

## [ Research Note ]

## 硫黄酸化細菌を用いた高濃度亜硫酸を含むワインからの亜硫酸除去

中村和夫\*・木村里絵

山梨大学大学院医学工学総合研究部 〒400-8511 甲府市武田 4-3-11

## Sulfite Removal from Wine Containing High Concentration of Sulfite by Sulfur-oxidizing Bacterium

Kazuo NAKAMURA\* and Rie KIMURA

Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi,  
Takeda, Kofu, Yamanashi 400-8511, Japan

*Acidithiobacillus caldus* ATCC51756 was used for the removal of sulfite from wine containing a high concentration of sulfite. The oxidation of sulfite by the cells occurred in the pH range of wine and grape juice. Percentage sulfite removal exceeded 50% in the pH range of 2.5 to 3.5 and 77% removal was achieved at pH 3.5. The optical density at 660 nm of the cells for the efficient removal of sulfite was 10.0 in the reaction mixture. The sulfite removal was not affected by the major components in wine. The percentage removal of sulfite from white wine containing a high concentration of sulfite reached 91% after a 6 h processing time without any pH adjustment of the wine.

**Key words :** *Acidithiobacillus caldus*, removal, sulfite, wine

## 緒言

食品工業において、亜硫酸およびその塩類は漂白、酸化防止などの効果を有し、食品添加物として広く用いられている。特にワインの醸造において亜硫酸は、有害菌の増殖抑制、酸化防止、漂白、ブドウ果皮からの赤色素の溶出、清澄の保持等の目的で使用される重要な添加剤である（横塚 1994）。そのためワインの製造過程においては亜硫酸が添加されるが、有効作用をもつ遊離型亜硫酸は徐々にワイン成分と反応し効力のない結合型に変化する。このため、遊離型亜硫酸濃度を適切な濃度に維持するために亜硫酸は逐次添加され、総亜硫酸濃度が増大する。しかし高濃度の亜硫酸は人体に悪影響を及ぼす恐れがあり、添加可能な最大亜硫酸濃度が規制されている（ワイン学編集委員会 1991）。一方亜硫酸を含まない商品の製造も試みられているが、技術的に困難が多く且つ食品管理上十分な成果が得られていない。従って低濃度な亜硫酸を含むワ

インは必要であり、高濃度亜硫酸を含むワインから亜硫酸濃度を低減化したワインを製造するために亜硫酸を除去する技術を開発することは、興味ある課題である。

これまで本研究室では化学独立栄養性硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus* (旧名 *Thiobacillus*) *thiooxidans* JCM7814 が基質である亜硫酸を酸化消費して反応液中から亜硫酸を減少させる働きをもっていることを明らかにした。しかし、アルカリによってブドウ果汁の pH である 3.0 から 4.5~5.5 に変化させないと亜硫酸を除去することができなかった。このことはブドウ果汁およびワインの品質を変えることになり、実用上問題があり実用化は不可能であった（黒澤ら 1996）。

そこで、亜硫酸を基質とした酸素吸収活性の最適 pH が 3.0 と報告され（Hallberg et al. 1996）、1983 年に分離された新しい硫黄酸化細菌である *Acidithiobacillus caldus* ATCC51756（Hallberg・Lindström 1994）を使用菌株として選択した。この反応 pH はワインの pH 範囲である 3.0~4.0 とほぼ一致しているため、*A. caldus* の亜硫酸酸化活性を利用することによりワイン中の亜硫

\*Corresponding author (email: f5kn@yamanashi.ac.jp)

2011 年 2 月 17 日受理

酸を硫酸に酸化除去することが出来ると考えられる。そこで本研究では、*A. caldus* 菌体を用いてワイン中からの亜硫酸除去について検討したので報告する。

## 材料と方法

### 1 菌株

化学独立栄養性硫黄酸化細菌の *Acidithiobacillus caldus* ATCC51756 (Hallberg・Lindström 1994) を用いた。

### 2 前培養

基本培地として ATCC 培地 (Product Information sheet for ATCC51756<sup>®</sup> 2008) を改変したものをを用いた。A 液として  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3.0 g;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1.4 g; KCl, 0.1 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.05 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g、基質として  $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$ , 0.76 g を 980 mL の蒸留水に溶かし、硫酸で pH 2.5 に調整した後、121°C で 15 分間オートクレーブ殺菌を行った。B 液として  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1.0 g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.05 g;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.2 g;  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.08 g;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.06 g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.09 g および  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1.0 g を 1 L の蒸留水に溶かした。A 液に B 液 10 mL と、Glucose, 0.45 g を 10 mL の蒸留水に溶かした C 液を 10 mL 加えた。乾熱殺菌済みの 500 mL 容三角フラスコに培地を 300 mL 分注し、種菌体を 5% (v/v) 接種した。培養は 45°C、85 rpm で 3~4 日間回転振とう培養した。

### 3 本培養

基質を  $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$  から  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1.24 g/L) に替えた ATCC 培地を用いた。5 L 容ジャーファーメンター (ABLE, BM-05) に A 液を 2,880 mL 入れ、121°C で 20 分間オートクレーブした。培地に無菌的に B、C 液を 30 mL ずつ加え、前培養液 300 mL を無菌的に接種した。培養は 45°C、300 rpm、pH 4.5、通気量 0.5 vvm の条件で通気攪拌培養を行った。培養中、pH および基質濃度を制御するために 1.5 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  と 1.53 M  $\text{K}_2\text{CO}_3$  を含む混合溶液を自動的に滴下した。

### 4 供試薬

緩衝液系における亜硫酸の基質として Glutaraldehyde-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 G-SO<sub>2</sub> と略記) を使用した。ワインに添加する亜硫酸として、メタ重亜硫酸カリウムを使用した。

### 5 供試ワイン

市販の白ワインを使用した。

## 6 亜硫酸濃度測定法

改良ランキン法 (アルカリ滴定法) (国税庁訓令 1991) により測定した。

試薬: A 液; 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , B 液; 0.01 N NaOH, C 液; 25%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , D 液; Methylred 0.2 g と Methyleneblue 0.1 g を純エタノール 50 mL に溶かし、さらに蒸留水に溶かして全量 100 mL とした混合指示薬を作製し、使用した。A、B 液は用時調製した。

### 1) 遊離型亜硫酸測定法

ナシ型フラスコに A 液 10 mL をとり、D 液を 3 滴加えた。これに B 液を液の色が緑色に変化するまで滴下 (1、2 滴) し、装置に取り付けた。丸底フラスコに試料 10 mL を入れ、C 液 20 mL を加えてすぐに装置に取り付けた。エアープンプで 0.5~0.6 L/min の流量で 15 分間通気した。終了後、ナシ型フラスコを外し、キャピラリーの先端を少量の蒸留水ですすぎ、洗液もナシ型フラスコに洗い込み、内容物を B 液で滴定した。終点は液の色が緑に変わった点とした。この適定量より、遊離型亜硫酸含有量を求めた。

### 2) 結句型亜硫酸測定法

結句型亜硫酸は、遊離型亜硫酸の測定に引き続いて行った。遊離型亜硫酸の測定後、ナシ型フラスコ内の A 液および D 液を新しいものに交換した。0.5~0.6 L/min の流量で通気しながら、丸底フラスコの残りの内容物をガスバーナーで 15 分間穏やかに加熱した。この時、炎の先端が直接フラスコに触れるような状態で加熱した。加熱終了後、遊離型亜硫酸の測定と同様に B 液で滴定し、結句型亜硫酸含有量を求めた。

### 3) 総亜硫酸測定法

遊離型亜硫酸濃度と結句型亜硫酸濃度を合計したものを総亜硫酸濃度とした。

## 7 ワインの一般分析法

### 1) pH 測定

BECKMAN の pH メーター (型式 F34) を用いて測定した。

### 2) 還元糖濃度測定

Somogyi 変法 (日本醸造協会 1977) により測定した。試薬と測定法を以下に示した。

試薬: A 液; ロッシェル塩 45 g,  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  112.5 g を蒸留水約 300 mL に加熱溶解し、これに  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  15 g を蒸留水約 50 mL に溶かしたものを少量ず

つ十分に攪拌しながら加えた。さらに  $\text{KIO}_3$  1.75 g を 40 mL の蒸留水に溶解したものを加え、全量を 500 mL とした。B 液;  $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  45 g, KI 20 g を蒸留水に溶かして 500 mL とした。C 液; 2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , D 液; 0.05 N  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , E 液; 1% デンプン溶液を作製し、使用した。

100 mL 容三角フラスコに A 液 10 mL をとり、試料 (還元糖として 5~25 mg となるように蒸留水を用いて適宜希釈) および蒸留水を加えて 30 mL とした。次に加熱して 2 分以内に沸騰させ、正確に 3 分間沸騰を持続し、流水中にて冷却した。次に B 液 10 mL を管壁に沿って静かに加え、さらに C 液 10 mL を加えて振とうし、よく混合して直ちに E 液を指示薬として D 液で滴定した。終点は液の色が明るい青色に変わった点とした。この適定量より糖量を Glucose として求めた。

### 3) 総酒石酸度測定 (注解編集委員会 1977)

試薬: A 液; フェノールフタレイン指示薬, B 液; 0.1 N NaOH を使用した。

200 mL 容三角フラスコに沸騰冷却した蒸留水 100 mL を入れ、A 液数滴を加え、B 液で中和した。これに、試料 10 mL を加えて B 液で滴定した。終点は液の色が淡桃色に変わった点とした。この適定量より総酒石酸度を求めた。

### 4) アルコール分測定 (東京大学農芸化学教室 1972)

試料 100 mL をメスシリンダーを用いて採取し、NaOH で pH 7.0 に調整した後、枝付きフラスコに移した。メスシリンダーを約 15 mL の蒸留水で 2 回洗い、洗液を合併した。これにリービッヒ冷却管を装置し、沸石を入れて金網上で加熱した。メスシリンダー中に留液が約 80 mL になるまで蒸留した。この留液に蒸留水を加えて全量を 100 mL とし、15°C 中で比重計を用いてその示度 (比重) を読み、比重からアルコール分の度数に換算した。

## 8 亜硫酸の除去法

緩衝液中の亜硫酸の除去および試料中の亜硫酸の除去を行った

### 1) 緩衝液中の亜硫酸除去法

チオ硫酸ナトリウム生育菌体を 0.025 M 硫酸緩衝液 (pH 4.0) を用いて菌体濃度を  $\text{OD}_{660}=12.0$  となるように懸濁し、調製した。0.1 M 硫酸緩衝液 (pH 3.5); 9.0 mL, 菌体懸濁液 (系内  $\text{OD}_{660}=1.0$ ); 1.0 mL, 0.02 M G-SO<sub>2</sub>; 2.0 mL の計 12.0 mL の反応混合液を 100 mL 容

三角フラスコに入れ、シリコ栓をつけて回転振とう反応 (35°C、130 rpm) を行った。一定時間毎に反応混合液を採取した。室温で 3 分間遠心分離 (10,000 rpm) し菌体を除去した。この上澄みを測定試料として、残存亜硫酸濃度を改良ランキン法によって測定した。また、菌体を添加しない試料 (菌体の代わりに 0.025 M 硫酸緩衝液 (pH 4.0) を加えたもの) を 2 つ作製し、1 つは初発亜硫酸濃度測定用とし、他の 1 つは回転振とうを行う菌体 Blank とした。

### 2) 菌体濃度が亜硫酸除去活性に及ぼす影響の測定法

チオ硫酸ナトリウム生育菌体を 0.025 M 硫酸緩衝液 (pH 4.0) を用いて菌体濃度を  $\text{OD}_{660}=12.0$ , 120.0 となるように懸濁・調製した。0.1 M 硫酸緩衝液 (pH 3.5), 27.0 mL; 菌体懸濁液 ( $\text{OD}_{660}=12.0$  あるいは 120.0), 3.0 mL; 0.02 M G-SO<sub>2</sub>, 6.0 mL の計 36.0 mL の反応混合液を 100 mL 容三角フラスコに入れ (系内菌体濃度;  $\text{OD}_{660}=1.0$ , 10.0)、シリコン栓を付けて回転振とう反応 (35°C、48 時間あるいは 10 時間、130 rpm) を行った。一定時間毎に反応混合液を 3.0 mL ずつ採取した。室温で 3 分間遠心 (10,000 rpm) し菌体除去を行った。この上澄みを測定試料として残存亜硫酸濃度を測定し、亜硫酸除去活性に及ぼす菌体濃度の影響について検討した。また、菌体を添加しない試料を 2 つ作製し、1 つは初発亜硫酸濃度測定用とし、他の 1 つは回転振とうを行う菌体 Blank とした。

### 3) ワイン中の亜硫酸除去法

pH 無調整のワインにメタ重亜硫酸カリウムの粉末を添加し、初発亜硫酸濃度が 300 ppm 付近のワインを調製した。チオ硫酸ナトリウム生育菌体を 0.025 M 硫酸緩衝液を用いて菌体濃度を  $\text{OD}_{660}=120.0$  となるように懸濁・調製した。ワイン; 11.0 mL, 菌体懸濁液; 1.0 mL の計 12.0 mL 反応混合液を 100 mL 容三角フラスコに入れ (系内菌体濃度;  $\text{OD}_{660}=10.0$ )、シリコ栓を付けて回転振とう反応 (35°C、6 時間、130 rpm) を行った。2 時間毎に反応混合液を 3.0 mL ずつ採取した。室温で 3 分間遠心分離 (10,000 rpm) し菌体を除去した。この上澄みを測定試料として、残存亜硫酸濃度を改良ランキン法によって測定した。また、菌体を添加しない試料 (菌体の代わりに 0.025 M 硫酸緩衝液 (pH 4.0) を加えたもの) を 2 つ作製し、1 つは初発亜硫酸濃度測定用とし、他の 1 つは回転振とうを行う菌体 Blank とした。

## 結果と考察

### 1 緩衝液系における亜硫酸の除去

#### 1) 亜硫酸除去活性に及ぼす反応 pH の影響

反応液系内の実際の pH は 0.1 M 硫酸緩衝液 (pH 2.5, 3.0, 3.5) ; 9.0 mL, 0.025 M 硫酸緩衝液 (pH 4.0) ; 1.0 mL, 0.02 M G-SO<sub>2</sub>; 2.0 mL の計 12.0 mL の反応混合液を作製し、測定した。この結果、反応緩衝液と反応液系内の pH との差は 0.08 以内であった。このことから、反応液の pH を使用する緩衝液の pH で表すことにした。

Table 1 に示したように pH 2.5~3.5 の緩衝液中では、

Table 1 Effect of pH on sulfite removal by *A. caldus* cells.

pH	Initial sulfite (ppm)	Final sulfite (ppm)	Sulfite removed (ppm)	Percentage sulfite removal (%) (n=5)
2.5	546	259	287	53±1.58
3.0	528	204	324	61±1.41
3.5	483	110	373	77±1.58

The reactions were carried out at 35°C for 10 hr with buffers of various pH. Glutaraldehyde sulfite additive compound was used as the sulfite sample.

#### 2) 亜硫酸除去活性に及ぼす菌体濃度の影響

菌体を添加しない場合 (菌体 Blank) の反応 10 時間あるいは 48 時間後の総亜硫酸濃度は初発総亜硫酸濃度と大きな差が見られなかった。一方、Fig. 1 に示したように菌体を添加した場合、系内菌体濃度 OD<sub>660</sub>=1.0 では反応 48 時間後で残存亜硫酸量が 35.66 ppm であったのに対し、系内菌体濃度 OD<sub>660</sub>=10.0 では反応開始 6 時間で全亜硫酸が消失した。

以上の結果より、菌体濃度を大きくすることで亜硫酸除去は十分に可能であることが示された。しかし、現段階での培養法では高い菌体収量が見込めないため、さらに菌体収量の高い培養法を検討する必要がある。

#### 3) 亜硫酸除去活性に及ぼすワイン中に含まれる主要成分の影響

ワイン中には糖、有機酸、アルコール、無機化合物などの成分が存在している (穂積 1967)。ここでは含有量が比較的多い糖 (Glucose)、有機酸 (酒石酸、リンゴ酸、クエン酸)、エタノールが亜硫酸除去活性に及ぼす影響を調べた。測定は亜硫酸除去法をもとに各成分を添加したときの亜硫酸除去率を求めた。

35°C、10 時間反応の結果、亜硫酸の除去率は 50%以上であり、pH を 3.5 にしたときが最も高く除去率は 77%を示した。このことからワインの亜硫酸除去において pH を人為的に変えることなく亜硫酸の除去が可能であることが示唆された。

しかし、*A. caldus* ATCC51756 の亜硫酸を基質とする酸素吸収活性の最適 pH が 3.0 であったのに対し、本研究における亜硫酸の除去率は pH 3.5 で最も高かった。この pH の相違については今後検討すべきであると考えられる。

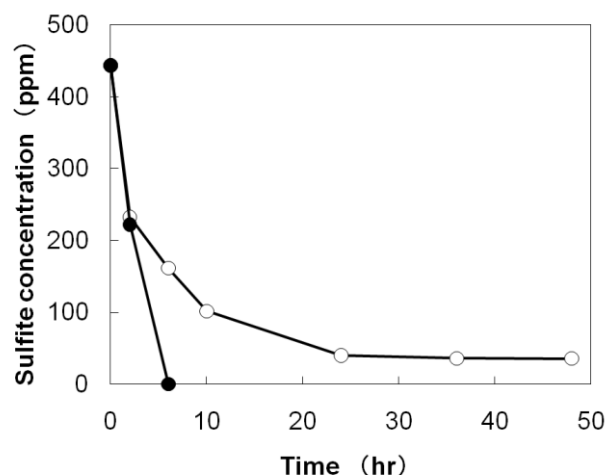


Fig.1 Effect of *A. caldus* cell concentration on sulfite removal. Glutaraldehyde sulfite additive compound was used as the sulfite sample. ○: Total sulfite concentration remaining after sulfite removal using the cell concentration that is equivalent to OD<sub>660</sub>=1.0 in the reaction mixture. ●: Total sulfite concentration remaining after sulfite removal using the cell concentration that is equivalent to OD<sub>660</sub>=10.0 in the reaction mixture. The residual sulfite concentration in five replicate experiments was 35.66±2.90 ppm at 48 h at the cell concentration equivalent to OD<sub>660</sub>=1.0, and 0 ppm at 6 h at the cell concentration equivalent to OD<sub>660</sub>=10.0.

添加物を含んだ試料の結果は Table 2 のようになった。この結果より本菌の亜硫酸除去活性はグルコース、クエン酸、酒石酸およびエタノールによる影響をほとんど受けないことが示された。また、リンゴ酸は亜硫酸除去活性を若干阻害すると考えられるが、相対活性で 59% の活性が維持されていることから、実際のワインにおいても十分な活性が得られるものと考えられる。この結果は、*A. thiooxidans* JCM7814 の pH 5.5 における亜硫酸除去活性が、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い（黒澤ら 1996）という結果と同

様であった。しかし、エタノールの影響についての結果は本報告が初めてである。

本菌株を用いた緩衝液系における亜硫酸を基質とする酸素吸収活性は予備的検討において遊離型亜硫酸および結合型亜硫酸を酸化することが明らかになっている。また、菌体により緩衝液系において遊離型亜硫酸および結合型亜硫酸が除去できているのを確認した。更に、ワイン中に含まれる主要成分の存在下においても亜硫酸の除去が可能であることが明らかとなった。以上のことよりワインの pH 範囲であるモデル緩衝液系において亜硫酸が除去できることが示された。

Table 2 Effect of major components in wine and grape juice on sulfite removal by *A. caldus* cells.

Component Added	Sulfite removed (ppm)	Relative percentage sulfite removal (%) (n=5)
Control	383	100
Glucose (135 g/L)	348	91±3.16
Citric acid (5 g/L)	360	94±1.87
Tartaric acid (5 g/L)	388	101±2.12
Malic acid (5 g/L)	225	59±1.58
Ethanol (10 %)	322	84±1.22

The experimental conditions were pH 3.5 at 35°C for 24 hr. Glutaraldehyde sulfite additive compound was used as the sulfite sample. Initial total sulfite concentration was 483 ppm.

## 2 ワイン中の亜硫酸除去

### 1) ワインの一般分析結果

実験に用いた市販の白ワインを分析したところ、pH が 3.12、総亜硫酸濃度が 152.23 ppm、還元糖濃度が 24.36 g/L、総酒石酸度が 0.51 g/100 mL とほぼ一般的な分析値を示したが、アルコール分は 15.16% (v/v) で一般的なワインの分析値 (15%未満) よりもやや高い値であった。

### 2) ワイン中の亜硫酸除去

上記白ワインに総亜硫酸濃度が 300 ppm となるようにメタ亜硫酸カリウムを添加し、本菌を添加した。その結果 Fig. 2 のように遊離型亜硫酸は完全に除去され、結合型亜硫酸もほぼ除去される結果となり、全亜硫酸除去率は 91% であった。

高濃度 (300 ppm) の亜硫酸を含むワインから本菌によって、pH を調整しないで 6 時間で亜硫酸を除去で

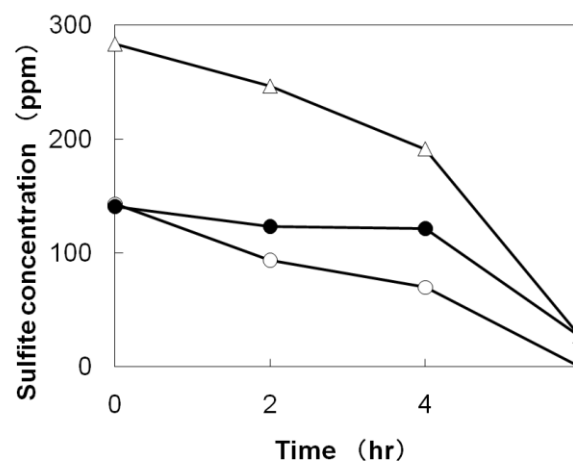


Fig.2 Changes in sulfite concentration in white wine (pH 3.12) at 35°C by the addition of *A. caldus* cells. ○: Free sulfite concentration, ●: bound sulfite concentration, and △: total sulfite concentration. The residual sulfite concentrations at 6 h in five replicate experiments were 0 ppm for free sulfite, 26.69±2.21 ppm for bound sulfite, and 26.69±2.21 ppm for total sulfite.

きることが明らかとなった。本研究により、高濃度亜硫酸を含むワインから *A. caldus* ATCC51756 の菌体を用いて pH を変えることなく亜硫酸を除去することを初めて達成することができた。

ワイン醸造を正しく行うためには一定量の亜硫酸添加は必要であるが、ワイン中において高濃度亜硫酸の存在はアレルギー発症を招き健康への影響が懸念される。このためにも適切な亜硫酸濃度に調製することが必要である。よってワイン醸造工業において高濃度亜硫酸を含むワインから本技術を用いることにより、亜硫酸を効率よく除去し適切な亜硫酸濃度に調節することができれば、健康問題への対応も可能となる。また、この技術を発展させると、他の食品工業において高濃度亜硫酸を含む食品から亜硫酸を低減化してアレルギー発症の予防が期待できる。ただし、実用化の段階に至るには本技術のワイン中の香り成分や色素に及ぼす影響を今後検討することが必要である。

### 要 約

中高温性硫黄酸化細菌である *Acidithiobacillus caldus* ATCC51756 を本研究の使用菌株とした。本菌の亜硫酸除去活性に及ぼす反応 pH を調べたところ、pH 2.5 以上で亜硫酸除去活性が認められた。その亜硫酸除去率は 50% 以上で、中でも pH 3.5 では 77% の除去率を示した。次に亜硫酸除去活性に及ぼす菌体濃度の影響を調べたところ、系内菌体濃度を  $OD_{660}=10.0$  とすることにより、亜硫酸除去率が上昇することが示された。さらに亜硫酸除去活性に及ぼすワイン中に含まれる主要成分の影響について調べたところ、亜硫酸除去活性は

ワイン中の主要成分によって影響されなかった。実際に白ワイン中の亜硫酸除去を行ったところ、pH を調整しなくても 91% の亜硫酸除去が認められた。

### 文 献

- Hallberg, K. B., M. Dopson, and E.B. Lindström. 1996. Reduced sulfur compound oxidation by *Thiobacillus caldus*. *J. Bacteriol.* 178: 6-11
- Hallberg, K.B. and E.B. Lindström. 1994. Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. *Microbiology* 140: 3415-3456.
- 穂積忠彦. 1967. 洋酒工業. p. 127. 光琳書院. 東京.
- 国税庁訓令. 1991. 国税庁所定分析法. p. 27-37. 国税庁. 東京.
- 黒澤尋・前川恵美・中村和夫・天野義文. 1996. 高濃度亜硫酸を含むブドウ果汁からの亜硫酸の除去. *日本醸造協会誌* 91: 367-372.
- 日本醸造協会. 1977. 新版・醸造成分一覽. p. 279-292、p. 298-305. 日本醸造協会. 東京.
- Product Information sheet for ATCC®51756. 2008. American Type Culture Collection. Manassas, VA.
- 東京大学農芸化学教室. 1972. 実験農芸化学 下巻. p. 639. 朝倉書店. 東京.
- 注解編集委員会. 1977. 国税局所定分析法注解. p. 14-16、p. 57-58. 日本醸造協会. 東京.
- ワイン学編集委員会. 1991. ワイン学. p. 84-85. 産調出版. 東京.
- 横塚弘毅. 1994. ワインの製造技術. p. 78-81. 山梨日日新聞社. 甲府.