

[研 究 報 文]

海洋由来糸状菌の培養上清液添加によるワインの色調変化の防止効果

山田勝久¹・今田千秋¹・佐藤充克²・小林武志¹・濱田（佐藤）奈保子¹¹東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科応用微生物学講座
〒108-8477 東京都港区港南 4-5-7²山梨大学大学院医学工学総合研究部ワイン科学研究センター
〒400-0005 山梨県甲府市北新1丁目13-1**Prevention of Wine Browning with Culture Supernatant of Fungus
Isolated from Marine Environment**Katsuhisa YAMADA¹, Chiaki IMADA¹, Michikatu SATO², Takeshi KOBAYASHI¹,
and Naoko HAMADA-SATO¹¹Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology
4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan²The Institute of Enology and Viticulture, University of Yamanashi
13-1 Kitashin-1-chome, Kofu, Yamanashi 400-0005, Japan

The effect of fungal culture supernatant on stabilizing red wine color was examined. A fungal strain isolated from marine environment was found to have tyrosinase inhibitory activity. A model wine was established to investigate the effect of polyphenol oxidase (PPO) on wine browning. Mushroom tyrosinase and epicatechin were chosen as PPO and substrate, respectively, in the model wine that had high concentrations of tartaric acid and ethanol. The fungal culture supernatant showed strong inhibitory activity against tyrosinase in the model wine. Application of the supernatant to red winemaking resulted in remarkable prevention of wine browning. Similar to potassium pyrosulfate, the supernatant had no adverse effect on the fermentation process. We found that the fungal culture supernatant effectively prevented wine browning in winemaking.

Key words: polyphenol oxidase, red wine, supernatant, tyrosinase inhibitor, wine browning

緒 言

ワインはブドウ栽培が可能な地域である約 60 カ国で生産され、日本の生産量は約 10 万キロリットルで、この 10 年間でおよそ 2 倍の数量に伸張している (4, 12)。歴史的にワインの飲用習慣が浅いわが国においても、先の生産量の伸張率が示すとおり、ワインは今日急速に日常化しつつあり、欧風料理専門店はもちろん、ファミリーレストランをはじめ国内飲食店におけるアルコール飲料のメニューとして常載される一方、贈答

品としても人気があることは周知のとおりである。こうした社会の潮流の中で、消費者が手頃な価格でおいしいワインを求めるのは至極当然のことであり、ワインの供給側はこれらの消費者ニーズに適確な対応を迫られているものと思われる。

ワインの魅力は何と云っても、ブドウ栽培地域の気候ならびにワイン製造環境との総合的な特徴の融合に伴って創出される色調、香りならびに味わいの個性にあると思われる。まずワインには色調で大別して、赤、ロゼ、白の三種があるが、これらの色はそれぞれの製法に伴うポリフェノールの種類や含有量の相違による

ものである。赤ワインに多く含まれる色素はアントシアニン系色素で、そのモノマー、オリゴマーおよびポリマーの存在量や存在比によって固有の色調を呈する(5、16、17、18、19)。しかしながらワインの色調はマスト作製時、発酵時ならびに貯蔵時において経時的に劣化するが、特にマスト作製時におけるポリフェノールオキシダーゼ(以降、PPOと省略する)による褐変現象が大きく関与することが知られている(13)。これを防止するためにこれまで亜硫酸塩が添加されてきたが、近年特に赤ワインが健康維持に大きく寄与することが報告されるようになり(2、3)、ワイン自身に対する健康面での検証を鑑みる時期に至っている。これにあたり、長年ワイン自体に対する品質維持や向上を目的として使用されてきた亜硫酸塩については、成長障害や肝機能障害の懸念など人体に対する影響を省みる必要性が高まりつつある今日においては、その使用について再考することも意義のあることと思われる。われわれは海洋由来の糸状菌の培養上清が、上述のPPOが関与する生鮮食材の黒変に対して防止効果を有することを報告しているが(10)、この作用効果のワインへの応用研究にあたり、ワインの原材料であるブドウ由来のPPOに対する阻害効果を確認するとともに、ワイン製造、特にマスト作成時における褐変現象に関してモデルワイン系での検討を行い、その系における本菌培養上清の作用効果について基礎的な検討を行った結果から得られた知見を踏まえて、実際のブドウを用いたワイン醸造において本菌培養上清の効果について検討を行ったので以下に報告する。

材料と方法

1. *Trichoderma* sp. 培養上清の作製

本報告の微生物(以後本菌と略す)は、伊豆諸島新島沖の水深約100mの海底堆積物中から分離されたもので、その形態学的特徴から真菌類線菌目淡色線菌科の糸状菌である *Trichoderma* sp. H1-7 と命名された(1)。

本菌の生産培地は、2%グルコース、0.5%バクトペプトン(Difco社製)を蒸留水に溶解後pH 8.0に調整し、バツフル付の500 mL容三角フラスコに100 mLずつ分注して綿栓を施したのち、121°Cで20分間高圧滅菌した。この培地に本菌を一白金耳植菌したのち、27°Cにおいて4日間回転振とう培養(160 rpm)を行った。培養後、遠心分離(13,000×G、4°C、10 min)した上清

をさらにメンブランフィルター(0.2 μm; ADVANTEC 東洋製)を用いて除菌処理した後、本実験に用いた。

2. *Trichoderma* sp. 培養上清のブドウ由来PPO活性阻害評価

本菌(*Trichoderma* sp.)培養上清のブドウ由来PPO活性に対する阻害効果を確認するために、実際にブドウから粗PPOを抽出して試験を行った。ブドウ由来のPPO粗酵素液の調製にあたっては、レッドグローブ種を用い、果実を洗浄後、果皮を剥いて種子を除去した果肉10 gに対して、1% Triton X100 含有PBS(pH 6.9) 5 mLを加えて氷冷下でガラス製ホモジナイザーを用いてよく磨り潰した。得られたホモジネート液を遠心分離(1,400×G、4°C、10 min)してその上清をPPO粗酵素液として評価に供した。PPO阻害活性の評価にあたっては、96穴マイクロタイタープレートの各ウェルに0.2 Mリン酸緩衝液(pH 7.0) 50 μLに上述のブドウ由来PPO粗酵素液を30 μL添加し、本培養上清の最終濃度として1および2%になるように評価系に添加した後、基質として4 mMエピカテキン(緑茶由来、和光純薬工業) 100 μLを添加する総量200 μL系で、20°Cで30分間反応させた。反応後マイクロプレートリーダー(Bio Rad社製、Model 550)により490 nmの吸光度を測定して、PPO活性の指標とした。

3. PPOによる色調劣化モデルワイン系の検討

モデルワインの作成にあたり、その主要構成成分としてポリフェノール、有機酸、アルコールおよび本研究の対象であるPPOを掲げた(15)。なお、PPOとしては高い活性を有し、かつ入手が容易であるチロシナーゼ(マッシュルーム由来、和光純薬工業)を用いた。またPPOの基質であるポリフェノールとしては、そのモノマーとしてエピカテキン(緑茶由来、和光純薬工業)を、ポリマーとしては市販のブドウ由来ポリフェノール(商品名:ぶどうポリフェノールPPR、サンブライト)を用いて検討を行った。有機酸としてはワイン中に多含される酒石酸(特級、和光純薬工業)を、またアルコールにはエタノール(特級、和光純薬工業)を用いた。

1) モデルワイン系におけるPPO濃度の検討

モデルワイン系における酒石酸およびエタノール濃度は、実際のワインを想定し、それぞれ0.3%および12.5%添加し(1、14)、基質のポリフェノール量として、エピカテキンは最終濃度2 mMとし、ブドウ由来

ポリフェノールは最終添加量が 0.1%となるように設定した。なお、PPOの濃度検討にあたり、最終濃度がそれぞれ 375、750 および 1,500 units/mLになるようにチロシナーゼ溶液を添加し、室温条件である 20°Cで活性を発現する濃度について検討を行った。本評価系におけるPPO活性については、上述 2. と同様に操作を行い、20 分間経過後の 490 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio Rad社製、Model 550) により測定して評価した。

2) *Trichoderma* sp. 培養上清のPPO活性阻害評価

1) のモデルワイン系においてPPO濃度については中村らの報告(8)を参照して最終濃度を 750 units/mlとし、精製水の代わりに本菌 (*Trichoderma* sp.) 培養上清を 1% および 10% 添加して 20°Cで 30 分間反応させたのち、490 nmにおける吸光度を測定してPPO活性とした。なお、PPO活性阻害率は下式により算出した (9、12)。

$$\text{PPO活性阻害率 (\%)} = 100 - \frac{\text{本菌培養上清添加系の吸光度}}{\text{ブランクの吸光度}} \times 100$$

4. 醸し発酵ワインにおける *Trichoderma* sp. 培養上清の添加効果

1) ワインの試作

本菌 (*Trichoderma* sp.) 培養上清のワインへの応用について検討するにあたり、実際にワインの試作工程中の添加を試みた。なお、本来ならば試作に際してワイン製造に適したブドウの品種を選定すべきであるが、本研究は本菌培養上清のワインの色調変化に対する影響を明らかにすることであり、また時期的にワイン製造に適した品種の入手が極めて困難であったことから、入手が容易な後述の市販のブドウ 3 品種 (いずれも 2007 年収穫分) を用いて検討を行った。

(1) レッドグローブ種による試作

市販のレッドグローブ種を水道水でよく洗浄後、約 50 gずつを 4 試験区に分別した。これらの試験区には精製水をブランクとして用い、ポジティブコントロールにはそれぞれ最終濃度が 75mg/Lのメタ重亜硫酸カリウム (14) および 100 mg/Lのアスコルビン酸を添加した。なお、本菌培養上清は最終濃度として 10 mL/100 mLとなるように添加した。予めこれらの添加を行ったのち、除梗破碎してブドウ破碎物 (マスト) を作製し、これを 3%酒石酸水溶液でpH 3.0 に調整した。これらのマストを 23°Brixになるまで白糖で補糖したのち、*Saccharomyces cerevisiae*の乾燥物 10 gを約 37°Cに保温

した精製水 100mLに攪拌分散して室温まで冷却した酵母溶液を各マストに対して 0.25% (v/v)量添加して 20°Cで発酵を行った。なお発酵の終点は、炭酸ガス減量にともなう重量変化が安定した時点とした。発酵終了後、遠心分離 (13,000×G、10 min) を行い、得られた上清をさらにメンブランフィルター (0.2 μm) で濾過して以後の試験に供した。

(2) スチューベン種およびデラウエア種による試作
市販のスチューベン種またはデラウエア種を用いたほかは、レッドグローブ種とすべて同一操作で試作を行った。

2) 試作ワインの評価

本研究で得られた 4 区分の試作ワインについての分析は、同一試料について 2 回以上行い、得られた分析値を平均値で示した。

なお試作中におけるマストの発酵過程については炭酸ガス減量にともなう重量変化を経日的に追跡した。また得られた試作ワインについては、横塚ら (20) の方法を参考にしてpH、°Brixおよび色調 (日立製作所製 : U-1500) を測定して本菌培養上清およびメタ重亜硫酸カリウムならびにビタミンCの試作ワインの色調安定性に対する影響を観察した。さらに試作ワインにおけるアルコール濃度をガスマススペクトログラフィー (Yokogawa: HP G1800A) により測定した。また赤ワインについてはフォリン試薬を用いる津志田らの方法 (7) により没食子酸相当量としてポリフェノール含有量を測定した。

(1) ワインカラー (wine color, WC = $A_{520}^{3.7}$)

赤ワインを重酒石酸カリウムで飽和した 10%エタノール水溶液 (pH 3.7) で 10 倍に希釈後、10 mmのガラス製セルを用いて色調 ($\lambda = 520 \text{ nm}$) を測定後得られた値を 10 倍して、pH 3.7におけるワインカラーとした。

(2) 酸性でのワインカラー (wine color at pH 0.4, WCA = $A_{520}^{0.4}$)

無色のカルビノールベースを赤色のフラビリウムベースとするために、ワインを 1 N塩酸で 10 倍に希釈後、同様に色調を測定して、pH 0.4 (酸性) におけるワインカラーとした。

(3) 酸化・褐色度 (degree of pigment coloration, DPC)
酸化・褐色度の指標となるDPC (20) は下式により算出し、各ブドウ品種における試作ワインの精製水添加区の値を 1.0 として換算比較した。

$$DPC(\%) = WC / WCA \times 100$$

結果と考察

1. *Trichoderma* sp. 培養上清の所見

本菌を4日間、回転振とう培養した後の培養上清は淡黄色の透明な液体であり、特に不快なおいなどは感じられなかった。なおこの培養上清の pH は約 6.0 であり、色調 ($\lambda = 520 \text{ nm}$) は 0.560 であった。

また別に評価した安全性に関する所見(データ省略)で、本培養上清には抗菌活性は認められず、培養細胞に10%添加しても細胞毒性や刺激性は全く認められなかったことから、本研究においてはこの濃度で外観上ならびに安全性面において特に問題はないものと推察されたが、今後実際のワインへの応用にあたっては、さらに詳細かつ綿密な安全性の確認を行うことを考えている。

2. ブドウ由来 PPO に対する *Trichoderma* sp. 培養上清の活性阻害効果

実際のブドウ(レッドグローブ種)から抽出した PPO に対する活性阻害効果を評価した結果、Fig. 1 に示すとおり、本菌培養上清の添加濃度に依存して PPO 活性を阻害した。これまでの報告(9)から、本菌培養上清はクルマエビやリンゴ、ナスなどの生鮮食材の黒変防止効果を有することがわかっているが、本来 PPO の最適活性域である中性域 (pH 6.9) においてブドウ由来の PPO 活性を顕著に阻害することがわかった。

3. 市販 PPO による色調劣化モデルワイン系

1) モデルワイン系における PPO 濃度の検討

本モデルワイン系中には、PPO 活性を低下させる要因である有機酸ならびにアルコールを多く含む。

さらに本系の評価は実際の経過時間を短縮して経時変化を反映させる、いわゆる加速試験としての性格を持たせることを目標として、上述の条件下でもポリフェノールの酸化反応が十分に進捗し得る PPO の必要量について検討を行った。なお、基質としてはポリフェノールのモノマーであるエピカテキンを、また PPO としてチロシナーゼを用いたモデルワイン系で反応を行ったところ、Fig. 2 に示すとおり PPO の添加量に依存して酵素反応の上昇が認められた。この結果から明らかのように、本モデルワイン系における PPO としてのチロシナーゼ活性は、最終濃度として 750 units/mL 以

Fig. 1 Inhibitory effect of *Trichoderma* sp. H1-7 culture supernatant on polyphenol oxidase (PPO) activity. PPO was isolated from grapes and symbols represent the percentage volume of supernatant added: (○), 0%; (●), 1%; (■), 2%.

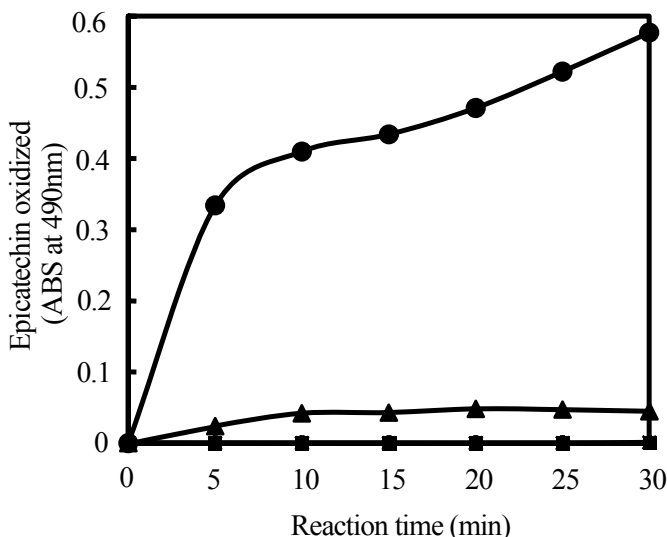
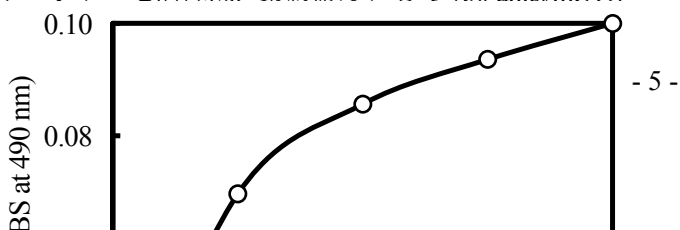


Fig. 2 Reaction of PPO (mushroom tyrosinase) at various concentrations with epicatechin. Symbols represent the concentration of mushroom tyrosinase added: (●), 1,500 units/mL; (▲), 750 units/mL; (■), 375 units/mL.

上が必要であり、十分な活性を考慮すると 1,500 units/mL 程度が望ましいと思われた。なお常法(9)によるリン酸緩衝液系 (pH 6.9、アルコール未含有) においては、チロシナーゼ活性として 250~500 units/mL 程度でも十分な反応速度が得られているが、今回のモデルワイン系ではそのおよそ 3~6 倍量のチロシナーゼ活性が必要であったことは、このモデルワイン系のチロシナーゼ活性を大幅に低減させたためと推察された。

つぎにモデルワイン系における基質として、市販の



ブドウ由来ポリフェノールを用いた PPO 反応の結果を Fig. 3 に示す。反応時間に対する吸光度の変動からもわかるように、本基質を用いた系では反応自身が緩慢であり、さらに反応開始 5 分後に酵素反応の顕著な鈍化現象が見られた。この原因として、基質に用いた市販のブドウ由来ポリフェノール中には種々の重合度のポリフェノールポリマーが含まれており、PPO 反応によりさらに種々のポリフェノールポリマーが形成されて、これらのポリフェノールポリマーが PPO 自身の活性を阻害することによるものと推察された (6)。この結果から、モデルワイン系にブドウ由来のポリフェノールを基質として選択する場合には、酵素反応が鈍化するまでの初期段階 (反応開始 5 分後) を評価判定することが望ましいと考えられる。

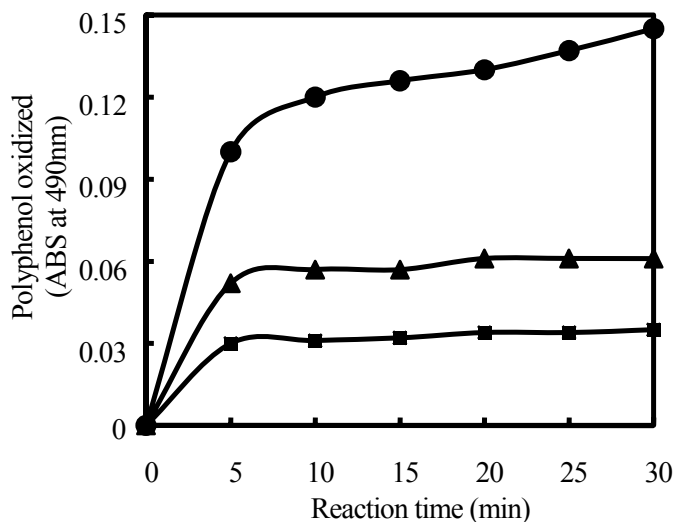


Fig. 3 Reaction of PPO (mushroom tyrosinase) at various concentrations with polyphenol isolated from grapes. Symbols represent the concentration of mushroom tyrosinase added: (●), 1,500 units/mL; (▲), 750 units/mL; (■), 375 units/mL.

2) モデルワイン系における *Trichoderma* sp. 培養上清の PPO 活性阻害効果

つぎに上述のモデルワイン系を用いて、本菌培養上清の PPO 活性に対する阻害効果を調べたところ、Table 1 に示すように、本菌培養上清は基質として用いたエピカテキンおよびブドウ由来ポリフェノールのいずれの系においても高い阻害効果が認められた。これらの結果から、本菌培養上清は本研究のモデルワイン系においてポリフェノールのモノマーおよびポリマーの基質において幅広くかつ十分な PPO 阻害活性を有しており、実際のワイン製造を鑑みても本培養上清の使用

は、ワインの色調の劣化に対する有効な防止策として十分応用が可能であると推察された。

Table 1 PPO inhibitory effects of the fungal culture supernatant on each polyphenols.

Kind of polyphenol	% of inhibition	
	1% addition	10% addition
Epicatechin	18.8	64.1
From a grape	44.6	62.7

3. 試作ワインにおける *Trichoderma* sp. 培養上清の有用性

本研究においてレッドグローブ種、スチューベン種およびデラウェア種の 3 種を用いて試作した各 4 試験

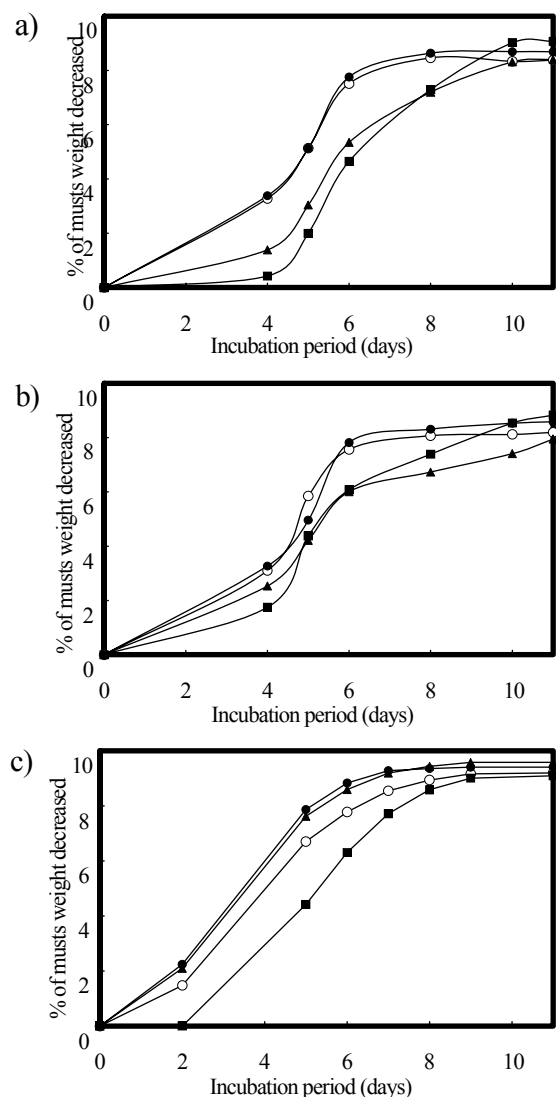


Fig. 4 Time course of decrease of must weight in fermentation after addition of various ingredients. Grape varieties include a) Redglobe, b) Steuben, and c) Delaware. Symbols represent various ingredients added in winemaking: (○), water; (■), potassium pyrosulfate; (▲) vitamin C; (●), *Trichoderma* sp. H1-7 culture supernatant.

区のワインの発酵過程について、炭酸ガス減量にともなう重量変化を観察したところ、いずれのブドウ品種を用いた試作ワインにおいても、Fig. 4-a)、-b) および -c) に示すように本菌培養上清添加区は精製水添加区と同様に速やかな重量減少が認められており、順調に発酵が進捗していることが推察された。またレッドグローブ種で 23.5°Brix、スチューベン種およびデラウエア種では 23°Brix で発酵を開始したマストは、重量変化が一定となった11日後の発酵終了時には3品種の試作ワインすべてが 6.5°Brix に低下していた (Table 2)。

これらの結果から本菌培養上清添加はワインの発酵に際して何ら障害とならないことがわかった。一方、これまで褐変防止を目的として汎用されているメタ重亜硫酸カリウム添加区は、精製水添加区および本菌培養上清添加区に比べて発酵初期における重量減少の速度は緩やかであったが、発酵開始から 11 日後には重量変化が精製水添加区とほぼ同一となり、発酵終了時点では3品種の試作ワインともに 6.5°Brix となって順調に発酵が進んだことが示唆された。なおビタミン C 添加区においては、初発として 22.5°Brix~23.0°Brix で発酵

Table 2 Characteristics of red wines after addition of various ingredients.

Addition	Subspecies	pH	°Brix		Alcohol (%)	Polyphenol (mg/L)	WC= A520 ^{3,7}	WCA= A520 ^{0,4}
			Start	End				
Distilled water	Redglobe	3.6	22.5	6.5	7.3	224	0.30	1.21
	Steuben	3.5	23.0	6.5	7.1	466	0.99	2.26
	Delaware	3.0	23.0	6.5	7.2	157	1.26	3.38
Potassium pyrosulfate	Redglobe	3.4	23.5	6.5	8.5	220	0.31	1.59
	Steuben	3.5	23.0	6.5	8.2	554	1.03	2.58
	Delaware	3.0	23.0	6.5	7.2	186	1.22	3.98
Vitamin C	Redglobe	3.4	23.0	7.5	7.5	-	0.44	1.54
	Steuben	3.4	22.5	7.0	7.6	-	0.76	1.72
	Delaware	3.0	23.0	7.0	6.1	-	1.20	3.51
Supernatant of strain HI-7	Redglobe	3.6	23.5	6.5	8.4	198	0.30	1.42
	Steuben	3.5	23.0	6.5	8.1	589	0.97	2.60
	Delaware	3.0	23.0	6.5	7.8	211	1.20	3.81

を開始したが、発酵終了時点の 11 日後では、7.0 ~ 7.5°Brix であり、他の試験区に比べて高い値を示した。この原因についての詳細は不明であるが、安全で優れた酸化防止作用を有する成分であるビタミン C でも、ワイン製造においては必ずしも適当な褐変防止剤であるとは考えられなかった。

上述のとおり、発酵過程の目安となる重量変化が一定となった時点を発酵終点として濾過精製したのち、更に除菌濾過 (0.2 μm) してワインを調製した。

試作ワインの色調 (WC) については、用いたブドウの品種の色調に合致して相違が見られた。すなわち果皮の色がスチューベン種やデラウエア種に比べて淡いレッドグローブ種で試作したワインの WC は、他の 2 種で試作したワインの WC に比べて低い値を示した。この傾向はメタ重亜硫酸カリウム添加区をはじめ、ビ

タミン C 添加区ならびに本菌培養上清添加区のいずれにも見られた。Table 2 に本研究において試作に用いた 3 種のブドウ品種から得られた試作ワインの概要を示す。この表からもわかるように、試作ワインの WC はポリフェノールの含有量に依存していた。なお、ビタミン C 添加区のポリフェノール量については、フォリン試薬を用いる津志田らの方法 (7) では、正しく測定出来ない可能性があるため除外した (11)。本菌培養上清添加区のワインの WC は精製水添加区およびメタ重亜硫酸カリウム添加区の赤ワインと同様の値を示したことから、本菌培養上清はワイン製造において重要な要素であるブドウ果皮からの色素の溶出を阻害しないことが示唆された。なおビタミン C 添加区の WC は、他の添加区に比べて高い値を示したが、これはビタミン C 自身の褐変によるものと推察された。つぎに試作

ワインの酸化および褐変の指標である DPC については Fig. 5 に示すように、培養上清添加区とメタ重亜硫酸カリウム添加区は、精製水添加区およびビタミン C 添加区に比べて低い値を示し、本菌培養上清はメタ重亜硫酸カリウムと同様、ワインの酸化および褐変を抑制することが示唆された。

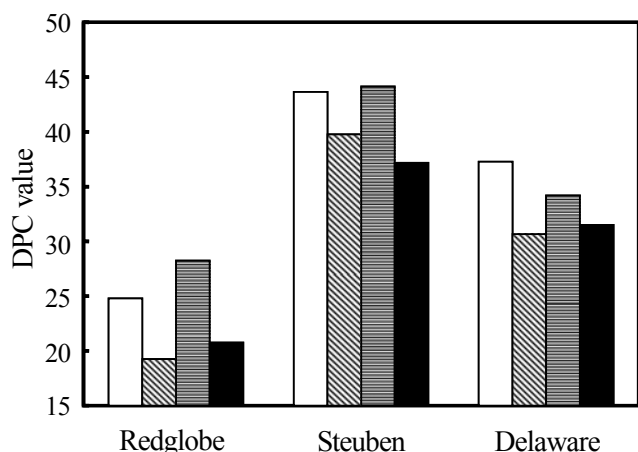


Fig. 5 Degree of pigmentation of red wines after addition of various ingredients. Symbols represent various ingredients added in winemaking: (□), water; (▨), potassium pyrosulfate; (▤), vitamin C; (■), *Trichoderma* sp. H1-7 culture supernatant.

上述の結果から本菌培養上清の添加は、今日まで褐変防止を一つの目的として汎用され続けているメタ重亜硫酸カリウムと同様、ワインの製造に有用であると思われる。

本研究において PPO 阻害活性を有する *Trichoderma* sp. の培養上清が、ワイン製造における褐変防止のために従来から汎用されてきたメタ重亜硫酸カリウムと同様に有効である可能性が示唆された。近年、消費者は食品に利用される成分について天然由来の指向性が高まっている。こうした潮流を鑑みると、ワインに対して多様な有効性と長年の使用実績を有するメタ重亜硫酸カリウムではあるが、これに代わる成分の研究開発の必要性も生じつつあると考えられる。本研究の結果、本菌培養上清は強い褐変防止効果を示すメタ重亜硫酸カリウムに匹敵する効果が示唆されたことから、ワイン製造において今後大いに利用検討の価値があるものと推察された。

要 約

チロシナーゼ阻害活性を有する海洋由来の糸状菌 (*Trichoderma* sp. H1-7) の培養上清をワインの色調安定化に応用することを試みた。まずワインの色調変化

の原因として知られるポリフェノールオキシダーゼ (PPO) に対する影響を検討するためにモデルワイン系の確立を検討した。その結果、酒石酸やアルコールを比較的多含するモデルワイン系においては、PPO として入手が容易で品質的にも安定しているマッシュルーム由来のチロシナーゼおよび基質としてはエピカテキンが最適であると思われた。このモデルワイン系において本菌培養上清を評価した結果、高い阻害活性が確認された。つぎに実際のワインへの応用について検討を試みた結果、本菌培養上清はワインの発酵過程に対して全く障害とはならず、メタ重亜硫酸カリウムと同様、ワインの色調に対する褐変防止効果が認められた。本研究の結果から、本菌培養上清はワイン製造において今後大いに利用検討の価値があるものと推察された。

文 献

1. Imada, C., Y. Sugimoto., T. Makimura, T. Kobayashi, N. Hamada, and E. Watanabe. Isolation and characterization of tyrosinase inhibitor producing microorganisms from marine environment. *Fish. Sci.* 67: 1151-1156 (2001).
2. Sato, M., N. Ramarathnam, Y. Suzuki, T. Ohkubo, M. Takeuchi, and H. Ochi. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J. Agric. Food Chem.* 44: 37-41 (1996).
3. Sato, M., N. Ramarathnam, Y. Suzuki, T. Ohkubo, M. Takeuchi, and H. Ochi. Superoxide radical scavenging activities of wines and antioxidative properties of fractions recovered from Merlot wine pomace. In: *Food Factors for Cancer Prevention*. ed. by H. Hibachi, T. Osawa, J. Terao, S. Watanabe, and T. Yoshikawa. pp. 359-364. Springer-Verlag Tokyo (1997).
4. 佐藤充克. ワインの機能性. *生物工学会誌*. 81: 525-527 (2003).
5. 佐藤充克. ワイン製造における潮流. *月間フードケミカル*. 3: 27-32 (2006).
6. 庄司俊彦. リンゴポリフェノールの食品素材としての応用. *日食科工誌*. 53: 159-164 (2006).
7. 津志田藤二郎・鈴木雅博・黒木証吉. 各種野菜類の抗酸化性の評価および数種の抗酸化成分の同定.

- 日食工誌. 41: 611-618 (1994).
8. 中村和夫・天野義文・加賀美元男. 甲州および Muscat Bailey A ブドウのポリフェノールオキシダーゼの電気泳動パターン. 山梨大発研報. 16: 15-20 (1981).
 9. 日本化粧品技術者会編. 美白化粧品. 化粧品の有用性. pp. 144-161. 薬事日報社 (2001).
 10. 山田勝久・今田千秋・小林武志・濱田（佐藤）奈保子. 海洋環境より分離した糸状菌培養上清の生鮮食材変色防止効果. 日食科工誌. 54: 274-279 (2007).
 11. 山中美穂・大田忠親・西山一朗. Folin-Ciocalteu 法によるマタタビ属果実の総ポリフェノール量測定における還元物質の影響. 駒沢女子短期大学「研究紀要」. 40: 97-100 (2007).
 12. 山梨大学編. 市民講座「ワイン学入門」. 山梨日日新聞社 (1996).
 13. 横塚弘毅・野崎一彦・櫛田忠衛. ぶどうマスト中のポリフェノールオキシダーゼ活性. 山梨大発研報告. 16: 15-20 (1981).
 14. 横塚弘毅・野崎一彦・櫛田忠衛. ブドウマスト中のポリフェノールオキシダーゼ活性. 山梨大発研報告. 18: 1-6 (1983).
 15. 横塚弘毅・野崎一彦・松土俊秀. 日本各地より集めたワインの有機酸、フェノール、糖及びアミノ酸分析. 山梨大発研報告. 19: 39-56 (1984).
 16. 横塚弘毅. カベルネ・ソービニオン及びマスカット・ベリーA 赤ワインの熟成中における色調の変化 I. 色素パラメータのスペクトル分析. 日本醸造協会誌. 90: 222-229 (1995).
 17. 横塚弘毅. カベルネ・ソービニオン及びマスカット・ベリーA 赤ワインの熟成中における色調の変化 II. 赤ワインのイソアミルアルコール抽出で水層に残った色素ポリマー画分の性質. 日本醸造協会誌. 90: 485-491 (1995).
 18. 横塚弘毅. カベルネ・ソービニオン及びマスカット・ベリーA 赤ワインの熟成中における色調の変化. 色素パラメータのスペクトル分析. 日本醸造協会誌. 90: 222-229 (1995).
 19. 横塚弘毅. カベルネ・ソービニオン及びマスカット・ベリーA 赤ワインの熟成中における色調の変化 III. 赤ワインの有機溶媒抽出による4つの色素画分の分別と得られた画分の pH 変化及び亜硫酸に対する感受性. 日本醸造協会誌. 90: 560-565 (1995).
 20. 横塚弘毅・奥田徹・佐藤充克. 種々の pH をもつマスカット・ベリーA ブドウマストから製造した赤ワイン新酒の色調と色素パラメータ. 日本ブドウ・ワイン学会誌. 9: 2-12 (1998).

