アルコール処理酵母による「生臭み」低減ワインの開発

煮魚や魚の干物と清酒は相性が良いのに、ワインとは相性が悪く、非常に生臭く感じる。これはワインに含まれる2価の鉄イオンが触媒になって魚介類に含まれる過酸化脂質が分解され、カルボニル化合物が生じることが原因である。では、ワインの鉄含量を低くするにはどうすればよいのか？ 筆者らは、シュールリーのワインでは鉄含量が低いことにヒントを得て、アルコール処理をした酵母を添加することでワインの鉄含量を低下する技術を開発した。その詳細を解説していただいた。

辻 俊 一

はじめに

お酒を飲む時にどんな料理と一緒に食べるかによって、食事全体の評価が変わることは多くの方が経験していることではないだろうか。一般的には、「赤身の肉には赤ワイン、白身の肉や魚には白ワイン」が合うというワインと料理を選ぶ上での基本的な考え方がある。しかしながら、この考え方に沿って、食事に合うワインを選んでも、全てが思い通りに行く訳ではない。例えば、日本で食されている一般的な魚介料理と特定のワインの組み合わせは、しばしば合わないと言われている。では、どのような点で合わないのか。日本に限らず、赤ワインと魚介料理の組み合わせは衝突すると言われることがある。その理由は、赤ワインに含まれるタンニンによって、金属味や金属臭、魚臭さ、苦味などが生じてしまうからだと言われている¹²⁾。しかしながら、ほとんどタンニンの含まれていない白ワインでも魚介類と合わないことが言われており³⁾、経験的な法則が絶対ではないことも少しずつ分かってきた。そんな中、田村らはワインと魚介類を食べ合わせた時に、ワイン中に含まれる数 mg/L の2価鉄イオンが魚介類に含まれる脂質の酸化を促進することで、「生臭み」を発生させることを明らかにした⁴⁵⁾。つまり、鉄イオンの少ないワインを開発できれば、魚介料理を

台無しにしない、良いワインと魚介料理の組合せが成立できる。魚介料理の多い日本において、ワインと魚介料理が「合わないもの」と誤解されないためにも、鉄を低減したワインを開発し、日本の食卓でワインをより多くの方に楽しんでもらうことを目的として研究を行ったので、その結果について報告したい⁶⁷⁾。

1. 背景

まずは、ワインと日本の魚介料理が合わない、つまり本稿で扱う「生臭み」について詳細を述べておきたい。ワインと魚介料理を口の中で合わせてはじめて感じる不快な生臭みを研究対象とし、魚介類そのものもっているにおいは取り扱わない。では、実際にどのような魚介料理が「生臭み」を発生させやすいのか。田村や藤田らの研究により、「生臭み」の発生には、魚介に含まれる過酸化脂質が深く関わっていることが示唆されており³⁵⁾、さらに口の中で発生する「生臭み」を抑えるには、オリーブオイルなどの油を添加することが有効だということも報告されている⁸⁾。日本では、脂肪分の多い魚介類（魚卵系含む）を生のまま刺身として食べる事が多く、加えて過酸化脂質の蓄積が多い魚介類の干物もよく食卓にあがるため、日本食とワインが合わないという印象を持たれているのだと考えられている⁸⁾。

Novel Method to Reduce Fishy Aftertaste in Wine and Seafood Pairing Using Alcohol-Treated Yeast Cells
Toshikazu TSUJI (Central Laboratories for Frontier Technology, Kirin Holdings Company, Limited)

次に、ワインやその原料であるブドウ果汁から鉄を低減するにはどうすればよいだろうか。単純に思えるが実は大きな3つの課題が存在している。1. 安全性、2. 工業利用可能な簡便性、3. 鉄のみを除去する特異性の3つである。ワイン中に鉄が7~10mg/L程度存在してしまうと、混濁の原因になること⁹⁾から、ワイン醸造では古くより、フェロシアン化カリウム（黄血塩）を添加することで鉄を化学的に沈殿させる除鉄法が行われてきたが、シアン化物であるということから、その安全性や廃棄処理の問題から日本では認可されていない^{10,11)}。またイオン交換樹脂などを用いたカラム処理によって鉄を除く方法^{12,14)}もあるが、やはり工業利用可能な簡便性に乏しい、さらには鉄以外の物質も吸着してしまい、ワインの風味を損ねてしまうことが多い、といった理由で、上記3つの課題全てをクリアできない。そこで、魚介類との食べ合わせが良いワインを開発するために、実用的に利用可能なワイン中の鉄除去法を目指して、発酵に用いる酵母を題材に検討を行った。なお、田村らの報告⁴⁾を見ると、鉄濃度が1mg/L以下のワインを選んでくれば、「生臭み」を発生させやすい素材であるホタテの干物と食べ合わせた場合に、多くのワインが「弱い生臭み」を感じる、あるいは「ほとんど感じない」程になっている。つまり、鉄濃度が1mg/L程度にまで下がったワインができれば、魚介料理との食べ合わせ時に、「生臭み」を感じにくくなる可能性が高い。そこで、本研究においては、ワイン中の鉄濃度1mg/Lを鉄低減の1つの目標として取り扱った。

2. 1ヶ月に及ぶ果汁発酵試験における鉄濃度変化と酵母の死滅率の関係

まずは、果汁の発酵中に酵母が鉄をどの程度吸収・吸着するのか詳細に調査を行った。予備検討として、いくつかのワイン酵母を用いて果汁発酵試験を実施したが、ほとんど鉄を吸収・吸着せず、発酵改善での鉄低減や鉄を多く吸収・吸着するような酵母の育種は難しいと考えられた。また嫌気条件下では、鉄の取り込みに関わるトランスポーターの発現が抑制されるという報告¹⁵⁾からも、この結果は正しいと考えられた。一方、数多くのワインの種類の中でも経験的に鉄の少ないものが存在することが知られていた。それが、シュールリーという伝統的な製法で作られたワインであ

る。シュールリーとはフランス語で「オリの上」を意味する言葉であり、ワインにコク味や旨みなどを付与するために、発酵後も酵母などからなるオリをタンク内に残したまま、数ヶ月~1年間、ワインとオリを接触させておく手法である。こうすることで、酵母の自己消化が促進され、コク味や旨みの元となる酵母内のアミノ酸やペプチドがワイン中に放出される。この事実ヒントを得て、長期間にわたるワイン発酵中の鉄濃度の変化を詳細に調査することとした。

ワイン酵母 OC-2 を用いて、20℃、静置の条件で、白ワイン用の果汁で発酵試験を行った。第1図に発酵試験中の鉄濃度の変化と酵母の死滅率、発酵経過をモニターするためのBrixを示した。第1図Aに示されるように、発酵開始直後から10時間までは、酵母は鉄を急速に吸着・吸収しているが、その後徐々に鉄濃度が上昇する。発酵開始7日後にBrixでモニターする糖分はほぼ変化しなくなり（糖切れ）、糖切れ直後では、発酵開始前とほぼ同じ鉄濃度（4.5mg/L）になってしまう。今回の目的の1つは、長時間発酵を続けた場合の鉄濃度の変化を見ることであったため、さらに発酵試験を続けたところ、面白い現象を見つけた。糖が消費された後（発酵開始から100時間後）に、死滅酵母細胞の割合が急激に増加し、それと同時に鉄濃度が急速に減少し始めた。さらに発酵試験を続けていくと、840時間、実に発酵開始から35日経過すると、ワイン中の鉄濃度は4.5mg/Lから1.0mg/Lにまで減少していた（第1図B）。この結果に基づき、「死滅した酵母に十分な鉄を吸着する能力がある」という仮説を立てた。

3. エタノール処理酵母による鉄吸着現象の発見

上記の仮説を検証するために、培養したワイン酵母 DV10 を一般的な殺菌法である熱処理（65℃、1hr）と70%エタノールの2条件で死滅させた。死滅した酵母を湿潤した状態で白ワイン用の果汁に添加したところ、第2図に示すように、エタノール処理した酵母（ETY: Ethanol-treated Yeast）でのみ顕著な鉄低減効果が見られた。

熱処理した酵母では、酵母は100%死滅していたが、鉄を全く吸着していなかった。ETYの鉄低減効果は菌体添加量をOD₆₀₀ = 3（乾燥菌体重量当りで計算すると、およそ2.7g/L）とすると、初期鉄濃度6.2mg/L

第1図 長期間発酵時の白ワイン果汁中の鉄濃度と死滅率の変化：(A)糖切れ前までの発酵経過，(B)発酵開始 840 時間までの果汁中の鉄濃度の変化⁶⁾ (平均値 ± SD, n = 3)。死滅率は蛍光色素 DiBAC4(3)を用いて，FACS にて蛍光強度の高い細胞をカウントした²³⁾

第2図 果汁添加時の ETY (DV10) の鉄低減効果⁶⁾ (平均値 ± SD, n = 3) 添加量は OD₆₀₀ で示す。

L あった果汁は 1.3mg/L にまで低減することがわかり，非常に効果的な鉄吸着剤であることが示唆された。また，エタノール処理によって鉄吸着能が付与されるのはワイン酵母だけではなく，パン酵母や実験室酵母として用いられる *Saccharomyces cerevisiae* やビール酵母である *Saccharomyces pastorianus* でも鉄低減効果が確認できた (第1表)。

4. エタノール処理条件の最適化

次に酵母をエタノール処理する条件を検討した。エタノール処理濃度が下がることで，より扱いやすい技術になると考えたからである。ワイン酵母 DV10 を用いて，エタノールの処理時間および濃度と鉄低減効果の関係を調べた。すると，第3図に示すように，エタ

第1表 各酵母株を用いた時の果汁の鉄低減効果の比較⁶⁾

菌株名	用途	1g/L ETY 添加群		3g/L ETY 添加群	
		鉄 (mg/L)	鉄除去率 (%)	鉄 (mg/L)	鉄除去率 (%)
SYT001 ²²⁾	実験室	2.5	49.1	1.5	69.2
DV10	ワイン	2.7	45.6	1.4	71.1
IFO1127	ビール	2.3	53.3	1.1	76.9
IFO1167	ビール	2.7	45.7	1.5	68.4

70%エタノール処理した酵母（乾燥）を果汁に添加。果汁初期鉄濃度 4.9mg/L。

第3図 ETY 作製時のエタノール処理濃度と処理時間が鉄低減効果に及ぼす影響⁶⁾(平均値±SD, n = 3, *; エタノール処理で完全に酵母が死滅していないことを示す)酵母は DV10 を使用し, OD₆₀₀ = 1 となる濃度で添加。果汁初期鉄濃度 62 mg/L。

ノール濃度に関わらず、短い時間（30 分以下）でエタノール処理した場合に、鉄低減効果が高くなることが明らかとなった。加えて、エタノール処理を長期間行うことによって、酵母の重量が減少することもわかった。例えば、70% (v/v) のエタノールで酵母を処理した場合、初期重量が乾燥菌体で 95mg だったものが、30 分処理で 95mg、1 日処理で 83mg、3 日処理すると 64mg と初期の 3 分の 1 が失われてしまった。菌体重量当りの鉄低減量にも変化がなかったため、処理時間は 30 分程度と短い方が良く考えられた。一方、濃度に関しては、40% (v/v) 以上のエタノールが望ましいことが明らかとなった。30% (v/v) 以下でも鉄低減効果はあるが、30%エタノールで処理した場合には 30 分程度の処理時間だと完全に酵母を死滅させること

第4図 ETY 乾燥時の温度が鉄低減効果に及ぼす影響⁶⁾(平均値±SD, n = 3) 酵母は DV10 を使用。果汁初期鉄濃度 5.0mg/L。one-way ANOVA, $P > 0.05$ で有意差なし。

はできない（第3図）ため、果汁やワインにこの酵母を添加した際に、不必要に発酵してしまう、あるいは香味に影響を与えてしまうことに成りかねない。この問題に関してはエタノール耐性の低いビール酵母などを選ぶことによって、解決できることがわかった。30%程度のエタノールでも酵母を死滅させ、かつ鉄低減効果を付与できることが明らかとなっている⁷⁾。

第2図、第3図の実験では、ETYは湿潤した状態で果汁に添加されている。しかしながら、実用的に利用するには、一度ETYを大量に作り、保管し、必要な時に利用するという形が理想である。第4図に示されるように、ETY乾燥時の温度が鉄吸着能に与える影響を検討した結果、一度エタノールで酵母を処理すれば、乾燥温度は鉄吸着能に影響を与えていないことが示された。

さらに乾燥させたETYを1ヶ月常温にて保存した後、果汁に添加したところ、保存前後で全く鉄低減効果は変わらないことも確かめられた（第5図）。酵母

第5図 乾燥 ETY の保存時間が鉄低減効果に及ぼす影響⁶⁾(平均値±SD, n = 3)酵母は DV10 を使用。果汁初期鉄濃度 6.4 mg/L(保存前), 5.4mg/L(保存後)。鉄除去率は初期鉄濃度からの変化率で算出した。

を 1g/L および 3g/L の濃度で果汁に添加すると、果汁中の鉄は 47% および 72% 低減されることが明らかとなった(第5図)。初期濃度が 1 ~ 10mg/L の鉄濃度の果汁を用いた場合には、ほぼ同じ効率で鉄が低減されており、初期鉄濃度に依存しない効果も確認できた⁷⁾。

5. ワイン中の鉄吸着剤としての ETY の利点

現在日本でワイン製造に用いることができる安全かつ簡便そして香味に影響を与えない鉄吸着剤としてフィチン酸がある。フィチン酸は穀物や豆類に多く含まれる物質であり、高いキレート作用を持つ。しかしながら、高いキレート作用はあるものの、どんな条件でも鉄をキレートできるわけではない¹¹⁾。Trela らの報告によれば、フィチン酸と鉄が 1:1 のモル比で含まれていて、かつカルシウムとフィチン酸のモル比が 5:1 の場合に 90% 以上の鉄が低減できることを報告している¹¹⁾。実際、我々もフィチン酸の鉄低減効果を調べてみたが、効果が出る果汁・ワインとほとんど鉄を低減できない果汁・ワインがあることがわかった。そこでフィチン酸では鉄を除去できなかったワインを用いて、ETY が鉄を低減できるかどうかを調査し、第6図に示した。

フィチン酸でほとんど鉄が低減できなかったワインでも、ETY は鉄を低減できることがわかった。興味深いことに、フィチン酸と ETY (3g/L) を両添加

第6図 白ワインにおける ETY とフィチン酸の鉄低減効果の比較と併用による相乗効果⁶⁾(平均値±SD, n = 3, **: one-way ANOVA, $P < 0.001$) 酵母は Dia yeast(キリン協和フーズ社)を使用。フィチン酸は 20mg/L, ETY は 3g/L で添加。

(以下、ATY-PA 法と呼ぶ) することで、ワイン中の鉄を相乗的に低減できることも明らかとなった(第6図)。ETY の使用量を 0.5g/L と少なくした場合にも、同様の相乗効果が確認された。つまり、鉄低減に必要な ETY の添加量も減らすことができ、実用的にも扱いやすい手法へと洗練することができた。

6. エタノール以外のアルコールで処理した酵母の鉄吸着能の評価

上記で、エタノール処理した酵母に鉄吸着能があることを示した。さらに、エタノール以外のアルコール処理で同様の結果を得ることが出来れば、処理設備の選択肢の拡大にもつながることから、低級アルコールで処理した酵母の鉄吸着能を評価した。検討の結果、イソプロピルアルコールなどを含んだアルコール処理酵母 (ATY) にも鉄低減効果があることを示した (第2表)。

7. 魚介類と食べ合わせたときの「生臭み」の官能評価

アルコール処理した酵母がワイン醸造に利用できる鉄吸着剤となるかを判断するために、ATY をワインに添加した場合に、①ワイン本来の香味を変化させてしまうことがないか、②「生臭み」が抑えられるのか、を検証することを目的として、官能試験を行った。官能試験はワインの官能評価経験のある 11 人のパネリストに実施してもらった。

まず、①の ATY がワインに与える影響について調査を行った。乾燥した ETY を 1, 2, 3g/L の濃度にて、ラボスケール (15L) で果汁から発酵させた白ワインに添加し、遠心と濾過助剤にて清澄化して、官能評価用のサンプルとした。官能評価には三点識別法を用いた。ETY 添加ワインと無添加の通常のワインを 3 サンプル中に混ぜ、パネリストに 3 サンプルのうち、どれが他のサンプルと異なるかを指摘してもらった。計 20 セットの試験をしてもらった結果を第3表に示す。1 あるいは 2g/L の ETY を添加した場合には、

第2表 アルコール処理酵母の鉄吸着能の評価⁶⁾

アルコールの種類	鉄濃度 (mg/L)
エタノール	3.36 ± 0.07
n- プロパノール	4.16 ± 0.14
イソプロピルアルコール	4.06 ± 0.06
n- ブタノール	3.66 ± 0.03
イソアミルアルコール	3.74 ± 0.10

実験室酵母 SYT001²²⁾ をそれぞれ 70% (v/v) のアルコールで処理した後、乾燥させ、3g/L の濃度で添加した。初期鉄濃度は 6.5mg/L。 (平均値 ± SD, n = 3)

無処理のワインと区別する事はできなかった。一方で、3g/L の濃度で ETY を添加すると、無処理のワインとは区別された。しかしながら、その香味の違いは「酵母臭の着香」ではなかったことから、3g/L 以上の ETY の添加は単に香味の変化をもたらす、ということが結論付けられた。

次に、②の「生臭み」について評価した。イソプロピルアルコールで処理した乾燥パン酵母 Dia yeast (キリン協和フーズ社) およびフィチン酸をラボスケールで発酵させた白ワインに添加し、上記サンプルと同様に遠心、濾過助剤にて清澄化した。ワインとの食べ合わせ時に「生臭み」を感じやすい魚介類としてホタテの干物を使用し、ワインは ATY 単独、フィチン酸単独、ATY + フィチン酸および無処理の計 4 サンプルを用いた。官能評価の方法はホタテの干物を食べ、続いてワインを飲んだときの「生臭み」の強さを Labeled Magnitude Scale (ほとんど感じない, 1.4; 弱い, 6.1; 強くも弱くもない, 17.2; 強い, 35.4; とても強い, 53.3; 想像でき得る限り強い, 100)^{3,20)} を用いて評価した。その結果、ATY を添加したワインはフィチン酸で処理したワインよりも生臭みを感じにくく、さらにその両方 (ATY-PA) で処理したワインは最も生臭みを感じにくいということが示された (第7図)。

無処理ワインで「強いレベルの生臭み」が発生したにも関わらず、ATY-PA で処理したワインでは「弱いレベルの生臭み」にまで低減できることがわかった。なお、Two-way ANOVA によって検定を行ったところ、パネリスト間での有意な差は無く [F (10,30) = 1.97, p = 0.073], サンプル間の生臭み強度に有意な差があることが確認できている [F (3,30) = 21.1, p = 1.48 × 10⁻⁷]. 気になるのは生臭み以外に変わったところが無いか? という点ではあるが、パネリストに「生臭み」以外で気になることがあれば指摘をする、という条件を伝えて試験を行ったが、3g/L の ATY

第3表 3点識別法による ETY 処理ワインと未処理ワインの香味の比較⁶⁾

ETY の量 ^a	正答数	総試験数	P
1 g/L	10	20	0.054
2 g/L	7	20	0.182
3 g/L	11	20	0.024

^a エタノール処理した IFO1167 (ビール酵母)

第7図 ホタテ干物と白ワインとの食べ合わせにおける ATY-PA 処理の「生臭み」低減効果⁶⁾
(平均値±SD, n = 11) 酵母は Dia yeast(キリン協和フーズ社)を使用。フィチン酸は 50mg/L, ATY は 3g/L で添加

を添加しているにも関わらず、指摘はなかった。第3表で述べたような ETY 添加による香味の変化は、この結果からもあまり大きいものではないということが推測された。

最後に ATY 添加によって化学的な分析値に変化がないかどうかの確認も行った。測定には GC および LC を用いた。有機酸 (ギ酸, 酢酸, コハク酸, リンゴ酸, 乳酸, クエン酸, ピルビン酸, リン酸およびピログルタミン酸), エステル (酢酸エチル, 酢酸イソアミル), アルコール (1-プロパノール, 2-メチル-1-ブタノール, 3-メチル-1-ブタノール, イソブタノール) およびアルデヒド (アセトアルデヒド) の濃度に顕著な変化はなかった⁶⁾。今回の報告では、全て白ワインおよび白ワインの果汁を用いた結果を報告したが、ATY 添加による生臭み低減効果など全ての試験について赤ワインでも同様の効果が確認されている。

8. まとめと今後の展望

今回、我々が開発したアルコール処理酵母は、酵母という「安全」な素材をワインや果汁に添加し、遠心分離などの操作で除くという「簡便な操作」だけで、「香味を変化させずに」鉄を除くという点でメリットのある鉄吸着剤だと考えられる⁶⁾。ワイン中の鉄は、土壌や砂埃による果汁への混入、あるいは醸造に使用する金属性のポンプや配管からの漏れ出しという、実に多くの要因による¹⁹⁾ため、混入そのものを防ぐ事

は難しい。また、発酵時間、発酵温度や pH といったその他様々なパラメーターによって、発酵中の鉄濃度は増減する^{9,19,20)}ため、最終的なワインの鉄濃度がどの程度になるかの判断も難しい。今回開発した技術は、ワインと果汁の両方から鉄を低減できるという柔軟性を持ち合わせ、醸造設備や原料に応じて、添加タイミングや添加量を変えることができる利点もあると考えている。

冒頭で述べたように、鉄は沈殿を引き起こす原因になり、10mg/L 以上になれば、不快な金属味を呈する¹⁹⁾ことも知られている。また、混濁を引き起こさない比較的低濃度の場合でも、ワイン中の鉄はフェントン反応を通じて、フェノール化合物の酸化を触媒し^{20,21)}、ポートワインでは硫酸鉄を添加すると酸化が早まるとされている⁹⁾。今回、注目した魚介料理との食べ合わせ時に発生する「生臭み」も比較的低鉄濃度で起こる現象であり、ATY-PA 法がこのような課題の解決にも繋がることを期待している。

一方で、この技術にもまだ課題もある。果汁に添加した場合とワインに添加した場合とで、鉄吸着量が変わる (ワインで吸着量が少ない傾向にある) ことや、鉄が吸着している酵母成分、アルコール処理による酵母への鉄吸着能付与メカニズムなど、今後さらなる工程改善・新素材の探索のために明らかにすべき問題がある。

本稿で紹介した技術と近い技術は、バイオレメディ

エーションと呼ばれる環境浄化に関する研究分野でよく見られる。本稿が醸造分野だけでなく、他分野の研究・開発者の参考にもなれば幸いである。

〈キリンホールディングス（株）
フロンティア技術研究所〉

文 献

- 1) D.Cooper: Wine with food, 87-97, Crescent Books, New York, (1980)
- 2) J. Simon: Wine with Food, 10-19, Octopus Publishing, London, (1996)
- 3) A. Fujita, A. Isogai, M. Endo, H. Utsunomiya, S. Nakano, H. Iwata: *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 4414-4420, (2010)
- 4) T. Tamura, K. Taniguchi, Y. Suzuki, T. Okubo, R. Takata, T. Konno: *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 8550-8556, (2009)
- 5) 田村隆幸: 醸協, **105**, 139-147, (2010)
- 6) T. Tsuji, K. Kanai, A. Yokoyama, T. Tamura, K. Hanamure, K. Sasaki, R. Takata, S. Yoshida: *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 6197-6203, (2012)
- 7) T. Tsuji, S. Yoshida, T. Tamura, K. Sasaki, K. Kanai: WO/2011/148651
- 8) 田村隆幸, 谷口潔, 鈴木由美子, 大久保敏幸, 高田良二, 金野知典: 日本味と匂学会誌, **16**, 645-648, (2009)
- 9) 財団法人日本醸造協会編: 醸造物の成分, 294-298, 日本醸造協会, 東京, (1999)
- 10) J. Pearce: *Food Chem. Toxicol.*, **32**, 577-582, (1994)
- 11) B.C. Trela: *Am. J. Enol. Vitic.*, **61**, 253-259, (2010)
- 12) V. M. Palacios, I. Caro, L. Pérez: *Adsorption*, **7**, 131-138, (2001)
- 13) G. L. Loubser, D. R. Sanderson, S. Afr. *J. Enol. Vitic.*, **7**, 47-51, (1986)
- 14) M. Feng, J. Mei, S. Hu, S. Janney, J. Carruthers, B. Holbein, A. Huber, D. Kidby: *Sep. Purif. Technol.*, **11**, 127-135, (1997)
- 15) F. R. Hassett, M. A. Romeo, J. D. Kosman: *J. Biol. Chem.*, **273**, 7628-7636, (1998)
- 16) L. Deibner, H. Bouzigues: *Ind. Agric. Aliment.*, **71**, 833-837, (1954)
- 17) P. Vohra, G. A. Gray, F. H. Kratzer: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **120**, 447-449, (1965)
- 18) B. G. Green, P. Dalton, B. Cowart, G. Shaffer, K. Rankin, J. Higgins: *Chem. Senses*, **21**, 323-334, (1996)
- 19) P. Pohl: *Trends Anal. Chem.*, **26**, 941-949, (2007)
- 20) C. S. Ough, M. A. Amerine: Methods for Analysis of Musts and Wines, 2nd ed., 268-288, J. Wiley & Sons, New York, (1988)
- 21) A. L. Waterhouse, V. F. Laurie: *Am. J. Enol. Vitic.*, **57**, 306-313, (2006)
- 22) S. Yoshida, J. Imoto, T. Minato, R. Oouchi, M. Sugihara, T. Imai, T. Ishiguro, S. Mizutani, M. Tomita, T. Soga, H. Yoshimoto: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 2787-2796, (2008)
- 23) R. A. Boyd, S. T. Gunasekera, V. P. Attc eld, K. Simic, F. S. Vincent, A. D. Veal: *FEMS Yeast Res.*, **3**, 11-16, (2003)