高濃度亜硫酸を含むブドウ果汁からの亜硫酸の除去

黒 澤 尋・前川恵美・中村和夫・天野義文

<山梨大学工学部化学生物工学科>

平成7年12月1日受理

Removal of Sulfite from Grape Juice Containing High Concentration of Sulfite

Hiroshi KUROSAWA, Emi MAEKAWA, Kazuo NAKAMURA and Yoshifumi AMANO

(Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Faculty of
Engineering, Yamanashi University, 4-3-11, Takeda
Kofu 400, Japan)

Microbial desulfurization of Koshu grape juice containing high concentration of sulfite (1,000 ppm) was investigated using *Thiobacillus thiooxidans* JCM7814, which is one of the chemoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria. The bacterial cells proved to oxidize both types of sulfite, *i.e.*, free-sulfite ($f\text{-SO}_2$) and bound-sulfite ($b\text{-SO}_2$). The oxidizing activity on $b\text{-SO}_2$ was observed over the pH range from 3.5 to 5.5, and the maximum activity was at pH 4.5. As for $f\text{-SO}_2$, the activity was observed over the pH range from 4.5 to 6.5; the maximum was at pH 5.5. The activity of sulfite oxidation was little affected by sugars and organic acids (citric, tartaric, and malic acids), which were major components of grape juice. Microbial desulfurization was also possible in the grape juice adjusted at pH from 4.5 to 5.5, in which the color was not changed. In grape juice adjusted at pH 4.5, 1,000 ppm of sulfite was almost completely removed within 3.5 hours at 30°C. The desulfurization was not accompanied by the decrease in reducing sugar, citric acid, tartaric acid, and malic acids, indicating that *T. thiooxidans* removed sulfite from grape juice containing high concentration of sulfite without changing major components.

Key words: 亜硫酸・ブドウ果汁・除去

緒 言

ワインの醸造において亜硫酸は、酸化防止、漂白、有害菌の増殖抑制、清澄の保持、ブドウ果皮からの赤色色素の溶出等の目的で使用される重要な添加剤である¹⁾。しかし、過剰な亜硫酸の摂取は健康上好ましいものではなく、その含有濃度には食品ごとに規制が設けられている。日本におけるワイン中の含有亜硫酸濃度の上限は、総亜硫酸濃度で350 ppmである。したがって、メーカーでは亜硫酸濃度を測定し、基準値以下となるように品質を管理している。しかしながら、原料ブドウの状態が悪いときやブドウ果汁を長期間保存する際には高濃度の亜硫酸を添加する必要がある。例えば、ドイツで行われているブースレゼルベ法では、果汁に1,000~1,500 ppmの亜硫酸を添加して長期間保存しておき、これを辛口の

ワインに加えることによって、甘口でフルーティーな独特のワインに仕上げている。前述のように亜硫酸の含有濃度は規制されているので、保存果汁をワインに混合する際には、亜硫酸濃度を通常のレベルに戻す必要がある²⁾。

これまでに知られている亜硫酸の除去法は、ワインについては通気や加熱により SO_2 ガスとして揮散させる方法、 SO_3^{2-} をイオン交換する方法などであるが、果汁については常圧向流蒸留法という方法がとられている^{2,3)}。この方法は大規模な設備と多くのエネルギーを必要とするため、一部の大規模な醸造所以外では行うことが難しく、日本においてブースレゼルベ法によるワイン製造法を導入する際の妨げとなっていると考えられる。したがって、安価で簡便、小規模でも実行可能な亜硫酸の除去法が確立されれば、甘口でフルーティーなワ

イン製造が可能となり、ワインの個性化や多様化につながるものと思われる。

本研究では、亜硫酸を硫酸に酸化する能力がある微生物（硫黄酸化細菌 *Thiobacillus thiooxidans*）を利用して、生物的に脱亜硫酸する新規亜硫酸除去法を確立するための基礎的検討を行った。

実験方法

1. 供試菌株

ブドウ果汁中の亜硫酸の除去には、硫黄酸化細菌の一種である *Thiobacillus thiooxidans* JCM 7814⁴⁾ を用いた。本菌はグルコースなどの有機物を資化せず、無機硫黄化合物のみをエネルギー基質として利用して生育する化学独立栄養細菌であり、亜硫酸の酸化能に優れている。

本菌の培養には、宇佐見他⁴⁾によって報告されたチオ硫酸をエネルギー基質とする改変 Starkey 培地 (5.0 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 3.0 g KH_2PO_4 , 2.0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.75 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 l 蒸留水, pH 5.0) を用いた。振盪フラスコによる種菌培養 200 ml を 1.5 l の培地を含むジャーファーマンター (東京理化 M-100) に接種し、30°C で通気攪拌培養 (0.5 vvm, 300 rpm) を行った。培養液の pH は、1.53 M の炭酸カリウム溶液を添加することによって 5.0 に制御した。また、基質であるチオ硫酸ナトリウム (1.50 M) を添加して、その濃度を一定 (20 mM) に制御した。対数増殖の後期において培養菌体を遠心分離により回収し、蒸留水で 2 回洗浄したのち、0.1 M クエン酸-NaOH 緩衝液 (pH 6.0) に懸濁して 4°C で保存した。

2. 実験材料

(1) ブドウ果汁

甲州種ブドウを除梗、圧搾して得られた果汁 (搾汁率 60%) に、 SO_2 濃度が 25 ppm となるよう亜硫酸水素ナトリウム (NaHSO_3) を添加し、-20°C で保存した。使用時に解凍して用いた。

(2) 供試ワイン

市販の甲州種ワイン (白) を用いた。

(3) 亜硫酸

遊離型として亜硫酸ナトリウム (Na_2SO_3)、亜硫酸水素ナトリウム (NaHSO_3) および SO_2 ガス、結合型としてグルタルアルデヒド亜硫酸付加物 (Aldrich 製, $\text{NaO}_3\text{SCH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{OH})\text{SO}_3\text{Na}$, 以下 $\text{G} \cdot \text{SO}_2$ と略記) を用いた。

3. 酸素吸収法による *T. thiooxidans* の亜硫酸酸化活性の測定

Rank brothers 社製酸素モニターを用いて、酸素吸収法により本菌の亜硫酸酸化活性の最適 pH を測定した。反応混合液 (全量 3.0 ml) の組成は、蒸留水 (D.W.) 1.5 ml, 0.1 M クエン酸-NaOH 緩衝液 (pH 3.0~6.5) 0.5 ml, 菌体懸濁液 ($\text{OD}_{660}=0.84$ in D.W.) 0.5 ml, 基質溶液 (5 mM EDTA $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を含む 0.05 M 亜硫酸ナトリウム溶液, または EDTA $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を含まない 0.05 M $\text{G} \cdot \text{SO}_2$ 溶液) 0.5 ml である。反応は基質を添加することによって開始し、反応温度は 30°C とした。本菌の $\text{OD}_{660}=1$ の菌体懸濁液が乾燥重量で 0.65 g-dry cell/l に相当することから、酸化活性を乾燥菌体重量当たりの比活性 ($\text{mg-O}_2/\text{g-cell} \cdot \text{min}$) で表わした。

4. *T. thiooxidans* による緩衝液系での亜硫酸の除去

0.1 M クエン酸-NaOH 緩衝液 (pH 5.5) に SO_2 濃度が 100 ppm となるよう $\text{G} \cdot \text{SO}_2$ を溶解した。この $\text{G} \cdot \text{SO}_2$ 溶液 25 ml に対し、*T. thiooxidans* の菌体懸濁液を系内での菌体濃度が $\text{OD}_{660}=1$ となるよう添加した。50 ml 容の三角フラスコで振盪 (135 rpm) しながら 30°C で 24 時間反応させたのちに、亜硫酸濃度を測定した。さらに、13.5% グルコース、0.5% 有機酸 (クエン酸, 酒石酸, リンゴ酸) を含む緩衝液においても同様の実験を行った。

5. *T. thiooxidans* によるブドウ果汁中の亜硫酸の除去

100 ml 容三角フラスコにブドウ果汁を 67 ml 入れた。ここに SO_2 として 1,000 ppm の亜硫酸を含むよう、亜硫酸水素ナトリウムを粉末添加または SO_2 ガスを吹き込み、シリコ栓を付けて 4 時間放置した。果汁の pH を 4 N NaOH で 3.0~5.5 に調整後、*T. thiooxidans* の菌体懸濁液を系内での最終濃度が $\text{OD}_{660}=10$ となるよう接種し、シリコ栓を付け振盪 (135 rpm, 30°C) し、一定時間ごとに亜硫酸濃度を測定した。亜硫酸除去処理前後の糖および有機酸の定量も行った。また、除去処理後、遠心分離 (15,000 rpm, 4°C, 10 min) により菌体を除去した果汁と市販ワインとをブレンドさせ試飲も行った。

6. 果汁の色調に及ぼす pH の影響

スペクトル分析を用いて果汁の色調を測定した。1,000 ppm の SO_2 を添加 (NaHSO_3) し、一晩放置したブドウ果汁 80 ml を遠心分離 (15,000 rpm, 4°C, 10 min) した。2 N または 4 N NaOH で pH を調整後、果汁を 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し、430 nm の吸光度を 10 mm のセルを用いて測定した。対照は蒸留水とし

た。

7. 分析方法

還元糖量は Somogyi-Nelson 法⁶⁾により定量した。亜硫酸濃度は改良ランキン法⁷⁾, SO_4^{2-} 濃度は BERTOLACINI と BARNEY⁸⁾ の方法に準じてそれぞれ定量した。pH は BECKMAN の pH メーター (型式 Φ 34) を用いて測定した。有機酸の定量は日立高速液体クロマトグラフ (ポンプ L-6000, UV検出器 L-4000, 波長 210 nm) を用いて行った。カラムサイズは 8 mm i. d. $\times$ 500 mm で、充填剤は HITACHIGEL 2618 を用いた。10 倍希釈した試料を 100 μ l 注入し、0.4% H_3PO_4 水溶液で溶出した (流速 0.5 ml/min)。カラム温度は 60°C とした。

実験結果および考察

1. *T. thiooxidans* による結合型亜硫酸の酸化

ブドウ果汁に添加された亜硫酸の一部は、果汁中の成分と結合して結合型亜硫酸 (b-SO_2) を形成する。通常、ブドウ果汁中には遊離型 (f-SO_2) と結合型 (b-SO_2) の亜硫酸が混在している。ワイン中の亜硫酸量は f-SO_2 と b-SO_2 を合わせた総亜硫酸量で規制されているので、亜硫酸の除去に際しては f-SO_2 と b-SO_2 の両方が除去されることが望まれる。*T. thiooxidans* が f-SO_2 を硫酸へ酸化することは既に知られているが⁹⁾, b-SO_2 の酸化についての知見は十分に得られていないため、ここでは *T. thiooxidans* による結合型亜硫酸の酸化について検討した。

クエン酸-NaOH 緩衝液 (pH 3.0~6.5) 中において、遊離型亜硫酸 (Na_2SO_3) と結合型亜硫酸 (G-SO_2) を基質とした場合の *T. thiooxidans* の亜硫酸酸化活性を酸素吸収法により測定した。

Fig. 1 に示したように、 b-SO_2 を基質とした場合でも

Fig. 1 Effect of pH on the sulfite-oxidizing activity of *T. thiooxidans* JCM 7814.

Reaction was done in 0.1M citrate-NaOH buffer at 30°C. The composition of the reaction mixture was as follows: 0.5 ml of the buffer, 0.5 ml of cell suspension (corresponded to 0.273 mg cells), 1.5 ml of distilled water and 0.5 ml of 0.05M Na_2SO_3 with 5mM EDTA $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (●) or 0.05M $\text{NaO}_3\text{SCH(OH)(CH}_2)_3\text{CH(OH)SO}_3\text{Na}$ without EDTA $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (▲).

酸素消費を伴う亜硫酸酸化活性が pH 3.5~5.5 の範囲で認められた。その最適 pH は 4.5 であり、 f-SO_2 を基質とした場合の最適 pH 5.5 よりも低くなった。また、最適 pH における亜硫酸の酸化速度は f-SO_2 を基質としたときの方が b-SO_2 のときよりも 2 倍ほど高かった。以上のことから、亜硫酸酸化活性の最適 pH および活性の大きさは亜硫酸の形態によって影響を受けるものの、本菌は遊離型だけでなく結合型亜硫酸も酸化可能であることが分かった。

2. *T. thiooxidans* の亜硫酸酸化に及ぼす果汁成分の影響

実際のブドウ果汁中には糖、有機酸、無機化合物など

Table 1 Effects of sugar and organic acids on sulfite oxidation of G-SO_2 by *T. thiooxidans* JCM 7814.

Compounds	Time (h)	SO ₂ conc. (ppm)			Relative activity* (%)
		f-SO ₂	b-SO ₂	Total	
Control	0	7.3	82	89	100.0
	24	0	6.3	6.3	
13.5% Glucose	0	7.3	81	88	95.0
	24	0	9.4	9.4	
0.5% Citric acid	0	9.9	77	87	102.8
	24	1.0	1.0	2.0	
0.5% Tartaric acid	0	7.6	75	83	96.1
	24	0	3.5	3.5	
0.5% Malic acid	0	7.6	76	84	70.1
	24	1.0	25	26	

* The activity of oxidizing total sulfite was indicated as % of control.

Fig. 2 Time course of sulfite concentration in untreated intact grape juice.

The pH of grape juice was not adjusted, and 70 ml of the juice was incubated at 30°C.

Symbols : ●, total sulfite ; ▲, free-sulfite ; ■, bound-sulfite.

の成分が存在している¹⁰⁾。ここでは、果汁中の含有量が比較的多い糖および有機酸が *T. thiooxidans* 亜硫酸の酸化活性に及ぼす影響について検討した。

総亜硫酸濃度として 80~100 ppm の $G \cdot SO_2$ を含む 0.1 M クエン酸-NaOH 緩衝液 (pH 5.5) に、グルコース、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸を通常の果汁中に含まれる平均的な濃度となるように添加した。ここに菌体を加え 24 時間反応させたときの亜硫酸濃度の変化を測定した。菌体を加えない場合 (菌体ブランク) では各試料とも亜硫酸濃度に変化は見られなかった。

菌体を添加した場合の亜硫酸濃度の変化を Table 1 に示した。対照 (添加物ブランク) の活性を 100% とし、添加物がある場合の活性を相対活性で示した。その結果、

13.5% グルコース、0.5% クエン酸、0.5% 酒石酸の影響は認められず、95% 以上の高い相対活性を示した。0.5% リンゴ酸を含む試料では、約 26 ppm の亜硫酸が残存した。これより、リンゴ酸は本菌の亜硫酸酸化活性を若干阻害すると考えられたが、0.5% のリンゴ酸が存在しても相対活性で約 70% の酸化活性が保持されていることから、実際の果汁においても十分な酸化活性が得られるものと考えられた。

3. *T. thiooxidans* JCM 7814 による果汁中の亜硫酸除去

実際のブドウ果汁における *T. thiooxidans* の亜硫酸除去能を検討した。

総亜硫酸濃度でおよそ 1,000 ppm の SO_2 を含む果汁 (pH 3.0~5.5) を、*T. thiooxidans* 菌体で処理し、亜硫酸濃度の変化を経時的に測定した。

Fig. 2 に示したように、菌体を添加しない通常の果汁 (pH 3.0) では、初発の総亜硫酸濃度 950 ppm が 2 日目までに 820 ppm に減少したが、それ以後は大きな変化はなく、最終的に消失した亜硫酸は約 150 ppm にすぎなかった。これに対し、果汁に菌体を添加した場合 (Fig. 3), pH を 4.5 (C), 5.0 (D) および 5.5 (E) に調整した果汁において、亜硫酸は 4~5 時間でほとんど消失した。亜硫酸の減少速度は pH を 4.5 にしたときが最も高く、約 3 時間 30 分ですべての亜硫酸が消失した。果汁の pH を 4.5 に調整して菌体を添加しない対照実験では、反応 6 日目でも総亜硫酸濃度は 690 ppm を維持しており、消失した亜硫酸は 260 ppm であった (Fig. 4)。これより、Fig. 3 における亜硫酸の減少は、pH による影響で

Fig. 3 Desulfurization in grape juice using *T. thiooxidans* JCM 7814 at various pHs (pH 3.0; A, pH 4.0; B, pH 4.5; C, pH 5.0; D, pH 5.5; E).

Grape juice (70 ml) inoculated with the bacterial cells was incubated at 30°C.

Symbols : ●, total sulfite ; ▲, free-sulfite ; ■, bound-sulfite.

Fig. 4 Time course of sulfite concentration in grape juice adjusted at pH 4.5.

The pH of grape juice was adjusted to 4.5, and 70 ml of the juice was incubated at 30°C.

Symbols: ●, total sulfite; ▲, free-sulfite; ■, bound-sulfite.

はなく菌体によるものであることが明らかとなった。また、果汁の SO_4^{2-} 濃度は、pH が 4.5~5.5 の条件下では、除去処理により 4.4 mM から約 20 mM に増加した。1,000 ppm の SO_2 がすべて SO_4^{2-} に酸化されたと仮定すると、 SO_4^{2-} 濃度は 15.6 mM 増加することになる。したがって、果汁中の亜硫酸は菌体により硫酸に酸化されたものと考えられる。

以上の結果より、*T. thiooxidans* による果汁中の亜硫酸除去には pH 4.5 が最適であることが示された。また、データは示していないが、シャルドネ種やリースリング種の果汁についても同様に亜硫酸を除去することができた。

なお、本実験を通し、改良ランキン法による初発の亜硫酸濃度測定値は理論値 (1,000 ppm) よりも 50~250 ppm ほど低くなる傾向が見られた。また、果汁に菌体を添加しない場合でも、日数が経つにつれ亜硫酸の消失が見られた。これは、亜硫酸が果汁中のフェノール類と不可逆的に結合し、改良ランキン法では検出できない物質に変化したためである¹¹⁾と思われる。さらに、一部の亜硫酸は自然酸化や還元化合物への移行によって消失したもの¹²⁾と考えられる。

4. 果汁の色調に及ぼす pH の影響

菌体を用いた亜硫酸の除去には、pH 調整を行う必要があることが示された。白ワイン用の品種については、褐変等による色調の変化が問題とされるので、ここでは 1,000 ppm の SO_2 を添加した果汁を用いて果汁の色調に及ぼす pH の影響を検討した。pH 調整を行う前の果汁の pH は 3.3 であり、薄黄色を有していた。Fig. 5 に示されるように、pH が 7.0 までは色調はほとんど変化せず、それ以上の pH 域では急激に色調が濃黄色へと変化した。ここには示していないが、100 ppm- SO_2 添加

Fig. 5 Effect of pH on the color of grape juice containing high concentration of sulfite.

The grape juice was adjusted at each pH with either 2N or 4N sodium hydroxide solution and measured for absorbance at 430 nm.

果汁でもほぼ同様の傾向を示した。亜硫酸無添加果汁では、pH 調整を行わなくても褐変が進行するが、亜硫酸を添加することにより pH 7.0 までは色調を維持可能であることが分かった。

5. 亜硫酸除去処理が及ぼす還元糖および有機酸への影響

果汁には糖や有機酸などワイン品質にかかわる様々な成分が含まれている。糖と酸の絶妙なバランスがブースレゼルベ法によるワインの最大の特徴であるため、亜硫酸除去処理がこれら成分に影響を及ぼすことはあまり好ましいことではない。酒石酸やリンゴ酸はワインの酸味に最も大きく関与する酸成分であると言われている。したがって、菌体による亜硫酸除去処理が果汁の主成分である糖や有機酸（クエン酸、酒石酸、リンゴ酸）にどのように影響するのか検討した。

Table 2 に示したように、還元糖や有機酸量は処理前後でほとんど変化が見られなかった。これは、*T. thiooxidans* は独立栄養細菌であり、糖や有機酸を酸化しないためである。顕著な減少がどの成分にも認められなかったため、糖や有機酸への影響はないと考えられた。

ブースレゼルベ法では、ワインの仕上げの際に全量の 25% 以内の果汁を加えて甘味度の調整を行っている。

Table 2 Changes in the concentration of major compounds in grape juice by desulfurization.

Compounds (g/l)	Desulfurization treatment	
	Before	After
Reducing sugar	137	136
Citric acid	0.5	0.7
Tartaric acid	5.6	6.4
Malic acid	6.0	6.7

そこで、高濃度の亜硫酸 (1,000 ppm) を *T. thiooxidans* 菌体により除去した果汁と市販の甲州種辛口ワイン (白) とをブレンドして調製したもの (処理果汁含量 25%) を、経験のある 5 名のパネルによってきき酒試験を行ったところ、pH 調整や微生物菌体に起因する異臭はほとんど感じられず、色調も良好で、甘口でフルーティーであるとの評価が得られた。

以上の結果より、高濃度の亜硫酸を含むブドウ果汁からの亜硫酸の除去に、独立栄養性の硫黄酸化細菌 *T. thiooxidans* を利用することが有効であることが示された。しかし、現状では、菌体による亜硫酸酸化を促すために、果汁の pH を調整する必要がある。このことは、本法を実用化する上での問題点となると考えられるが、より低 pH 域で機能する酵素や菌体のスクリーニングを行うことによって解決できるものと思われる。微生物菌体による亜硫酸除去法は、従来法 (常圧向流蒸留法) に比べ大規模な設備を必要とせずに行えるため、小規模のワイナリーでも実行可能であると思われる。果汁を一時保存するには冷凍、不活性ガス置換等の方法が使用されているが、亜硫酸を併用することで腐敗に対する安全性はより確実になる。このような場合、ある程度高濃度の亜硫酸を使用しても、それを小規模で確実に除去できる方法が保障されれば、ブドウ果汁の利用範囲はさらに拡大し、また、効率的な利用が期待できる。

要 約

化学独立栄養性の硫黄酸化細菌の一種である *T. thiooxidans* を利用して、高濃度の亜硫酸を含むブドウ果汁から亜硫酸を除去するための検討を行った。本菌は遊離型 (f-SO₂) および結合型亜硫酸 (b-SO₂) の両方を酸化することが可能であった。結合型亜硫酸の酸化活性は、pH が 3.5~5.5 の範囲において認められ、最適 pH は 4.5 であった。遊離型は、pH 4.5~6.5 の範囲において活性が認められ、最適 pH は 5.5 であった。本菌の亜硫酸酸化活性は果汁中の主要成分であるグルコースや有機酸 (クエン酸、酒石酸、リンゴ酸) によってほとんど阻害されなかった。ブドウ果汁からの亜硫酸の除去は、果汁の pH が 4.5~5.5 の範囲において可能であることが分かった。このとき、pH 調整による色調の変化は見ら

れなかった。pH を 4.5 に調整した果汁では、高濃度の亜硫酸 (1,000 ppm-SO₂) が、3.5 時間でほぼ完全に除去できた。亜硫酸除去処理前後の還元糖およびクエン酸、酒石酸、リンゴ酸量を比較したところ、差は認められなかった。これより、*T. thiooxidans* 菌体により果汁中に高濃度に含まれる亜硫酸が主要成分を変化させることなく除去されたことが示された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり有機酸の分析に御協力いただいた山梨県工業技術センター乙黒親男主任研究員に深謝申し上げます。

文 献

- 1) 横塚弘毅：ワインの製造技術，p.79，山梨日日新聞社 (1994)
- 2) G. TROOST : *Technologie des Weines*, p.340-345, Eugen Ulmer, Stuttgart (1988)
- 3) J. FARKAS : *TECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF WINE* VOLUME 1, p.384, Gordon and Breach Science Publishers, New York (1988)
- 4) N. WAKAO, K. HANADA, A. TAKAHASHI, Y. SAKURAI and H. SHIOTA : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 37, 35-48 (1991)
- 5) 宇佐見昭次，木野邦器，黒田和彦，杉本信幸：醸酵工学，58, 123-129 (1980)
- 6) 安藤鋭郎，寺山 宏，西沢一俊，山川民夫：生化学研究法 I，p.256，朝倉書店 (1974)
- 7) 国税庁訓令：国税庁所定分析法，p.27-37，国税庁 (1991)
- 8) R. J. BERTOLACINI and J. E. BARNEY : *Anal. Chem.*, 29, 281-283 (1957)
- 9) D. P. KELLY : *Autotrophic Bacteria*, Ed. H. G. Schlegel and B. Bowien, p.193-217, Springer-Verlag, Berlin (1989)
- 10) 穂積忠彦：洋酒工業，p.127，光琳書院 (1967)
- 11) Y. MITSUHASHI, T. HAMANO, A. HASEGAWA, K. TANAKA, Y. MATSUKI, T. ADACHI, K. OBARA, H. NONOGI, T. FUKE, M. SUDO, M. IKUZAWA, K. FUJITA, T. IZUMI, S. OGAWA, M. TOYODA, Y. ITO and M. IWAIDA : *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 168, 299-304 (1979)
- 12) R. ESCHENBRUCH : *Am. J. Enol. Vitic.*, 25, 157-161 (1974)