

2018年度 生物工学奨励賞（江田賞） 受賞



ビール醸造における微生物検査法の迅速化に関する研究

浅野 静



Studies on rapid detection of beer-spoilage bacteria

Shizuka Asano (Research Laboratories for Alcohol Beverages, Asahi Breweries, 1-1-21, Midori, Moriya, Ibaraki 302-0106) *Seibutsu-kogaku* **97**: 108–114, 2019.

はじめに

ビールの起源は、紀元前四千年メソポタミア文明まで遡るとされており、シュメール人がビールを造る様子が陶板に記録されている¹⁾。当時のビールは、娯楽や余暇で楽しむ嗜好品というよりは、不衛生な飲料水の代用品、重要なビタミンの補給源、あるいは宗教上のキーマテム、時には労働の賃金として幅広い用途に活用されていたと考えられている^{2,3)}。また、紀元前三千年頃にはすでにエジプトでもビールは多く飲まれており、高い醸造技術を有していたといわれている。その後、ビールの製造方法は各地へ伝播した。

現在、我々が口にするビールに、爽快な味と香りを付与する重要な役割を果たしているのがホップである。実は中世以前のヨーロッパにおけるビール醸造では、ホップに限らず多様な草根本皮類が使用されていた。11世紀後半から、ホップのビール防腐効果が優れていることが認識されるようになり、現在のようにホップが多用されるようになっていった。このホップに含まれるフムロンなどの α 酸が麦汁煮沸中に異性化してイソ α 酸となり、水溶性で苦味を持つ物質となる。図1にイソ α 酸の構造式を示す。このホップ成分はグラム陽性菌に対してプロトンイオノフォアとして作用し、細胞膜内外のプロトン勾配を消失させることにより抗菌活性を示すと報告されている⁴⁾。

ビールはこのホップ成分による抗菌作用の他にも、

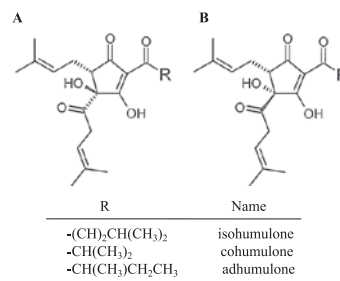


図1. イソ α 酸の構造式。
(A) trans-体, (B) cis-体。

pHが低いこと(3.8–4.7)、アルコールを含むこと、溶存酸素がきわめて低いこと、炭酸ガスによってガス圧がかかること、酵母による発酵後の液体であるため、栄養分が少ないことなどから、微生物的に安定な食品とされている。しかしながら、一部の微生物種はこのような過酷な条件でも生育し、ビールに混濁や不快な香味を引き起こすことが知られ、ビール混濁菌と呼ばれている^{4,5)}。ビール混濁菌による汚染事故は、100 mLあたり数個レベルという低い菌数で引き起こされてしまうことに加え、被害が500 kLの発酵タンク全体、あるいは充填されて出荷されてしまった場合には、全国に流通する該当ロットの製品すべてに及ぶなど規模が莫大となるため、ビール醸造においては混濁菌に対する厳しい管理が行われている。

ビール混濁乳酸菌

これらのビール混濁菌の中でもっとも注意しなければいけないのが乳酸菌、特に*Lactobacillus*属乳酸菌であり、混濁事故の原因菌として世界的にも事故件数が多い^{6,7)}。発酵食品における有用菌として登場することの多い*Lactobacillus brevis*は、ビール製造においては悪玉菌の代表であり、ビール工場で頻出するもっとも有名なビール混濁菌である⁸⁾。また*L. lindneri*は、製品ビールだけでなく半製品からも検出される菌として広く知られている⁹⁾。さらに、2004年に新菌種提案された*L. paracollinoides*は、強いビール混濁能を有しており、工場環境からの検出例が多いと報告されている¹⁰⁾。その他、2017年にも*L. cerevisiae*や*L. curtus*が新菌種提案されるなど、ビール混濁菌の菌種は増える一方である^{11,12)}。さらに、*Lactobacillus*属という同じ属に属するにもかかわらず、ビール混濁能の有無は菌種レベルで解析しなければ判別できないという点が、品質管理においてビール混濁菌の検査を困難にしてきた。

微生物検査法の技術開発

このようなビール混濁菌の検査は、検査培地の改良、検出までの時間の短縮、そして検出菌の同定方法の技術開発という3つのアプローチで飛躍的に進歩してきた。ここでは検出菌の同定方法に着目して述べる。

検出された菌の同定方法として、1980年代までは主にグラム染色ならびに糖の資化性などの伝統的な実験手法が主流であった。しかし、これらの手法による同定は判定までに時間を要するうえに、得られる結果が曖昧なため、品質管理上満足できるレベルではなかった。その後、1990年代から徐々に、PCR法を用いた遺伝子増幅法が菌種同定に適用されるようになり、ビール製造各社が独自にプライマーを設計しビール混濁性菌のPCR法を開発するようになった¹³⁻¹⁵⁾。この菌種特異的PCR法の利点は、検査にかかる時間が数時間程度まで短縮できること、新しいビール混濁菌種の報告がされた場合でもプライマーの設計や検出感度の評価などのブラッシュアップで短期に対応できることである。本法を、顕微鏡観察やグラム染色などの手法と組み合わせることで、漏れのない網羅的な微生物検査体制を維持することが可能となった。

マルチプレックスPCR法の開発

一方、ビール混濁菌の判定を菌種特異的PCR法で行うことの問題点もあった。前述のように、近年の微生物の検出と単離技術、および遺伝学的同定手法の進歩によ

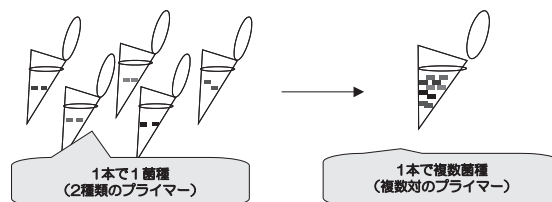


図2. マルチプレックスPCR法

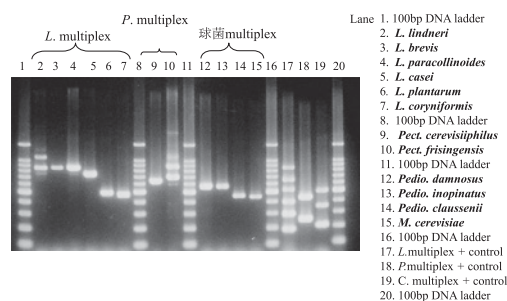


図3. ビール混濁菌のマルチプレックスPCR法。検出対象菌を各マルチプレックスPCR法にて反応させて得られる増幅産物と、人工陽性対照による検査系の信頼性確認法。

り、新規ビール混濁菌種は続々と報告されている。1菌種に対して1種類のPCR法を行う菌種特異的PCRを実施する場合、検出対象となる菌種が多くなると、検体数が増加し検査室での同定作業が煩雑になるのである。そこでこの問題点を解消するために、複数対のプライマーを内包するマルチプレックスPCR法によるビール混濁菌種の一括検出同定法を開発することにした(図2)¹⁶⁾。

本検査系では、グラム染色や形態観察結果に応じて、既知のビール混濁菌12菌種を便宜的に3グループに分け、各グループが1反応系となるようマルチプレックスPCR法を構築することとした(図3)。ビール混濁性乳酸菌6菌種*Lactobacillus brevis*, *L. lindneri*, *L. paracollinoides*, *L. coryniformis*, *L. plantarum*, および*L. casei*を一括して検出するL. multiplex (L: *Lactobacillus*属)法については、菌種数が多いため、非特異的な増幅反応を防ぐ目的で、対象6菌種中5菌種に対応する下流プライマーを共通プライマーにした。グラム陰性の偏性嫌気性ビール混濁菌である*Pectinatus*属の2菌種、*Pectinatus cerevisiiphilus*および*Pectinatus frisingensis*を一括して検出するP. multiplex (P: *Pectinatus*属)、さらに、ビール混濁球菌4菌種*Pediococcus damnosus*, *Pediococcus inopinatus*, *Pediococcus clausenii*, および*Megasphaera cerevisiae*を一括して検出する球菌multiplexを構築した。評価の結果、それぞれのマルチプレックスPCR法の検出感度は菌種特異的なシプレックスPCR法と比較して同等であり、また、ビール工場環境菌14菌種に対して擬似バンドとなるようなPCR産物は認められな

かったことから、実用水準の検出感度と特異性を備えた手法であることが確認できた。

本マルチプレックス法をあえて3反応系に分けて開発した理由は2つある。まず、1反応系における対象菌種を少なくすることで、新規に報告されたビール混濁菌種を追加しやすくすることである。対象菌種が多くなると、プライマー数が増えることで非特異的な反応が起こりやすくなることから、開発の難易度が上がり開発期間が長くなってしまふのである。さらに、顕微鏡観察やグラム染色といった簡易的な性状調査で明確に判別がつく場合は、それに応じたマルチプレックス法のみ実施することで、PCR法の検体数を少なくすることができる利点がある。

この他、さらなる省力化、信頼性向上のため、各マルチプレックスPCR法に配合されたプライマー対の増幅反応を1反応系で確認することを可能とした人工陽性対照も合わせて開発したので、詳細は参考文献を参照していただきたい^{16,17)}。本陽性対照は、検出対象とする菌のDNA抽出溶液を検査室に持ち込むことなくPCR検査ができることから、検査室の汚染を防ぐ必要のあるさまざまな産業で有用であると考えている。

ビール馴化と乳酸菌

世界各国で大規模に工業生産されているビールのほとんどで、加熱による殺菌が行われているのに対して、日本では非加熱のいわゆる「生ビール」が主流であることはあまり知られていない。生ビールは新鮮で爽やかな香味が保たれる反面、微生物による汚染リスクが高いため、多くの場合、フィルターろ過法を用いた除菌処理が行われている^{18,19)}。その中でも、メンブレンフィルターは耐圧性に優れているのに加え、取扱いが簡便なことから、近年多用されるようになっており、工場における微生物制御において最後の砦と言っても過言ではない。しかしながら、市販メンブレンフィルターの性能はメーカーや素材によって大きく異なるのが現状である。すなわち、

工場において適切な微生物管理を行うには、除菌フィルターの性能を精査し、管理基準に見合ったフィルターを選択することが重要となってくる。

この選択基準の一つとしてあげられるのがフィルターの孔径である。一般に市販フィルターの品質保証項目は酵母や大腸菌など微生物を指標菌とした除菌性能で規定されるが、ビール混濁菌で評価した場合にどのような挙動が観察されるかについては知見がなかった。そこで、ビール製造においてフィルターろ過工程以前で汚染リスクが高いとされている*Lactobacillus*属菌4菌種を用いて、フィルターの除菌性能を評価したところ、培養条件によって除菌効率に差異があることがわかった²⁰⁾。一般的な乳酸菌用培地であるMRS (de Man, Rogosa, Sharpe)培地で培養した菌(未馴化菌と呼ぶ)と、ビールで数回植え継いだ菌(馴化菌と呼ぶ)を用いて、フィルターLRV(log reduction value)を算出した結果が表1である。除菌性能をあらわす値として用いられるこのLRVは、一次側菌濃度を分子に、二次側菌濃度を分母にとり、常用対数で表した値である。たとえば、 10^6 cells/mLの菌液(一次側)をフィルターろ過し、ろ液(二次側)の菌濃度が 10^4 cells/mLとなった場合には、LRVは2となる。本試験では、MRS培地で培養した未馴化菌と、ビールで植え継いだ馴化菌を、0.65 μ m孔径のミリポア社製フィルターでろ過し、CFU(colony forming unit)で計測した菌濃度からその除菌性能を算出した。*L. brevis*および*L. lindneri*においては、ビール馴化により著しいLRVの減少が認められ、フィルターによる除菌効率が菌濃度に換算して1~3桁下がるのがわかった。このことから、ビール混濁乳酸菌の一部の菌種は、ビールへの馴化によって除菌フィルターを通過しやすい状態に移行することが明らかとなった。すなわち、ビール環境に棲息する菌は、筆者らが想定していた以上にフィルターでの除菌工程を逃れやすくなっているのである。この除菌効率の差異は何が原因となっているのか。

表1. ビール馴化によるLRVの変化

供試株		未馴化 ^a	馴化 ^a
<i>Lactobacillus brevis</i> ABBC45	4.15, 4.22	2.87, 2.77	
<i>L. brevis</i>	ABBC64	4.97, 4.95	3.78, 3.44
<i>L. lindneri</i>	DSM 20690 ^T	5.59, 5.82	2.46, 2.39
<i>L. lindneri</i>	DSM 20692	5.74, 6.10	2.65, 2.80
<i>L. paracollinoides</i>	JCM 11969 ^T	>6.12, >6.17	>5.52, >5.69
<i>L. backi</i>	LA21	6.00, 6.45	5.10, 4.75

^a測定は2点併行で行い、結果は並列で表記した。

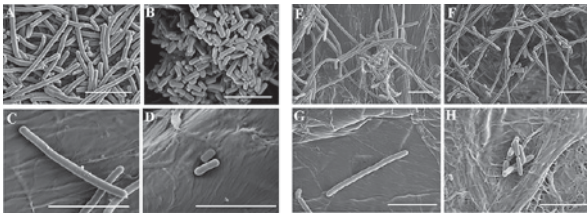


図4. ビール未馴化菌と馴化菌の電子顕微鏡観察. (A, C) ビール未馴化の*L. brevis* ABBC45, (B, D) ビールに馴化した*L. brevis* ABBC45, (E, G) ビール未馴化の*L. lindneri* DSM 20690^T, (F, H) ビールに馴化した*L. lindneri* DSM 20690^T. Bars: 5 μm.

ビール馴化による形態変化

フィルターろ過では、微生物を物理的に繊維間隙に捕捉することにより除菌している。そのため、除菌性能は、細菌のサイズと孔径との関係に大きく左右されると考えられる。そこで、前述のLRV測定試験において見いだされたフィルター除菌性能の違いの原因を探るため、走査型電子顕微鏡を用いて、ビール馴化による形態的な差異を観察した。

*L. brevis*と*L. lindneri*の未馴化菌およびビール馴化菌を固定し、走査型電子顕微鏡にて観察したのが図4である。まず、図4のA・CとB・Dを比較してみる。ビール馴化した*L. brevis*では個々の細胞が非常に短く、MRS培地で通常観察されるような長い菌はほとんど観察されない。また、図4のE・GとF・Hでは、同じく除菌性能が低下していた*L. lindneri*を示した。ここでも同様に、ビール馴化した*L. lindneri*では、サイズの大きい菌体は存在するものの、その存在比は未馴化菌と比べてかなり小さくなっていることが観察された。つまり、供試した2菌種において、ビールに馴化した菌は未馴化菌と比較して著しく小型化することが明らかとなったのである。

ビール馴化による小型化現象を定量的に調べるため、未馴化菌およびビール馴化菌のうち、ランダムに選択した40個の菌体の細胞サイズを計測した。なお、本試験では、*L. brevis*および*L. lindneri*の未馴化菌およびビール馴化菌を、細胞内酵素であるエステラーゼと反応し蛍光を発するCFDA (carboxyfluorescein diacetate) により染色し、高精度蛍光顕微鏡にて検出を行い、専用解析ソフトにより算出される細胞の長さとの幅の数値を解析する手法を採用している。

解析の結果を図5に示す。ビール馴化した*L. brevis*では、細胞の長さの平均値が未馴化菌の半分以下になっており、細胞サイズが短桿状へシフトしていた。この結果は、顕微鏡観察で得られた知見と一致する。また、*L. lindneri*についても同様の傾向が認められた。

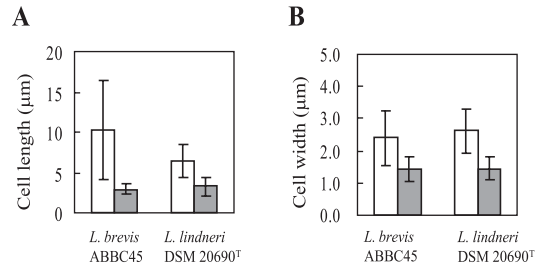


図5. ビール馴化による細胞サイズの変化. *L. brevis* ABBC45と*L. lindneri* DSM 20690^Tの長さ(A)と幅(B). □: ビール未馴化菌, ■: ビール馴化菌. n = 40, mean ± S.D.

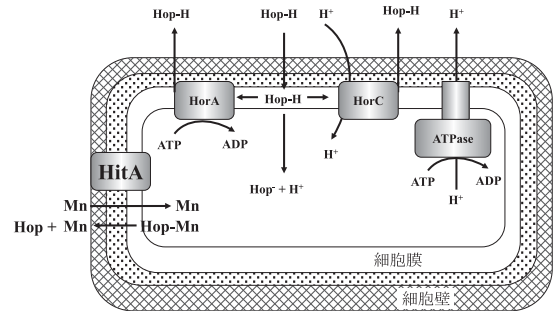


図6. 乳酸菌におけるホップ耐性機構

これらの結果から、今回観察した*L. brevis*および*L. lindneri*は、ビール馴化によって、細胞のサイズに変化が起きており、短桿状に偏る傾向があることがわかった。このサイズの変化については、ビール中のエタノールの存在やpHが低いこと、あるいはビール中の貧弱な栄養分による飢餓によって引き起こされるなど、いくつかの要因が考えられるが、筆者は中でもホップ成分に着目している。

これまでの研究成果から、ホップ成分のイソα酸が菌体内に侵入するのを防ぐ機構(ホップ耐性機構)に関与する遺伝子として、ホップ耐性遺伝子*horA*および*horC*が見つかった。これらの遺伝子は、ビール混濁乳酸菌のプラスミド上にあり、多剤排出ポンプと推定されるHorAおよびHorCをコードしていることが明らかとなっている(図6)^{21,22}。ビール馴化菌は、ビール環境においてホップ成分との接触を最小限に防ぎ、ホップ耐性機構を賦与する排出ポンプHorAおよびHorC、ならびにproton-translocating ATPaseなどの膜タンパク質の発現を効率的に制御するために、表面積を小さくすることでビール環境に適応するのであろうと考えられる。この点については未だ仮説にすぎないが、ビール馴化による形態変化はビール混濁乳酸菌を知るうえで興味深く、今後さらに解析する余地がある。

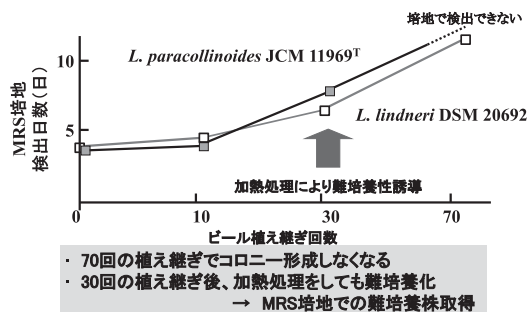


図7. ビール混濁性乳酸菌のMRS培地での難培養化現象

乳酸菌検査培地での難培養化現象

ビール馴化をさらに高度に進めた場合、ビール混濁菌はどのような挙動を示すのであろうか。ビール混濁乳酸菌 *L. paracollinoides* と *L. lindneri* をビールで繰り返し植え継ぎ、乳酸菌用のMRS培地でのコロニー形状の観察、およびコロニー形成能を評価した。その結果、すべての株において、ビールでの植え継ぎ回数が増加するに従い、MRS培地でのコロニー形成が遅くなるとともに、形成されるコロニーが微小になっていった(図7)^{23,24)}。その後、40~70回植え継ぎを繰り返した結果、ビールには旺盛に生育するもののMRS培地ではコロニーを形成しない株を取得するに至った。これらの株は、EBC (European Brewery Convention) やASBC (American Society of Brewing Chemists) により推奨される乳酸菌検査培地でもコロニー形成を行わないが、ビールに少量のMRS培地を加えて調製したビール寒天培地では良好に検出できることが明らかとなった。

このような、検査用培地や栄養源豊富な培地では培養できない微生物は環境微生物学の分野では珍しい現象ではない。近年、自然環境中の微生物の多くは、培地で培養できない「難培養状態」にあることが報告されている^{25,26)}。一方、培養できないという状態は微生物研究者からみた視点であり、微生物の立場からすると、ある限られた環境にしか生存できないほど、その環境に進化・適応した環境絶対適応微生物である、という考え方も提唱されている²⁷⁾。

こうした知見をふまえると、ビールのような過酷で栄養源の乏しい環境に棲息する混濁乳酸菌は、ホップ耐性をはじめとするさまざまな耐性機構を獲得しながら、長い時間をかけてビール環境に適応するように進化を続けたのではないかという仮説が立てられる。実際に、ビール混濁性を示す *L. brevis* は、塩基配列比較などの解析によって一般的な自然環境から分離される *L. brevis* とは分類学的に異なるサブグループに属すること、ならびに、*L.*

lindneri および *L. paracollinoides* は、ビール醸造環境から特異的に検出されることも本仮説を支持していると考えている²⁴⁾。

直接検出法

前述の通り、ビール製造における品質管理技術の向上には、検査培地の性能向上と検出までの時間短縮が課題である。これまでの知見で、ビールに少量のMRS培地を加えたビール寒天培地 (ABD: advanced beer-spoiler detection) では、これまで培養法で捉えきれなかった難培養菌の検出ができることがわかった²⁸⁾。さらに、ビール成分を多く含むため、環境雑菌やビール中で増殖しない非混濁菌がノイズとして検出されないという選択性が高い培地でもあることに加え、未知のビール混濁菌が検出できるという優れた点も兼ね備えている。しかしながら、対象とする混濁乳酸菌は培地上での増殖速度が非常に遅く、目視で確認できるまでに数日から1週間程度かかってしまうことが難点であった。

一方で、1970年代ごろから、培養法を介さず試料中の微生物種を蛍光顕微鏡下で直接計測する方法が医薬品および食品業界で広まってきた。中でも環境微生物分野で多用される FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法を用いた直接FISH法は、対象となる微生物が特異的に持つリボソームRNA (rRNA) 配列に相補的な配列(プローブ)を蛍光標識し、微生物細胞内のrRNAを標的としてハイブリダイゼーションを行うことにより、特定の微生物を検出する方法である^{29,30)}。そのため、迅速な検出と確実な菌種同定を行うことができる。しかしながら、本法では蛍光強度が細胞内のrRNA量に依存するため、生理活性の低い状態では蛍光強度が低く検出しにくい。また、数 μm の菌体を検出するには高い感度が求められる反面、試薬や実験器具由来のバックグラウンドノイズが問題となってしまうのが難点であった。

マイクロコロニー法による検出

マイクロコロニー法とは、目視で確認できるコロニーになるまで培養を待つのではなく、初期の増殖段階の微小コロニーを顕微鏡で検出する手法である。サンプルをメンブレンでろ過し、短時間培養した後、蛍光活性染色を施し顕微鏡で観察するのが一般的な手順である。ビール業界においても、1970年前後から酵母や細菌のマイクロコロニー法などが開発されており、死菌を検出することなく、増殖能を有する生菌のみが検出できる点がメリットとされてきた^{31,32)}。しかしながら、これまでのマイクロコロニー法においては細胞内ATPを検出する、あるいは微生物の生細胞内に普遍的に存在するエステ

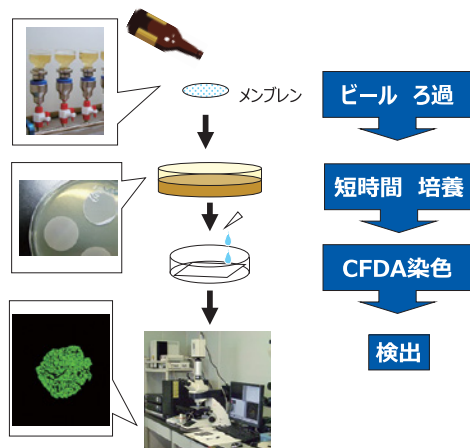


図8. マイクロコロニーCFDA法

ラーゼによって蛍光物質に加水分解されるFDA (fluorescein diacetate) 系試薬を用いた染色法を用いる場合がほとんどであり、細菌の存在、および生菌数を確実に把握できるものの、検出菌種の同定はもとより、ビール混濁性の判定ができないことがネックとなっていた。

そこで本研究では、迅速なビール混濁菌検査法の構築を目的として、ABD培地を用いて、マイクロコロニー法とFISH法の利点を組み合わせたマイクロコロニーFISH法を検討することとした³³⁾。すなわち、マイクロコロニー法により培養法よりも短時間で生菌の検出を行い、CFDA (carboxyfluorescein diacetate) 染色にて陽性であった場合には、FISH法を連続して行うことで確実な菌種同定ができる手法である。この際、マイクロコロニーFISH法で検出されるのは数十 μm のマイクロコロニーであるため、FISH法の弱点であったノイズやバックグラウンドによる検出感度低下や非特異的な検出は抑えられることが期待された。

ビール混濁性が強く、迅速な検査が求められる*L. brevis*、*L. paracollinoides*および*L. lindneri*を検出対象菌種として選択し、保有株の中でもっとも生育が緩慢な株を供試菌株とした。ABD培地において嫌気培養を行った結果、通常目視でコロニーが観察できるようになるまでに少なくとも3~6日を要するのに対して、マイクロコロニー法では*L. brevis*は20時間、*L. paracollinoides*は40時間、*L. lindneri*においては64時間で、ろ過メンブレン上のほとんどすべての菌が、検出可能なマイクロコロニーを形成していることがわかった(図8)。また、検出の際のCFDAによる染色も良好で、微生物か否か判断に迷うような夾雑物の存在も確認されなかった。

さらに、各菌種に特異的なCy3標識プローブを用いて、CFDA染色後にFISH法を適用した結果が図9である。操作によるコロニー形状の崩壊もなく、菌種特異的に反

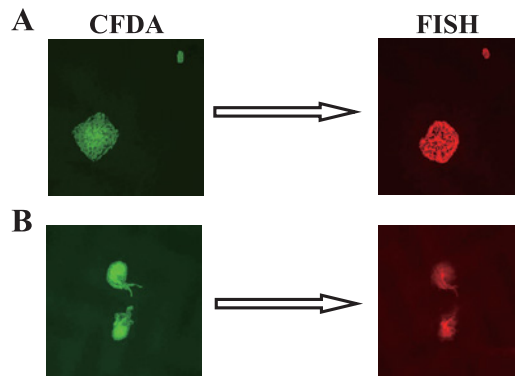


図9. マイクロコロニーFISH法。(A) CFDA染色された*L. brevis* ABBC45のマイクロコロニーに対して、菌種特異的FISH法を実施した。(B) *L. paracollinoides* JCM 15728。

応することがわかった。

本法の開発により、培養に要する時間を概ね3分の1以下に短縮できたとともに、まだ報告例のない未知のビール混濁菌も迅速検出できるようになった。

おわりに

近年、消費者の嗜好の変化に合わせて、麦芽加工方法や酵母の種類、発酵法、麦芽以外の副原料やホップの添加方法など、多種多様なアプローチでビールが造られている。欧米でもクラフトビールの流行に伴い、非加熱殺菌のビールの流通も増加してきた中で、未だに微生物による混濁事故と市場からの製品回収の事例は絶えない³⁴⁾。その背景には、常に新しい未知の混濁菌が出現し、検査を複雑かつ煩雑にしている実状がある。本研究は、品質と鮮度の高い美味しいビールを消費者の方々に届けることを目的として取り組んできた。今後もビール醸造だけでなく、さまざまな食品分野に貢献できるような技術開発を進めていきたい。

謝 辞

本研究を行うに当たり、ご指導いただきました東京大学名誉教授北本勝ひこ先生ならびに東京大学准教授有岡学先生に深く感謝致します。

文 献

- 1) 都島 惟：THE BEER ビールのすべて、食品産業新聞社、p. 18-20 (1996)。
- 2) 橋本直樹：ビールのはなし-Part 2 おいしさの科学、p. 1-10、技報堂出版 (1998)。
- 3) Hill, A. E.: *Beer - A quality perspective* (Bamforth, C. W. Ed.), p. 121-154, Elsevier, London (2009)。
- 4) Sakamoto, K. and Konings, W. N.: *Int. J. Food Microbiol.*, **89**, 105-124 (2003)。
- 5) Back, W.: *Brauwelt Int.*, **4**, 326-333 (1994)。

- 6) Hutzler, M., Müller-Auffermann, K., Koob, J., Riedl, R., and Jacob, F.: *Brauwelt Int.*, **31**, 23–25 (2013).
- 7) Shimokawa, M., Suzuki, K., and Yamagishi, H.: *Brauwelt Int.*, **34**, 98–103 (2016).
- 8) Hollerova, I. and Kubizniakova, P.: *J. Inst. Brew.*, **107**, 355–358 (2001).
- 9) Back, W., Bohak, I., Ehrmann, M., Ludwig, W., and Schleiffer, K. H.: *Syst. Appl. Microbiol.*, **19**, 322–325 (1996).
- 10) Suzuki, K., Ozaki, K., and Yamashita, H.: *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 712–718 (2004).
- 11) Asakawa, Y., Takesue, N., Asano, S., Shimotsu, S., Iijima, K., Suzuki, K., Motoyama, Y., and Aizawa, M.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **67**, 3899–3906 (2017).
- 12) Koob, J., Jacob, F., Wenning, M., and Hutzler, M.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **67**, 3452–3457 (2017).
- 13) Tsuchiya, Y., Kaneda, H., Kano, Y., and Koshino, S.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **50**, 64–67 (1992).
- 14) Motoyama, Y. and Ogata, T.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **58**, 4–7 (2000).
- 15) Wold, K., Bleken, A., and Hage, T.: *Proceedings of the 30th European Brewery Convention Congress*, p. 129 (2005).
- 16) Asano, S., Suzuki, K., Ozaki, K., Kuriyama, H., Yamashita, H., and Kitagawa, Y.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **66**, 37–42 (2008).
- 17) 特許第4819545号
- 18) Back, W.: *Brauwelt Int.*, **10**, 42–49 (1992).
- 19) Kunze, W.: *Technology brewing and malting; 3rd ed.*, p. 453–487, VLB Berlin, Germany (2004).
- 20) Asano, S., Suzuki, K., Iijima, K., Motoyama, Y., Kuriyama, H., and Kitagawa, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 334–338 (2007).
- 21) Suzuki, K.: *Brewing Microbiology* (Hill, A. Ed.), pp. 141–173, Elsevier Woodhead (2015).
- 22) 鈴木康司：生物工学, **88**, 601–605 (2010).
- 23) Suzuki, K., Iijima, K., Asano, S., Kuriyama, H., and Kitagawa, Y.: *J. Inst. Brew.*, **112**, 295–301 (2006).
- 24) 鈴木康司：日本醸造協会誌, **105**, 512–521 (2010).
- 25) Oliver, J. D.: *J. Microbiol.*, **43**, 93–100 (2005).
- 26) Oliver, J. D.: *FEMS Microbiol. Rev.*, **34**, 415–425 (2010).
- 27) 工藤俊章, 大熊盛也：Bio Industry, **23**, 5–7 (2006).
- 28) Suzuki, K., Asano, S., Iijima, K., Kuriyama, H., and Kitagawa, Y.: *J. Appl. Microbiol.*, **104**, 1458–1470 (2008).
- 29) Yasuhara, T., Motoyama, Y., Ogawa, A., Kagami, N., and Kawatsura, K.: *Proceedings of the World Brewing Congress*, p. 72 (2004).
- 30) Yamaguchi, N., Baba, T., Nakagawa, S., Saito, A., and Nasu, M.: *Nephrol. Dial. Transplant.*, **22**, 612–616 (2007).
- 31) Kanda, H.: *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, O-18 (2007).
- 32) 中村光晴, 小林央子：ジャパンプードサイエンス, **46**, 58–63 (2007).
- 33) Asano, S., Iijima, K., Suzuki, K., Motoyama, Y., Ogata, T., and Kitagawa, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **108**, 124–129 (2009).
- 34) Begrow, W.: *Brewing and Beverage Industry International*, **5**, 10–13 (2017).