

[J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 25; 5~14 1990]

ワイン中のインベルターゼ活性と その性質

中西載慶・横塚弘毅

Invertase Activity and its Properties in wines

KOTOYOSHI NAKANISHI and KOKI YOKOTSUKA

*Laboratory of Wine Chemistry, The Institute of Enology and Viticulture
Yamanashi University, Kofu 400.*

Abstract

The levels of invertase activity in juice, must, and wine were examined during vinification and aging processes. The remaining activity levels in white wines were significantly higher than those in red wines. In red wines, a lowering of the level in the enzyme activity was mainly observed during the processes of the fermentation and aging. Invertase activity was also detected in many commercial imported white wines. On the other hand, invertases from Semillon, Sylvaner, Chardonnay, and Riesling wines were purified to homogeneity on polyacrylamid slab gel electrophoresis. The invertases from the four sources showed similar enzymatic properties. In addition, these invertases had very similar molecular weights and amino acid composition.

インベルターゼは、微生物、植物、動物等広く自然界に分布し、古くから極めてよく調べられている酵素の1つである。果実のインベルターゼについても、これまで、ミカン、ナツメヤシ、キウイフルーツ、バナナ、カキなどについて報告がなされているが¹⁻⁶⁾、ブドウのインベルターゼに関する研究は、比較的少なく^{7,8)}、その酵素化学的性質などについてはあまり明らかにされていない。さきに我々は、当研究施設育種試験地で栽培されている14品種の醸造用ブドウのインベルターゼについて調べ、その活性は品種によりかなり異なるものの、酵素的性質は何れもよく類似し、特に耐熱性に優れ、また安定性の高い酵素であることを既に報告した⁹⁾。また、このインベルターゼの一部はワインに移行し、特に白ワインではかなりの活性が熟成後のワイン中に検出されることも明らかにした^{9,10)}。

一般にワイン醸造において、ブドウ果汁中に存在する多くの酵素(蛋白質)は、果実の圧搾・搾汁時、あるいは発酵や熟成中に、果実中に存在するフェノール化合物(タンニン)などと不溶性の複合体を形成し、沈殿したり、あるいはSO₂の添加などにより失活する場合が多く^{11,12)}、インベルターゼのように熟成後のワインにも活性が残存する例は、ブドウ果実中の他の酵素では、あまり知られていない。それ故、酵素化学的あるいはブドウの生理学的観点から、ブドウインベルターゼの諸性質を明らかにすることは興味あるものと考えられる。また、ブドウインベルターゼが熟成後のワインにも残存するという事実は、ワイン醸造プロセス中のブドウ蛋白質の挙動を知るうえで重要であると思われ、また、それらの検討にあたり本酵素が1つのマーカー蛋白質として利用することができれば、さらに興味深いものと考えられる。

そこで本報では、当研究施設で製造された数種のワインを対象に、ワイン醸造中におけるインペルターゼの活性推移を調べるとともに、4種の白ワインよりインペルターゼを分離・精製し、それらの諸性質についても比較検討した。また、日本産および外国産市販ワイン中のインペルターゼ活性についても調べたので合わせて報告する。

実験方法

供試ブドウおよびワイン

1988年9～10月に当研究施設付属育種試験地において収穫されたシルバーナ、シャルドネ、甲州、マスカット・ベリーA、カベルネフラン、およびカベルネ・ソービニオン種ブドウを用いた。ワインは、当研究施設付属試験工場において通常の方法により製造されたものを用いた。また、ワインからのインペルターゼの精製にあたっては、1986年に当研究施設で製造され、ビン熟成2年を経過したセミヨン、シルバーナ、シャルドネ、およびリースリングワインを用いた。市販ワインは、1本(720ml)が、1,000～2,500円の価格で購入されたもので、それらより無作為に外国産ワイン30種(白;18種,赤;12種)と日本産ワイン28種(白;18種,赤;11種)を選択し、用いた。

酵素液の調製

果汁及びマストは遠心分離(15,000rpm, 30min)後、その上清液を、4℃の水中で十分に透析し、その透析内液を粗酵素液として用いた。ワインの場合は、同様に透析後、その内液を粗酵素液とした。

酵素活性測定法

前報に従って測定した⁹⁾。すなわちシュークロースを基質とした反応系において増加する還元糖をソモギ法により定量した。なお、酵素活性は酵素1mlが1分間に1 μ Mのグルコースに相当する還元糖を生成する力価を1 unitと表示した。

酵素精製法

上記のセミヨン、シルバーナ、シャルドネ、およびリースリングワイン、各々4750ml, 3300ml, 5100ml, および5100mlを分画分子量50,000の膜(UK-50)を用いて、N₂ガス、2～3 kg/cm²(ゲイジ圧)の条件下で、限外濾過(ADVANTEC HP-150)を行なった。ワインの初発の液量の1/8～1/10程度まで濃縮された時点で、初発の液量と同量となるよう蒸留水を加え、再び同条件下で限外濾過を行ない、最終的にセミヨン450ml, シルバーナ600ml, シャルドネ168ml, およびリースリング258mlの濃縮液を得た。これらをさらに40℃以下で減圧濃縮を行ない、各々100mlとした後、硫酸アンモニウムを80%飽和となるよう添加し、4

℃で1夜放置した。生じた沈殿物を遠心分離(15,000rpm, 30min)により集め、7mlの0.1M酢酸緩衝液(pH 5.0)に溶解した。これを上記と同様の緩衝液で平衡化したSephadex G-100のカラム(2.6X90cm)につけ、15ml/hの流速でゲル濾過を行なった。

蛋白質の定量法

Bio-Rad社の蛋白質測定用キットを用い、牛血清アルブミンをスタンダードとして定量した。

電気泳動法

ポリアクリルアミドおよびSDSポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動は、既報¹³⁾に準じて行なった。なお、蛋白質の検出にはクマシーブリリアントブルーR-250を用い、糖の染色は、過ヨウ素酸-フクシン染色法¹⁴⁾を用いた。また、分子量の測定にあたっては、標準蛋白質としてチトクロームC(M.W 12500)、キモトリプシノーゲン(25000)、卵白アルブミン(45000)、および牛血清アルブミン(68000)を用いた。

アミノ酸分析

蛋白質として0.5mg相当の精製酵素を試験管に採りエバポレーターにより蒸発乾固した後、6N HCl 1mlを加え、脱気封管し、110℃、24時間加水分解した。得られた分解物中のアミノ酸組成はアミノ酸自動分析機(協和精密KTC-104)により求めた。

結果および考察

ワイン醸造中におけるインペルターゼ活性の推移

ブドウ果汁中の本酵素の活性は、ブドウ品種により異なっているが、白ワイン用ブドウと赤ワイン用ブドウとの差は明確ではない。しかし、それらブドウより製造されたワイン中に残存する活性は、白ワインにおいては比較的高い値を示し、赤ワインではかなり低い値を示すことなどが既に明かにされている^{9,10)}。そこで、ここでは、当研究施設で常法により製造された4種の白ワイン(セミヨン、シルバーナ、シャルドネ、および甲州)と3種の赤ワイン(マスカット・ベリーA、カベルネ・フラン、およびカベルネ・ソービニオン)を対象に、その製造経過中におけるインペルターゼ活性の推移を調べた。酵素活性の測定は、果汁、かもし発酵後のマスト(赤ワイン)、発酵終了時、および濾過・ビン詰め後1年経過したワインについて行なった。その結果をTable 1に示す。なお、果汁中の活性は、セミヨン、シルバーナ、シャルドネ、および甲州種ブドウの場合には、各々50kg, 56kg, 122kg, および100kgを除梗・破砕後、バスラントタイプの搾搾機で搾汁した果汁の活性を示す(搾汁率; セミヨン63%, シルバーナ54%, シャルドネ59%, および甲州58%)。また、マスカットベリーA、カベルネフラン、およびカベルネソー

ピニヨンの場合には、各々208kg, 130kg, および130kgを除梗・破碎後(かもし発酵前)の果汁中の活性を示す。また、かもし発酵は8日間行なわれた。なお、Table 1に示されるセミヨンにおける結果は、1986年に収穫され、同様の方法により製造された時のものである。

ワイン中の残存活性(ワイン中の酵素活性/果汁中の酵素活性×100%)は、白ワインでは30~70%の範囲にあったが、赤ワインでは、何れも5%以下であった。特に、赤ワインでは、発酵中および熟成中にその活性の低下が顕著であることがわかった。この原因としては、赤ワインでは、白ワインに比べ、不溶性のタンニン-インベルターゼ複合体が形成され易いか、あるいはその他成分による酵素の失活が著しいことなどが考えられるが、今後詳しい検討が必要と思われる。なお、各製造過程における活性や残存活性のブドウ品種間における比較は、使用ブドウ量、搾汁率等が異なっているので厳密には難しいが、本酵素の活性推移の傾向を知るには十分と考えられる。

一方、ワイン中のインベルターゼの残存活性と蛋白質量との関係を調べたところ、Fig. 1に示すように、蛋白質含量が高いワインほど、インベルターゼの残存活性が高い傾向にあることが推察された。この結果はブドウ蛋白質のワインへの移行などを調べるにあたっては、興味あるものと思われる。しかし、この両者の関連性については、今回試験したサンプルが少ないことから、今後さらに多くのサンプルについて検討する必要があると考えられる。

市販ワイン中のインベルターゼ活性

ブドウ品種、生産国、製造年などを全く考慮することなく選択した種々の市販ワイン中の本酵素活性を調べた。その結果、試験した外国産白ワインでは18サンプル中、9サンプルに0.2~3.1units/ml wineの活性が検出された。しかし、日本産ワインでは17サンプル中、1サンプルに0.3units/ml wineの活性が検出されたのみであった。この結果は、外国産と日

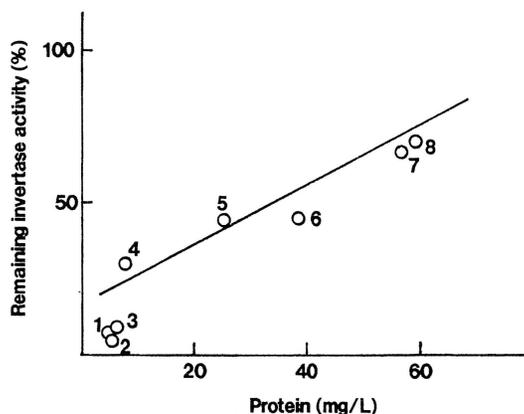


Fig. 1. Relationship between remaining invertase activity (activity in wine/activity in juice × 100%) and protein concentration in wine.

Wine numbers (vintage) : 1, Muscat Bailey A (1988); 2, Cabernet Sauvignon (1988); 3, Cabernet franc (1988); 4, Chardonnay (1988); 5, Riesling (1986); 6, Sylvaner (1988); 6, Semillon (1986).

Table 1. Changes in invertase activity in juices and wines during wine making.

Grape varieties ¹⁾	Invertase activity (units/ml)			
	Juice	Fermentation on skins	Finished wine	Aged wine ²⁾
Semillon	16.0 (100) ³⁾	—	13.3 (83)	10.8 (68)
Sylvaner	14.1 (100)	—	12.6 (89)	9.6 (68)
Chardonnay	4.3 (100)	—	2.3 (53)	1.9 (44)
Koshu	2.5 (100)	—	1.0 (40)	0.8 (32)
Muscat Baiely A	4.5 (100)	3.6 (80)	1.1 (24)	0.2 (4)
Cabernet Franc	9.5 (100)	8.0 (84)	3.8 (40)	0.3 (3)
Cabernet Sauvignon	5.1 (100)	4.2 (82)	1.0 (20)	0.1 (2)

1) Semillon grapes and other grapes were harvested at our Institute's vineyard in 1986 and 1988, respectively. Wines were produced by conventional vinification procedures at our Institute's winery.

2) The bottled wines were aged at 15°C for 1 year.

3) Relative activity.

本産ワインにおける、原料ブドウの種類や品質あるいは製造法の相違に起因する可能性もあるが、今後興味ある検討課題と思われる。なお、赤ワインでは、外国産12サンプル、日本産11サンプルのいずれもが、0.1units/ml wine以下の活性であった。

インペルターゼ活性に及ぼすベントナイト処理および熱処理の影響

これまでの検討からインペルターゼの活性は市販ワインに比べ、当研究施設で製造されたワインの方が比較的高い値を示す傾向にある。一般に市販ワインでは、通常ベントナイト処理が行なわれ、また場合によっては熱処理などが行なわれている。また、流通過程における保存状態は必ずしも適当でない場合がある。一方、当研究施設の場合には、上述の何れの処理も行なわず、また一定の温度で保存されている。そこで、ここでは当研究施設で1987年および1989年に製造されたセミヨンおよびシルバーナワインを用いて、本酵素活性に及ぼすベントナイト処理と熱処理の影響について調べた。ベントナイト処理にあたっては、上記ワイン100mlに各々0~300mgのベントナイトを加え、室温でスターラーにより30分間攪拌した。ついて約3時間静置後、遠心分離(15,000rpm, 30min)し、その上清液を4℃の水中で十分に透析し、

その透析内液中の酵素活性と蛋白質量を測定した。その結果をFig.2に示す。ワイン中に残存する酵素活性および蛋白質量はベントナイトの添加量の増加にともなって減少し、いずれも類似した減少曲線を示した。しかし低濃度のベントナイトにおいては蛋白質量に比べ酵素活性の方が残存率が高いことから、インペルターゼ蛋白質は、ワイン中に存在する他の蛋白質に比べ若干ベントナイトへの吸着性が弱い傾向にあるものと推察される。熱処理にあたっては、上記ワイン10mlを試験管に採り、各温度で30分間保持した後、氷水中で急冷し、次いで上記と同様の方法で透析し、その透析内液の酵素活性を測定した。その結果をFig.3に示す。2つのワインともよく類似した傾向を示し、60℃までは失活は認められなかったが、70℃では残存活性は20%以下であった。

これらの結果および上述の市販ワインでの分析結果等から、インペルターゼ活性が検出されるワインは、少なくとも、高温・長時間の熱処理は行なわれていないこと、過度の(高濃度)ベントナイト処理が行なわれていないこと、あるいはワイン製造にあたり濃縮果汁ではなく生果汁が使用されている可能性が高いこと等が予想される。それ故、ワイン中(特に白ワイン)のインペルターゼ活性の測定は、原料

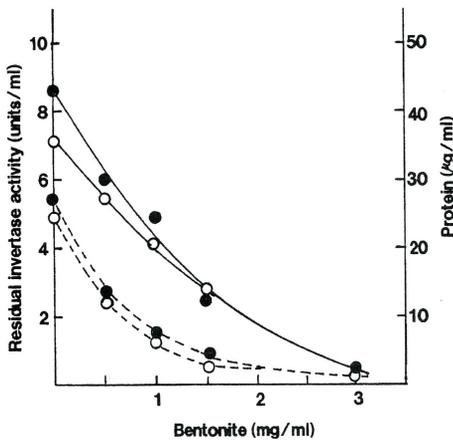


Fig. 2. Effect of bentonite treatment on invertase activity and protein concentration in wine.

Semillon and Sylvaner wines which were produced at our Institute's winery in 1987 and 1988 were used. The wines were dialyzed at 4℃ after bentonite treatment, and then invertase activity and protein concentration in the dialyzed wines were measured.

●, Semillon wine. ○, Sylvaner wine.

——, Invertase activity.

-----, Protein concentration.

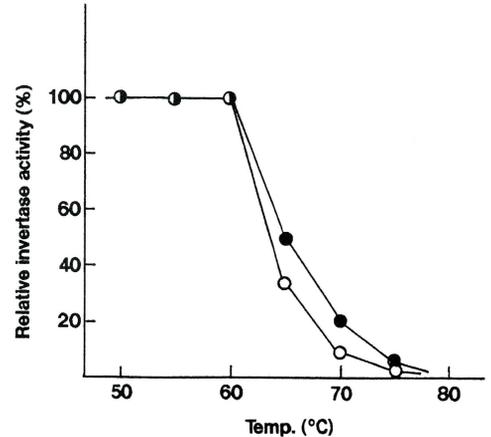


Fig. 3. Effect of heat treatment on invertase activity.

The wine was maintained for 30min at the indicated temperatures. The wine was dialyzed at 4℃ after cooling rapidly cooled in ice-cold water, and residual activity in the dialyzed wine was measured.

●, Semillon wine. ○, Sylvaner wine.

ブドウ(果汁)の品質, ベントナイト処理条件, あるいはワインの熱処理の有無などを判定するための1つの指標として役立つ可能性が考えられ, 今後の興味ある検討課題と考えられる。

ワインからのインベルターゼの精製と性質

先に我々は, セミヨン種ブドウの果汁とワインより同様の方法によりインベルターゼを精製し, それらの諸性質を比較することにより, 果汁中のインベルターゼは, ワイン醸造中および熟成中において, その性質が大きく変わることなく, ワイン中に残存していることを示した¹⁰⁾。一方, 果汁からワインに移行する活性の割合(残存活性)は, 上述のようにブドウ品種によりかなり異なっている。それ故, 異なったワインよりインベルターゼを精製し, それらの諸性質を比較することは興味あるものと思われる。

そこでここでは, 比較的残存活性の高いセミヨン, シルバーナ, シャルドネ, およびリースリングワイ

ンより本酵素の簡便な精製を試みた。一般にワイン中の蛋白質量はブドウ果汁のそれと比較するとかなり少なく, またその蛋白質のほとんどは分子量30,000以下であることが, 横塚ら¹⁵⁾および他の研究者により報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。そこでこれらの事実を考慮し, まず分画分子量50,000の膜を用いて, ワインを限外濾過法により濃縮し, 次いで実験方法の記載に従って精製した。その結果をTable 2に示す。限外濾過により, 初発の総活性の15~34%が膜を通過し, 活性回収率は, 66~86%であった。また, この操作により比活性は約3倍増加した。Fig. 4に硫酸塩析後のサンプルをゲル濾過した時の本酵素の溶出経過を示す。試験した4種のワインとも, 酵素の溶出経過はよく類似し, また活性と蛋白質のピークはよく一致していた。そこで, セミヨンワインでは, フラクション番号43~53, シルバーナでは, 42~50, シャルドネでは, 38~46, リースリングでは, 42~50を

Table 2. Summary of purification of invertases from various wines.

Step	Volume (ml)	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Semillon wine	4750	51158	284	180	100
Ultrafiltration ¹⁾	450	38142	68	561	76
Ammonium sulfate precipitation ²⁾	7	34327	30	1144	67
Sephadex G-100	48	21461	9	2385	42
Chardonnay wine	5100	9435	184	51	100
Ultrafiltration	168	7118	47	151	75
Ammonium sulfate precipitation	7	5661	19	298	60
Sephadex G-100	40	3010	2	1505	32
Sylvaner wine	3300	29205	185	158	100
Ultrafiltration	600	24702	58	426	85
Ammonium sulfate precipitation	7	22358	14	1597	77
Sephadex G-100	50	14252	6	2375	49
Riesling wine	5100	12495	204	61	100
Ultrafiltration	258	8201	60	137	66
Ammonium sulfate precipitation	7	6360	12	530	51
Sephadex G-100	44	5816	3	1939	47

1) Model UHP-150 (ADVANTEC) was used for the ultrafiltration. The membrane (UK-50), with a passing molecular weight below 50,000, was used.

2) 80% saturation

4種のインペルターゼの酵素的性質

4つの精製されたインペルターゼの至適温度、至適pH、熱安定性、およびpH安定性を調べた。それらの結果をFig. 5に示す。いずれの酵素ともよく類似し、特に酸性pH域で安定で、かつ耐熱性に優れた酵素であった。また、本酵素は、 10^{-2} MのHgCl₂、SDS、N-ブロモコハク酸イミド、および 10^{-4} Mのp-クロル安息香酸第二水銀により、その活性のほとんどが阻害あるいは不活性化された。また、 10^{-2} MのCdCl₂、CuCl₂、およびFeCl₂による阻害は50~80%であり、4つのインペルターゼにおける顕著な差はなかった。これらの結果は、先にセミヨン果汁から精製されたインペルターゼ⁹⁾の場合と同様であった。

4種のインペルターゼの分子量とアミノ酸組成

4つの精製されたインペルターゼの分子量を、SDSポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動により調べた結果をFig. 6に示す。いずれの酵素ともその分子量

は約65,000と推定された。ワイン中の蛋白質の分子量は、上述のようにそのほとんどが20,000~30,000であることを考えれば、本インペルターゼはワイン中に存在する蛋白質のなかでは比較的高分子の部類に属していると言える。4つの精製されたインペルターゼのアミノ酸組成について調べた結果をTable 3に示す。いずれのインペルターゼともアスパラギン酸、グリシン、ロイシンの順に多く含まれ、またその他の各アミノ酸の含量も極めてよく類似していた。アスパラギン酸やグリシンなどが多く含まれている点は、ワイン中に存在する他の低分子の蛋白質のアミノ酸組成と類似していた¹⁵⁾。今回精製した上記4種のワインは、いずれも分類学上、ヨーロッパ系白ブドウ品種(*Vitis vinifera*)に属するものであるため、これらの品種と異なるブドウ品種より製造されたワイン中のインペルターゼについて精製し、その諸性質を比較することは興味あるものと思われる。

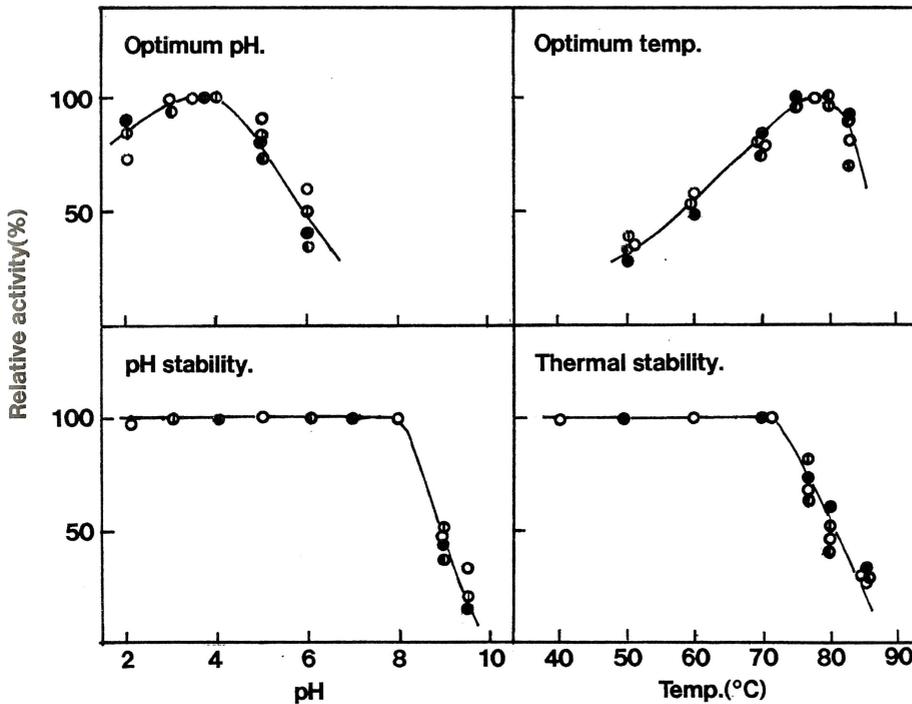


Fig. 5. Enzymatic properties of purified invertases from wines.

Optimum pH: the buffers used were 0.1M HCl-glycine buffer (pH 2-3), McIlvaine buffer (pH 3-8), and 0.1M ammonia water-ammonium chloride buffer (pH 8-9.5). Optimum temp.: the enzyme activity was measured at the temperature indicated and optimum pH. pH stability: the enzyme solution was maintained at various pHs at 30°C for 30min and the residual activity was measured at the optimum pH. Thermal stability: the enzyme solution was maintained at various temperatures for 30min, followed by rapid cooling in ice-cold water, after which the residual activity was measured.

●, Semillon wine. ○, Sylvaner wine. ◐, Chardonnay wine. ◑, Riesling wine.

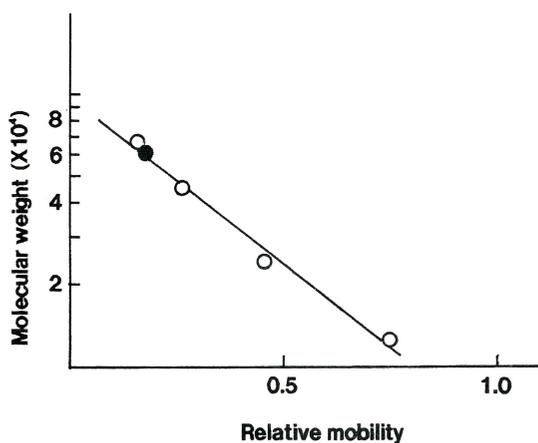


Fig. 6. Estimation of molecular weight of invertase by sodium dodecyl sulfate slab gel electrophoresis.

Marker proteins used were cytochrome C (A), chymotrypsinogen A (B), egg albumin (C), and bovine serum albumin (D).

●, purified invertases from Semillon, Sylvaner, Chardonnay, and Riesling wines.

要 約

ワイン製造過程におけるブドウインベルターゼの活性推移、市販ワイン中のインベルターゼ活性、およびワイン中のインベルターゼの精製と性質等について検討し、以下の結果を得た。

1. 白ワインではビン熟成1年後のワインにおいても压榨果汁中の活性の32~68%の活性が残存していたが、赤ワインにおける活性は、いずれも5%以下であった。また、赤ワインにおける活性の低下は、発酵中および熟成中で顕著であった。
2. 市販の外国産白ワインにおいては、試験した18サンプル中、9サンプルにインベルターゼ活性が検出されたが、日本産白ワインでは17サンプル中、わずか1サンプルに弱い活性が認められたのみであった。赤ワインにおいては、外国産、日本産とも活性は極めて微弱であった。
3. ワイン中のインベルターゼ活性の測定は、原料ブドウの品質やワインの製造法を推察するための1つの指標として、役立つ可能性のあることが示唆された。
4. セミヨン、シルバーナ、シャルドネ、およびリースリングワインよりインベルターゼを精製し、

Table 3. Amino acid compositions of invertases purified from four wines.

Amino acids	Mole (%)			
	Semillon	Chardonnay	Sylvaner	Riesling
Asp	14.9	14.5	14.7	14.1
Thr	7.9	8.1	7.9	8.0
Ser	7.7	8.1	7.6	7.8
Glu	7.2	7.5	7.3	7.3
Pro	5.3	5.3	5.3	5.1
Gly	9.5	9.2	9.3	9.2
Ala	7.4	7.5	7.4	7.5
Cys-Cys	0.1	0.2	trace	trace
Val	6.2	8.0	7.7	8.6
Met	2.5	2.5	2.6	2.5
Ile	3.8	4.3	4.1	4.6
Leu	8.8	8.6	8.8	8.6
Try	4.4	4.5	4.6	4.5
Phe	4.4	4.1	4.4	4.1
Lys	2.9	3.3	3.0	3.1
His	2.1	2.0	2.2	2.0
Arg	3.1	2.5	3.2	3.1

Five hundred μg of the purified enzyme was used for amino acid analysis.

それらの分子量, アミノ酸組成, および若干の酵素的性質について調べた結果, いずれも極めてよく類似していることがわかった。

終わりに, 本実験に協力いただいた宮地哲雄君に感謝致します。

文 献

- 1) Kato, T., Kubota, S.: *Physiol. Plant.*, **42**, 67 (1978).
- 2) Marouf, B., Zeki, L.: *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 990 (1982).
- 3) Sum, W. F., Rogers, P. J., Jenkins, I. D., Guthrie, R. D.: *Phytochemistry*, **19**, 399 (1980).
- 4) Hasegawa, S., Smolensky, D. C.: *J. Agric. Food Chem.*, **18**, 902 (1970).
- 5) Matsui, T., Kitagawa, H.: *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **35**, 856 (1988).
- 6) 辻政雄, 小宮山美弘: *日本食品工業学会誌*, **34**, 425 (1987).
- 7) Arnold, W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **110**, 134 (1965).
- 8) Ishikawa, N., Nakagawa, H., Ogura, N.: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 837 (1989).
- 9) Nakanishi, K., Yokotsuka, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **69**, 16 (1990).
- 10) Nakanishi, K., Wu, W., Yokotsuka, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, in press.
- 11) Yokotsuka, K., Makino, S., Singleton, V. L.: *Am. J. Enol. Vitic.*, **39**, 293 (1988).
- 12) Kidoron, M., Harel, F., Mayer, M.: *Am. J. Enol. Vitic.*, **29**, 30 (1978).
- 13) 日本生化学会編: *生化学実験講座* 1, p. 222 (1979).
- 14) 日本生化学会編: *生化学実験講座* 5, p. 407 (1979).
- 15) Yokotsuka, K., Yoshii, M., Aihara, T., Kusida, T.: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 510 (1977).
- 16) Lamikanra, O., Inyang, I. D.: *Am. J. Enol. Vitic.*, **39**, 113 (1988).
- 17) Hsu, J., Heatherbell, D. A.: *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 6 (1987).
- 18) Somers, T. C., Ziemelis, G.: *Am. J. Enol. Vitic.*, **24**, 47 (1973).