

NOUVELLES ACQUISITIONS SUR L'HYDROLYSE DES COMPOSES GLYCOSIDIQUES DANS LE VIN

Juan CACHO

Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología, Facultad de Ciencias, Universidad Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Espagne
Email: jcacho@unizar.es

Communication orale présentée au Colloques Internationaux sur les Arômes du Vin (Project VINAROMAS), Toulouse et Saragosse, les 20 et 22 Novembre, 2012

Introduction

L'arôme du vin est l'un des facteurs les plus importants qui détermine son caractère et sa qualité. La formation de ces arômes est un processus très complexe, où participent un grand nombre de réactions chimiques et enzymatiques. Il est généralement admis que les composés dérivant du raisin jouent un rôle décisif dans l'expression des caractéristiques aromatiques du cépage. Ces composés forment ce qu'on appelle arôme variétal. L'arôme variétal se caractérise par composés présent sous une forme libre, par des précurseurs spécifiques, et par d'autres composés comme les acides aminés ou les acides gras dont le profil est caractéristique du cépage. Parmi les précurseurs spécifiques du raisin, on peut trouver des précurseurs cystéinylés et glutathionylés à partir desquels se forment les thiols variétaux et des précurseurs glycosylés qui sont à l'origine des terpènes, des phénols volatiles, des alcools, des norisoprénoïdes et d'autres composés. L'existence de ces derniers précurseurs dans le raisin est connue depuis longtemps, et leur présence a aussi été identifiée dans d'autres fruits et légumes. Les précurseurs glycosylés sont constitués d'une unité osidique liée par une liaison β -glucosidique à un composé volatil appelé aglycone. Dans le raisin, les précurseurs glycosidiques forment une réserve potentielle d'arômes qui peuvent être libérés au cours de la vinification ou le vieillissement du vin par hydrolyse. Cette hydrolyse, qui peut être acide ou enzymatique, dépend aussi des processus métaboliques. L'hydrolyse acide se produit de façon naturelle au pH du vin. D'un autre côté l'hydrolyse enzymatique peut être réalisée par des enzymes glycosidases présentes dans le raisin, par des glycosidases d'origine levurienne, bactérienne ou fongique.

L'une des voies de recherche développée au sein de notre laboratoire vise à d'étudier et à comprendre les processus selon lesquels les précurseurs glycosidiques sont transformés pour libérer des composés odorants, et à déterminer leur rôle dans l'arôme du vin. Ces travaux comprennent différents volets :

- Étude de l'hydrolyse des précurseurs glycosidiques par différentes souches de levures et bactéries au cours de la fermentation alcoolique et malolactique avec détermination des molécules formées et leur impact sensoriel.
- Comparaison de stratégies d'hydrolyses rapides de précurseurs avec celles réalisées par les levures au cours de la fermentation alcoolique et évaluation de leur pouvoir prédictif pour mesurer le potentiel aromatique du raisin.
- Étude de la libération et de la formation d'arômes à partir de leurs précurseurs au cours du vieillissement du vin, en présence ou en absence de lies.

Les travaux de la Thèse Doctorale de M^{elle} Natalia Loscos sont exposés au cours de cette présentation.

1. Libération d'arômes à partir de précurseurs au cours de la fermentation alcoolique (3).

Le rôle des levures dans hydrolyse des précurseurs était, jusqu'à il y a encore peu de temps, pas très clair car les travaux publiés en la matière étaient parfois contradictoires. Même si l'activité

glycosidasique a été mise en évidence dans les levures commerciales, la stabilité de cette dernière a été décrite comme limitée dans les conditions de vinification. Le travail de thèse et celui d'Ugliano et al. (15) ont permis de mettre en évidence la capacité des levures commerciales du genre *Saccharomyces* à libérer et à former des composés odorants à partir de leurs précurseurs glycosidiques au cours de la fermentation alcoolique.

Dans ce travail, la fermentation alcoolique a été réalisée sur un moût naturel, avec ou sans addition d'extrait de précurseurs glycosidiques. Trois levures du genre *Saccharomyces* ont été utilisées. Suite à la fermentation, les vins ont été caractérisés par voie analytique et sensorielle. Un total de 64 composés odorants ont été analysés, parmi lesquels 51 d'entre eux ont vu leur concentration modifiée par l'addition de précurseurs. Dans la plupart de cas, l'ajout de précurseurs a induit une augmentation de la concentration en composés odorants dans les vins étudiés. Cependant, dans quelques cas (comme par exemple, les acides 3-méthyl- et 2-méthylbutyrique, et le Z-3-hexen-1-ol), l'addition de précurseurs a provoqué une diminution de la concentration par rapport aux vins sans addition de précurseurs. Ce dernier comportement pourrait être dû à l'interférence que cause l'addition de fractions de précurseurs sur la synthèse de ces composés, principalement d'origine fermentaire.

Les augmentations de concentration les plus importantes ont été observées sur les dérivés de la vanilline (vanillate de méthyle, vanillate d'éthyle, acétovanillone et acétyringone), sur certains benzènes (cinnamate d'éthyle, dihydrocinnamate d'éthyle et dihydrométhyleugénol), et phénols volatiles (gaïacol et m-cresol) ainsi que sur les composés norisoprénoïdes (actinidoles, 3-oxo- α -ionol et β -ionone). Dans la plupart des cas, l'augmentation de concentration observée n'a pas dépassé le seuil de perception olfactive (sauf pour la β -damascenone, la β -ionone et les vinylphénols). Néanmoins, nous avons pu constater que certains groupes de composés comme les lactones, les cinnamates, les dérivés de la vanilline et les terpènes exerçaient une action simultanée sur l'arôme. En conséquence, l'addition de précurseurs a provoqué une augmentation des notes florales dans les vins à l'issue de la fermentation alcoolique.

2. Comparaison de la capacité de différentes souches de levures à libérer des arômes variétaux à partir de précurseurs (10).

Après avoir vérifié que des levures du genre *Saccharomyces* étaient capables d'hydrolyser des précurseurs glycosidiques au cours de la fermentation alcoolique, nous avons mené une étude pour comparer l'activité enzymatique et la capacité de différentes souches de levures *Saccharomyces* et non *Saccharomyces* à libérer des arômes à partir d'un extrait de précurseurs. Certains auteurs (16) avaient démontré que certaines souches du genre non *Saccharomyces* présentaient une activité enzymatique supérieure à celle du genre *Saccharomyces*, et qu'elles étaient capables de libérer des quantités plus importantes de certains composés odorants. Cependant, les conditions opératoires utilisées dans cette étude étaient les conditions optimales pour la libération de ces composés par action des glycosidases (incubation à pH 5 et à 30 °C).

Afin d'approfondir ces connaissances, nous avons réalisé une étude comparative sur plusieurs souches de levures dans des conditions standards de vinification (100 g/L glucose, 100 g/L fructose, 20 °C, pH 3.5) sur un moût modèle enrichi en glycosides. Les vins obtenus ont été caractérisés par analyses sensorielles et les composés formés ont été dosés en GC-MS.

21 des souches étudiées ont présenté une activité β -glucosidase, dont 12 d'entre elles ont une activité intense. L'activité hydrolytique s'est montrée plus fréquente chez les souches du genre non *Saccharomyces*. En ce qui concerne l'analyse sensorielle, les vins enrichis en précurseurs ont montré une augmentation des notes de violette, fruit exotique, fleur d'oranger, pêche, grillé et fruit secs, principalement dans le cas de levures du genre *Saccharomyces*. En ce qui concerne la libération d'arômes, nous avons constaté de grandes différences entre levures, et démontré que le genre de levure possédait une influence critique sur les teneurs de la plupart des arômes variétaux. Par exemple, la souche de *Torulasporea* a présenté les concentrations les plus élevées

en Riesling acétal, en vanillate d'éthyle, en certaines lactones (γ -nonalactone et γ -decalactone), en dihydrocinnamate d'éthyle et en farnésol. D'un autre côté, les vins obtenus avec les souches de *Brettanomyces* ont montré les teneurs les plus importantes en 4-éthylgâïacol, 4-éthylphénol et les acides 3-méthyl et 2-méthylbutyrique. Les vins élaborés avec les souches du genre *Saccharomyces* ont été les plus riches en β -damascenone, en β -ionone, en linalol et en vinylphénols. La plupart de ces composés, à l'exception des éthyl- et vinylphénols, ont été libérés en concentrations relativement faibles, mais suffisantes pour causer des effets sensorielles significatifs.

3. Libération d'arômes variétaux à partir de précurseurs au cours de la fermentation malolactique (11).

Des études précédentes ont démontré que les bactéries du genre *O. oeni* présentaient une activité glycosidase (17) et étaient capables de transformer les précurseurs glycosidiques du raisin en libérant des arômes variétaux au cours de la fermentation malolactique aussi bien dans des vins modèles que dans des vins réels (18, 19). Toutefois, peu d'éléments ont été publiés sur la capacité hydrolytique des souches du genre *Lactobacillus* et *Pediococcus*. Bien que leur activité β -glucosidase ait été prouvée (20), leur capacité à libérer des arômes à partir des précurseurs glycosidiques n'a pas été étudiée. En conséquence, nous avons étudié l'activité β -glucosidase de plusieurs souches de bactéries lactiques du genre *O. oeni*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*. Les souches présentant l'activité β -glucosidase la plus forte ont été sélectionnées afin d'étudier leur capacité à libérer des arômes au cours de la fermentation malolactique d'un vin modèle enrichi en précurseurs glycosidiques. Après fermentation malolactique, les vins ont été caractérisés par analyse sensorielle et les composés volatiles formés ont été dosés en GC-MS.

Nous n'avons pas trouvé d'activité β -glucosidase dans les souches du genre *Pediococcus* étudiées, alors que certaines souches du genre *Lactobacillus* et *O. oeni* ont présenté une activité intense. Ces souches ont été capables de libérer des petites quantités de terpènes, de C13-norisoprénoïdes, de phénols-volatils et de dérivés de la vanilline, même dans les cas où la fermentation malolactique ne s'est pas déroulée (comme dans le cas des souches du genre *Lactobacillus*). En général, les vins inoculés avec les souches du genre *O. oeni* ont présenté des concentrations plus élevées en arômes variétaux que ceux inoculés avec les souches du genre *Lactobacillus*, en particulier pour certains dérivés de la vanilline (vanilline, vanillate d'éthyle, acétovanillone et syringaldéhyde), 4-vinylphénol et γ -decalactone. Néanmoins, les vins obtenus avec une des souches de *Lactobacillus* ont montré des teneurs similaires à ceux des souches *O. oeni*. En ce qui concerne les analyses sensorielles, les vins enrichis en glycosides ont montré une augmentation des notes végétales, de violette, épicées et oxydées du fait de l'action des bactéries sur le *pool* de précurseurs.

4. Comparaison de différentes stratégies d'hydrolyse rapide pour mesurer le potentiel aromatique du raisin (12).

La plupart de méthodes utilisées pour le dosage des précurseurs glycosiques du raisin, sont des méthodes indirectes basées sur l'analyse des composés odorants libérés après l'hydrolyse acide rapide ou enzymatique en utilisant des préparations enzymatiques d'origine microbienne. De ce fait, les caractéristiques les plus importantes de ces deux stratégies sont mieux connues. Bien qu'il existe des études comparatives sur les composés libérés par ces deux types d'hydrolyse (21, 22), et des études comparant l'hydrolyse enzymatique réalisée par les préparations enzymatiques et celle menée par des levures (23), le nombre de travaux dans lesquels sont reliés les arômes libérés par ces deux types d'hydrolyse rapide avec les arômes qu'on retrouve après la fermentation alcoolique, est plutôt rare (24). Dans ce travail, nous avons étudié ces deux stratégies d'hydrolyse rapide pour déterminer laquelle est la plus adéquate pour mesurer le potentiel aromatique du raisin.

Pour cela, nous avons utilisé 7 cépages, dont la fraction de précurseurs glycosidiques a été

extraite en utilisant notre protocole. Ces extraits ont été hydrolysés par voie acide et enzymatique, et ont été ajoutés dans un moût synthétique (200 g/L glucose) fermenté à 20 °C. Les arômes libérés ont été analysés en GC-MS suivant nos méthodologies de dosage. Les différences entre cépages n'ont pas été très marquées, sauf dans le cas du Muscat, du Chardonnay et du Grenache. Le Muscat a présenté les teneurs les plus élevées en terpènes, le Chardonnay en certains norisoprénoïdes (TPB, 3-oxo- α -ionol, 3-oxo- β -ionone et actinidoles), en dihydrocinnamate d'éthyle et en γ -nonalactone. Le Grenache a présenté les teneurs plus élevées en certains dérivés de la vanilline (vanillate de méthyle, acétovanillone, zingerone et syringaldéhyde) et en 4-vinylgâïacol. En ce qui concerne les stratégies d'hydrolyse, la fermentation alcoolique a présenté une capacité relativement faible à libérer des arômes variétaux à partir de la fraction de précurseurs. Ceci confirme qu'une partie du potentiel aromatique contenu dans le raisin reste sous la forme glycosylée après la fermentation alcoolique. D'un autre côté, l'hydrolyse enzymatique a été, généralement, la plus efficace pour libérer la plupart des arômes variétaux, particulièrement les phénols volatils, les dérivés de la vanilline, l'alcool benzylique et le 3-oxo- α -ionol. L'hydrolyse acide a montré un pouvoir d'hydrolyse intermédiaire, mais elle a été la plus efficace pour la formation de C13-norisoprénoïdes. Cette stratégie d'hydrolyse a permis de prédire les teneurs de plusieurs composés aromatiques majeurs dans l'arôme du vin (comme le linalol, l' α -terpinéol, la β -damascenone, les vinylphénols et les dérivés de la vanilline). Au contraire, certains des arômes libérés par hydrolyse enzymatique ne sont pas représentatifs des arômes libérés au cours de la fermentation.

5. Évolution des arômes variétaux au cours du vieillissement du vin sur lies (14).

Étant donné qu'une partie du potentiel aromatique du raisin reste sous la forme glycosylée après la fermentation alcoolique, il est possible qu'il soit révélé au cours du vieillissement du vin. Pendant cette étape, l'acidité du vin provoque l'hydrolyse et la transformation lente des glycosides et des aglycones libérés. De plus, quand le vin est élevé sur lies, les enzymes hydrolytiques libérées par autolyse des levures peuvent agir sur la fraction de précurseurs glycosidiques. Les travaux publiés à ce sujet ne sont pas très abondants. Même si une diminution des teneurs totales en glycosides a été observée après le contact du vin avec les lies (25), nous ne disposons pas d'informations sur les arômes libérés et sur le rôle des lies dans cette libération. Pour cela nous avons étudié l'évolution des arômes variétaux au cours du vieillissement du vin sur lies.

Après fermentation alcoolique d'un moût naturel enrichi en précurseurs glycosidiques, les vins sont restés en contact avec leurs lies pendant 9 mois à 20 °C. Les composés odorants formés ont été dosés en GC-MS à différents moments du vieillissement (fin de fermentation, après 3 mois et après 9 mois). Deux comportements différents ont été observés : certains composés ont montré une augmentation de leur concentration au cours du temps, c'est le cas de la plupart des norisoprénoïdes (sauf la β -damascenone et la β -ionone), du linalol, de l' α -terpinéol, du vanillate d'éthyle, du syringaldéhyde et du cinnamate d'éthyle ; d'autres composés comme les vinylphénols et l'hexenol ont montré une diminution de leur concentration. Cette diminution est imputable à l'instabilité de ces composés, qui augmente dans certains cas en présence de lies. Leur dégradation n'est ainsi pas compensée par la formation à partir des précurseurs. Dans la plupart de cas, la contribution de l'hydrolyse acide à la libération d'arômes variétaux a été peu importante, sauf dans le cas du linalol, de l' α -terpinéol et du syringaldéhyde.

Les lies provenant de levures différentes ont montré des capacités légèrement différentes à libérer des arômes variétaux. Cependant ces phénomènes ne sont pas toujours représentatifs de ceux observés au cours de la fermentation alcoolique.

6. Évolution des arômes variétaux à partir de précurseurs au cours du vieillissement accéléré du vin (13).

Afin de compléter les travaux précédents, nous avons étudié la libération d'arômes variétaux au cours du vieillissement accéléré d'un vin (sans lies). Le vin est chauffé entre 40-50 °C, en

l'absence d'oxygène, afin de reproduire les réactions hydrolytiques qui se déroulent au cours du vieillissement du vin en bouteille. Ces réactions incluent des phénomènes d'hydrolyse de glycosides, de déshydratation, de cyclisation et de réorganisation des aglycones libérés comme c'est le cas de monoterpènes et des C13-norisoprénoides. La formation et la transformation de ces deux groupes de composés au cours du vieillissement du vin ont été largement étudiées. Cependant, peu d'informations ont été publiées sur des composés comme les dérivés de la vanilline, les phénols volatiles ou les lactones.

Des vins provenant de la fermentation alcoolique d'un moût modèle enrichi en précurseurs, ont été soumis à un vieillissement accéléré à 50 °C pendant 9 semaines. Les arômes variétaux formés ont été analysés après une, trois et neuf semaines.

Nous avons observé une augmentation des teneurs en la plupart des arômes variétaux dans la première semaine de vieillissement. Toutefois, beaucoup d'entre eux ont vu ensuite leur concentration diminuer au cours du temps. Certains composés qui n'étaient pas détectés après fermentation étaient présents à des concentrations élevées après la première semaine de vieillissement (vitispiranes, TDN, TPB, Riesling acétal, oxydes de linalol furaniques, syringaldéhyde, etc.). Les seuls composés dont la concentration a augmenté tout au long du vieillissement sont les dérivés de la vanilline, le gáïacol, le 4-éthylphénol et les oxydes de linalol. En règle générale, nous avons pu observer une accentuation des différences variétales au cours du vieillissement alors qu'elles n'étaient pas si évidentes après la fermentation alcoolique. Ces différences variétales sont représentatives de celles déjà observées après hydrolyse acide et enzymatique des extraits de précurseurs.

Références bibliographiques

- (1) Ibarz, M. J. Estudio de los aminoácidos y otros componentes de la uva como precursores del aroma del vino. Desarrollo de métodos para su análisis. Universidad de Zaragoza, Zaragoza, 2005.
- (2) Ibarz, M. J.; Ferreira, V.; Hernandez-Orte, P.; Loscos, N.; Cacho, J. Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavor precursors extracted from grapes. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1116*, 217.
- (3) Loscos, N.; Hernandez-Orte, P.; Cacho, J.; Ferreira, V. Release and formation of varietal aroma compounds during alcoholic fermentation from nonfloral grape odorless flavor precursors fractions. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6674-6684.
- (4) Lopez, R.; Aznar, M.; Cacho, J.; Ferreira, V. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr., A* **2002**, *966*, 167-177.
- (5) Mateo, J. J.; DiStefano, R. Description of the β -glucosidase activity of wine yeasts. *Food Microbiol.* **1997**, *14*, 583-591.
- (6) Loscos, N.; Segurel, M.; Dagan, L.; Sommerer, N.; Marlin, T.; Baumes, R. Identification of S-methylmethionine in Petit Manseng grapes as dimethyl sulphide precursor in wine. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *621*, 24-29.
- (7) Trossat, C.; Rathinasabapathi, B.; Weretilnyk, E. A.; Shen, T. L.; Huang, Z. H.; Gage, D. A.; Hanson, A. D. Salinity promotes accumulation of 3-dimethylsulfoniopropionate and its precursor S-methylmethionine in chloroplasts. *Plant Physiology* **1998**, *116*, 165- 171.
- (8) Segurel, M. A.; Razungles, A. J.; Riou, C.; Salles, M.; Baumes, R. L. Contribution of dimethyl sulfide to the aroma of Syrah and Grenache Noir wines and estimation of its potential in grapes of these varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7084-7093.
- (9) Segurel, M. A.; Razungles, A. J.; Riou, C.; Trigueiro, M. G. L.; Baumes, R. L. Ability of possible DMS

precursors to release DMS during wine aging and in the conditions of heat-alkaline treatment. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2637-2645.

(10) Hernandez-Orte, P.; Cersosimo, M.; Loscos, N.; Cacho, J.; Garcia-Moruno, E.; Ferreira, V. The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chem.* **2008**, *107*, 1064-1077.

(11) Hernandez-Orte, P.; Cersosimo, M.; Loscos, N.; Cacho, J.; Garcia-Moruno, E.; Ferreira, V. Aroma development from non-floral grape precursors by wine lactic acid bacteria. *Food Res. Int. In Press, Accepted Manuscript* (doi:10.1016/j.foodres.2009.02.023).

(12) Loscos, N.; Hernandez-Orte, P.; Cacho, J.; Ferreira, V. Comparison of the suitability of different hydrolytic strategies to predict aroma potential of different grape varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 2468-2480.

(13) Loscos, N.; Hernandez-Orte, P.; Cacho, J.; Ferreira, V. Evolution of the aroma composition of wines supplemented with grape flavor precursors from different varieties during accelerated wine aging. *Food Chem.*, (FOODCHEM-D-09-01533) (en trámite).

(14) Loscos, N.; Hernandez-Orte, P.; Cacho, J.; Ferreira, V. Fate of grape flavor precursors during storage on yeast lees. *J. Agric. Food Chem. Accepted Manuscript*, (ID jf-2008- 04057q).

(15) Ugliano, M.; Bartowsky, E. J.; McCarthy, J.; Moio, L.; Henschke, P. A. Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6322-6331.

(16) Fernandez-Gonzalez, M.; Di Stefano, R.; Briones, A. Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from Muscat must by different yeast species. *Food Microbiol.* **2003**, *20*, 35-41.

(17) Grimaldi, A.; Bartowsky, E.; Jiranek, V. A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *105*, 233- 244

(18) Ugliano, M.; Genovese, A.; Moio, L. Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5073-5078.

(19) Ugliano, M.; Moio, L. The influence of malolactic fermentation and *Oenococcus oeni* strain on glycosidic aroma precursors and related volatile compounds of red wine. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86*, 2468-2476.

(20) Grimaldi, A.; Bartowsky, E.; Jiranek, V. Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology. *J. Appl. Microbiol.* **2005**, *99*, 1061-1069.

(21) Sefton, M. A.; Skouroumounis, G. K.; Massywestropp, R. A.; Williams, P. J. Norisoprenoids in *Vitis vinifera* white wine grapes and the identification of a precursor of damascenone in these fruits. *Aust. J. Chem.* **1989**, *42*, 2071-2084.

(22) Sefton, M. A.; Francis, I. L.; Williams, P. J. The volatile composition of Chardonnay juices - A study by flavor precursor analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* **1993**, *44*, 359-370.

(23) Fernandez-Gonzalez, M.; Di Stefano, R. Fractionation of glycoside aroma precursors in neutral grapes. Hydrolysis and conversion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Lebensm. Wiss. Technol.* **2004**, *37*, 467-473.

(24) Kotseridis, Y.; Baumes, R. L.; Skouroumounis, G. K. Quantitative determination of free and hydrolytically liberated β -damascenone in red grapes and wines using a stable isotope dilution assay. *J. Chromatogr., A* **1999**, *849*, 245-254.

(25) Zoecklein, B. W.; Marcy, J. E.; Jasinski, Y. Effect of fermentation, storage sur lie or post-fermentation thermal processing on White Riesling (*Vitis vinifera* L.) glycoconjugates. *Am. J. Enol. Vitic.* **1997**, *48*, 397-402.