

## [ Technical Brief ]

## エタノールを使用したブドウ果汁の資化性窒素 (アミノ酸) の分析方法

藤田 晃子\*・塚本 香・藤井 力・後藤 (山本) 奈美

独立行政法人酒類総合研究所 〒739-0046 広島県東広島市鏡山 3-7-1

## An Ethanol Addition Method for Analyzing Yeast Assimilable Nitrogen (Amino Acid) Levels in Grape Juice

Akiko FUJITA\*, Kaori TSUKAMOTO, Tsutomu FUJII, and Nami GOTO-YAMAMOTO

National Research Institute of Brewing, 3-7-1 Kagamiyama, Higashi-hiroshima, Hiroshima 739-0046, Japan

The formol titration method is commonly used for the analysis of yeast assimilable nitrogen levels in grape juice. Recently, a formalin-free ethanol addition method, which does not use formaldehyde aqueous solution, was developed for the analysis of total amino acid levels in Japanese sake. In this study, we applied this method to the analysis of yeast assimilable nitrogen (amino acid) levels in grape juice. After the addition of ethanol to neutralized grape juice sample, the mixture was titrated using a pH meter or phenolphthalein as end point indicator. The titration values showed good correlation with the values obtained by the formol titration method and the concentrations of total amino acids determined by an amino acid analyzer.

**Key words:** amino acid, analysis, ethanol, grape juice, yeast assimilable nitrogen

## 緒 言

ブドウ果汁中の窒素化合物量はワイン醸造において重要である。ブドウは米や麦のような穀類よりもタンパク質やアミノ酸が少ないので (香川 2008)、ワイン酵母は清酒やビール酵母よりも窒素不足の状態が増殖・発酵している。酵母が利用できる窒素 (資化性窒素) は、主にアミノ酸とアンモニウム塩で、果汁の窒素量が低いと、発酵が緩慢になったり (Blateyron and Sablayrolles 2001, 米倉ら 2005)、停止したりする (Bisson 1999)。また、甲州種ブドウについては、果汁の資化性アミノ酸含量 (総アミノ酸含量から酵母が発酵中に資化できないプロリンの含量を減じたもの) が高いほど、醸造したワインの果実系の香りが高く、官能評価が高い傾向がみられると報告されている (小松ら 2009)。従って、発酵開始前にブドウ果汁の窒素量を把握しておくことが大切であり、窒素が不足する場

合はリン酸水素二アンモニウムなどが発酵助成剤として利用されている (Blateyron and Sablayrolles 2001)。

ブドウ果汁の資化性窒素量は一般的にホルモール滴定法 (Sørensen 1907) で測定されており、我が国ではホルモール滴定法に基づいた清酒等のアミノ酸の測定法 (国税庁所定分析法 3-6) がブドウ果汁に応用されているのが現状である (小松ら 2011, 米倉ら 2005)。この方法では、試料を中和した後、アミノ酸等のアミノ基をホルムアルデヒドと縮合させ、遊離のカルボキシル基を水酸化ナトリウム溶液で滴定し、滴定値に係数を乗じて窒素量に換算する (西谷 2000)。操作が簡単で、高額な分析機器を必要としないが、医薬用外劇物のホルマリン (ホルムアルデヒド水溶液) を使用する。ホルムアルデヒドは「労働安全衛生法施行令」において、特定化学物質の第2類物質 (がん等の慢性障害を引き起こす物質のうち、第1類物質に該当しないもの) に区分され、その取り扱い場所の備えるべき要件 (局所排気装置の設置など) が「特定化学物質障害予防規則」で定められている。

\*Corresponding author (email: fujita@nrib.go.jp)

2016年1月8日受理

我々は、清酒においてホルマリンを使用しないアミノ酸の分析法を検討し（藤田ら 2015）、エタノール添加法として酒類総合研究所標準分析法に追加した。この方法は、はじめに Willstätter と Waldschmidt-Leitz (1921) により報告され、高宮 (1927) により検討が加えられたアルコール・水酸化カリウム滴定法（アルコール溶液においてアルカリ滴定によりアミノ酸を定量する方法）を清酒に応用したものである。この方法では試料を水酸化ナトリウム溶液で中和した後、一定量のエタノールを加えて混合し、水酸化ナトリウム溶液で滴定する。つまり、ホルマリンをエタノールに置き換えれば、ホルモール滴定法と同様の器具とアルカリ溶液を使用し、同様の操作で分析できる。そこで、エタノール添加法がブドウ果汁の資化性窒素の分析にも応用できるか検討した。

## 材料と方法

### 1. 試薬

和光純薬工業（株）特級を使用した。エタノールはエタノール (99.5) (純度 (GC) 質量分率 99.5%以上) を使用した。フェノールフタレイン指示薬、N/10 水酸化ナトリウム溶液、及び中性ホルマリン溶液は国税庁所定分析法 3-6-1 に従って調製した。

### 2. 果汁試料

品種、産地、収穫時期の異なる 19 種類のブドウを使用して果汁を調製した (Table 1; No. 1~10: 白ブドウ, No. 11~19: 黒ブドウ)。ブドウは除梗、破碎した後、液体を遠心分離し (6,000 rpm, 10 分間)、上清を凍結保存し、使用時に融解して試料とした。No. 1, 2, 3, 8, 11 についてはブドウ破碎時にピロ亜硫酸カリウムを 100 mg/kg の濃度で添加して調製した凍結果汁を使用時に融解し、10 mL に対して過酸化水素 (30~35.5%水溶液) 20  $\mu$ L を添加して試料とした。これらの試料について、2014 年 11 月から 2015 年 11 月の間に下記 3~5 の分析を実施した。

### 3. ホルモール滴定法による資化性窒素の滴定指示薬滴定法

果汁試料 10 mL をとり、フェノールフタレイン指示薬数滴を加えて N/10 水酸化ナトリウム溶液で淡桃色を呈するまで中和した。これに中性ホルマリン溶液 5 mL を加え、遊離した酸を N/10 水酸化ナトリウム溶液

Table 1 Grape juice samples used in this study.

Sample no.	Grape cultivar	Source	Harvest year
1	Manai	Hiroshima	2014
2	Riesling	Hiroshima	2014
3	Rich Baba	Hiroshima	2014
4	Viognier	Hiroshima	2014
5	Rosaki	Hiroshima	2014
6	Sémillon	Hiroshima	2014
7	Trebbiano	Hiroshima	2014
8	Plural mixture	Hiroshima	2012
9	Riesling	Hiroshima	2014
10	Niagara	Hiroshima	2014
11	Cabernet Sauvignon	Hiroshima	2013
12	Cabernet Sauvignon	Hiroshima	2014
13	Gros Colman	Hiroshima	2014
14	Syrah	Hiroshima	2014
15	Nebbiolo	Hiroshima	2014
16	Cabernet Sauvignon	Yamanashi	2009
17	Cabernet Sauvignon	Hyogo	2009
18	Merlot	Yamagata	2009
19	Merlot	Hyogo	2009

で再度淡桃色を呈するまで滴定した。

なお、3 及び 4 の滴定においては、滴定量 (mL) に N/10 水酸化ナトリウム溶液の力価を乗じて測定値とした。また、測定値に 140 を乗じて窒素量 (mg/L) とした。測定は 2 回行い、平均値で示した。

### pH 計による方法

果汁試料 10 mL をとり、pH 計 ((株) 堀場製作所製の pH METER F-22 及びスタンダード pH 電極 9615S-10D) を用いて、N/10 水酸化ナトリウム溶液で pH 8.2 になるまで中和した。これに中性ホルマリン溶液 5 mL を加え、遊離した酸を N/10 水酸化ナトリウム溶液で再度 pH 8.2 になるまで滴定した。

なお、最初の中和に要した N/10 水酸化ナトリウム溶液の量 (mL) に力価を乗じて酸度とし、酸度に 0.75 を乗じて酒石酸等量 (g/L) とした (国税庁所定分析法 9-10)。

### 4. エタノール添加法による資化性窒素の滴定指示薬滴定法

果汁試料 10 mL をとり、フェノールフタレイン指示

薬数滴を加えて N/10 水酸化ナトリウム溶液で淡桃色を呈するまで中和した。これに一定量のエタノールを加えて混合し、無色に戻った溶液を N/10 水酸化ナトリウム溶液で再度淡桃色を呈するまで滴定した。

#### pH 計による方法

果汁試料 10 mL をとり、pH 計 ((株) 堀場製作所製の pH METER F-22 及び低電気伝導率水・非水溶媒用 pH 電極 6377-10D) を用いて、N/10 水酸化ナトリウム溶液で pH 8.2 になるまで中和した。これにエタノール 15 mL を加えて混合し、N/10 水酸化ナトリウム溶液で pH 9.8~10.0 になるまで滴定した。

#### 5. 遊離アミノ酸の定量

日本電子 (株) 製の全自動アミノ酸分析機 (JLC-500/V) を使用し、マニュアルに従って分析した。まず、果汁試料 0.2 mL に純水 0.8 mL と 2% スルホサリチル酸 1 mL を加えて攪拌後、20~30 分間置き、孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターでろ過した。次に、陽イオン交換樹脂を充填したカラムにろ液を導入し、種々の緩衝液を流すことにより各々のアミノ酸成分に分離した後、溶出液にニンヒドリン試薬を加えて加熱することにより生成した色素を流動比色で測定し、アミノ酸の定性と定量を行った。

### 結果と考察

#### 1. 指示薬滴定法の測定条件の検討

エタノール添加法による清酒のアミノ酸の分析においては、清酒 10 mL を中和後、エタノール 25 mL を

添加し、N/10 水酸化ナトリウム溶液で滴定を行う (酒類総合研究所標準分析法)。そこで、No. 1, 2, 3 の果汁試料 10 mL をとり、フェノールフタレイン指示薬数滴を加えて N/10 水酸化ナトリウム溶液で淡桃色を呈するまで中和後、清酒の場合と同様にエタノール 25 mL を加えて混合し、無色に戻った溶液を N/10 水酸化ナトリウム溶液で再度淡桃色を呈するまで滴定した。その結果、測定値はホルモール滴定法の測定値と比較して 1.4~1.5 倍高くなった (Table 2)。エタノール添加法とホルモール滴定法では、どちらも試料のアミノ酸組成によって測定値が影響を受けることが示されている (藤田ら 2015, 岡本ら 2013)。エタノール添加法の測定値はホルモール滴定法と比較してグリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸で低くなり、イソロイシン、ヒスチジン、プロリンで高くなる。ブドウ果汁は清酒に比べてプロリンの割合が高いことやグリシンの割合が低いことなどから (日本醸造協会 1999, 米倉ら 2005)、ブドウ果汁を清酒の条件で分析すると、エタノール添加法の測定値の方が高くなったのではないかと考えられた。

清酒においては、中和後に添加するエタノール量を増やすと滴定に要するアルカリ溶液の量が増えること、試料 10 mL に対して添加するエタノール量が 5~190 mL の範囲では測定値がホルモール滴定法の測定値と高い相関を示すことがわかっている (藤田ら 2015)。そこで、果汁試料 No. 1~7 各 10 mL に対して添加するエタノール量を 20 mL、15 mL、10 mL と減らしてみた

Table 2 Comparison of grape juice titration values determined by the ethanol addition method and the formol titration method using phenolphthalein as the indicator.

Sample no.	Ethanol addition method				Formol titration method
	(25 mL)	(20 mL)	(15 mL)	(10 mL)	
1	1.7	1.5	1.2	1.1	1.2
2	1.8	1.6	1.3	1.0	1.2
3	1.7	1.6	1.2	1.1	1.2
4	N.D.	1.6	1.0	N.D.	1.0
5	N.D.	2.0	1.6	1.1	1.7
6	N.D.	N.D.	1.1	N.D.	1.2
7	N.D.	1.7	1.3	1.1	1.4

Values in parentheses indicate volumes of ethanol added after neutralization of 10 mL of grape juice samples.

N.D. means not determined.

ところ、測定値が低くなった (Table 2)。15 mL の場合、ホルモール滴定法の測定値に最も近づくとともに相関を示した (Fig. 1)。なお、果汁試料 No. 8, 9, 10 (白ブドウ) 及び No. 11~19 (黒ブドウ) については、エタノール添加法、ホルモール滴定法ともに試料の色の影響で指示薬の色の変化が捉えにくく、分析できなかった。

ところで、亜硫酸を含む果汁試料をホルモール滴定法で分析すると、亜硫酸を含まない試料に比べて測定値が低くなることが知られており、亜硫酸が含まれる場合は試料 10 mL にあらかじめ 30% 過酸化水素水を 2~3 滴添加して亜硫酸を硫酸に酸化させてから分析に使用されている (Aerny 1996)。測定値に及ぼす亜硫酸の影響を確認するため、亜硫酸を含まない果汁試料 No. 6 にピロ亜硫酸カリウムを 200 mg/L の濃度で添加して測定してみたところ、エタノール添加法 (1.1→0.8)、ホルモール滴定法 (1.2→0.9) ともに測定値が低下した。ピロ亜硫酸カリウムを同様に添加した試料 10 mL に、さらに過酸化水素 50  $\mu$ L を添加して測定した場合は、測定値がエタノール添加法で 1.1、ホルモール滴定法で 1.2 となり、ピロ亜硫酸カリウム無添加の場合の測定値に戻った。

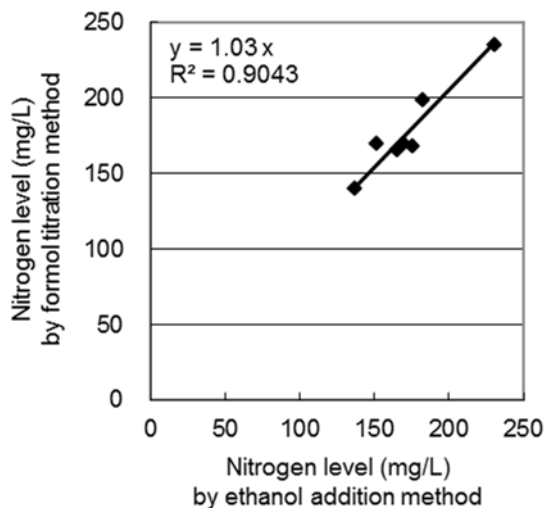


Fig. 1 Comparison of grape juice nitrogen levels determined by the ethanol addition method and the formol titration method. Seven juice samples were analyzed using phenolphthalein as the indicator. Nitrogen level (mg/L) = 140  $\times$  titration value (titration volume (mL)  $\times$  factor of 0.1 mol/L sodium hydroxide).

また、ピロ亜硫酸カリウムを 400 mg/L の濃度で添加した場合、測定値がエタノール添加法で 0.3、ホルモール滴定法で 0.7 とかなり低くなったが、ピロ亜硫酸カリウムを添加した試料に過酸化水素 50  $\mu$ L を添加すると、同様にピロ亜硫酸カリウム無添加の場合の測定値に戻った。

従って、エタノール添加法においても、亜硫酸を含む試料の場合は測定値が低くなるが、ホルモール滴定法の場合と同様に過酸化水素の添加でその影響が抑えられることがわかった。

## 2. 分析中の pH の変化

1 において、果汁試料 No.1~7 各 10 mL を中和後、エタノール 15 mL を添加して滴定した際、分析中の pH を測定したところ、果汁 pH 3.1~3.8 (平均 3.4)、中和後 pH 7.7~8.2 (平均 7.9)、エタノール添加後 pH 8.0~8.5 (平均 8.2)、滴定後 pH 9.4~10.0 (平均 9.7) となり、清酒の結果 (藤田ら 2015) と同様のパターンを示した。ホルモール滴定法の場合、中和後にホルマリンを添加すると pH が低下するが、一方で中和後にエタノールを添加すると、フェノールフタレインは無色に戻るが、pH は逆にわずかに上昇し、その後の滴定で終点 (淡桃色) の pH が 10 近くまで上昇することがわかった。

20°C における水の比誘電率は 80、エタノールの比誘電率は 25 である (日本化学会 2004)。従って、中和後の試料にエタノールを添加すると、溶液の誘電率が低下する (自己解離定数  $pK_w$  が上昇することにより、アミノ酸とフェノールフタレインの解離平衡が酸性側にシフトし、フェノールフタレインの水溶液における変色域 (pH 8.2~10.0) が塩基性側 (pH 10 付近) にシフトした結果、アルカリ溶液中での滴定が可能になったと推測される。原理の解明についてはさらに詳細な検討が必要である。

## 3. pH 計による方法の測定条件の検討

黒ブドウなど着色した果汁を分析する場合、フェノールフタレイン指示薬とアルカリ溶液を用いて滴定する方法では色の変化を観察することが難しい。ホルモール滴定法では、一般的に pH 計による方法が使用されている。そこで、エタノール添加法について、pH 計による方法を検討した。

まず、ブドウ果汁 19 点について試料 10 mL をとり、pH 計を用いて pH 8.2 になるまで中和した。酸度は酒

Table 3 Comparison of grape juice titration values determined by the ethanol addition method and the formol titration method using a pH meter.

Sample no.	Acidity (tartaric acid equivalent g/L)	Ethanol addition method			Formol titration method
		(pH 9.8)	(pH 9.9)	(pH 10.0)	(pH 8.2)
1	3.3	1.0	1.0	1.1	1.2
2	8.2	1.3	1.4	1.5	1.3
3	3.4	1.0	1.0	1.1	1.2
4	13.0	1.3	1.4	1.5	1.0
5	11.4	1.4	1.5	1.7	1.7
6	5.8	1.1	1.2	1.3	1.2
7	9.0	1.5	1.6	1.7	1.4
8	4.3	1.3	1.4	1.5	1.5
9	17.4	2.0	2.2	2.3	2.1
10	4.8	1.9	2.0	2.2	2.2
11	5.1	2.1	2.2	2.4	2.1
12	7.1	1.2	1.3	1.4	1.3
13	12.5	1.2	1.3	1.4	1.2
14	13.5	1.2	1.3	1.4	1.1
15	18.2	1.3	1.5	1.6	1.4
16	4.3	0.5	0.6	0.6	0.3
17	6.0	0.4	0.5	0.6	0.5
18	6.1	0.6	0.6	0.7	0.6
19	3.8	0.6	0.6	0.7	0.5

pH values in parentheses indicate the end points of the titration.

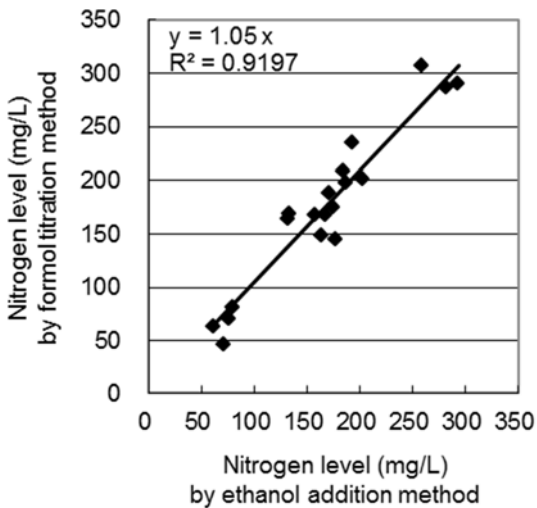


Fig. 2 Comparison of grape juice nitrogen levels determined by the ethanol addition method and the formol titration method using a pH meter. Nineteen juice samples were titrated up to pH 9.8 in the ethanol addition method and pH 8.2 in the formol titration method. Nitrogen level (mg/L) = 140 × titration value (titration volume (mL) × factor of 0.1 mol/L sodium hydroxide).

石酸等量で 3.3~18.2 g/L であり、試料によって大きく異なっていた (Table 3)。次に、エタノール 15 mL を加えて混合し、N/10 水酸化ナトリウム溶液で滴定し、2 の滴定後の pH を参考に pH 9.8, 9.9, 10.0 になったところで滴定量を記録した。ホルモール滴定法の pH 計による測定値と比較した結果、相関がみられた (Fig. 2 ; 終点 pH 9.8 の場合)。終点を pH 9.9 とした場合は回帰式  $y = 0.97x$ 、決定係数  $R^2 = 0.9232$ 、終点を pH 10.0 とした場合は回帰式  $y = 0.89x$ 、決定係数  $R^2 = 0.9251$  となった。従って、終点を pH 9.8~9.9 とすると、ホルモール滴定法の値に概ね近い値になることがわかった。

#### 4. エタノール添加法による測定値とアミノ酸濃度との比較

果汁試料 19 点について、全自動アミノ酸分析機を用いて 41 種類の遊離アミノ酸の分析を行った。エタノール添加法及びホルモール滴定法 (それぞれ指示薬滴定法及び pH 計による方法) の測定値をアミノ酸濃度と比較した結果、全ての方法で相関がみられ、測定

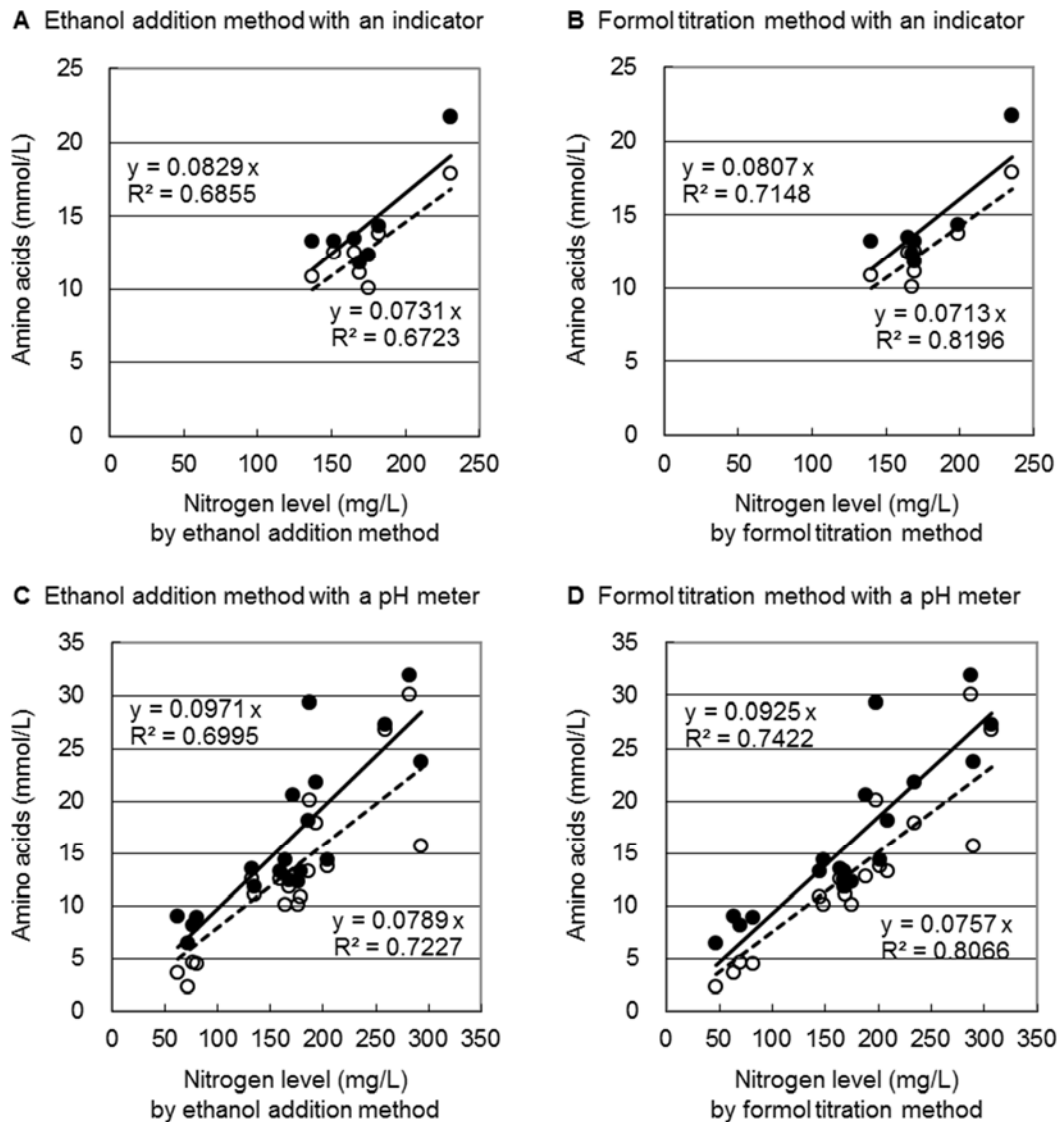


Fig. 3 Comparison of grape juice nitrogen levels determined by the ethanol addition method (A and C) and the formol titration method (B and D) and amino acid concentrations. Seven juice samples were analyzed using phenolphthalein as the indicator (A and B). Nineteen juice samples were titrated up to pH 9.8 in the ethanol addition method (C) and pH 8.2 in the formol titration method (D). Nitrogen level (mg/L) = 140 × titration value (titration volume (mL) × factor of 0.1 mol/L sodium hydroxide). ●, Total amino acids; ○, Amino acids except proline.

値はアミノ酸濃度を概ね反映することがわかった (Fig. 3)。総アミノ酸濃度との比較では、全ての方法で決定係数  $R^2$  が 0.7 程度であった。プロリンを除く資化性アミノ酸濃度との比較では、エタノール添加法で  $R^2$  が 0.7 程度であったが (Fig. 3A, C)、ホルモール滴定法では 0.8 程度とやや高い相関を示した (Fig. 3B, D)。果汁試料の総アミノ酸に占めるプロリンのモル分率は 2~64% であり、アミノ酸組成は果汁によって大きく異なっていた。ホルモール滴定法の場合、プロリンの測定

値は理論値の 1 割程度と低い、エタノール添加法の場合、2 割程度とやや高くなる (藤田ら 2015)。従って、ホルモール滴定法の測定値は、総アミノ酸濃度よりも総アミノ酸からプロリンを除いた濃度との相関の方が高くなったと考えられる。

以上の結果、エタノール添加法で果汁を分析することにより、アミノ酸濃度と相関があり、ホルモール滴定法に近い測定値が得られることがわかった。今後、ホルマリンを使用しない分析法として製造現場で活用

されることが期待される。ただし、エタノール添加法のホルモール滴定法との相関は清酒のアミノ酸よりやや低く、滴定量で最大0.3 mL (窒素量として約40 mg/L) の差異が認められた (Table 3, Fig. 2)。従って、測定値は目安と考え、ある程度正確な測定値を必要とする場合は、必要な対応をした上でホルモール滴定法を用いるか、分光光度計を用いてアンモニアと $\alpha$ -アミノ酸の分析 (Zoecklein et al. 1995) をすることが望ましい。

### 要 約

清酒のアミノ酸の分析法として最近設定されたエタノール添加法が、ブドウ果汁の窒素性窒素の分析に応用できるか検討した。ブドウ果汁 10 mL を中和し (フェノールフタレイン指示薬で淡桃色、または pH 8.2 まで)、特級エタノール (99.5) 15 mL を添加後、N/10 水酸化ナトリウム溶液で滴定する (指示薬で淡桃色、または pH 9.8~9.9 まで) ことにより、従来のホルモール滴定法に近い測定値が得られることを確認した。この方法の測定値はアミノ酸濃度に対してホルモール滴定法と同程度の相関を示した。

### 謝 辞

ブドウ果実及び果汁を提供していただきました各地のワインメーカーの皆様、並びに酒類総合研究所の小山和哉氏、西堀奈穂子氏に深謝いたします。

### 文 献

Aerny, J. 1996. Composés azotés des moûts et des vins. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 28: 161-165.  
Bisson, L.F. 1999. Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 50: 107-119.  
Blateyron, L. and J.M. Sablayrolles. 2001. Stuck and slow fermentations in enology: statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *J. Biosci. Bioeng.* 91: 184-189.  
藤田晃子・塚本 香・橋本知子・遠藤路子・松丸克己・藤井 力. 2015. エタノールを使用した清酒のアミノ酸度分析方法の検討. *日本醸造協会誌* 110: 591-598.  
香川芳子. 2008. 五訂増補食品成分表 2009 資料編. p. 118, 119, 132, 133. 女子栄養大学出版部. 東京.  
国 税 庁 所 定 分 析 法 「 3-6 ア ミ ノ 酸 」.

<https://www.nta.go.jp/shiraberu/zeiho-kaishaku/tsutatsu/kobetsu/sonota/070622/pdf/03.pdf>  
国 税 庁 所 定 分 析 法 「 9-10 総 酸 (遊 離 酸) 」.  
<https://www.nta.go.jp/shiraberu/zeiho-kaishaku/tsutatsu/kobetsu/sonota/070622/pdf/09.pdf>  
小松正和・中山忠博・恩田 匠・上垣良信・鈴木幾雄・莊 富盛・久本雅嗣・奥田 徹・前島善福. 2009. 甲州種ワインの高品質化に向けた栽培・醸造技術に関する研究. *山梨県工業技術センター研究報告* 23: 38-44.  
小松正和・中山忠博・恩田 匠・上垣良信・木村 亮・佐野祐子・久本雅嗣・奥田 徹・前島善福. 2011. 甲州種ワインの高品質化に向けた栽培・醸造技術に関する研究 (第3報). *山梨県工業技術センター研究報告* 25: 25-40.  
厚生労働省. 労働安全衛生法施行令. <http://law.e-gov.go.jp/htmldata/S47/S47SE318.html>  
厚生労働省. 特定化学物質障害予防規則. <http://law.e-gov.go.jp/htmldata/S47/S47F04101000039.html>  
日本醸造協会. 1999. 醸造物の成分. p. 63-84, 352-359. 日本醸造協会. 東京.  
日本化学会. 2004. 改訂5版化学便覧基礎編II. p. II-372, II-620. 丸善. 東京.  
西谷尚道. 2000. 第四回改正国税庁所定分析法注解. p. 23-24. 日本醸造協会. 東京.  
岡本 健・杉島紋子・大田朋槻・赤崎哲也. 2013. バンスライク法、Sorensen 法 (ホルモール滴定法) 及びニンヒドリン比色法で得られるアミノ態窒素の定量値に関する比較研究. *関税中央分析所報* 53: 11-17.  
Sørensen, S.P.L. 1907. Formol titration. *Biochem. Z.* 7: 45.  
酒類総合研究所標準分析法「3-6B) エタノール添加法」. <http://www.nrib.go.jp/bun/bunpdf/nb03.pdf>  
高宮悦雄. 1927. R. Willstätter 及 E. Waldschmidt-Leitz のアルカリ滴定法に依るアミノ酸及ペプチドの定量法の実験的研究補遺. *日本農芸化学会誌* 3: 815-823.  
Willstätter, R. and E. Waldschmidt-Leitz. 1921. Alkalimetrische Bestimmung von Aminosäuren und Peptiden. *Ber. d. Deutsch. Chem. Ges.* 54: 2988-2993.  
米倉裕一・中山繁喜・櫻井 廣. 2005. 果汁の窒素量

がワイン醸造に及ぼす影響. 岩手県工業技術センター研究報告 12: 55-57.

Zoecklein, B.W., K.C. Fugelsang, B.H. Gump, and F.S. Nury.

1995. Wine Analysis and Production. p. 340-342. Chapman & Hall. New York.