

ビール産業における微生物品質保証技術

鈴木 康司

ビールはアルコールを含むこと、嫌気状態であること、栄養成分が少ないこと、抗菌作用を持つホップ成分を含むなどの理由により、生育しうる微生物の菌種はきわめて少ない¹⁾。しかしながら、いったん微生物事故を引き起こした場合、消費者に対する信頼を裏切ることとなり、長年培ってきた企業ブランドに多大な損害を与える。したがって、ビール混濁性を示す微生物を迅速に検出しその混濁性を判定することは、ビール工場における製造環境改善ならびに製品の品質保証を行う上できわめて重要である。

日本においては加熱殺菌処理を施さない生ビールが主流であり、この流れは世界的にも広がりつつある中、生であるがゆえに混入微生物が生育し混濁事故が発生する品質リスクは大きい。このような状況の下、日本のビール産業では高い水準の衛生管理技術とそれを支える微生物検査法が発展してきた。その中でも、当社は業界でも先駆的な取り組みを行い、その成果を世界へ発信することによりビール産業全体の技術発展に寄与してきた。本稿では、当社がこれまで世界に先駆けて提案してきた技術ならびに知見について紹介する。

乳酸菌によるビール変敗の諸問題

乳酸菌は古くから主要なビール変敗微生物として知られており、欧州ではビールにおける約60～90%の微生物事故事例が乳酸菌を原因としたものであると報告されている²⁾。これらビール混濁乳酸菌による変敗の様式としては、製品ビールの混濁、ジアセチルなどの異臭発生、粘質化などがあげられる^{3,4)}。一方、乳酸菌に属せばどの菌種でもビールに生育して混濁させるわけではなく、ビール混濁乳酸菌は*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus lindneri* および *Pediococcus damnosus* など数種に限定され、混濁乳酸菌種は分類学上お互いに近縁関係にないことが知られている¹⁾。以上のことから、ビール産業における微生物管理においては、乳酸菌のビール混濁性を判定する迅速法として、菌種同定法がこれまで中核的な役割を果たしてきた¹⁾。しかしながら、菌種同定法によるビール混濁性判定には2つの問題点がある。まず1つ目の問題点は、同一のビール混濁菌種に属していても強いビール混濁性を示す株と、まったく示さない株が存在することである¹⁾。菌種同定法では、このような同一菌種内に認められる株レベルでのビール混濁性の差異を識別するこ

とができない。2つ目の問題は、筆者らが最近報告した*Lactobacillus paracollinoides*⁵⁾の事例が示すように、既知の種に属さないにもかかわらず強いビール混濁性を示す未知の乳酸菌種が出現する点である。このような場合、既知菌種に対する同定検査法では未知菌種に対応することができない。特に後者の事例は、一度の微生物品質事故が企業に対する消費者の信頼を失墜させるビール産業においてはきわめて深刻な問題である。

また、ビール産業におけるもう一つの大きな問題は、ビール混濁乳酸菌が、品質検査で用いられる微生物検出培地で生育しない事例があることである。実際に、検査培地で検出がないにもかかわらず品質事故が発生した事例は国内・国外を問わず多いとされている。また、このような検出困難な乳酸菌で品質事故が発生した場合、相手の姿が検知できないがゆえに、原因の究明や再発防止策が進まないことが多い⁶⁾。そのため、従来型の検査培地では検出が困難なビール混濁乳酸菌に対して有効な培地の開発が望まれていた。

乳酸菌のビール混濁性判定法の開発

ホップは特有の苦味をビールに賦与する天然抗菌成分であり、乳酸菌を含むグラム陽性細菌に対してプロトンイオノフォアとして作用することにより抗菌活性を示すと報告されている⁷⁾。一方、ビール混濁乳酸菌株の特徴的な性質は、ホップ成分に対して強い耐性を示すことであり、この点において一般的な乳酸菌と異なる¹⁾。また、ビール混濁乳酸菌株が同一菌種に属す非混濁菌株に比べて強いホップ耐性を持つことも知られている。そこで筆者らは、乳酸菌のビール混濁性を決定する主要因子であるホップ耐性に着目し、本因子により菌種という枠を超えて乳酸菌のビール混濁性を判定できる遺伝子マーカー探索を行うこととした。

ホップ耐性遺伝子 *horA* の発見 ホップ耐性遺伝子 *horA* は、きわめて強いビール混濁性を示す *L. brevis* ABBC45株が保有する15.1 kbのプラスミド pRH45に見いだされた⁸⁾。一般に多くのビール混濁乳酸菌は、徐々にホップ濃度を高めた培地で植え継ぐことにより次第に高いホップ耐性を獲得するが、この現象はホップ馴化と呼ばれている。pRH45は、*L. brevis* ABBC45株のホップ耐性がホップ馴化により高くなるにつれ、コピー数が増加する性質を有していた⁸⁾。このため、本プラスミドが

ABBC45株にホップ耐性を賦与する一因子であると推察し、pRH45に関する解析を進めた。pRH45を欠失した変異株を得るため、さまざまなキュアリング法を評価した結果、ABBC45株を通常の培養温度より高い30°Cで継代培養を繰り返し行うことによりpRH45が欠失した変異株ABBC45^C株を得ることができた。そこで、本変異株のホップ耐性を評価した結果、野生株の1/2程度のホップ耐性しか示さないことが判明した⁹⁾。pRH45に見いだされた*horA*遺伝子の産物は、推定されるアミノ酸配列から*Lactococcus lactis*由来の多剤排出ポンプであるLmrAと53%の相同性を示すことがわかり⁸⁾、本遺伝子は多剤排出ポンプをコードしていることが示唆された。そこで、筆者らは*Lc. lactis*を用いた*horA*遺伝子発現系を構築し、本遺伝子がホップ耐性を賦与する多剤排出ポンプとして機能するABCトランスポーターであることを実証した¹⁰⁾。本研究は、醸造微生物学において初めてのホップ耐性遺伝子の発見およびその機構の解明につながり、これまで謎とされてきたホップ耐性機構解明に大きな一歩を記し、踏み出すこととなった。

第2のホップ耐性遺伝子*horC*の特定 ホップ耐性が低減したABBC45^C株には依然としてビール混濁性が残存しており、*horA*遺伝子以外にもホップ耐性機構が存在すると考えられた。ABBC45^C株取得の際、通常培養温度より高い30°Cで培養することでホップ耐性を弱めることができたため、さらにホップ耐性が低減した株の取得を目指し、培養温度を37°Cに高めてABBC45^C株を継代培養した。その結果、ビール混濁性を完全に失った変異株ABBC45^{CC}株を取得することに成功した⁹⁾。また、得られたABBC45^{CC}株は、ビール非混濁性*L. brevis*であるJCM 1059^T株と同等のホップ耐性しか示さないこともわかった。

ABBC45^{CC}株はABBC45^C株と比較して、約23.4 kbのプラスミド(pRH45 II)が消失していたため、このプラスミドの解析を進めた。その結果、pRH45 IIはプラスミドごと脱落しているわけではなく、一部の領域が欠失し、残りの領域はABBC45^{CC}株に残存していた⁹⁾。このため、欠失領域がビール混濁性の喪失に関係していると考えた。ABBC45^C株を用いた生化学的な実験結果から、ABBC45^C株にはプロトン駆動力依存型のホップ耐性機構が存在するという知見を得ていたため、欠失領域に存在していた12個のORF(open reading frame)の中から、プロトン駆動力依存型RNDスーパーファミリーの排出ポンプに類似した二次構造をコードするORF(*horC*遺伝子)に着目した¹¹⁾。

*horC*遺伝子がホップ耐性遺伝子としての機能を有しているか検証するため、本遺伝子の機能解析はABBC45^{CC}株に*horC*遺伝子を再導入することにより行った。その結

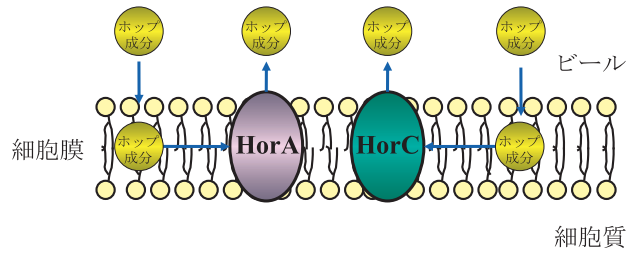


図1. HorAおよびHorCタンパク質によるホップ耐性機構

果、得られた*horC*遺伝子導入株はABBC45^C株の水準までホップ耐性が上昇しており、第2のホップ耐性遺伝子として特定された。さらに*horC*遺伝子導入株においてはビール混濁性が回復することも確認され、ビール非混濁乳酸菌株にビール混濁性を賦与できた初めての事例となった¹²⁾。なお、HorCタンパク質もHorAタンパク質と同様にホップ成分の排出ポンプとして機能していると推測している(図1)。

ビール混濁性判定マーカーによる網羅的検査法の構築 新たに見いだされたホップ耐性遺伝子*horA*ならびに*horC*により、漏れのないビール混濁乳酸菌判定が可能か否かについて環境頻出細菌を含む130株を用いて調査を行った¹¹⁾。PCR法ならびにサザンブロット解析により検討した結果、ビール混濁乳酸菌51株については、*horA*ホモログの保有率は94%、*horC*ホモログの保有率は96%であり、いずれも優れたビール混濁性判定マーカーとなるものの、単独の遺伝子マーカーでは擬陰性反応を生じることも明らかとなった。一方、2つの遺伝子マーカーを併用した場合、調査したすべての混濁株が少なくともいずれか1つの遺伝子マーカーを保有していることがわかり、*horA*ならびに*horC*は、漏れのない検査法という観点でお互いに補完できる関係にあることが判明した。また、ビール非混濁乳酸菌に対しては、*horA*では若干の擬陽性反応が認められるものの、*horC*には調査した範囲内で擬

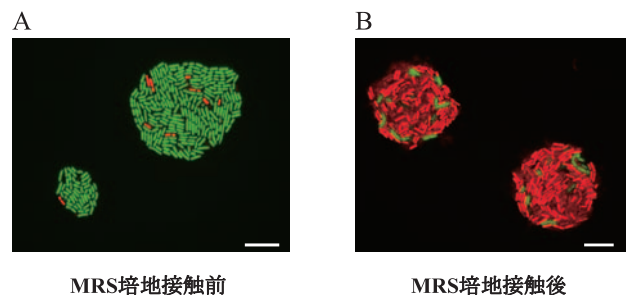


図2. *Lactobacillus lindneri* DSM 20692^{VN}株のMRS寒天培地における挙動。ビール寒天培地で形成させたステルス型ビール混濁乳酸菌のマイクロコロニーをMRS寒天培地に一定時間接触後、5-(and 6-) carboxyfluorescein diacetateおよびpropidium iodideで二重蛍光染色した。本試験系では生菌は緑色に、死菌は赤色に染色される。Bar, 10 μm。

陽性反応は認められなかった。さらに、ビール混濁性を持たない腸内細菌科や芽胞菌のような環境頻出細菌については、*horA* あるいは *horC* を保有する株は認められなかった。以上のことから、菌種に依存しないビール混濁性判定マーカーという新規概念により網羅的なビール混濁乳酸菌検査法が構築できる可能性が示され、本検査法の実運用への展開に向かって大きな前進を遂げることとなった。なお、筆者が知る限り、食品の変敗形質を標的とした遺伝子マーカーで、菌種の枠を超えて網羅的な微生物検査を可能にした事例は、ビール混濁性 *L. brevis* から見いだされた *horA* 遺伝子が食品産業で最初のものであったように思う。

ホップ耐性遺伝子の水平伝播仮説 *L. brevis* ABBC45 株に見いだされたホップ耐性遺伝子 *horA* および *horC* はプラスミドに存在しており、さらにこれら遺伝子の周辺領域にはトランスポゼースなど DNA 断片の転移に関与する遺伝子群が存在していた^{1,13)}。このことから、*horA* および *horC* 遺伝子はプラスミドやトランスポゾンを通じて伝播していることが推察された。そこで、*L. brevis* 以外の菌種が保有する *horA* 遺伝子周辺領域 5.6 kb および *horC* 遺伝子周辺領域 8.2 kb について塩基配列を決定し、詳細な解析を行った。その結果、解析に用いたビール混濁乳酸菌 *L. lindneri* DSM 20690^T 株、*L. paracollinoides* JCM 11969^T 株、*P. damnosus* ABBC478 株の *horA* および *horC* 遺伝子周辺領域は、いずれも *L. brevis* ABBC45 株の当該領域とまったく同じ ORF 構造が保存されていた。さらに、これらの菌株は属あるいは種が異なるにもかかわらず、解析領域内の塩基配列は約 99% の相同性を示していた¹⁴⁾。以上のことはホップ耐性遺伝子が乳酸菌の属あるいは種を超えて水平伝播していることを強く示唆するものである。

筆者らの提唱したホップ耐性遺伝子の水平伝播仮説は、*horA* および *horC* 遺伝子をマーカーとして乳酸菌のビール混濁性を推定する上で理論的根拠を与えるものとなった。さらに重要なことは、これまでビール産業で問題になってきた新菌種・未知菌種の出現に対して有効な検査法となる可能性を示せたことである。このことをさらに検証するため、ごく最近新菌種提案されたばかりのビール混濁菌種 *Pediococcus claussenii*¹⁵⁾ ならびに *Lactobacillus backi*¹⁶⁾ の 2 種について、それぞれ複数株得られたため調査を行った。その結果、すべての株について *horA* および *horC* 遺伝子の少なくとも一方を保有していることがわかり、ホップ耐性遺伝子を判定マーカーとする検査法が、新菌種・未知菌種を含めた網羅的微生物検査法に有用であることが示されている。

検出困難な乳酸菌の検査培地の開発

検出困難な乳酸菌株の取得 ビール混濁乳酸菌種の

うち、*L. lindneri*、*L. paracollinoides* および *P. damnosus* は、MRS 培地のような通常の乳酸菌検査培地では検出困難な株が多い¹⁷⁾。筆者らの環境調査では、当時分離された半数以上のビール混濁乳酸菌株が、MRS 培地での生育性を示さなかったという事例もあり、ビール環境に潜む乳酸菌は検出困難なものが多いことが裏づけられた⁶⁾。ビール産業では、このように従来型検査培地で検知が困難な乳酸菌をステルス型乳酸菌とよび恐れている。そこで、ビール混濁乳酸菌の多くが、なぜ培地で検出困難であるのかについて調査を行った⁶⁾。まず、MRS 培地で生育性を示す *L. paracollinoides* JCM 11969^T 株と JCM 15729 株、および同じく MRS 培地で生育性を示す *L. lindneri* DSM 20692 株と HC92 株をビールで繰り返し植え継いで、MRS 寒天培地でのコロニー形成能を評価した。その結果、すべての株について、ビールでの繰り返し植え継ぎ回数の増加に伴い、MRS 寒天培地上でコロニー形成に要する時間が遅延していき、形成されるコロニーも微小なものとなっていった。そして、40~70 回ビールで植え継ぎを繰り返すことにより、MRS 寒天培地上でコロニー形成能を失った株を得るに至った(表 1)。以上の試験結果から、ビール混濁乳酸菌が MRS 培地などの乳酸菌培地で生育性を示さないのは、ビール環境への高度適応が関連するのではないかと推察された⁶⁾。なお、*L. paracollinoides* JCM 11969^T 株と JCM 15729 株ならびに *L. lindneri* HC92 株は、ビール製造環境から分離した当時、MRS 培地で生育性が認められないあるいは非常に緩慢な生育性しか示さない検出困難な乳酸菌株であった。分離後、徐々に MRS 培地環境に馴化させることにより良好な培地生育性を獲得した株であるため、分離当時の状態に戻ったともいえる。

次に、MRS 寒天培地でコロニー形成能を失った変異株について、ビールを寒天で固化させて調製したビール寒天培地上でコロニー形成を試みた¹⁷⁾。その結果、これらの乳酸菌株は、ビール寒天培地上でコロニーを形成することが分かった。そこで、ビール寒天培地を用いてメンブランフィルター上で 3~4 日程度嫌気培養して形成させたマイクロコロニーを、5-(and 6-) carboxyfluorescein diacetate と propidium iodide で二重染色し、蛍光顕微鏡で観察を行った。その結果、数十から数百の細胞からなるマイクロコロニーが形成されており、マイクロコロニーを形成するほとんどの細胞が生細胞として染色された(図 2A)。同様の条件にてビール寒天培地上で培養しマイクロコロニーを形成させたメンブランフィルターを、MRS 寒天培地上に移行させて引き続き 18 時間嫌気培養を行った。MRS 寒天培地で継続培養後、5-(and 6-) carboxyfluorescein diacetate と propidium iodide で二重染色を行った結果、MRS 寒天培地上で培養したマイクロ

表1. ビールでの繰り返し培養が混濁乳酸菌株の培地生育性に及ぼす影響

菌株	植え継ぎ回数 ^a	検出時間 (日数) ^b	CFUs ^b	MPN ^c
<i>L. paracollinoides</i> JCM 11969 ^T	0	4, 4	486, 445	460
	10	4, 4	580, 725	460
	30	7, 7	141, 156	750
	70	N.D., N.D.	0, 0	1100
<i>L. paracollinoides</i> JCM 15729	0	4, 4	384, 420	240
	10	4, 4	214, 188	240
	30	7, 8	76, 70	240
	60	10, 10	11, 13	460
<i>L. lindneri</i> DSM 20692	0	4, 4	417, 513	240
	10	4, 4	696, 788	460
	30	6, 6	181, 145	460
	70	N.D., 14	0, 1	240
<i>L. lindneri</i> HC92	0	6, 6	516, 488	460
	10	7, 7	586, 612	1100
	20	8, 8	61, 59	240
	40	N.D., 14	0, 1	1100

^a 供試 *Lactobacillus* 株を繰り返しガス抜きビール (pH 4.2) で植え継ぎ、表に記載の植え継ぎ回数の時点で、MRS 寒天培地における生育性を評価した。なお、植え継ぎにおける培養は 25°C、嫌気にて行った。

^b 本試験は 2 点並行で実施した。MRS 寒天培地で検出に要した時間を日数で記載し、25°C 嫌気培養にて 14 日後に形成された CFU (colony forming units) を示した。N.D., 培養 14 日後検出なし。

^c それぞれの株の生菌数は、pH5.0 に調整したガス抜きビールを用いた MPN (most probable number) 法で算出した。

コロニーは、死細胞がほとんどとなり、ステルス型乳酸菌株は MRS 寒天培地上で比較的急速に死滅することが示唆された (図 2B)。これは、ビール中で繰り返し植え継がれてビール環境に高度に適応した乳酸菌株が、MRS 培地環境に突然投げ出されて、あたかもショック死したかのようであった。以上のことから、ステルス型ビール混濁乳酸菌は、ビール製造環境に高度に適応したがために品質検査に用いられる培地で生育しなくなったのではないかと推察した。

ABD 培地の開発 貴重な微生物試料が得られたため、これまで検出が困難とされてきたステルス型混濁乳酸菌の検査培地開発に取り組んだ。混濁乳酸菌の難培養性が、ビール環境への極度の適応が原因であることが示唆されたため、ビールを基礎とした培地の改良を進めたのである。その過程で、通常の検査培地に含まれるさまざまな栄養成分が、ステルス型乳酸菌株の生育を阻害するという意外な事実がわかってきた。ビールのような過酷で栄養成分が少ない環境に深く適応した乳酸菌株は、過剰な栄養成分に接触すると死滅してしまうのである。これは、長期の病に伏した患者が、フルコースのディナーを食べられないのとよく似ている。そのため、ビール環境に高度に適応したビール混濁乳酸菌株には、お粥のような希薄な栄養成分を含む培地が適しているのではないかと発想を抱いた。このようにして、ごく少量の栄養成分をビールに添加して開発した混濁乳酸菌検査培地が

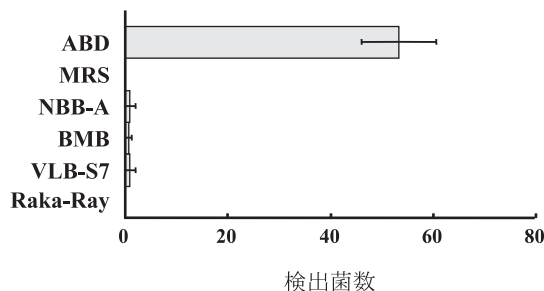


図3. ステルス型ビール混濁乳酸菌 *L. lindneri* DSM 20692^{VN} 株に対する各検査培地の検出力. European Brewery Convention あるいは American Society of the Brewing Chemists により推奨されるビール混濁乳酸菌検査培地を用いて比較を行った。

ABD (advanced beer-spoiler detection) 培地である⁶⁾。これまでビール産業では、従来型培地で検出困難な混濁乳酸菌を生育させる未知の栄養成分があるはずとの前提のもと、検査培地の開発が行われてきた。ところが、これら一連の研究結果より、過剰な栄養成分を加えないビール環境に近い培地が実は有効であるという新たな検査培地開発の方向性を示したことになる。実際に、ABD 培地の検出力を従来型の検査培地と比較した結果、これまで検出が困難とされたステルス型ビール混濁乳酸菌に対する有効な対抗策となりえることが明らかとなった (図3)。また、ABD 培地を用いて環境調査を行ったところ、検出されたビール混濁乳酸菌株のうち、従来型検査

培地では検出できないものが大半を占めることもわかった。以上のことから、ビール環境に潜む乳酸菌は、著者らがこれまで研究材料としてきた実験室株とは性状が大きく異なることが明確に示されたことになる。余談であるが、古代エジプト文明の遺跡から発見されたビールの残渣を電子顕微鏡観察すると、酵母とともに乳酸菌が見つかるという。ビール醸造の変遷とともに進化し、ビール環境に深く適応するようになったのが、ビール混濁乳酸菌本来の姿なのであろう^{17,18)}。そして、ビール混濁乳酸菌は、ビールという飲料が世界に広まる中で、ビール環境に潜みながら世界中に伝播してきたと考えられる。

乳酸菌迅速検査法の開発 上述した ABD 培地の開発により、これまで検出困難であったビール混濁乳酸菌を含めた網羅的な検査が可能となった。しかしながら、培地による培養検査であるため、生育が緩慢な乳酸菌の場合は微生物試験が完了するまでに 1 週間程度の時間を要するなどの欠点があった。そこで筆者らは、ABD 培地とマイクロコロニー法を組み合わせた迅速検査法の開発を試みた¹⁹⁾。

まず、この目的を達成するため、マイクロコロニーの染色試薬としては、安価ですべての微生物に対して汎用性が高い CFDA (carboxyfluorescein diacetate) を選択した。本試薬は生きた菌体に含まれる酵素であるエステラーゼにより分解を受け、分解産物となって初めて蛍光を発するため、微生物の生死判定が菌種に依存せずできる利点がある。また、蛍光染色したマイクロコロニーの検出系としては当社独自で開発してきた μ Finder 微生物検査システムを採用することとした。本システムは、メンブランフィルター上に生育したマイクロコロニーについて、フィルター全面を自動的に 10～15 分でスキャンして検出できるという優れた性能を持つ。さらに、一定水準以上の ATP 発光量が検出に必要であるバイオルミネッセンス法と異なり、 μ Finder 微生物検査システムは数個レベルから成る微小マイクロコロニーでも確実に検出できる点でも優位性がある。評価の結果、本システムと ABD 培地を組み合わせたマイクロコロニー法により、生育が非常に緩慢でこれまで培養に時間を要した *L. lindneri* や *L. paracollinoides* も 72 時間以内に検出が可能となった。このことにより、ビール混濁乳酸菌を 3 日以内に検出できる新迅速検査システムを構築し、実用化に至った。3 日間という培養判定期間は、これまで培地で馴養された実験室株を用いた評価試験の感覚からは迅速な印象を受けないかもしれないが、実際のビール工場環境棲息乳酸菌は、従来型検査培地で 14 日間以上かけても検出できない場合が多かったことを考えると大きな技術的進

歩と考えるとよい。現在では、CFDA により検出されたマイクロコロニーを直接 fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法で検査することにより、検出後の菌種同定も同時に実施できる検査系が確立されている。

おわりに

ビールは紀元前 8000 年から 6000 年前にメソポタミアで誕生したといわれており、ホップがビールの原料に使われるようになったのは 5～9 世紀ごろであったとされる。ビール混濁乳酸菌は、この長いビール醸造の歴史の中で、競合微生物が少ないビール環境に棲みつき共生を果たしてきた微生物群であると考えられるようになった。この共生の歴史の中で、ホップ耐性遺伝子を獲得しながら、ビール環境で生き残るために複雑な耐性機構を異菌種間で共有しながら発展させてきたと推察される^{3,4,20)}。このような環境適応は、ビールだけでなく、シードルやワイン、清酒などの酒類変敗乳酸菌についても同様のことが観察されている^{3,4)}。そして、これら変敗乳酸菌を検査するために、それぞれの酒類への環境適応を逆に利用した検査法が開発されるようになってきた^{3,4)}。今後は、環境適応を切り口とした変敗微生物検査法が、酒類分野だけでなく伝統的な発酵食品の分野にも広がっていくものと考えられる。

文 献

- 1) 鈴木康司ら：醸協，**101**，94 (2006)。
- 2) Back, W.: *Brauwelt*, **24/25**, 766 (2003)。
- 3) 鈴木康司：醸協，**105**，512 (2010)。
- 4) 鈴木康司：醸協，**105**，575 (2010)。
- 5) Suzuki, K. et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 115 (2004)。
- 6) Suzuki, K. et al.: *J. Appl. Microbiol.*, **104**, 1458 (2008)。
- 7) Simpson, W. J.: *J. Inst. Brew.*, **99**, 405 (1993)。
- 8) Sami, M. et al.: *J. Ferment. Bioeng.*, **84**, 1 (1997)。
- 9) Suzuki, K. et al.: *J. Appl. Microbiol.*, **96**, 946 (2004)。
- 10) Sakamoto, K. et al.: *J. Bacteriol.*, **183**, 5371 (2001)。
- 11) Suzuki, K. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 5089 (2005)。
- 12) Iijima, K. et al.: *J. Appl. Microbiol.*, **100**, 1282 (2006)。
- 13) Suzuki, K. et al.: *Lett. Appl. Microbiol.*, **42**, 392 (2006)。
- 14) Suzuki, K. et al.: *J. Inst. Brew.*, **112**, 173 (2006)。
- 15) Dobson, C. M. et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 2003 (2002)。
- 16) Bohak, I. et al.: *Monatsschr. Brau.*, **March/April**, 78 (2006)。
- 17) Suzuki, K. et al.: *J. Inst. Brew.*, **114**, 209 (2008)。
- 18) Suzuki, K.: Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria, In *Beer in Health and Disease Prevention*, (Preedy, V. R. and Watson, P. R.), p. 150, Elsevier Science (2008)。
- 19) Asano, S. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **108**, 124 (2009)。
- 20) Behr, J. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 6483 (2006)。