conforman la pared celular y favorecer la liberación de los metabolitos
67 secundarios (Satapathy et al., 2020). Durante la etapa de maceración, estas enzimas optimizan la
68 extracción de antocianinas, taninos y otros compuestos fenólicos (Fernández-González et al.,
69 2024). Las pectinasas se encuentran de forma natural en las plantas; sin embargo, la producción
70 industrial se realiza principalmente con sistemas microbianos, entre los que se encuentra un gran
71 número de cepas bacterianas como *Bacillus* spp. (Mercimek Takcı & Turkmen, 2016), algunas
72 levaduras como *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* (Bilal et al., 2022;
73 Poondla et al., 2016) y muchos hongos filamentosos, principalmente de los géneros *Aspergillus* y
74 *Penicillium* (Li et al., 2015). *Aspergillus niger* es el microorganismo más utilizado en este campo
75 biotecnológico, ya que ha sido reconocido generalmente como seguro (GRAS) por la
76 Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) del gobierno de los Estados Unidos
77 (Reginatto et al., 2017). La producción de pectinasas se ha llevado a cabo mediante fermentación
78 en estado sólido (SsF) (Pitol et al., 2016; Poletto et al., 2017) y fermentación sumergida (SmF)
79 (Fratebianchi et al., 2017; Silva et al., 2019). En esta última, el microorganismo crece en un medio
80 líquido y se caracteriza por ser un proceso con condiciones fisicoquímicas controladas y asépticas,
81 con nutrientes disueltos homogéneamente y siempre disponibles en el medio de cultivo (Ravindran

82 & Jaiswal, 2016). El control de este bioproceso depende de diversos factores, donde destacan el
83 pH y la temperatura (Amin et al., 2019), los cuales deben ser evaluados para definir las mejores
84 condiciones en el proceso de producción de la enzima.

85 En este contexto, el objetivo del trabajo fue caracterizar las condiciones de producción de
86 pectinasas a través de cultivos sumergidos con *A. niger* y aplicarlas durante el proceso de
87 maceración del vino para evaluar su efecto en la extracción de compuestos fenólicos.

88

89

90 **Materiales y métodos**

91

92

93 **Preparación del inóculo y de los cultivos sumergidos**

94

95

96 Se utilizó la cepa *Aspergillus niger* NRRL 332, proporcionada por el Departamento de Agricultura
97 de los Estados Unidos de América, la cual fue propagada en cajas de Petri con medio de cultivo
98 papa dextrosa agar (PDA, marca BD Bioxon) e incubada a 30 °C durante 5 días. Posteriormente,
99 se realizó un raspado de esporas y se resuspendieron en una solución al 0.05 % v/v de Tween 20
100 para cuantificarlas con una cámara de Neubauer. Se realizaron diluciones hasta alcanzar una
101 concentración de 1×10^5 esporas \cdot mL⁻¹ (Reginatto et al., 2017).

102

103

104 **Producción de pectinasas**

105

106

107 Se utilizaron matraces Erlenmeyer con 50 mL de caldo de cultivo compuesto de extracto de
 108 levadura al 1.0 % (grado analítico, Meyer), MgSO₄ al 0.48 % (grado analítico, Meyer), FeSO₄ al
 109 0.018 % (grado analítico, Meyer), CaCl₂ al 0.0075 % (grado analítico, Meyer), KH₂PO₄ al 0.02 %
 110 (grado analítico, Fermont), (NH₄)₂ SO₄ al 0.0125 % (grado analítico, Fermont) y pectina cítrica
 111 pura grado reactivo al 1.0 % (grado analítico, Fermont) y se inocularon con la solución de esporas
 112 preparada previamente. Los tratamientos se incubaron con agitación constante a 200 rpm durante
 113 72 h (Reginatto et al., 2017). La producción de pectinasas se evaluó con un diseño experimental de
 114 superficie de respuesta central compuesto (**Cuadro 1**) con dos factores, pH inicial (3.1, 3.5, 4.5, 5.5
 115 y 6.1) y temperatura (22, 25, 30, 35 y 38 °C), cada uno con dos niveles (+1 y -1), dos puntos axiales
 116 (+1.5 y -1.5) y un punto central (0), resultando en un total de nueve tratamientos con sus respectivas
 117 réplicas (cinco réplicas para el punto central y tres para los puntos axiales y niveles), con el software
 118 Matlab 2013. La variable respuesta fue la actividad enzimática de los caldos de cultivo expresada
 119 en U·mL⁻¹. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima
 120 requerida para producir un micromol de ácido galacturónico por minuto en las condiciones de
 121 ensayo. El diseño Central Compuesto se basó en la siguiente ecuación polinómica de segundo
 122 orden (1):

$$123 \quad Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

124 Donde: Y es la actividad de pectinasa predicha (U·mL⁻¹), X_i y X_j son los parámetros Temperatura
 125 (°C) y pH), β₀ es el término de intersección, y β_i, β_{ii} y β_{ij} son los coeficientes lineales, cuadráticos
 126 y de interacción, respectivamente. Las respuestas predichas obtenidas a partir del diseño Central
 127 Compuesto se compararon con las respuestas reales para estimar la precisión de esta metodología.

128 **Cuadro 1.** Diseño experimental Central Compuesto para producción de pectinasas por *A. niger*
 129 NRRL 332.

Tratamiento	Combinación de puntos codificados	Temperatura	pH
1	0, 0	30	4.5
2	-1, -1	25	3.5
3	+1, -1	35	3.5
4	-1, +1	25	5.5
5	+1, +1	35	5.5
6	-1.5, 0	22	4.5

7	+1.5, 0	38	4.5
8	0, -1.5	30	3.1
9	0, +1.5	30	6.1

130

131 A partir de las condiciones que generaron la mayor actividad de pectinasas fueron realizadas
132 cinéticas de producción de biomasa por triplicado, actividad enzimática, consumo de sustrato y
133 variación del pH, midiendo cada parámetro en intervalos de 12 h durante cinco días.

134 La producción de biomasa se determinó mediante el método de peso seco descrito por Reginatto et
135 al. (2017) separando los pellets formados de la fase líquida con papel filtro Whatman No. 1 y
136 secándolos a 80 °C durante 24 h, los resultados se expresaron en $g \cdot L^{-1}$. El consumo de sustrato se
137 cuantificó mediante el método de antrona descrito por Sim et al. (1997); la absorbancia de la
138 muestra se midió en un espectrofotómetro (GENESYS™ 10, Thermo Scientific™, USA) a 650 nm
139 y los resultados se expresaron en $g \cdot L^{-1}$. Para determinar la actividad enzimática, el caldo de cultivo
140 se sometió a microfiltración para concentrar la enzima utilizando una celda Amicon® de 50 mL y
141 una membrana de celulosa de 10 kDa, a una presión de 40 psi y 180 rpm. La fracción retenida se
142 recuperó con resuspensión en 10 mL de buffer acetato 0.1 M y pH 4.5, adicionando 1 % (p/v) de
143 pectina cítrica como sustrato; posteriormente, se midió la concentración de ácido galacturónico
144 liberado con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) propuesto por Miller (1959). Las
145 muestras se analizaron en un espectrofotómetro (GENESYS™ 10, Thermo Scientific™, USA) a
146 540 nm y los resultados se expresaron en $U \cdot mL^{-1}$. Con el mismo concentrado enzimático, se midió
147 el contenido de proteína mediante la técnica de Bradford (1976), utilizando una curva de
148 calibración con albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) como estándar. Los
149 resultados se expresaron en $mg \cdot L^{-1}$.

150

151

152

Electroforesis por SDS-PAGE

153

154

155 El peso molecular de las pectinasas producidas se estimó mediante SDS-PAGE siguiendo el método
156 de (Laemmli, 1970) con algunas modificaciones, utilizando un gel separador y un gel concentrador.
157 El gel separador se preparó con 2.5 mL de solución de Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8, marca Sigma
158 Aldrich), 4.82 mL de agua destilada, 5 mL de acrilamida (marca Sigma Aldrich), 0.125 mL de SDS
159 al 10 % (marca BioRad), 0.06 mL de PSA (BioRad) y 17.5 μ L de TEMED (N, N, N', N'-
160 tetrametiletilendiamina, grado analítico, BioRad). El gel concentrador se elaboró con 0.15 mL de
161 solución de Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8 (grado analítico, Sigma Aldrich), 3.78 mL de agua destilada,
162 0.75 mL de acrilamida (grado analítico, Sigma Aldrich), 0.1 mL de SDS al 10 % (grado analítico,
163 BioRad), 0.025 mL de PSA al 10 % (grado analítico, BioRad) y 7 μ L de TEMED (grado analítico,
164 BioRad). La electroforesis se llevó a cabo en un equipo Mini Protean® Tetra Cell (BioRad, EE.
165 UU.) a 180 V durante 45 minutos. La tinción de las proteínas se realizó con Azul Brillante de
166 Coomassie R-250 (grado analítico, BioRad). Las resoluciones proteicas obtenidas se analizaron
167 con un escáner de cromatogramas de longitud de onda dual (Shimadzu, CS-910, Japón) y la
168 adquisición de datos se realizó utilizando el software Chromatography Station CSW de DataApex
169 Ltd.

170

171

172 **Aplicación del extracto enzimático en el proceso de maceración del vino**

173

174

175 Se utilizaron 1200 g de frutos de uva (*Vitis vinifera*) variedad *Carignan*, cosechados en Ensenada,
176 Baja California, México, que presentaron contenido de sólidos solubles totales de 29 °Brix. Los
177 frutos se dividieron en tres grupos de 100 g cada uno, que se molieron en mortero y se colocaron
178 en matraces Erlenmeyer de 250 mL. El material del primer grupo se colocó a 25 °C, se tomó como
179 control positivo (CP) y representó la concentración inicial de compuestos fenólicos. El segundo
180 grupo constituyó el control negativo (CN) y se formó con macerado de uva a 40 °C. El tercer grupo
181 (E) consistió en macerado de uva adicionado con 3 mL del concentrado enzimático con una
182 actividad hidrolítica de 4.66 U·mg⁻¹ y sometido a temperatura de 40 °C. Todos los tratamientos
183 estuvieron en agitación constante a 200 rpm durante 30 min. Se cuantificó el perfil fitoquímico de

184 los macerados de uva utilizando curvas de calibración con estándares. La concentración de fenoles
185 totales (TP) se determinó según el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi,
186 1965). La absorbancia se midió a 760 nm. Se utilizó ácido gálico como estándar (grado analítico,
187 Sigma Aldrich) y los resultados se expresaron como mg de ácido gálico equivalente (GAE·mL⁻¹).
188 Los flavonoides totales (FI) se cuantificaron de acuerdo con el método de cloruro de aluminio con
189 quercetina (meq-Q·mL⁻¹, grado analítico, Sigma Aldrich) a 510 nm (Zhishen et al., 1999) Los
190 taninos condensados (TC) se midieron con el método de vainillina utilizando catequina como
191 estándar (meq-C·mL⁻¹, grado analítico, Sigma Aldrich) a 550nm (Price et al., 1978). La
192 concentración de antocianinas se cuantificó con el método diferencial de pH para determinar el
193 contenido de antocianina monomérica total (Ant) de las muestras (Lee et al., 2005) con cianidina-
194 3-glucósido·mL⁻¹ (C3G·mL⁻¹, grado analítico, Sigma Aldrich). La absorbancia de las muestras
195 diluidas con soluciones tampón de cloruro de potasio (pH 1.0) y acetato de sodio (pH 4.5) se midió
196 mediante un espectrofotómetro a longitudes de onda de 520 y 700 nm. Los valores de absorbancia
197 se calcularon de acuerdo con la ecuación (2):

$$198 \quad A = (A_{520} - A_{700})pH_{1.0} - (A_{520} - A_{700})pH_{4.5} \quad (2)$$

199 Por último, se evaluó el color con un colorímetro Hunter Lab (Mini Scan XE Plus 45/0-L, EUA) y
200 se expresó como luminosidad, ángulo de matiz y cromaticidad (Carvajal-Herrera et al., 2011).

201 Esta fase se realizó con un diseño completamente al azar, donde los tratamientos CP, CN y E
202 constituyeron la fuente de variación. Se aplicó un análisis de varianza complementado con pruebas
203 de comparación de medias de tratamiento realizadas con el estadístico de Tukey, con nivel de
204 significancia de 0.05.

205

206

207

Resultados y discusión

208

209

210 *Aspergillus niger* NRRL 332 mostró la mayor producción de pectinasas a una temperatura (T°) de
211 25 y 30 °C y un pH que varió de 5.0 a 5.8 con un rango de variación entre 8.91 y 9.09 U·mL⁻¹

212 (Figura 1), sin diferencias significativas entre estos niveles. El modelo utilizado (Ecuación 1) en la
 213 superficie de respuesta, se ajustó en 84.8 % a los datos experimentales (Cuadro 2), expresado en la
 214 Ecuación 3.

$$215 \quad Y = -49.3309 + 3.3713 * A + 2.8385 * B + 0.0678 * A * B - 0.0623 * A^2 - 0.4439 * B^2 \quad (3)$$

216 **Cuadro 2.** Ajuste del modelo a los datos experimentales de producción de pectinasas por
 217 *Aspergillus niger* NRRL 332.

Temperatura (°C)	pH	Y experimental (U·mL ⁻¹)	Y predictivo (U·mL ⁻¹)	Error (%)
22	4.5	4.1093	5.1810	26.0792
25	3.5	8.3822	6.4436	23.1282
25	5.5	9.5884	7.5204	21.5678
30	4.5	8.0292	8.6754	8.0475
30	2.9	5.6354	6.1352	8.8690
30	6.1	8.2866	8.9428	7.9188
35	3.5	4.5175	5.1496	13.9924
35	5.5	7.0805	7.5824	7.0881
38	4.5	5.2125	4.1954	19.5127
			Promedio:	15.1337

218

219 Al realizar un análisis de varianza ($P \leq 0.05$), se corroboró que, tanto la temperatura como el pH
 220 influyeron significativamente sobre la producción de pectinasas (Cuadro 3). Diversos estudios han
 221 investigado las condiciones óptimas para la producción de pectinasas por *Aspergillus niger*. Por
 222 ejemplo, El Enshasy et al. (2018) evaluaron el efecto del pH inicial sobre la producción de
 223 pectinasas de la cepa NRC1ami, encontrando que un pH de 5.5 era óptimo para la producción de
 224 pectinasa en cultivo sumergido. Por otro lado, (Sandri & da Silveira, 2018) estudiaron la
 225 producción de pectinasas de *Aspergillus niger* LB-02-SF en cultivo en estado sólido, utilizando un
 226 pH de 4.0 y una temperatura de 30 °C, obteniendo una actividad enzimática máxima de 68 U·g⁻¹.
 227 Estos estudios indican que, aunque las condiciones óptimas pueden variar según la cepa y el método
 228 de cultivo, un pH en el rango de 4.0 a 5.5 y una temperatura de 30 °C son comunes para la
 229 producción eficiente de pectinasas por *Aspergillus niger*.

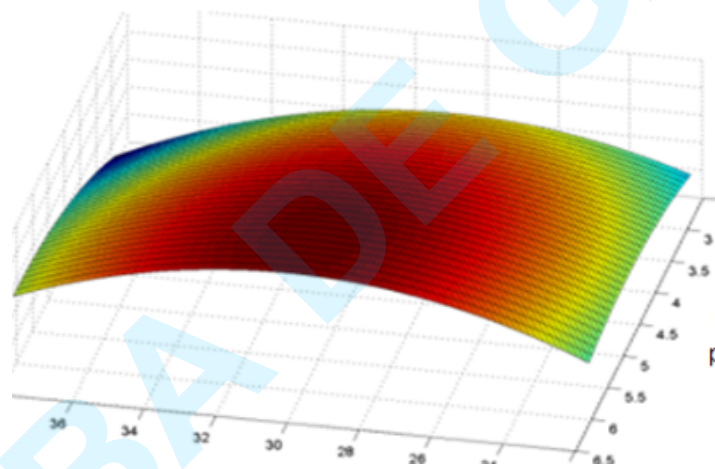
230

231 **Cuadro 3.** Análisis de varianza del efecto de la temperatura y el pH sobre la producción de
 232 pectinasas de *A. niger* NRRL 332.

Fuente	SC	GL	CM	Estadístico F	Valor P
Regresión	57.78	5	11.55	7.14	0.001
A	15.48	1	15.48	9.57	0.005
B	0.85	1	0.85	0.53	0.476
A*A	23.48	1	23.48	14.52	0.001
B*B	2.53	1	2.53	1.57	0.224
A*B	1.38	1	1.38	0.85	0.366
Error	33.97	22	0.27		

233 $R^2=0.95$; Coeficiente de Variación= 8.4249; A= Temperatura; B= pH.

234



235

236 **Figura 1.** Superficie de respuesta de la interacción de la temperatura y pH sobre la producción de
 237 pectinasas de *A. niger* NRRL 332.

238

239

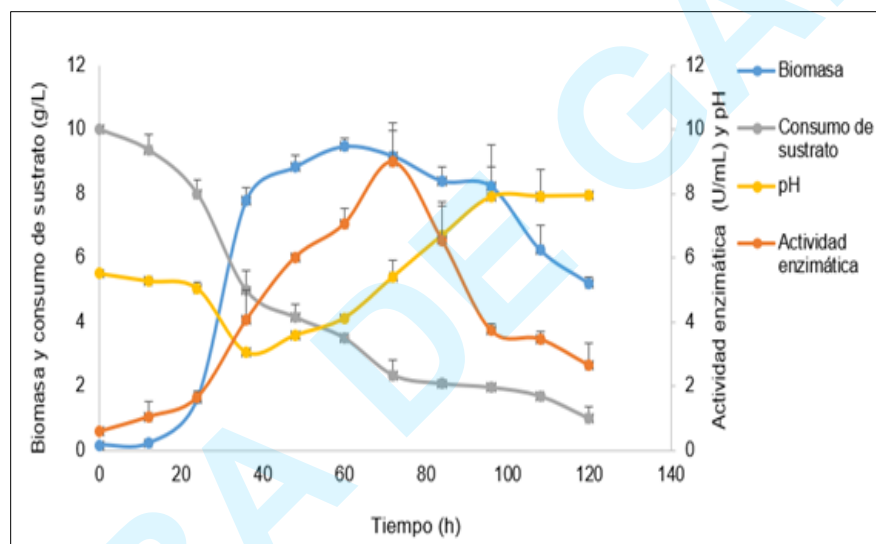
240 **Cinéticas de crecimiento y producción de pectinasas**

241

242

243 En la **Figura 2** se muestra que la cepa produjo un máximo de $9.1 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ a las 72 h de incubación.
244 Asimismo, se observa que la mayor producción de biomasa ocurrió a las 65 h. Por tanto, se infiere
245 que la producción de pectinasas estuvo relacionada directamente con el crecimiento del
246 microorganismo. Además, se muestra que la producción de enzimas aumentó conforme se
247 consumió el sustrato (pectina cítrica pura), se encontró que por cada gramo de pectina consumida
248 se produjeron 1.12 unidades de actividad enzimática (**Cuadro 4**). Algunos estudios han indicado
249 que la producción de pectinasas en *Aspergillus niger* está regulada por la expresión del gen *pg1*, el
250 cual es inducido en presencia de pectina en el medio de cultivo, resultando en una mayor
251 producción de pectinasas (Lin et al., 2021).

252



253

254 **Figura 2.** Cinéticas de crecimiento y producción de pectinasas por *A. niger* NRRL 332.

255

256 Asimismo, se observa una disminución inicial del pH en las primeras 24 horas, seguida por un
257 incremento después de 60 horas de incubación. Este comportamiento ha sido atribuido a la
258 producción de compuestos ácidos como el ácido cítrico y el ácido glucónico, que son productos
259 conocidos del metabolismo de *A. niger* (Shrestha et al., 2021). Además, esta especie es capaz de
260 sintetizar otras enzimas hidrolíticas importantes, tales como fitasas y amilasas, lo que refuerza su
261 relevancia en procesos biotecnológicos (Sahu & Sevda, 2022).

262

263

Cuadro 4. Parámetros cinéticos de *A. niger* NRRL 332.

μ_{\max} (h ⁻¹)	Y x/s (g de biomasa·g de sustrato ⁻¹)	Y p/s (U·g de sustrato ⁻¹)
0.0769	1.52	1.12

264

265

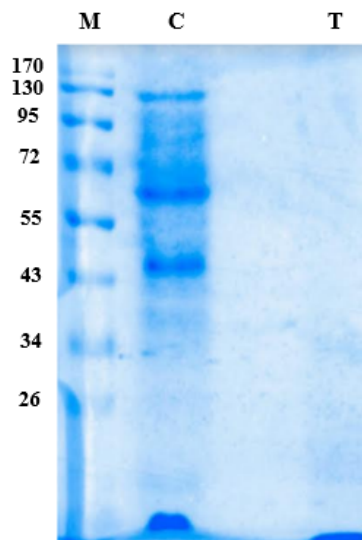
266

Caracterización por SDS-PAGE

267

268

269 Los resultados del zimograma presentado por el método de electroforesis SDS-Page mostraron dos
 270 bandas con pesos moleculares de 45 y 70 kDa (**Figura 3**), lo que indicó que probablemente eran los
 271 pesos de las pectinasas producidas por el microorganismo en estudio. De acuerdo con (Okonji et
 272 al., 2019), el peso molecular de las pectinasas varía de 30 a 70 kDa. Los resultados obtenidos son
 273 consistentes con estudios que han caracterizado poligalacturonasas con pesos moleculares
 274 similares. Por ejemplo, (Nawaz et al., 2021) purificaron una poligalacturonasa de *Penicillium*
 275 *notatum* con un peso molecular de 38 kDa. La evaluación de la actividad enzimática se apoyó en
 276 el método DNS, basado en la determinación de grupos carbonilos libres (C=O) de los azúcares
 277 reductores, que se producen cuando la cadena de pectina es hidrolizada por la pectinasa. Estos se
 278 presentan cuando la cadena de pectina es hidrolizada por la pectinasa, por lo que se aceptó que
 279 entre las enzimas pécticas producidas se encontraba una poligalacturonasa.



280

281 **Figura 3.** Electroforesis en SDS page de pectinasas producidas por *A. niger* NRRL 332. M:
282 Marcador de peso molecular (kDa). C: Bandas correspondientes a pectinasas. T: Tratamiento
283 control (caldo de cultivo sin pectinasas).

284

285

286 **Aplicación del extracto enzimático en el proceso de maceración del vino**

287

288

289 Con el uso de pectinasas en la maceración de frutos de uva, las concentraciones de fenoles solubles
290 totales, flavonoides, antocianinas y taninos condensables aumentaron en 90, 44, 104 y 43 %
291 respectivamente, con respecto al control positivo (**Cuadro 5**). El uso de pectinasas durante la
292 maceración de uvas y otros frutos se ha estudiado ampliamente debido a su capacidad para
293 descomponer la pared celular y facilitar la liberación de compuestos fenólicos y otros metabolitos
294 beneficiosos. De acuerdo con (Guler, 2023) las técnicas de maceración que incluyen la
295 combinación de tratamientos enzimáticos y de calor no solo aumentan la extracción de antocianinas
296 y flavonoides, sino que también mejoran la capacidad antioxidante del producto final. Este estudio
297 mostró que el tratamiento con microondas combinado con pectinasas incrementó el contenido de
298 catequina y trans-resveratrol, compuestos clave para la actividad antioxidante de los jugos de uva.
299 Esto evidencia que la sinergia entre tratamientos térmicos y enzimáticos puede potenciar la
300 liberación de compuestos fenólicos desde la piel y semillas de las uvas. De manera similar, (Osete-
301 Alcaraz et al., 2022) discutieron la importancia del uso de pectinasas no solo para aumentar la
302 extracción de compuestos fenólicos durante la maceración, sino también para mejorar la claridad
303 y la estabilidad del vino. Su investigación demostró que el uso de pectinasas puede reducir el
304 material suspendido en el mosto, facilitando la sedimentación y promoviendo un producto final
305 más claro y con mejores características cromáticas. Estos hallazgos subrayan cómo la optimización
306 de los procesos enzimáticos puede influir en la composición fenólica y la calidad visual del vino.
307 Por otro lado, (Ngadze et al., 2018) analizaron el impacto de la combinación de tratamiento
308 enzimático y calor en la extracción de compuestos fenólicos en *Strychnos cocculoides*, encontrando
309 un incremento en el rendimiento del jugo y en la concentración de compuestos como la quercetina

310 y el ácido cafeico. La combinación de pectinasas y calor favoreció la descomposición de la pectina,
 311 lo que no solo mejoró la extracción de los compuestos fenólicos sino también la calidad
 312 fisicoquímica y la claridad del jugo. Esto apoya la idea de que las condiciones de tratamiento
 313 térmico y la selección de enzimas específicas son determinantes para maximizar el
 314 aprovechamiento de los componentes bioactivos de las frutas.

315 Por otra parte, el tipo de tratamiento empleado en la maceración de los frutos de uva no provocó
 316 un efecto significativo sobre la luminosidad, pero sí sobre el ángulo de tono y la cromaticidad
 317 (Cuadro 5), lo que indica que el aspecto del extracto obtenido fue diferente en color y, por tanto,
 318 se espera que el vino obtenido tenga un aspecto diferente. Entre las características que definen la
 319 calidad de un vino, el color es un factor determinante y, al respecto, los atributos sensoriales son
 320 los primeros que se observan en la cata. A través del color, en sus aspectos de intensidad y tonalidad,
 321 se recibe información sobre los posibles defectos y virtudes, la estructura, la edad y la evolución
 322 en el vino (Acosta et al., 2013). Por ello, el color del extracto de maceración se caracterizó mediante
 323 los parámetros clásicos de luminosidad, cromaticidad y ángulo de tono. La luminosidad representa
 324 si un color es oscuro, gris o claro, variando desde cero para el negro hasta 100 para el blanco
 325 (Carvajal-Herrera et al., 2011). Los valores de luminosidad (L^*) obtenidos en los extractos
 326 procesados con los tratamientos CP, CN, y E fueron 6.1, 6.3, y 6.4 respectivamente, no existiendo
 327 diferencia significativa ($P > 0.05$) entre ellos.

328 **Cuadro 5.** Comparación de medias de la extracción de compuestos fenólicos.

Trat	Variables respuesta						
	TP (GAE·mL ⁻¹)	Fl (meq-Q·mL ⁻¹)	Ant (C3G·mL ⁻¹)	TC (meq- C·mL ⁻¹)	L*	H* (°H)	C*
CP	234.2 ± 17.9 ^b	95.1 ± 3.5 ^b	49.9 ± 11.1 ^b	310.5 ± 36.3 ^b	6.1 ± 1.3 ^a	305.9 ± 9.9 ^b	5.2 ± 1.2 ^b
CN	248.2 ± 8.9 ^b	97.7 ± 8.4 ^b	67.1 ± 3.3 ^b	315.1 ± 46.3 ^b	6.3 ± 0.9 ^a	310.5 ± 12.4 ^b	5.2 ± 0.5 ^b
E	447.2 ± 31.3 ^a	137.7 ± 15.0 ^a	102 ± 11.2 ^a	445.9 ± 42.9 ^a	6.4 ± 1.41 ^a	347.8 ± 3.8 ^a	6.4 ± 0.6 ^a

329 Trat: tratamientos PC: control positivo; CN: control negativo; E: tratamiento con enzima. Variables respuesta. TP:
 330 fenoles solubles totales; Fl: flavonoides totales; Ant: antocianinas totales; TC: Taninos Condensados; L*: luminosidad;
 331 H*: ángulo de tono; C*: cromaticidad. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); GAE·mL⁻¹: mg

332 equivalentes de ácido gálico·mL⁻¹; meq-Q·mL⁻¹: mg equivalentes de quercetina; C3G·mL⁻¹: mg equivalentes de
333 cianidina-3-glucósido·mL⁻¹; meq-C·mL⁻¹: mg equivalentes de catequina.

334
335 El ángulo de tono (H*) representó el color del producto obtenido de la maceración y se ha asumido
336 que representaría la tonalidad que tendría el vino elaborado a partir de éste. El control positivo (CP)
337 presentó una tonalidad de 305.9°, es decir el color púrpura característico de la fruta de la uva. Con
338 el tratamiento CN el ángulo aumentó a 310.5°, equivalente a un tono púrpura más intenso que el
339 anterior; mientras que con la aplicación pectinasas se logró aumentar 347.8°, referentes a una
340 tonalidad rojiza característica de los pigmentos de compuestos fenólicos como las antocianinas. La
341 cromaticidad representa la pureza del color e indica qué tan pálido o intenso es el tono. El
342 tratamiento E produjo el valor de cromaticidad más alto con 6.4, mientras que, los tratamientos CN
343 y CP ambos con 5.2, sin diferencias entre ninguno de ellos ($P > 0.05$). Aunque la luminosidad no
344 se vio afectada significativamente entre los tratamientos, la aplicación de enzimas mostró un
345 aumento en el ángulo de tono del extracto de maceración, ya que este atributo fue más parecido a
346 un valor absoluto de rojo y los valores de cromaticidad más altos indicaron que dicho tono se
347 mostró con mayor intensidad.

348 La tonalidad y el color de los vinos son aspectos fundamentales en la percepción de su calidad y
349 atractivo. En vinos tintos jóvenes, se valoran tonalidades púrpura y rojo-violáceo, indicativas de
350 frescura y riqueza en antocianinas, los principales pigmentos presentes en las uvas (He et al., 2010).
351 Con la maduración, se busca un rojo más intenso y brillante, asociado a una mayor complejidad y
352 estructura. La transición hacia tonos más anaranjados o marrones es típica de vinos envejecidos y,
353 aunque puede indicar madurez, también se asocia con la pérdida de frescura y vitalidad
354 (Waterhouse et al., 2016).

355 Los compuestos fenólicos desempeñan un papel crucial en la copigmentación del vino. Este
356 fenómeno ocurre cuando las antocianinas interactúan con otros fenoles, formando complejos
357 estables que intensifican y estabilizan el color (Boulton, 2001). La copigmentación contribuye a
358 los tonos rojo-violáceos profundos, especialmente deseables en vinos tintos jóvenes. Además, la
359 presencia de antocianinas y compuestos flavonoides en la matriz del vino influye en la percepción
360 visual, realzando la cromaticidad y pureza del color (He et al., 2010).

361 Con el paso del tiempo, el color de los vinos cambia debido a reacciones de polimerización y
362 oxidación. Las antocianinas libres disminuyen y se combinan con taninos y otros compuestos,
363 formando complejos más grandes y menos solubles que conducen a tonalidades más anaranjadas
364 y marrones. Esta transición se asocia con la oxidación de los compuestos fenólicos y la pérdida de
365 las propiedades de copigmentación (Ribéreau-Gayon P. et al., 2006). La aplicación de enzimas,
366 como las pectinasas, ha mostrado favorecer la liberación de antocianinas y otros fenoles,
367 contribuyendo inicialmente a una mayor intensidad de color, pero también puede influir en la
368 estabilidad a largo plazo del color debido a cambios en la estructura de los pigmentos (Morata et
369 al., 2003).

370 En este contexto, la discusión de los resultados sugiere que la aplicación de pectinasas, al aumentar
371 el ángulo de tono y la cromaticidad, realza la tonalidad rojiza, probablemente por la liberación y
372 modulación de antocianinas y otros compuestos fenólicos. Este comportamiento es consistente con
373 lo reportado en estudios que destacan cómo las enzimas pueden intensificar la percepción del color
374 a través de la descomposición de las paredes celulares de las uvas y la liberación de pigmentos
375 (Morata et al., 2003). Por lo tanto, el uso de enzimas no solo mejora la extracción de compuestos
376 fenólicos, sino que también tiene implicaciones significativas en la estabilidad y evolución del
377 color durante el almacenamiento.

378

379

380

Conclusiones

381

382

383 El uso de pectinasas producidas por *Aspergillus niger* en el proceso de maceración de frutos de uva
384 favoreció la liberación de compuestos fenólicos. Como resultado, se incrementaron los atributos
385 de color, específicamente el ángulo de tono y la cromaticidad, lo que podría favorecer la producción
386 de vinos con características sensoriales superiores.

387

388

Agradecimientos

389 Los autores agradecen el apoyo recibido por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y
390 Tecnologías (CONAHCyT) de México.

391

392

393

Referencias

394 Acosta, Y., Etxabe, R., Fábrega, J., García A., Murcia, J. L., Nebot, J., Tolosa, L., & Urrero, G.
395 (2013). *El libro del vino* (J. Induráin, Ed.; Primera, Vol. 1). LAROUSSE EDITORIAL, S. L.

396 Amin, F., Bhatti, H. N., & Bilal, M. (2019). Recent advances in the production strategies of
397 microbial pectinases—A review. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 122,
398 pp. 1017–1026). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.048>

399 Bilal, M., Ji, L., Xu, Y., Xu, S., Lin, Y., Iqbal, H. M. N., & Cheng, H. (2022). Bioprospecting
400 *Kluyveromyces marxianus* as a Robust Host for Industrial Biotechnology. In *Frontiers in*
401 *Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A.
402 <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.851768>

403 Boulton, R. (2001). The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine:
404 A Critical Review. In *Am. J. Enol. Vitic* (Vol. 52, Issue 2).

405 Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microorganism
406 quantities of protein, using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–
407 254.

408 Caldas, T. W., Mazza, K. E. L., Teles, A. S. C., Mattos, G. N., Brígida, A. I. S., Conte-Junior, C.
409 A., Borguini, R. G., Godoy, R. L. O., Cabral, L. M. C., & Tonon, R. V. (2018). Phenolic compounds
410 recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *Industrial*
411 *Crops and Products*, 111, 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.012>

412 Carvajal-Herrera, C., Jaime, J., Torres, A., Darío, I., Tascón, O., Eugenio, C., Montoya, M., &
413 Wilson, J. (2011). Colorimetría del fruto de café (*Coffea arabica* L.) durante su desarrollo y
414 maduración. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 64(2), 6229–6240.
415 <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179922664020>

416 El Enshasy, H. A., Elsayed, E. A., Suhaimi, N., Malek, R. A., & Esawy, M. (2018). Bioprocess
417 optimization for pectinase production using *Aspergillus niger* in a submerged cultivation system.
418 *BMC Biotechnology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0481-7>

419 Fernández-González, M., Izquierdo-Cañas, P. M., García-Romero, E., Paniagua-Martínez, T., &
420 Gómez-Alonso, S. (2024). The Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* Strain Overexpressing the
421 Endopolygalacturonase PGU1 Gene on the Aminoacidic, Volatile, and Phenolic Compositions of
422 Cabernet Sauvignon Wines. *Fermentation*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/fermentation10070375>

423 Fratebianchi, D., Crespo, J. M., Tari, C., & Cavalitto, S. (2017). Control of agitation rate and
424 aeration for enhanced polygalacturonase production in submerged fermentation by *Aspergillus*
425 *sojae* using agro-industrial wastes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92(2),
426 305–310. <https://doi.org/10.1002/jctb.5006>

427 Gao, Y., Fangel, J. U., Willats, W. G. T., Vivier, M. A., & Moore, J. P. (2016). Dissecting the
428 polysaccharide-rich grape cell wall matrix using recombinant pectinases during winemaking.
429 *Carbohydrate Polymers*, 152, 510–519. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.115>

430 Gao, Y., Zietsman, A. J. J., Vivier, M. A., & Moore, J. P. (2019). Deconstructing wine grape cell
431 walls with enzymes during winemaking: New insights from glycan microarray technology. In
432 *Molecules* (Vol. 24, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24010165>

433 Guler, A. (2023). Effects of different maceration techniques on the colour, polyphenols and
434 antioxidant capacity of grape juice. *Food Chemistry*, 404.
435 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134603>

436 Gutiérrez-Escobar, R., Aliaño-González, M. J., & Cantos-Villar, E. (2021). Wine polyphenol
437 content and its influence on wine quality and properties: A review. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 3).
438 MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules26030718>

439 He, F., Mu, L., Yan, G. L., Liang, N. N., Pan, Q. H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C. Q. (2010).
440 Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. In *Molecules* (Vol. 15, Issue
441 12, pp. 9057–9091). <https://doi.org/10.3390/molecules15129057>

442 Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
443 bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.

444 Lee, J., Durst, R. W., Wrolstad, R. E., Barnes, K. W., Eisele, ; T, Giusti, ; M M, Haché, ; J,
445 Hofsommer, ; H, Koswig, ; S, Krueger, D. A., Kupina, ; S, Martin, ; S K, Martinsen, ; B K, Miller,
446 T. C., Paquette, ; F, Ryabkova, ; A, Skrede, ; G, Trenn, ; U, & Wightman, J. D. (2005).
447 Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages,
448 Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of*
449 *AOAC International*, 88(5), 1269–1278.

450 Li, P. J., Xia, J. L., Shan, Y., Nie, Z. Y., Su, D. L., Gao, Q. R., Zhang, C., & Ma, Y. L. (2015).
451 Optimizing Production of Pectinase from Orange Peel by *Penicillium oxalicum* PJ02 Using
452 Response Surface Methodology. *Waste and Biomass Valorization*, 6(1), 13–22.
453 <https://doi.org/10.1007/s12649-014-9317-4>

454 Lin, W., Xu, X., Lv, R., Huang, W., Ul Haq, H., Gao, Y., Ren, H., Lan, C., & Tian, B. (2021).
455 Differential proteomics reveals main determinants for the improved pectinase activity in UV-
456 mutagenized *Aspergillus niger* strain. *Biotechnology Letters*, 43(4), 909–918.
457 <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03075-w>

458 Mercimek Takci, H. A., & Turkmen, F. U. (2016). Extracellular Pectinase Production and
459 Purification from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* Strain. *International Journal of Food*
460 *Properties*, 19(11), 2443–2450. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1123270>

461 Merkyte, V., Longo, E., Windisch, G., & Boselli, E. (2020). Phenolic compounds as markers of
462 wine quality and authenticity. In *Foods* (Vol. 9, Issue 12). MDPI AG.
463 <https://doi.org/10.3390/foods9121785>

464 Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.
465 *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.

466 Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Colomo, B., & Suárez, J. A. (2003). Pyruvic Acid and
467 Acetaldehyde Production by Different Strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Relationship with
468 Vitisin A and B Formation in Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25),
469 7402–7409. <https://doi.org/10.1021/jf0304167>

470 Nawaz, A., Sameer, M., Akram, F., Tahir, S. F., Arshad, Y., Haq, I. U., & Mukhtar, H. (2021).
471 Kinetic and thermodynamic insight of a polygalacturonase: A biocatalyst for industrial fruit juice

472 clarification. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 20(2), 1029–1045.
473 <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio2355>

474 Ngadze, R. T., Verkerk, R., Nyanga, L. K., Fogliano, V., Ferracane, R., Troise, A. D., & Linnemann,
475 A. R. (2018). Effect of heat and pectinase maceration on phenolic compounds and physicochemical
476 quality of *Strychnos cocculoides* juice. *PLoS ONE*, 13(8).
477 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202415>

478 Okonji, R. E., Itakorode, B. O., Ovumedia, J. O., & Adedeji, O. S. (2019). Purification and
479 biochemical characterization of pectinase produced by *Aspergillus fumigatus* isolated from soil of
480 decomposing plant materials. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 7(3), 1–8.
481 <https://doi.org/10.7324/JABB.2019.70301>

482 Osete-Alcaraz, A., Bautista-Ortín, A. B., Ortega-Regules, A. E., & Gómez-Plaza, E. (2019).
483 Combined Use of Pectolytic Enzymes and Ultrasounds for Improving the Extraction of Phenolic
484 Compounds During Vinification. *Food and Bioprocess Technology*, 12(8), 1330–1339.
485 <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02303-0>

486 Osete-Alcaraz, A., Gómez-Plaza, E., Pérez-Porras, P., & Bautista-Ortín, A. B. (2022). Revisiting
487 the use of pectinases in enology: A role beyond facilitating phenolic grape extraction. *Food*
488 *Chemistry*, 372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131282>

489 Pitol, L. O., Biz, A., Mallmann, E., Krieger, N., & Mitchell, D. A. (2016). Production of pectinases
490 by solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Chemical Engineering Journal*,
491 283, 1009–1018. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.08.046>

492 Poletto, P., Polidoro, T. A., Zeni, M., & da Silveira, M. M. (2017). Evaluation of the operating
493 conditions for the solid-state production of pectinases by *Aspergillus niger* in a bench-scale,
494 intermittently agitated rotating drum bioreactor. *LWT*, 79, 92–101.
495 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.018>

496 Poondla, V., Yannam, S. K., Gummadi, S. N., Subramanyam, R., & Reddy Obulam, V. S. (2016).
497 Enhanced production of pectinase by *Saccharomyces cerevisiae* isolate using fruit and agro-
498 industrial wastes: Its application in fruit and fiber processing. *Biocatalysis and Agricultural*
499 *Biotechnology*, 6, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.02.007>

500 Price, M. L., Scoyoc, S. Van, & Butler, L. G. (1978). A Critical Evaluation of the Vanillin Reaction
501 as an Assay for Tannin in Sorghum Grain. In *J. Agric. Food Chem* (Vol. 26, Issue 5).

502 Ravindran, R., & Jaiswal, A. K. (2016). Microbial enzyme production using lignocellulosic food
503 industry wastes as feedstock: A review. In *Bioengineering* (Vol. 3, Issue 4). MDPI AG.
504 <https://doi.org/10.3390/bioengineering3040030>

505 Reginatto, C., Rossi, C., Miglioranza, B. G., Santos, M. dos, Meneghel, L., Silveira, M. M. da, &
506 Malvessi, E. (2017). Pectinase production by *Aspergillus niger* LB-02-SF is influenced by the
507 culture medium composition and the addition of the enzyme inducer after biomass growth. *Process*
508 *Biochemistry*, 58, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.018>

509 Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdiou D., & Rychlewski Christine. (2006).
510 *Handbook of Enology Volume 2 The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments 2 nd Edition*
511 (Second). John Wiley & Sons Ltd.

512 Sahu, R., & Sevda, S. (2022). Pectinases: Production, Harvest, Recovery, and Potential Industrial
513 Application. In *Industrial Microbiology and Biotechnology* (pp. 257–277). Springer Nature.
514 https://doi.org/10.1007/978-981-16-5214-1_10

515 Sandri, I. G., & da Silveira, M. M. (2018). Production and application of pectinases from
516 *Aspergillus niger* obtained in solid state cultivation. *Beverages*, 4(3).
517 <https://doi.org/10.3390/beverages4030048>

518 Satapathy, S., Rout, J. R., Kerry, R. G., Thatoi, H., & Sahoo, S. L. (2020). Biochemical Prospects
519 of Various Microbial Pectinase and Pectin: An Approachable Concept in Pharmaceutical
520 Bioprocessing. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 7). Frontiers Media S.A.
521 <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00117>

522 Shrestha, S., Rahman, M. S., & Qin, W. (2021). New insights in pectinase production development
523 and industrial applications. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 105, Issue 24, pp.
524 9069–9087). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH.
525 <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11705-0>

526 Silva, J. de C., de França, P. R. L., de Melo, A. H. F., Neves-Petersen, M. T., Converti, A., & Souza
527 Porto, T. (2019). Optimized production of *Aspergillus aculeatus* URM4953 polygalacturonases for

- 528 pectin hydrolysis in hog plum (*Spondias mombin* L.) juice. *Process Biochemistry*, 79, 18–27.
529 <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.014>
- 530 Sim, L., Ward, O. P., & Li, Z.-Y. (1997). Production and characterisation of a biosurfactant isolated
531 from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. In *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (Vol.
532 19). <https://academic.oup.com/jimb/article/19/4/232/5991500>
- 533 Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-
534 phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- 535 Wang, J., Zhang, Y., Wang, H., & Huo, S. (2019). Evaluation of extraction technologies and
536 optimization of microwave and ultrasonic assisted consecutive extraction of phenolic antioxidants
537 from winery byproducts. *Journal of Food Process Engineering*, 42(4).
538 <https://doi.org/10.1111/jfpe.13064>
- 539 Waterhouse, A. L., Sacks, G. L., & Jeffery, D. W. (2016). *Understanding Wine Chemistry* (Second).
540 Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118730720>
- 541 Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in
542 mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559.