

## [ 研 究 報 文 ]

## 有機溶媒中でのカフタリック酸キノンの合成

奥田 徹<sup>1</sup>・大藪伸也<sup>2</sup>・久本雅嗣<sup>1</sup>・高柳 勉<sup>1</sup>・横塚弘毅<sup>1</sup><sup>1</sup>山梨大学大学院医学工学総合研究部ワイン・クリスタル系 (ワイン科学研究センター)<sup>2</sup>山梨大学大学院医学工学総合教育部自然機能開発専攻

〒400-0005 甲府市北新 1-13-1

## Formation of Quinone by Oxidation of Caffeoyltartaric acid in Organic Solvent

<sup>1</sup>Tohru OKUDA, <sup>2</sup>Shinya OYABU, <sup>1</sup>Masashi HISAMOTO, <sup>1</sup>Tsutomu TAKAYANAGI,  
and <sup>1</sup>Koki YOKOTSUKA<sup>1</sup>Department of Research and Department of Education of Graduate School of Medical and Engineering Science,  
and The Institute of Enology and Viticulture, University of Yamanashi, Kitashin, Kofu, 400-0005, Japan

The oxidation of caffeoyltartaric acid (CA) to caffeoyltartaric acid quinone (CQ) in organic solvent was investigated. CA is the major phenol compound in grape, and CQ, the oxidized product of CA, is considered to be the most important compound that affects the color and taste of grape juice or wine. CA was oxidized to quinone with *o*-chloranil as the oxidizing agent in chloroform at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The reaction product was yellow in color and showed absorption maxima at 256, 306, and 400 nm. This product was converted into CA by reduction with ascorbic acid, and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (APCIMS) analysis indicated a molecular weight of 310. From these results, the product was identified as CQ. CQ was stable in chloroform for 360 min at  $-20^{\circ}\text{C}$ , but was very unstable in an aqueous solution.

**Keywords:** oxidation, quinone, polyphenol, wine, caffeoyltartaric acid.

## 緒 言

ワイン中のフェノール化合物は、色や呈味 (苦味や収斂みなど) を与える感覚・嗜好性機能を持つだけでなく、また抗酸化活性を持ち健康に対する効果の点からも重要な成分である。ワインに含まれるフェノール化合物の大部分はブドウ由来であり、ワイン製造において果汁の压榨時より瓶詰め後の熟成期間まで、徐々に酸化され、構造変化が起こることが知られている(1, 10, 20, 22, 23, 25, 28)。

フェノール化合物の酸化反応は、2つの過程に分けて考えることができる (Fig. 1)。第1の過程ではフェノール化合物が対応するキノンに酸化される反応で、果汁中では主としてポリフェノールオキシダーゼ (Polyphenol oxidase, PPO) がこの反応を触媒する(16,

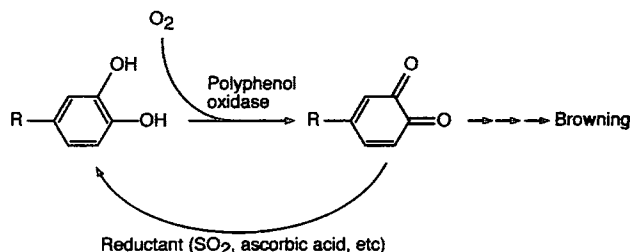


Fig. 1. Oxidation reaction of phenols.

32-34)。第1の反応で生成したキノンは、第2の反応過程で他のフェノールを酸化したり(23)、またそれら自身が非常に複雑な非酵素反応を経て、最終的に褐色の縮合化合物が生成する。

ブドウ果汁中に多く存在するカフタリック酸 (Caffeoyltartaric acid, CA) は、PPO との親和性が高く、速やかにカフタリック酸キノン (Caffeoyltartaric acid quinone, CQ) が生成する (Fig. 2)。通常は PPO の基質

2005年5月10日受理

となりにくいアントシアニン等の化合物も、CQ と反応することにより共役酸化をうけ、脱色等の現象が生じると考えられている(5, 12, 14-15, 18-19, 35)。一方、果汁中に還元型グルタチオンが存在する場合、CQ はグルタチオンと結合し、2-S-グルタチオニルカフタリック酸を生じ、酸化の進行が遅延される(6-8, 17, 21, 26, 29, 31)。

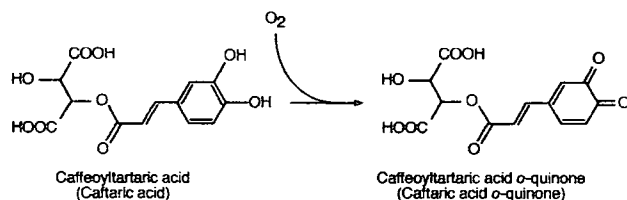


Fig. 2. Oxidation of caffeoyltartaric acid to caffeoyltartaric acid quinone.

このように、CA の酸化により生成する CQ の反応性は高く、様々な反応様式が考えられるため重要である。さらに、これらの反応は PPO 活性が無い状態でも非酵素的に起こると考えられ、瓶内でのフェノール化合物の酸化重合反応を理解する上でも重要である(2, 10, 22, 24)。

これまで多くの研究者がキノンの反応機構を解明するために、数々の実験を行ってきた。これらの研究は CA 等のフェノール化合物を出発物質として、PPO による酵素的酸化によりキノンを生成し、共存させた他のフェノール化合物との反応性を見る実験や、フェノール化合物を水溶液中で酸素と反応させる実験であった(3, 4, 6, 9, 12, 23, 35)。しかし、ベンゼンスルフィン酸などによる誘導体化を用いずに、生成する CQ を検出することは困難であり、生成物も多種類検出され、キノ分子からの酸化反応機構を特定するには至っていない。これは、生成したキノンが水溶液中で非常に反応性に富み、目的の化合物以外の物質とも容易に反応するためであり、共存する水分子や PPO 酵素の基質となるフェノール化合物、生成したキノン同士が反応に関与すると考えられる。フェノール化合物の酸化反応の機構を理解するためには、これらの共存する化合物数を減らし、キノンがどのような化合物と反応をおこし、生成物がどのような構造になるのかを詳細に検討する必要がある。このためにはキノン分子を安定な状態で得る必要があった。

水溶液中で PPO の酵素反応を利用してキノンを生成した場合、キノン分子は直ちに別の化合物に変化す

る。しかし、水分子を含まない有機溶媒中では、フェノール化合物からキノン分子を比較的安定に調製した報告がある(11, 13)。そこで、本研究では、有機溶媒中でのフェノール化合物の酸化反応により、CQ の合成反応を行い、安定な状態でキノン分子を獲得することを目的とした。

## 材料と方法

### 試薬及び機器

CA はワインより下記の方法により調製した(下記参照)。*o*-クロラニルはシグマ=アルドリッチ株式会社のもを用いた。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

HPLC システムは、Hitachi 製(L-7100 ポンプ、L-7405 検出器、D-7500 インテグレーター)(L-6200 ポンプ、L-4200 検出器、D-2500 インテグレーター)のもを用いた。APCIMS(大気圧化学イオン化質量分析)は M-1200AP 質量分析装置(Hitachi)を、<sup>1</sup>H-NMR は AV400M Digital NMR (Bruker) 用いた。

### ブドウ果汁の酸化

甲州種ブドウは、山梨大学ワイン科学研究センター附属育種試験地で栽培したもの(約 17° Brix)を用いた。予め 4°C で十分に冷却したブドウ果実(約 40 g)を二重のガーゼで圧搾(搾汁率約 50%)し、果汁を得た。得られた果汁は 4°C で 100 mL 容のビーカー中でマグネティックスターラーにより緩やかに攪拌・酸化させた。酸化中の果汁をサンプリングし、18,600×g で 1 分間遠心分離し、得られた上清を 0.20 μm のフィルター(ANOTOP10、Whatman 社)で濾過後、HPLC によりフェノール化合物を分析した。

### HPLC による果汁フェノール化合物の分析

濾過後の試料(20 μL)を以下の条件で分析した。

カラムには Bondasphere (ODS), (5 μm, 3.9 mm×150 mm, Waters 社)を用いて、流速 0.9 mL/min、検出波長 280 nm とした。溶出には 0.4%リン酸-アセトニトリルの濃度勾配を用い、アセトニトリルの濃度は 0 分は 8%、5-10 分は 22%、25 分で 49%、30 分で 80%となるように設定した。

## CA の抽出

キノンの生成に用いる CA は、山梨大学ワイン科学研究センターで 2000 年に製造された甲州種ワインより、Singleton らの方法に従って調製した(27)。すなわち、甲州ワイン 1 L に二亜硫酸カリウムを 2 g/L となるように添加後、ロータリーエバポレーターで約 1/10 量まで減圧濃縮した。予め 50 mM 酒石酸緩衝液 (pH 2.3) で分配平衡化 (室温) した酢酸エチルを濃縮ワインに等量添加し、分液漏斗中室温で十分に混合し、酢酸エチル層を得た。水層に平衡化した酢酸エチルを再度添加し、合計 3 回の抽出を行った。得られた酢酸エチル層を濃縮し、約 5 mL の抽出液を得た。

## Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーによる CA の分離・精製(27)

得られた抽出液を 50 mM 塩酸-0.2% 酢酸溶液で予め平衡化した Sephadex LH-20 カラム (2.6 i. d. × 70 cm) にアプライし、同溶液 (100 mL) 及び 0.2% 酢酸溶液 (1.5 L) で溶出し、溶出液を 18 mL ずつフラクションコレクターで分画した。各フラクションの吸光度 (280 nm 及び 320 nm) を測定し、CA のピークを合わせ、凍結乾燥して、乾燥粉末を得た。

## o-クローラニルによる CA の酸化反応

5.0 mM の CA (無水メタノール溶液) と 50 mM の o-クローラニル (無水メタノール溶液) を作成し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で冷却した。予め  $-20^{\circ}\text{C}$  で冷却したクロロホルム 1.6 mL に 5.0 mM CA 溶液と 50 mM o-クローラニル溶液をそれぞれ 200  $\mu\text{L}$  ずつ添加し、直ちに混合し、 $-20^{\circ}\text{C}$  の寒剤 (氷と塩化ナトリウム) 中で反応させた。なお、長時間 (1 時間以上) の保存が必要な場合は、 $-80^{\circ}\text{C}$  のフリーザー中で保存した。

## HPLC による酸化反応生成物の確認

反応液 (20  $\mu\text{L}$ ) 中の酸化反応生成物を以下の条件で分離・分析した。

LiChrospher 100RP-18 (ODS) (5  $\mu\text{m}$ , 4.0 mm × 250 mm, Merck 社) カラムを用い、流速 0.9 mL/min で溶出を行ない、検出波長 280 または 420 nm で溶出液をモニターした。溶出には 0.4% リン酸-アセトニトリルの濃度勾配を用い、アセトニトリルの濃度は 0 分で 8%、5-10 分で 22%、25 分で 49%、30 分で 80% となるように

設定した。

## 結果と考察

### 甲州果汁を酸化中のフェノール化合物の変化

甲州種ブドウ果汁を  $4^{\circ}\text{C}$  で酸化させ、フェノール化合物の変化を HPLC で調べた (Fig. 3)。圧搾直後 (3 分) では、CA 及びクータリック酸が主要なフェノール化合物であった。しかし、これらの化合物は酸化の進行に伴って急速に減少し、6 時間後にはほとんど認められなかった。これらの結果から、CA とクータリック酸は急速に酸化されたと考えられた。

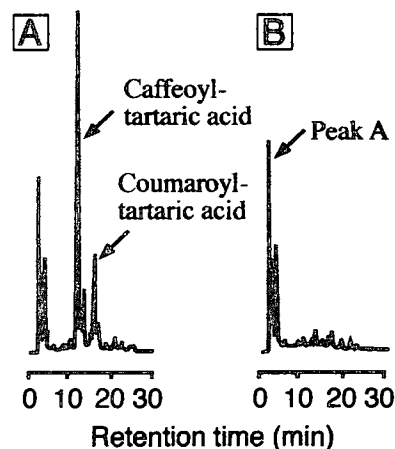


Fig. 3. Changes in phenols during oxidation of Koshu grape juice by stirring in air for 3 min (A) and 360 min (B) after pressing.

また、ピーク A 以外のピークは、反応の進行中にも増加が認められず、酸化反応の生成物は速やかに不溶化したと考えられた。また、これらの化合物の酸化過程で生じると考えられる CQ のピークは、420 nm での検出においても確認できなかった。CA 及びクータリック酸の濃度は、圧搾直後ではそれぞれ約 170 mg/L 及び 25 mg/L の濃度であり、全フェノール化合物濃度 (320 mg 没食子酸換算/L) の約 53% 及び 8% であった。以上の結果から、酸化に大きな影響を与えるフェノール化合物は、従来の報告と同様に CA であることが考えられた。

### 甲州ワインからの CA の調製

CA のキノンについて研究を行うためには、充分な量の CA を調製する必要があった。そこで、甲州ワインから CA を抽出し、Sephadex LH-20 カラムにより分離・精製した。Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフ

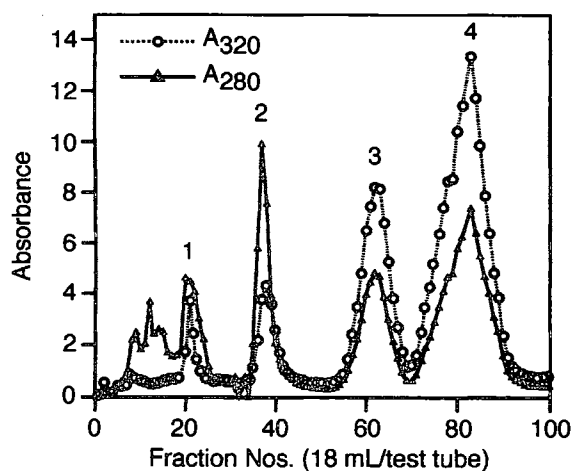


Fig. 4. separation of caffeoyltartaric acid on Sephadex LH-20 column.

をを行った結果、320 nm の吸収は大きく 4 つのピークに分かれた (Fig. 4)。CA と推定されるピーク 4 を集め、凍結乾燥後、極大吸収波長の解析(27)、 $^1\text{H-NMR}$  分析により、CA であることを確認した。

#### 有機溶媒中での CA の酸化反応

ブドウ果汁中では、CA は通常、PPO 酵素により CQ に酸化され、次に生成したキノン分子は、直ちに非酵素的な反応により種々の化合物へ変化する。そこで、キノン分子を安定に得るためには、水分子を含まない状態で非酵素的に CA を CQ に酸化する必要があると考えた。フェノール化合物からの酸化反応をキノン分子で止める必要があるため、穏やかな酸化作用を持つ酸化剤として、*o*-クロラニルを選択した。*o*-クロラニルはコーヒー酸をコーヒー酸キノンへ酸化した反応例

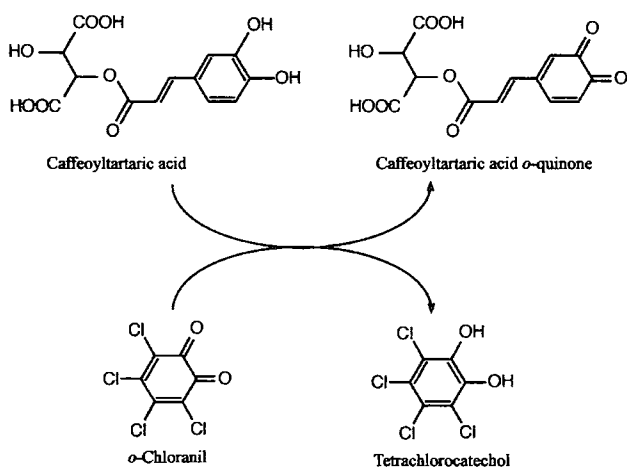


Fig. 5. Oxidation of caffeoyltartaric acid with *o*-chloranil and its reaction products.

が報告されており(11)、CA の酸化反応には適していると考えられた。CA と *o*-クロラニルの予想される反応式を Fig. 5 に示した。

酸化反応に用いた CA 及び *o*-クロラニルを HPLC で分析した (Fig. 6)。なお、順相系 (シリカゲルカラム) での分離も試みたが、化合物の分離が悪いため、逆相系 (ODS) で分析を行った。甲州ワインから調製した CA は、CA に相当するピーク以外何も見られないことから非常に純度が高いことが明らかになった (Fig. 6A)。一方、*o*-クロラニルは 420 nm の検出波長では単一のピークを示したが、280 nm の検出波長では若干の不純物が検出された (Fig. 6B)。

Davies(11)はテトラヒドロフラン/ジエチルエーテル中で、*o*-クロラニルを用いてコーヒー酸を酸化し、コーヒー酸キノンを結晶化したと報告している。この方法に基づいてコーヒー酸及び CA の酸化を試みたが、得られた化合物は直ちに黒色に変化し結晶化は困難であった。しかし、反応条件を検討した結果、溶媒をクロロホルムとし、反応温度を  $-20^\circ\text{C}$  以下に下げた場合、反応液がオレンジ色に変色したことから、反応が進行していると考えられた。そこで反応後の溶液を HPLC で分離したところ、280 nm で検出したクロマトグラム

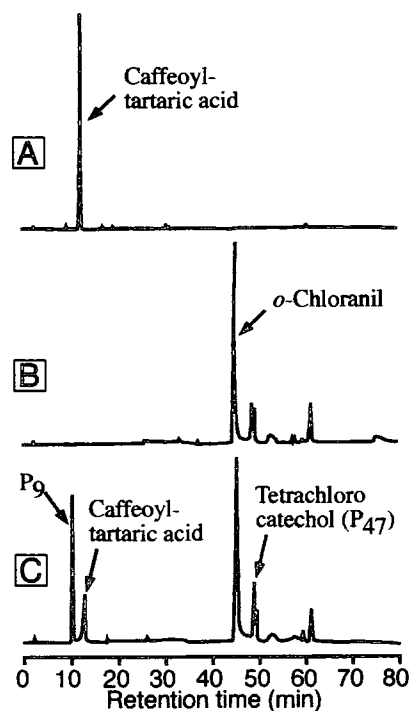


Fig. 6. HPLC of caffeoyltartaric acid (A), *o*-chloranil (B), and their reaction products (C) detected at 280 nm.

には、生成物と考えられる新しいピークが二つ（溶出時間9分と47分、Fig. 6C中でそれぞれP9及びP47と示した）認められた（Fig. 6C）。溶出時間47分のピーク（P47）は、市販のテトラクロロカテコールと溶出時間が一致することから、Fig. 5の反応式で生成物の一つとして考えられたテトラクロロカテコールであると判断した。検出波長が420 nmの場合は、溶出時間

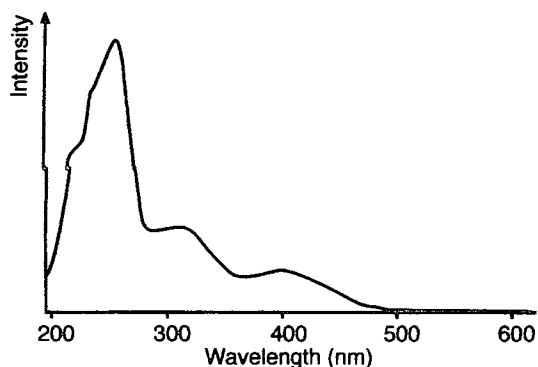


Fig. 7. Absorption spectrum of P9.

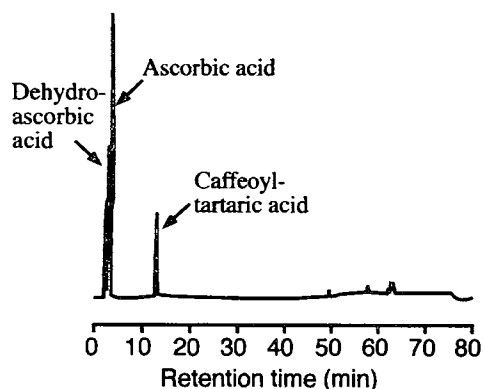


Fig. 8. Products of reduction of P9 with ascorbic acid.

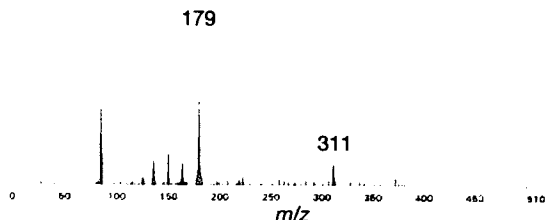


Fig. 9. Molecular weight determination of P9 using APCIMS (positive).

が9分のピークと $\alpha$ -クロラニルが検出された。そこでP9の極大吸収波長をダイオードアレイ検出器で測定した。その結果、256、306、及び400 nmに極大波長が観察された（Fig. 7）。一般にキノ分子は400 nm付近に吸収をもつ化合物が多いことから、P9がキノ分子であることが示唆された。

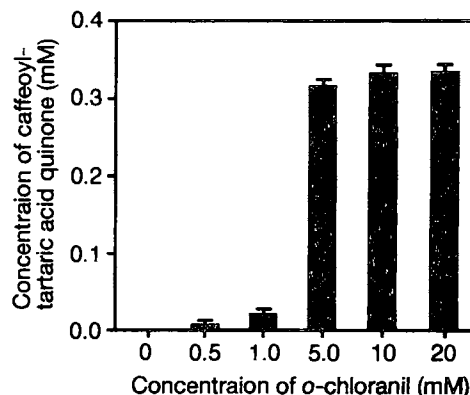
キノ分子は一般に還元すると元のフェノール化合物になることが知られている(23, 30) (Fig. 1)。そこで、予めアスコルビン酸を入れた試験管に、P9を分取し、反応液を再度HPLCで分離・分析した（Fig. 8）。その結果、CAと同じ溶出時間にピークが認められた。

さらにP9の分子量をAPCIMS（Positiveモード）で分析し、分子量を決定した。本化合物は $m/z = 311$  [M+H]<sup>+</sup>であり、 $m/z = 179$  [M+H]<sup>+</sup>のフラグメントピークも検出された（Fig. 9）。フラグメントピークは酒石酸エステルが加水分解された状態を示しており、従って、本化合物の分子量は310であり、CQと一致した。

以上の実験結果から、P9はCQであると決定した。HPLCから分取したCQ溶液は黄色を呈していたが、分取後1~2分以内に無色透明に変化した。また、分取した液を30秒以内にHPLCで分析した場合、CQはわずかしが認められなかった。これらの実験結果から、生成したCQは水溶液中では非常に不安定であり、単離することは困難であると考えられた。

#### CQの反応条件

次にクロロホルム中でCAと $\alpha$ -クロラニルを混合した場合の収率について検討した。反応温度は-20℃とした。CA濃度を0.5 mM（終濃度）に対して添加する $\alpha$ -

Fig. 10. Formation of caffeoyltartaric acid quinone by oxidation of caffeoyltartaric acid (0.5 mM) with various concentrations of  $\alpha$ -chloranil.

クロラニルの濃度を0.5~20 mMまで変化させたときの生成するCQの生成量をFig. 10に示した。CAと $\sigma$ -クロラニルは1:1で反応すると考えられるが(Fig. 5)、両化合物の終濃度がともに0.5 mMの場合、生成するCQの濃度は非常に低かった。一方、 $\sigma$ -クロラニル濃度が5 mM以上の場合CQの生成量は急激に増え、約70%の高い収率となった。

### CQの安定性

Daviesはコーヒー酸と、 $\sigma$ -クロラニルから得たコーヒー酸キノンは $-20^{\circ}\text{C}$ 以上の温度では、有機溶媒中であっても不安定であると報告している(11)。そこで、反応液中でのCQの安定性を調べた。 $-20^{\circ}\text{C}$ で反応させた反応液を $25^{\circ}\text{C}$ 、 $0^{\circ}\text{C}$ 、及び $-20^{\circ}\text{C}$ で保存し、反応溶液中のCQ濃度の経時変化を調べた(Fig. 11)。 $25^{\circ}\text{C}$ で保存した場合、急速なキノンの分解が認められ、360分後にはキノンのピークは認められなくなった。

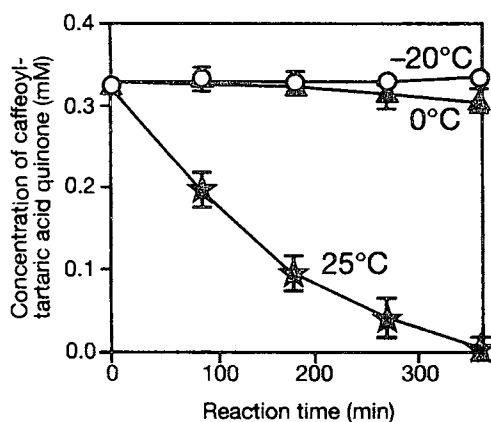


Fig. 11. Stability of caffeoyltartaric acid quinone in chloroform at  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $0^{\circ}\text{C}$ , or  $25^{\circ}\text{C}$ .

なお、キノンの分解に伴い、多くの新しいピークが検出されるようになった。これらのピークは酸化の促進によって生成した化合物と考えられた。また、 $0^{\circ}\text{C}$ での保存では、若干のCQの分解が認められたが、 $-20^{\circ}\text{C}$ での保存では360分までは分解は認められず、生成したCQは安定であった。以上の結果から、有機溶媒中でもCQは安定ではないが、温度が $-20^{\circ}\text{C}$ であれば、かなり安定にCQを保存できることが確認された。

以上の実験結果から、有機溶媒中でCAを $\sigma$ -クロラニルにより酸化することでCQを安定な状態で得ることができた。また、本反応の収率は70%程度と高く、

十分な量のCQを得ることが可能となった。得られたキノンは、ODSカラムで容易に分離され、ピークを分取することでCQ溶液を得ることが可能であったが、得られた溶液は速やかに変化した。水分子を含まない溶液中で反応液からCQだけを分離することが可能になれば、キノン分子からの褐変現象を逐次的に解析することが可能になると考えられる。

### 要約

ブドウ果汁及びワインの色調や呈味に大きな影響を与えると考えられるCQの酸化機構を解明するために、CAからCQを安定に調製する方法を検討した。本実験ではクロロホルム中で、CAを $\sigma$ -クロラニルにより酸化し、反応液をHPLCで分離した。生成物は黄色を呈し、400 nmに極大吸収を持つ化合物であった。この化合物をアスコルビン酸で還元したところ、CAの生成が確認された。さらに、質量分析を行なった結果、本化合物の分子量は310であり、これらの結果から本化合物はCQであると考えられた。CQは水溶液中で不安定であったが、クロロホルム中で低温( $-20^{\circ}\text{C}$ )では安定であった。

### 謝辞

本実験を行なうにあたり、山梨大学大学院医学工学総合研究部(応用化学科)の七澤真人教授に貴重な助言を頂きました。また、質量分析には大阪市立大学大学院生活科学研究科の菊崎泰枝助教授に協力して頂きました。両先生に深く感謝します。本実験の一部は平成16年度山梨大学工学系学域研究推進基金により遂行した。

### 文献

1. Bakker, J. and C.F. Timberlake. The mechanism of colour changes in aging port wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 37:288-292 (1986).
2. Baron, R., M. Mayen, J. Merida and M. Medina. Changes in phenolic compounds and browning during biological aging of sherry-type wine. *J. Agric. Food Chem.* 45:1682-1685 (1997).
3. Cheynier, V. and M. Moutounet. Oxidative reactions of caffeic acid in model systems containing polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 40:2038-2044 (1992).

4. Cheynier, V., C. Osse and J. Rigaud. Oxidation of grape juice phenolic compounds in model solutions. *J. Food Sci.* 53:1729-1732 (1988).
5. Cheynier, V. and J.M. Ricardo-da-Silva. Oxidation of grape procyanidins in model solutions containing trans-caffeoyltartaric acid and polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 39:1047-1049 (1991).
6. Cheynier, V., J. Rigaud and M. Moutounet. High-performance liquid chromatographic determination of the free o-quinones of trans-caffeoyltartaric acid, 2-s-glutathionylcaffeoyltartaric acid and catechin in grape must. *J. Chromatography* 472:428-432 (1989).
7. Cheynier, V., J.M. Souquet and M. Moutounet. Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 40:320-324 (1989).
8. Cheynier, V.F. and M.W.J.V. Hulst. Oxidation of trans-caftaric acid and 2-s-glutathionylcaftaric acid in model solutions. *J. Agric. Food Chem.* 36:10-15 (1988).
9. Chillers, J.J.L. and V.L. Singleton. Characterization of the products of nonenzymatic autooxidative phenolic reactions in a caffeic acid model system. *J. Agric. Food Chem.* 39:1298-1303 (1991).
10. Danilewicz, J.C. Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper. *Am. J. Enol. Vitic.* 54:73-85 (2003).
11. Davies, R. The synthesis and isolation of caffeoquinone and caffeoquinone methylester. *Tetrahedron Lett.* 4:313-314 (1976).
12. Kader, F., J.-P. Haluk, J.-P. Nicolas and M. Metche. Degradation of cyanidin 3-glucoside by blueberry polyphenol oxidase: Kinetic studies and mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* 46:3060-3065 (1998).
13. Kader, F., M. Irmouli, J.P. Nicolas and M. metche. Proposed mechanism for degradation of pelargonidin 3-glucoside by caffeic acid o-quinone. *Food Chem.* 75:139-144 (2001).
14. Kader, F., M. Irmouli, J.P. Nicolas and M. Metche. Involvement of blueberry peroxidase in the mechanisms of anthocyanin degradation in blueberry juice. *J. Food Sci.* 67:910-915 (2002).
15. Kader, F., J.-P. Nicolas and M. Metche. Degradation of pelargonin 3-glucoside in the presence of chlorogenic acid and blueberry polyphenol oxidase. *J. Sci. Food Agric.* 79:517-522 (1999).
16. Okuda, T., A.G. Pue, K. Fujiyama and K. Yokotsuka. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Muscat Bailey A grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 50:137-143 (1999).
17. Okuda, T. and K. Yokotsuka. Levels of glutathione and activities of related enzymes during ripening of Koshu and Cabernet Sauvignon grapes and during winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.* 50:264-270 (1999).
18. Pifferi, P.G. and R. Cultrera. Enzymatic degradation of anthocyanins: The role of sweet cherry polyphenol oxidase. *J. Food Sci.* 39:786-791 (1974).
19. Raynal, J. and M. Moutounet. Intervention of phenolic compounds in plum technology. 2. Mechanisms of anthocyanin degradation. *J. Agric. Food Chem.* 37:1051-1053 (1989).
20. Ribereau-Gayon, P., Y. Glories, A. Maujean and D. Dubourdieu. Phenolic compounds, in *Handbook of Enology volume 2*, Wiley (New York), (2000)
21. Rigaud, J., V. Cheynier, J.-M. Souquet and M. Moutounet. Influence of must composition on phenolic oxidation kinetics. *J. Sci. Food Agric.* 57:55-63 (1991).
22. Rossi-Jr., J.A. and V.L. Singleton. Contributions of grape phenols to oxygen absorption and browning of wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 17:231-239 (1966).
23. Singleton, V.L. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: Observations and practical implications. *Am. J. Enol. Vitic.* 38:69-77 (1987).
24. Singleton, V.L. and T.E. Kramling. Browning of white wines and an accelerated test for browning capacity. *Am. J. Enol. Vitic.* 27:157-160 (1976).
25. Singleton, V.L. and J.A. Rossi. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144-159 (1965).
26. Singleton, V.L., M. Salgues, J. Zaya and E. Trousdale. Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymatic oxidation in grape must and wine. *Am. J.*

- Enol. Vitic. 36:50-56 (1985).
27. Singleton, V.L., C.F. Timberlake and A.G.H. Lea. The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *J. Sci. Food. Agric.* 29:403-410 (1978).
  28. Singleton, V.L., E. Trousdale and J. Zaya. Oxidation of wines. I. Young white wines periodically exposed to air. *Am. J. Enol. Vitic.* 30:49-54 (1979).
  29. Singleton, V.L., J. Zaya, E. Trousdale and M. Salgues. Caftaric acid in grapes and conversion to reaction product during processing. *Vitis* 23:113-120 (1984).
  30. Toscano, G, M.L. Colarieti and G. Greco-Jr. Oxidative polymerisation of phenols by phenol oxidase from green olives. *Enzyme Microbial Technol.* 33:47-54 (2003).
  31. Yokotsuka, K. Effect of press design and pressing pressure on grape juice components. *J. Ferment. Bioeng.* 70:15-21 (1990).
  32. Yokotsuka, K., S. Makino and V.L. Singleton. Polyphenol oxidase from grapes: Precipitation, re-solubilization and characterization. *Am. J. Enol. Vitic.* 39:293-301 (1988).
  33. Yokotsuka, K., K. Nozaki and T. Kushida. ブドウマスト中のポリフェノールオキシダーゼ活性. *J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ.* 18:1-6 (1983).
  34. Yokotsuka, K., T. Shimizu and T. Shimizu. Polyphenoloxidase from six mature grape varieties and their activities towards various phenols. *J. Ferment. Bioeng.* 71:156-162 (1991).
  35. Yokotsuka, K. and V.L. Singleton. Disappearance of anthocyanins as grape juice is prepared and oxidized with PPO and PPO substrates. *Am. J. Enol. Vitic.* 48:13-25 (1997).