

## 酵母菌体を利用するブドウ酒の醸造について

(第3報) 酵母菌体から放出されるアミノ酸について

増田 博, 村木 弘行

(昭和41年9月15日受理)

### Utilization of Yeast Cells in Wine-Making

#### Part 3. Amino Acids Discharged by Yeast Cells into the Wine

By Hiroshi MASUDA and Hiroyuki MURAKI

White wines were experimentally made with grapes of Kōsyū variety and a wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* Hansen OC-2 by the following three methods:

- (A) Centrifuged at 15,000 r. p. m. to remove yeast cells at the end of the fermentation,
- (B) Racked immediately when the wine became clear (one month after the end of the fermentation),
- (C) Kept on sedimented yeasts for four months after the end of the fermentation.

The amounts of nitrogenous compounds were highest in the case of C and lowest in A. Amino acids in these wines were identified by paper chromatography. There were found sixteen amino acids in A:  $\alpha$ - and  $\beta$ -alanine,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -amino-butyric acid, arginine, asparagine, aspartic acid, glutamic acid, glutamine, glycine, histidine, hydroxyproline, pipercolic acid, proline, serine and threonine. In B leucine, lysine and tyrosine were found in addition to the above, and cystine, methionine, phenylalanine and valine appeared only in C.

Each amino acid except proline was of little quantity in A, and tended to increase by keeping the wine in contact with yeast cells. Especially  $\alpha$ -alanine, arginine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, histidine, leucine and lysine showed large increase.

Lees obtained from the wine B was subjected to the cell-disintegration treatment, i. e. refrigeration with dry ice followed by thawing under high carbon dioxide pressure and decompression rupture by ejecting through a small nozzle. As the result, considerable amounts of nitrogenous compounds appeared in the supernatant of the lees. Estimation of the amino acids by paper chromatography indicated that  $\alpha$ -alanine, aspartic acid and glutamic acid in the supernatant

showed the greatest increase; glycine, lysine, serine and glutamine showed medium increase; and most of the other amino acids also showed somewhat increase.

## 緒 論

さきの報告<sup>1)</sup>において、著者らは白ブドウ酒の発酵中および貯蔵中における窒素成分の変化を追跡し、発酵開始と共に急激に減少して4~6日目に最低値に達すること、それ以後は酵母からの放出によって次第に増加し、滓引きを行なわなければ2カ月までは比較的すみやかに増加すること、次いで増加はゆるやかとなり、4~5カ月で最高値に達することを認めた。また前報<sup>2)</sup>においては、滓に適当な酵母菌体破壊処理を加えることによって、さらに多量の窒素やリン成分をブドウ酒中に溶出させ得ることを示した。いずれの場合も、滓の酵母菌体から溶出される諸成分は、ブドウ酒の酒質改良に有効であることが認められるが、この溶出成分の中でアミノ酸が非常に大きな役割を演ずるであろうことは想像に難くない。そこで本報においては、滓引きをおくらせてブドウ酒と滓とを長期間接触させた場合、および滓に対して菌体破壊処理を加えた場合の、それぞれについて、酵母からどのようなアミノ酸が溶出されるかをペーパークロマトグラフィー(以下P.C.と略記)によって検索した。その結果を以下に報告する。

## 実 験 方 法

### 1. 供試ブドウ酒の調製方法

昭和40(1965)年度の山梨県産甲州種ブドウ果98.4kgを破碎し、果梗2.0kgを除き、直ちに圧搾して粕24.4kgを分け、果汁54.0lを採取した。果汁の分析値は次の通りである。

還元糖(ブドウ糖として).....15.4 g/dl

総酸(酒石酸として).....6.11 g/l

この果汁にSO<sub>2</sub>(メタカリを使用)50 ppmを加え、酒母(*Saccharomyces cerevisiae* Hansen OC-2)0.5 lと、精製糖8.0 kgを添加して発酵せしめた。酒母添加後15日目に発酵が終期に入ったので、醪を充分攪拌して均一にした上で6 lを採取し、SO<sub>2</sub>50 ppmを添加したのち連続遠心分離機を用いて15,000 rpmで遠心分離して酵母菌体を除き、約5°Cに冷却して発酵を停止させ、14日間静置してから、さらに第2回の滓引きを行なって完全に清澄せしめた(TABLE I, WA)。一方、WAを採取した残の醪は、TABLE Iに示すWB, WCの2区分に分け、それぞれ通常のように発酵を終了させた後そのまま静置し、WBは発酵終了後35日目に、またWCは112日目に第1回の滓引きを行なった。WBの滓引き時期は最も通常の醸造法に従ったものであり、WCにおける滓との接触期間は、さきの報告<sup>1)</sup>で窒素成分が最高値に達すると認められた長さである。いずれもTABLE Iに示すように第2回の滓引きを行なって充分清澄せしめた。

### 2. 滓の処理方法

供試した滓は、前項のWBに対する第1回の滓引きによって得られた滓4.0 l(TABLE I)である。この滓はそのままでは粘度が高く、処理しにくかったので、上澄であるWB区の

TABLE I  
供試ブドウ酒の仕込区分および方法  
*Process of Racking of the Wines*

Sign	Must	Addn. of starter <sup>a)</sup>	End of the fermentation	1st Racking			2nd Racking				
				Date	Lees	Wine	SO <sub>2</sub> Addn. to wine	Date	Lees	Wine	SO <sub>2</sub> Addn. to wine
	<i>l</i>			<i>l</i>	<i>l</i>	<i>ppm</i>		<i>l</i>	<i>l</i>	<i>ppm</i>	
WA	6	Oct. 27, 1965	Nov. 11, 1965	Nov. 11, 1965 <sup>b)</sup>	—	5.6	50	Nov. 25, 1965	0.1	5.5	—
WB	34	Oct. 27, 1965	Nov. 11, 1965	Dec. 16, 1965	4.0	30.0	—	Mar. 14, 1966	0.5	29.4	50
WC	17	Oct. 27, 1965	Nov. 11, 1965	Mar. 3, 1966	3.0	13.7	—	Mar. 14, 1966	0.2	13.5	50

a) *Saccharomyces cerevisiae* Hansen OC-2 (RIFY-7013).

b) Racking was made by centrifuging the fermenting must at 15,000 *r. p. m.*

ブドウ酒を加えて2倍容に希釈し、また同時にSO<sub>2</sub> 100 *ppm*を加えて酸化および細菌による汚染を防止した。これをTABLE IIに示す各区分に分け、それぞれの処理を行なった。LCは対照区であって無処理の滓を遠心分離したものであり、LDは前報<sup>2)</sup>に準じてドライアイスを用いて菌体破壊処理を行なったものである。滓の処理量は1回に250 *ml*とし、これにドライアイス粉末を加えて凍結させ、約110 *g*のドライアイスと共に容量900 *ml*の加圧槽に入れて密閉し、室温になるまで徐々に加温して融解すると共にCO<sub>2</sub>による圧力を55~60 *kg/cm<sup>2</sup>*まで上昇させた。これをそのまま約1時間保持したのち、ノズルから急激に噴出せしめた。この処理を2回くりかえして行なったところ、500 *ml*の滓から410 *ml*の処理液が得られ、遠心分離によって375 *ml*の上澄液が得られた。LFはLDと比較するために試みたもので、フレンチプレスを用いて1,000~1,500 *kg/cm<sup>2</sup>*の圧力で1回の菌

TABLE II  
滓の処理方法  
*Cell-disintegration Treatment for the Sedimented Yeasts<sup>a)</sup>*

Sign	Lees <sup>b)</sup>	Method of cell-disintegration	Yield of supernatant after centrifuging <sup>c)</sup>
	<i>ml</i>		<i>ml</i>
LC	300	None	265
LD	500	Decompression ruptured <sup>d)</sup>	375
LF	200	French press <sup>e)</sup>	190

a) Obtained by the 1st racking for WB in TABLE I.

b) Diluted to twofold volume by the supernatant wine.

c) At 15,000 *r. p. m.* for 10 *min.*

d) By holding the lees with dry ice in a closed vessel, followed by thawing under CO<sub>2</sub> pressure of 55 to 60 *kg/cm<sup>2</sup>*, and then rupturing by ejecting through a small nozzle.

e) Pressure was 1,000 to 1,500 *kg/cm<sup>2</sup>*.

体破壊処理を行なったものである。各区分とも、15,000 rpm で10分間遠心分離し、清澄な上澄液を得て試料とした。

### 3. 定量方法

すべて前報<sup>2)</sup>に準じて行なった。

### 4. アミノ酸のP.C.

(1) 試料の前処理：試料ブドウ酒（あるいは滓の処理液）100 ml を、40 ml の H<sup>+</sup> 型 Amberlite I R-120 のカラム (dia. 22×100 mm) に通し、カラムを水洗したのち 5 M・アンモニア水で溶出し、減圧濃縮して 5 ml とし、P.C.の供試料とした。

(2) ろ紙：東洋ろ紙 No. 50, 30×30 cm を用いた。

(3) 展開溶媒および展開方法：次の溶媒を使用した。

- |  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| (i) <i>n</i> -ブタノール：酢酸：水 (4:1:2)               | (v) メタノール：水：ピリジン (80:20:4)        |
| (ii) フェノール：水 (10:2)                            |                                   |
| (iii) 2 <i>N</i> ・アンモニア水で飽和させた <i>n</i> -ブタノール | (vi) アセトン：尿素：水 (60:0.5:40, v/w/v) |
| (iv) 2, 4-ルチジン：コリジン：水 (1:1:1)                  |                                   |

展開方法は二次元上昇法とし、主として(i)~(ii)の溶媒の組合せを用い、必要に応じて他の溶媒を組合わせて使用した。

### (4) 発色方法

- (i) 0.2% ニンヒドリンの水飽和 *n*-ブタノール溶液を噴霧し、90°C に10分間加熱する。
- (ii) 坂口反応：(a) 10% か性ソーダ、(b) 0.1% α-ナフトールのアルコール溶液、(c) 次亜臭素酸ソーダ溶液 (5% のか性ソーダ溶液 100 ml にブロム 2 g を溶解させたもの)、を順次に噴霧する。アルギニンが赤色に呈色する。
- (iii) PAULY 反応：(a) ジアゾ試薬 (0.9 g のスルファニル酸を 9 ml の濃塩酸に溶解し、水で 100 ml とし、この液 5 ml を 5% の亜硝酸ソーダ溶液 25 ml に氷冷攪拌下に加えたもの)、(b) 5% 炭酸ソーダ水溶液を順次に噴霧する。ヒスチジンおよびチロシンが橙乃至赤橙色に呈色するほか、ジオキシフェニルアラニンも黄褐色に呈色する。
- (iv) 0.3% *o*-フタルジアルデヒドのアルコール溶液を噴霧し、90°C に10分間加熱する。最も顕著に呈色するのはグリシンおよびヒスチジンで、グリシンは緑色、紫外線下で褐色、ヒスチジンは緑色、紫外線下では明るい黄色の蛍光を発する。また種々の他のアミノ酸も発色するが、色調はうすく、かつ異なっている。

主として(i)の発色方法を用いたが、アミノ酸の同定および分離検出の一助として他の方法をも用いた。

## 結果および考察

### 1. 試醸酒および滓処理液の一般分析結果

TABLE III に示した通りで、発酵終期に遠心分離して酵母菌体を除去したもの (WA) は窒素 (N) 成分が少なく、酵母との接触期間が長くなるにつれて増加することは、前報<sup>1)</sup>と同様の結果である。ただし、プロリン態Nは全く変化がなく、またペプチド態Nのみは、かえってWAに多い。

滓の処理液についても前報<sup>2)</sup>と同様に、プロリン態Nとアミド態Nを除いて各N成分が増加を示す。ドライアイス処理 (LD) の効果は、フレンチプレス1回処理 (LF) と比べて同等以上のものと認められる。

TABLE III  
試醸酒および滓処理液の分析値  
*Analyses of the Obtained Wines and Supernatants  
of Cell-disintegrated Lees*

Sign <sup>a)</sup> :		WA	WB	WC	LC	LD	LF
Alcohol	Vol. %	10.9	16.1	16.3	—	—	—
Sugar-free extracts	g/dl	2.32	1.58	1.55	—	—	—
Reducing sugars	〃	2.25	0.46	0.18	—	—	—
Total acids	g/l	5.88	5.56	5.52	—	—	—
Volatile acids	〃	0.67	0.62	0.69	—	—	—
Volatile esters	mg/l	288	168	324	—	—	—
Aldehydes	〃	15	7	7	—	—	—
Total nitrogen (N)	〃	87	97	115	165	204	194
Free $\alpha$ -NH <sub>2</sub> -N	〃	5	15	26	45	59	53
Peptide-N	〃	11	7	2	12	34	29
Proline-N	〃	55	55	55	58	62	60
Free NH <sub>3</sub> -N	〃	6	7	10	13	16	17
Amide-N	〃	8	9	15	15	14	17

a) See TABLE I and II.

## 2. P.C. によるアミノ酸の検索結果

TABLE IV およびFig. 1 に示した通り、計23種のアミノ酸が見出されたほか、3種の未確認スポットが検出されたが、これらはペプチド類ではないと思われる。Fig. 1 には二例のクロマトグラムのみを示したが、これ以外の供試料に対するクロマトグラムも、ほぼ類似のものであった。各スポットの同定は、各溶媒によるRf値の測定および標品アミノ酸との同時展開により、また二、三のアミノ酸に対しては特異的発色反応をも利用した。アルギニンとヒスチジンのスポットは尾をひきやすく、明確に分離しにくい、発色反応を選択することにより容易に分離検出することができる。メチオニンとバリンもFig. 1の溶媒系では分離しにくいアミノ酸であるが、溶媒系を選択し、必要があれば切り取って再クロマトグラフィーを行なうことよって分別することができる。ロイシンとイソロイシンは、恐らく両者とも存在すると思われるが、明確な分離確認ができず、推定の域を出なかった。

検出されたアミノ酸の中には、ブドウ酒中に存在するものとして特に新しいものは見

TABLE IV

ペーパークロマトグラフィーによって試醸酒および滓処理液中に見出されたアミノ酸  
*Amino Acids Detected by Paper Chromatography<sup>a)</sup> in the Wines  
 and the Supernatants of Cell-disintegrated Lees*

Sign <sup>b)</sup> Sample <sup>c)</sup> used : ml	WA		WB	WC	LC	LD	LF
	0.03	0.05	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
$\alpha$ -Alanine	1	2	3	3	3	3	3
$\beta$ -Alanine		1	1	1	1	1	1
$\alpha$ -Aminobutyric acid		1	1	1	1	1	1
$\gamma$ -Aminobutyric acid	1	2	2	2	3	3	3
Arginine	1	1	2	2	2	2	2
Asparagine		1	1	2	2	2	2
Aspartic acid	1	1	2	3	3	3	3
Cystine				1	1	1	1
Glutamic acid	1	2	3	3	3	3	3
Glutamine		1	1	1	1	2	2
Glycine	1	2	2	3	3	3	3
Histidine		1	1	2	2	2	2
Hydroxyproline	1	2	2	2	2	2	2
Leucines <sup>d)</sup>			1	1	1	2	2
Lysine			1	2	1	2	2
Methionine				1	1	1	1
Phenylalanine				1	1	1	1
Pipecolic acid	1	2	2	2	2	2	2
Proline	3	3	3	3	3	3	3
Serine		1	1	1	1	2	2
Threonine		1	1	1	1	1	1
Tyrosine			1	1	1	1	1
Valine				1	1	1	1

a) The small light spots were labelled 1; the spots of more quantity, 2; the spots of the greatest quantity, 3.

b) See TABLE I and II.

c) Amino acids separated from 100 ml of wine by Amberlite IR-120 and evaporated to 5 ml in vacuum.

d) Leucine and isoleucine are possibly present.

当らないが、 $\alpha$ -アミノ酪酸、ヒドロキシプロリンおよびピペコリン酸は、これまでに検出された例が比較的少なく、 $\alpha$ -アミノ酪酸は TARANTOLA<sup>3)</sup> によってイタリア産のブドウ酒中に、ヒドロキシプロリンは DIMOTAKIS<sup>4)</sup> によってギリシャ産のブドウ酒中に、ピペコリン酸は WEISS<sup>5)</sup> によってアルサス産のブドウ果汁中に見出され、また関連物質としてオキシピペコリン酸が TERCEL<sup>6)</sup> によってフランス産のブドウ酒中に見出されている他には、あまり報告例が見当らない。

前記 (i)–(ii) の溶媒系を用い、ろ紙に付与する供試料の量を 0.005–0.1 ml の間で

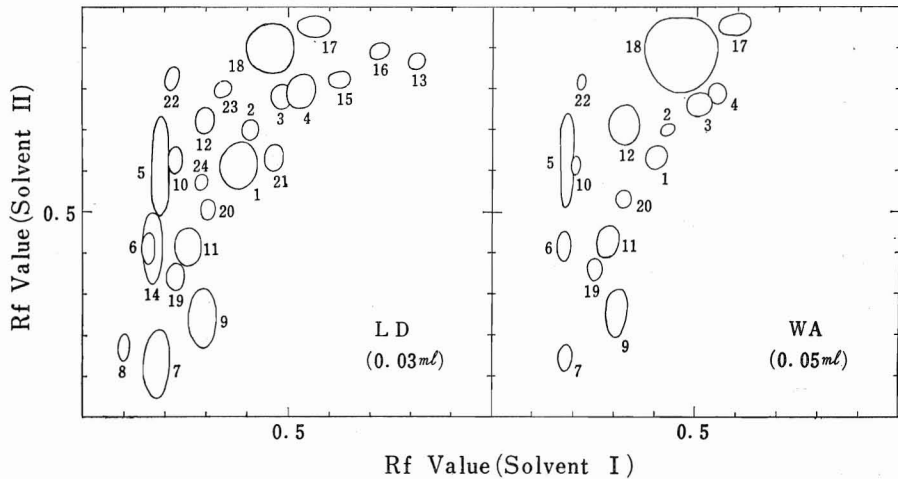


Fig. 1. Two-dimensional paper chromatograms of amino acids in the wine and the supernatant of cell-disintegrated lees.

For WA (0.05 ml) and LD (0.03 ml), see TABLE IV.

Solvent I, *n*-Butanol : Acetic acid : Water=4 : 1 : 2; Solvent II, Phenol : Water=10 : 2.

Identity of the spots : 1,  $\alpha$ -Alanine; 2,  $\beta$ -Alanine; 3,  $\alpha$ -Aminobutyric acid; 4,  $\gamma$ -Aminobutyric acid; 5, Arginine+Histidine; 6, Asparagine; 7, Aspartic acid; 8, Cystine; 9, Glutamic acid; 10, Glutamine; 11, Glycine; 12, Hydroxyproline; 13, Leucines; 14, Lysine; 15, Methionine+Valine; 16, Phenylalanine; 17, Pipcolic acid; 18, Proline; 19, Serine; 20, Threonine; 21, Tyrosine; 22, 23 and 24, Unidentified.

種々に変えて展開し、各アミノ酸の発色感度<sup>7)</sup>を参考として、各スポットの呈色度および面積の消長を調べることによって各アミノ酸の存在量を推定比較した。その結果は TABLE IVに一部を示した通りで、発酵終期に酵母菌体を除いてしまったもの(WA)には16種のアミノ酸が見出されたが、その量はプロリンが最も多く、 $\alpha$ -アラニン、 $\gamma$ -アミノ酪酸、グルタミン酸、グリシン、ピペコリン酸などが次ぎ、他のアミノ酸は比較的少ない。約1カ月の酵母菌体との接触により(WB)、ロイシン、リシン、チロシンのスポットが見出されるようになると共に、各アミノ酸とも増加の傾向を示し、その増加量は $\alpha$ -アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸が最も著しく、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、セリンがこれに次ぎ、また $\beta$ -アラニン、 $\alpha$ -および $\gamma$ -アミノ酪酸、アスパラギン、ヒドロキシプロリン、スレオニンなども多少の増加が認められる。さらに滓引きをおくらせて約4カ月間滓と接触せしめると(WC)、シスチン、メチオニン、フェニルアラニン、バリンが検出されるようになり、検出アミノ酸は23種に達する。またこれと共に $\alpha$ -アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸がふたたび顕著な増加を示し、アスパラギン、グリシン、ヒスチジン、リシンがこれに次ぎ、 $\gamma$ -アミノ酪酸、アルギニン、ロイシン、セリン、スレオニンも僅かに増加するようである。

滓の酵母菌体破壊処理によって溶出、増加するアミノ酸は、 $\alpha$ -アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸を主とし、グルタミン、グリシン、ロイシン、リシン、セリンがこれに

次ぎ,  $\beta$ -アラニン,  $\gamma$ -アミノ酪酸, アルギニン, シスチン, ヒスチジン, メチオニン, フェニルアラニン, スレオニン, バリンも多少の増加の傾向が認められた。

滓との接触によるアミノ酸増加については, BOURDET ら<sup>8)</sup>, LAFON-LAFOURBADE ら<sup>9)</sup>, POUX ら<sup>10)</sup>, TERCELJ<sup>6)</sup> などの報告があるが, これらの各報告に本報の結果を加えて, たがいに比較してみると, よく一致する点もあるが, また一致しない点も多く, 酵母から放出されるアミノ酸は種々の醸造条件によって必ずしも一定していないことを示している。ほとんど常に増加を示し, しかもその量が比較的多いのは,  $\alpha$ -アラニン, アスパラギン酸, グルタミン酸, グリシン, ロイシン, リシン, バリン等であり, アミノ酪酸, アルギニン, ヒスチジン, フェニルアラニン, セリン, スレオニン, チロシン等は, 時として顕著な増加を示すこともあるが, 常にという訳ではないようである。

どのような醸造条件が, どのように溶出アミノ酸に影響するかということは, 全く今後の検討に属する問題であり, また溶出アミノ酸の種類とブドウ酒の酒質とを, 今ただちに結びつけて論議することはできないが, 将来の検討に対して本実験の結果も一つの資料を提供するものと考え。

## 要 約

甲州種ブドウ果を原料とし, 酒母としてブドウ酒酵母 OC-2 を用いた白ブドウ酒について, 発酵終期に酵母菌体を除去してしまったもの, 発酵終了の約1カ月後に滓引きを行なったもの, 約4カ月後に滓引きを行なったもの, の3種を試醸し, それぞれの成分アミノ酸をペーパークロマトグラフィーによって検索した。その結果, 発酵終期には  $\alpha$ -および  $\beta$ -アラニン,  $\alpha$ -および  $\gamma$ -アミノ酪酸, アルギニン, アスパラギン, アスパラギン酸, グルタミン酸, グルタミン, グリシン, ヒスチジン, ヒドロキシプロリン, ピペコリン酸, プロリン, セリン, スレオニンの16種のアミノ酸が見出されたが, プロリンを除いてはいずれも量が少なかった。酵母菌体との接触が長くなるにつれて, ロイシン, リシン, チロシン, 次いでシスチン, メチオニン, フェニルアラニン, バリンが新たに検出されるようになると共に, ほとんどのアミノ酸が増加の傾向を示した。増加量の比較的多いものとしては,  $\alpha$ -アラニン, アルギニン, アスパラギン酸, グルタミン酸, グリシン, ヒスチジン, ロイシン, リシン等があげられる。

また同時に, このブドウ酒から分離した滓に対して, ドライアイスを用いて凍結, 融解, 加圧, 噴出処理を行なって酵母菌体破壊を試み, これによって菌体から溶出するアミノ酸をペーパークロマトグラフィーによって検索した。その結果は上記とほぼ類似のもので, ほとんどのアミノ酸が増加するが, 主として  $\alpha$ -アラニン, アスパラギン酸, グルタミン酸, 次いでグリシン, ロイシン, リシン, セリン, グルタミンなどの溶出, 増加が著しかった。

終りに本稿に対し御校閲を賜った本研究所の林武先生に御礼申し上げます。また実験に協力して戴いた斉藤麗子, 川口広子両君に感謝いたします。



## 文 献

- 1) 増田博, 村木弘行: 酵母菌体を利用するブドウ酒の醸造について(第1報) 白ブドウ酒醸造における滓引時期について 本誌, **10**, 15 (1963)
- 2) 増田博, 村木弘行: 同上(第2報) 滓の酵母菌体破壊処理について 本誌, **11**, 37 (1964)
- 3) TARANTOLA, C.: *Atti dell'Accademia Italiana della Vite e del Viuo* Vol. VI, 1954; Ref. *Deut. Wein-Ztg.*, **92**, 98 (1956)
- 4) DIMOTAKIS, M. P.: Acides aminés libres dans les yins gracs. *Annales de la Chimie*, 20 A, 1955; Ref. *Bull. I'O. I. V.*, **29** (299), 81 (1956)
- 5) WEISS, H., A. ROUSSET, M. -T. MAILLARD et R. BONNET: L'évolution qualitative et semiquantitative des acides aminés au cours de la fermentation des moûts de raisin provenant de cépages d'Alsace. *C. R. Acad. Sci.*, **250**, 1322 (1960); Ref. *Z. Lebensm.-Untersuch. u.-Forsch.*, **115**, 388 (1961)
- 6) TERCELJ, D.: Etude des composés azotés du vin. *Ann. Tech. Agr.*, **14**, 307 (1965)
- 7) BLOCK, R. J., E. L. DURRUM and G. ZWEIG: *A manual of paper chromatography and paper electrophoresis*. p. 76, Acad. Press Inc., New York, 1955
- 8) BOURDET, A. et J. HERARD: Influence de l'autolyse des levures sur la composition phosphorée et azotée des vins. *Ann. Tech. Agr.*, **7**, 177 (1958)
- 9) LAFON-LAFOURCADE, S. et E. PEYNAUD: Composition azotée des vins en fonction des conditions de vinification. *Ibid.*, **10**, 143 (1961)
- 10) POUX, Ch., C. FLANZY et M. FLANZY: Les levures alcooliques dans les vins; protéolyse et protéogénèse. *Ibid.*, **13**, 5 (1964)