ビール発酵と発泡酒発酵における酵母の応答と香味形成

発泡酒は、酒類市場において低価格と高品質から市民権を得、最近では、新ジャンルの醸造酒も登場しシェアを拡大しつつある。これら発泡酒や新ジャンルの醸造酒の発酵においては、発酵原料の栄養成分の質と量的な違いから、新たな醸造技術の開発が必要であった。

本稿では、発泡酒の窒素源枯渇条件の醸造における酵母のストレス応答として、硫黄化合物の代謝を中心に解説していただいた。品質の高い発泡酒を製造するために、各製造者が醸造技術の開発に如何に努力しているかが伺える。

近 藤 平 人

1. はじめに

日本の酒類市場に本格的に発泡酒が登場してきたのは90年代中頃のことであり、当初はビールより低価格の魅力で市場を急拡大してきたものが、現在では発泡酒固有の独特な香味が受け入れられ、発泡酒ユーザーと呼ばれる消費者層も定着しつつある。その発泡酒がこの世に出始めて間もない頃は、発泡酒を外国に紹介する際に、“It is not beer, but the Japanese Beer-flavor Sparkling Malt Beverage.”などと表現していたが、今日では海外ビール学会などでも、“Japanese Happoshu”という言葉で充分通用するほどになっている。

発泡酒もビールと同様に原料に麦芽を使用し、仕込工程で製造した麦汁に酵母を添加して発酵させ、熟成、清澄、ろ過した後、ビン詰めをするプロセスはほぼ共通である。それでは、ビールと発泡酒の違いとは何であろうか。酒税法上、ビールとは、麦芽、ホップ、及び水を原料として発酵させたもの、または、麦芽、ホップ、水及び米その他の政令で定める物品を原料として発酵させたもので、その原料中当該政令で定める物品の合計が麦芽の重量の十分の五を越えないものに限る、と厳しく制限されている。一方発泡酒は、ビールと同じ原料を使用するも、全原料中の麦芽の使用比率

が67%未満であるか、ビールの原材料として指定された物品以外を使用した場合のものとなる。発泡酒はその使用する麦芽比率によっても酒税率が異なり、麦芽比率25%未満、25%以上50%未満、50%以上の3区分に定められていて、25%未満のものが最も税率が低い。良いものをより安くという人間の心理も手伝って、現在日本の発泡酒市場の多勢を占めているのがこの麦芽比率25%未満のものとなっている¹⁾。

2. ビールと発泡酒の麦汁

いわゆるオールモルトビールと呼ばれている麦芽100%のビールから、徐々に原料中に占める麦芽の割合を下げていって25%の発泡酒とした場合に、その麦汁の成分はどのように変化するであろうか。勿論、発酵終了後のアルコール度数は等しくなるように、麦芽以外の副原料（発泡酒ではこれが主原料になる訳だが）として米その他の政令で定める物品（多くは、コーンスターチやシロップが使用される）を発泡酒では使用し、ビール麦汁と糖濃度（原麦汁エキス分）が同じになるように調整することが多い。この場合には、麦汁に添加される酵母によって資化されアルコールに変換する炭素源（C源）はビールも発泡酒もほぼ同量ということになる。異なるのは、麦芽から麦汁中に抽出されるアミノ酸を中心とした窒素源（N源）、脂肪

第1図 発泡酒とビール麦汁

(ア) 全窒素含量(mg/100 ml麦汁), (イ) 脂肪酸含量(mg/ml)。酵母が添加される前の冷麦汁中の含量をあらわす。

酸、ミネラル、ビタミン等といった類のものであり、これらは麦芽比率が25%になるとオールモルトの場合と比較して1/3~1/4となる(第1図)。この量的、質的な違いが後述する酵母の働きや発酵パフォーマンス、最終製品の香味成分組成といったものに大きな影響を及ぼすことになる。

3. 発泡酒に供される酵母

ビール、発泡酒に用いられる醸造用酵母は分類学上、*Saccharomyces pastrianus* 種に分類されている²⁾³⁾。主にビール発酵に用いられてきた醸造用酵母の *Saccharomyces pastrianus* 種を、分子遺伝学的解析によりさらにその亜種に細かく分けると、*Saccharomyces cerevisiae* のグループと *Saccharomyces bayanus* を始めとした *cerevisiae* の遺伝的形質を有しないグループ(ここでは *non-cerevisiae* のグループと呼ぶ)、および、この2つのグループに属する種間の雑種高次倍数体のグループの3つに分類されると考えられている。また、ビール酵母は発酵パフォーマンスや香味成分特徴から、古くは上面発酵酵母(エール酵母)と下面発酵酵母(ラガー酵母)に大別されてきたが、最近、ビール酵母(ビール醸造に使用されてきた酵母)のゲノム全塩基配列が決定され⁴⁾⁵⁾、そのエール酵母の多くは *Saccharomyces cerevisiae* に分類され、日本の市場の多くを占有しているピルスナータイプ(下面発酵淡色ビール)の醸造に使用されてきた下面発酵酵母の多くが *cerevisiae* グループに属するものと *non-cer-*

visiae グループに属するものの雑種高次倍数体であることが次第に判ってきた。このうち雑種高次倍数体の酵母は、麦芽糖(マルトース)やマルトトリオースの資化能に優れ、中にはメリピオース資化能を有するものもある。これらは、以前は *Saccharomyces uvarum*, や *Saccharomyces carlsbergensis* という名前で呼ばれていたこともあったが、現在この分類は曖昧なものとなっている。そして、ビール独特の発酵パフォーマンスや香味成分形成は、この雑種高次倍数体酵母のなす複雑な遺伝子の発現とその作用の結果であるといえる。

それでは、発泡酒の発酵に供される発泡酒用酵母とは一体何であろうか、勿論、発泡酒製造会社は企業秘密上発泡酒発酵に用いる酵母について明らかにしてはしないが、発泡酒もビールと同様に麦汁中の資化性糖の多くがマルトースであり、このマルトースの資化性能に優れているビール酵母の近縁種が発泡酒用酵母として使用されているものと考えられる。

以下、染色体構成として *cerevisiae* と *non-cerevisiae* の雑種高次倍数体である典型的なビール酵母を用いてビールおよび発泡酒の発酵を行った際の現象について述べる。なお、本報で紹介するビールとは麦芽比率100%のもの、発泡酒は麦芽比率が25%のもので、2の項で紹介した内容の麦汁成分を有するものである。

第2図 発泡酒とビール発酵における酵母の増殖

縦軸は発酵もろみ中の酵母数($\times 10^6$ cells/ml), 横軸は発酵開始からの経過時間(hr)をあらわす。発泡酒: ---●---, ビール: ---◆---。発酵条件: 同一の発酵容器を用いて, 図1の成分内容である同容量の発泡酒麦汁およびビール麦汁に, それぞれ同数かつ同一種類の酵母を添加し, 温度, 圧力, その他の発酵条件は全て同一で行った。

4. 発泡酒発酵中の酵母の増殖と糖資化

酵母に限らず, 一般的な微生物の増殖は, 新規の培地に摂取された後, Lag-phaseと呼ばれるセルサイクルのスイッチがオンになる前の環境順応ステージを経て, 盛んに細胞分裂を繰り返すLog-phase, そして, 培地中の栄養素が枯渇して分裂が終了し細胞数が一定となるStationary-phaseに到るのが普通である。ところが, 発泡酒発酵における酵母の増殖は極めて特異である。

発泡酒は1 mlの麦汁中に2000万近い数の酵母が投入されて発酵が開始されるため, 短いLag-phaseはあるものの, 速やかにセルサイクルの回転が始まって増殖のPhaseに進む。しかし, わずか1回出芽し, 娘細胞を1個生成しただけで, 直ちにセルサイクルの回転を止めStationary-phaseに入る(第2図)。このことは, N源, 脂肪酸, ミネラル, ビタミン等といった酵母の生体構成に必須な成分がビール麦汁に比べて絶対的に不足しているため, 1回目の出芽終了時点では既にN源を始め増殖に必須な因子が完全に枯渇しており, セルサイクル上の2回目の出芽に向かう際のチェックポイントであるG1-phaseのReplication Restriction Start Pointを通過できないためと考えられる。

しかし, アルコール発酵完遂のため, 増殖が終了した後も, 麦汁中の資化性糖が完全に無くなるまでさらに発酵を継続させる必要があり, 長期間非増殖の

Phaseに酵母はおかれることになる。この間, 主要なN源であるアミノ酸の枯渇に従い麦汁の緩衝力が低下し, さらに, 有機酸生成とも相まってpHの極端な低下が起こる。また, アルコールおよび炭酸ガス濃度も徐々に上昇してそのストレスを直に受けることにもなる。これらの影響から, ビール発酵と比較すると, 特に発酵後期に於ける糖資化(エキス資化)速度が極端に低下していくという現象が観られるのも発泡酒発酵の特徴である(第3図)。

5. 発泡酒発酵を終えた酵母のストレス状態

発酵開始時には栄養充分な増殖環境であったものが, 1回の細胞分裂完成後は, 制限栄養源下の苛酷な環境の中を長期間耐えることを余儀なくされるという真にストレスの多いのが発泡酒発酵であるといえる。どの程度のストレスを受けているかは, 発酵終了もろみ中のプロテイナーゼ-Aの活性を測定することである程度推定できる⁶⁾。プロテイナーゼ-Aは酵母の液胞中に存在する酵素で, 老廃タンパク質の分解等に関与しているものであるが, 酵母はストレスを受けると細胞外へこの酵素を漏出するという性質を持っている⁷⁾。この現象は, 酵母細胞がストレス(特にN源枯渇)を受けた際に, プロテイナーゼ-Aをコードする遺伝子PEP4の発現量が急激に増加し, この酵素の前駆体が液胞にソーティングされる際の機能が飽和状態となって細胞外へミスソーティングされるためと考えられている。また, 発泡酒中にプロテイナーゼ-Aが多

第3図 発泡酒とビール発酵における糖質化プロファイル

縦軸は発酵もろみ中のエキス分(w/v%)，横軸は発酵開始からの経過時間(hr)をあらわす。発泡酒：---●---，ビール：---◆---。発酵条件は図2と同様で行った。

第4図 発泡酒とビール発酵の終了時におけるもろみ中のプロテイナーゼA活性

発泡酒とビールそれぞれの発酵終了時もろみ中のプロテイナーゼA活性を $\times 10^{-5}$ units/mlであらわした。1 unitは25.0°C, pH6.0において、1 mgのインシュリン β 鎖を完全加水分解する酵素力と定義する。

ということは、ビールや発泡酒の泡の形成に重要な関与をする泡タンパク質の分解を促進し、発泡酒の泡品質低下にもつながって具合が悪い⁸⁾。発泡酒発酵終了時の発酵もろみ中の酵素活性を観てみると、実にビールの3倍以上の高い値を示していた(第4図)。

また、酵母細胞の細胞質pHもストレスの指標としてよく使用される⁹⁾。バイタリティーの高い、つまりは発酵機能の高い酵母の細胞質pHは中性付近となっており、バイタリティーが低下すると酸性側にシフトする性質を持つ。31P-NMRを用いて細胞質pHを測定したところ、ビール発酵の場合、発酵後期での細胞質pHの低下がほとんど観られず、発酵終了時の酵母のpHが6.8-7.0と中性付近であったのに対して、発泡酒発酵の場合は発酵後期でのpH低下が著しく、発酵終了時は約6.6と酸性側に偏っていた(第5図)。

これらのことから、栄養成分の少ない発泡酒における発酵環境が如何に酵母にとって苛酷なものであるかが推察できる。

6. 発泡酒発酵の香味特徴

上述のとおり苛酷な発酵環境に耐えた酵母は、特にN源の枯渇によって発酵中酵母の細胞内代謝に有意な変化を及ぼし、結果として生成する香味成分に強烈な特徴が付与される。

発酵途上で麦汁中のN源が完全に枯渇するため、発酵後期での酵母細胞は生体内のN源を上手くターンオーバーさせながら発泡酒発酵を完遂すべく代謝を行うことになる。これは、タンパク自身のターンオーバーによってN源代謝を維持するだけでなく、含硫アミノ酸などの積極的な分解によってアミノ基を供給

第5図 発泡酒とビールの発酵後期における酵母細胞質 pH

縦軸は 31P-NMR で計測した酵母細胞の細胞質 pH, 横軸は発酵度 (%) をあらわす。発泡酒: ---●
---, ビール: ---◆---

第6図 発泡酒とビール発酵における S 化合物の生成

(ア) 硫化水素, (イ) メチオノール, (ウ) 2-メチルチオエタノール, (エ) 3-メチルチオプロピルアセテート。縦軸はガスクロマトグラフィー分析において標準品を基に算出した濃度 (ppb) をあらわす。分析に用いたガスクロマトグラフィーの機種は Hewlett-Packard model 6890 gas chromatograph を使用, デテクターに sulfur chemiluminescence detector を使用, データー解析に data analysis computer system 'chemistation' を使用した。発泡酒, ビールそれぞれの発酵終了時のもろみ液をジクロロメタンで抽出し, 100 倍に濃縮したものをガスクロマトグラフィーに供した。それぞれ 2 回試行を行った。

し, 同時に様々な S 化合物を生成していることが伺える。実際, 発酵エンドにおける, もろみ中の硫化水素, メチオナール, メチオノール, 3-メチルチオプロピルアセテート, 2-メチルチオエタノールといったチオアルデヒド類, チオエステル類, チオエタノール類などのオフフレーバーの原因となる各種 S 化合物の含有量は発泡酒発酵で有意に増加することが確認された (第6図)。これらの S 化合物は, 単体でも特有な不快臭を発生するが, 多くの場合, 幾つかの化合物の相乗効果によって強烈なオフフレーバーとなることが知られている。

また, 高級アルコールのなかでも, イソブタノールやイソアミルアルコールの生成量が発泡酒発酵で顕著に増加しており, 一方, エステル類は総じてビール発酵の方が高い結果となった (第7図)。これらの醸造成分は, 個々の成分毎に最適値を議論することは難しく, 全体の中でのバランスという観点で議論されるのが普通だが, この高級アルコール濃度が高く, エステル成分が少ないという発泡酒発酵もろみの香味成分バランスは, 官能評価上総じて問題ありと判断されることが多い。

第7図 発泡酒とビール発酵における高級アルコール、エステルの生成

(ア) ノルマルプロパノール、イソブタノール、(イ) イソアミルアルコール、フェネチルアルコール、(ウ) エステル類。濃度はppm。

7. 発泡酒発酵中の酵母の遺伝子発現

近年では、DNA マイクロアレイ技術¹⁰⁾が積極的にビールや発泡酒などの醸造の世界にも展開され、発酵途上の酵母の複雑な遺伝子発現を網羅的且つ詳細に解析することが行なわれている。そこで、今回の発酵試験で、DNA マイクロアレイにより酵母の遺伝子発現パターンを観たところ、両者にユニークな特徴が伺えた。N 源枯渇の影響が出ていない発酵前期においては酵母の遺伝子発現パターンに大きな差異はみられず、ビールの発酵でも発泡酒の発酵でもほぼ同様な遺伝子発現プロファイルで、ほぼ同一の機能を発揮して代謝が行われているものと予想された。一方で、N 源が完全枯渇した状態の発酵後期では2つの発酵で大きな違いが生じていた。発泡酒の発酵後期では、*HSP*、*CIS*、*SSA*、*TIR*といったストレス応答関連の遺伝子や、細胞凝集に関与する *MUC1* などの発現が特に増加しており、*TFC3*、*UBP7*、*MMS21*、*SBE2*、*DBF20*、*SPT5* などの増殖に関連する遺伝子発現はビール発酵と比較して大きく減少していた。このよう

に、ビールと発泡酒の発酵後期では、酵母の働きが全く異なっていたのである。

さらに、発泡酒発酵系にて、発酵前期と後期で発現量が大きく変化した遺伝子群を詳細に観てみると、含硫アミノ酸代謝系に関連する遺伝子群、N 源代謝と S 化合物代謝のクロストークに関与する遺伝子群が目についた。S 化合物代謝の中心経路は、 SO_4^{2-} を吸収した後、 SO_2 と H_2S を中間代謝物として、含硫アミノ酸のメチオニンとシステインを合成する経路であることはよく知られている (第8図)。その下流の経路では、システインはさらに分解されてピルビン酸を生成、その過程で脱硫反応を起し H_2S と NH_3 を生成する。同様に、メチオニンはエールリッヒ様経路と呼ばれている脱アミノ反応の経路によって、メチオナルやメチオノールに変換すると同時に NH_2 が副産物として生成する¹¹⁾。また、途中から分岐した経路ではチオエステル類やチオエタノール類にも変換される。上述のとおり、これらの化合物は総じて発泡酒の香味にとってネガティブなオフフレーバーの原因となる。

これらの含硫アミノ酸の分解系と低中沸点 S 化合

第 8 図 酵母における含硫アミノ酸生合成系代謝マップ

第 9 図 発泡酒とビール発酵における S 代謝関連遺伝子の発現量

ノーザンブロット実施後、遺伝子発現を示すバンドの濃淡をデンストメーターにて計測した。すべての遺伝子が相対比較可能なように PDA 1 (α -subunit of pyruvate dehydrogenase) 遺伝子の発現を基に標準化した。MET 2 ; homoserine *o*-trans-acetylase, MET 10 ; subunit of assimilatory sulfite reductase, MET 17 ; *o*-Acetylhomoserine-*o*-Acetylserine Sulfhydrase, SAM 1, 2 ; S-adenosylmethionine synthetase, CYS 3 ; cystathionine gamma-lyase, CYS 4 ; cystathionine beta-synthase, SSU 1 ; sensitive to sulfite.

物生成系に關与する遺伝子群の発現量をノーザンブロット解析にて詳細に解析してみると、今回の麦芽比率 25% 発泡酒発酵における発酵後期では、MET 2, MET 10, MET 17, CYS 3, SAM 1 といった遺伝

子の発現が有意に増加しており、逆に SO₂ の排出に關与する SSU 1 遺伝子の発現はビールの発酵後期に比べて抑制されていることなどが判った (第 9 図)。

N 源が枯渇する発泡酒の発酵後期では、不要にな

ったタンパク質がアミノ酸に分解され、続いて、過剰なアミノ酸が脱アミノ化されて、不足するアミノ酸や核酸などに変換されると考えられている。さらに、これに付随して含硫アミノ酸の代謝にも変化が生じるであろうと予想される。発泡酒発酵後期の酵母細胞内では、N 源の自給自足のために、含硫アミノ酸の分解系や更にその下流の代謝が、これらの代謝に関与する遺伝子群の発現の増大と共に活発化している様子が伺える。

ビールの発酵においては、一般に窒素成分は枯渇しないとされているので、発泡酒とビールの発酵環境における酵母の活躍は全く異なるものであることが理解できる。発泡酒の発酵中に、酵母細胞内でこれらの特異な代謝が行われた結果、発酵後期では、硫化水素をはじめとした低中沸点含硫化合物の生成が促され、これらは発泡酒品質にとって大敵なオフフレーバーの原因ともなり得るのである。

一方で、分岐鎖アミノ酸の分解から NH_3 および高級アルコールの産生に関与する酵素群をコードする遺伝子の発現増加も確認された¹²⁾。日本酒などの場合、精米歩合を高め窒素分を減らすことによって高級アルコールに由来する吟醸香を醸し出すことができるとされ、実際の醸造にも応用されている。この面から考えると、その発酵過程で窒素飢餓に陥る発泡酒には、ビールに比べて好ましいフレーバーを付与できるわけだが、その反面、硫化水素をはじめとした低中沸点 S 化合物というオフフレーバーも生じる可能性がある。先に述べた発泡酒特有の香味成分の生成と、発酵中酵母の遺伝子発現パターンとはコンシステントな関係があるので、特に発泡酒の製造現場では善玉をいかに増やし、悪玉をいかに減らすかの腕が試されることになる。

8. おわりに

以上ここに紹介した発泡酒発酵の特徴は、全て単純に麦芽比率を 25% にして麦汁を製造した際にあらわれるものである。ところが、現在市場に出回っている発泡酒は、酒類市場に発泡酒という大きなジャンルを形成していることから領けるように本当に香味の素晴らしいもので、ここに紹介してきたような、酵母へのストレスによって生じるオフフレーバーなどの香味欠点は見当たらない。これは、発泡酒製造メーカーの日々

研鑽によって、ここで紹介したスタンダードな発泡酒の発酵環境が引き起こすであろう数々の問題を醸造技術の革新と企業努力によって克服してきた結果である。

その醸造技術の革新に大いに役立っているのが、高感度な分析機器や DNA マイクロアレイなどである。これらの進歩によって、酵母が生成する醸造成分が詳細に解析でき、また、発酵中の酵母の遺伝子発現を網羅的且つ詳細に解析することが可能となったことから、発酵中の酵母の状態をリアルタイムで、しかもピンポイントで評価することもできるようになり、酵母の環境応答と香味成分生成を結びつける酵母細胞内の代謝メカニズムもより正確に推定できるようになった。この結果、発酵を制御する物理的なパラメーターの変化が直接酵母の代謝に及ぼす影響に加えて、発酵に供する際の酵母の生理状態が、麦汁中の成分の影響を受けつつ、そのストレス応答という反応で最終的な香味成分の生成に関与していることなどが次第に明確になってきている。そして、発泡酒の醸造においては、古典的な Brewing 技術に加えて、発酵に供する酵母のバイタリティー制御といった全く新しい概念の酵母ハンドリング技術が導入されるなどして、発泡酒の発酵で起こりうるであろうネガティブな要因を排除することが徹底的に行われている。

また、最近では原料に麦芽を全く使用しない、つまりは発泡酒のジャンルにも属さない新規な醸造酒が、日本の酒市場に登場しシェアを拡大しつつある。このような、酵母にとっては培地となる原料液（ビールや発泡酒でいえば麦汁）が全く異なるものを、従来のビール醸造と同じ方法で発酵させれば、本論で述べたような S 化合物をはじめとした多くの悪玉因子が産生し、オフフレーバーの多い香味となるところである。しかし、この新ジャンルの醸造酒においても醸造成分の詳細な解析、酵母の遺伝子発現と代謝変化の膨大なデーターを基に、悪玉因子が発生しないような新規の酵母ハンドリングや発酵プロセスを導入することで克服している。

今後は、酵母の遺伝子発現に加えて、その結果生じるタンパクレベルでの機能発現解析データーを獲得し、それを基に発泡酒の香味成分形成を自由自在にコントロールしていくことが可能となっており、次々と新しいプロセスが生まれてくることが予想される。麦芽比率が低いのがゆえに達成しうる独特な香味、ビールにはない

華やかな風味が発泡酒の醍醐味で、それを待ち望んでいる多くのお客様の声に答えるべく、そして、Japanese-Happoshu を世界の酒市場でより大きなステイタスを獲得すべく発泡酒製造技術者は日々取り組んでいる。

<サントリー株式会社 ビール・RTD 商品開発研究所>

参考文献

- 1) http://www.suntory.co.jp/customer/FAQ/a_beer.html
- 2) Tamai, et al. : Yeast **14**, 923 (1998)
- 3) Vaughan-Martini, and Martini, A. : The Yeast, A Taxonomic Study (Kurtzman, C. P. and Fell, J. W.) , 4th ed., p358, Elsevier, Amsterdam (1998)
- 4) Nakao, Y. et. al. : Whole Genome Sequence of a Lager Brewing Yeast, "Proceedings of the 29th EBC Congress", 524-530 (2003)
- 5) 中尾嘉弘他：日本農芸化学会大会要旨集, p 158 (2003)
- 6) Kondo, H. et. al. : Substrate specificities and kinetic properties of proteinase A from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the development of a novel substrate, "J. Biochem." **124**, 141-147 (1998)
- 7) Kondo, H et. al. : Development of a novel and sensitive method for measurement of proteinase A in beer, "Proceeding of the 25th Congress of the European Brewery Convention, Brussels", 669-676 (1995)
- 8) Kondo, H et. al. : Advanced method for measuring proteinase A in beer and application to brewing, "Journal of the Institute of Brewing", vol. 105, No. 5, 293-300 (1999)
- 9) Furukubo, S. et. al. : The in vitro 31P-NMR analysis of brewing yeast and its practical application to brewing, "Proceeding of the 26th Congress of the European Brewery Convention, Maastricht", 423-430 (1997)
- 10) Schena, M. et. al. : Quantitative Monitoring of gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray, *Science*, **270**, 467-470 (1995)
- 11) Kondo, H. et. al. : Gene Expression Analysis of Brewing Yeasts during Beer Fermentations using DNA Microarray, "Proceeding of the 29th congress, European Brewery Convention, Dublin", 531-543 (2003)
- 12) Kondo, H. et. al. : Relationship between the Sulfurous Off-flavours Formation and the Gene Expression profiles of Brewing Yeast in two Distinct Beer Fermentations, "Brewing Yeast fermentation performance, third edition", in press, Blackwell Science, Oxford.