ビール混濁性を示す *Lactobacillus paracollinoides* および *L. lindneri* からの難培養株の取得

鈴木康司・浅野 静・飯島和丸・栗山英俊・北川 泰
(アサヒビール分析技術研究所)

平成 19 年 2 月 2 日受理

Induction of viable but nonculturable states in beer spoilage *Lactobacillus* *paracollinoides* and *L. lindneri*

Koji SUZUKI, Shizuka ASANO, Kazumaru IJIMA, Hidetoshi KURIYAMA and Yasushi KITAGAWA

(Analytical Technology Laboratory, Asahi Breweries Ltd., 1-21 Midori 1-chome,
Moriya-shi, Ibaraki, 302-0106, Japan)

Beer spoilage *Lactobacillus paracollinoides* and *L. lindneri* strains were repeatedly subcultured in degassed beer and the culturability of these *Lactobacillus* strains was periodically examined on MRS agar. As a consequence, *L. paracollinoides* JCM 11969^T and LA 4 progressively exhibited diminished culturability on MRS agar, and after the 70 th and 60 th subcultures, respectively, most of the viable cells were no longer detectable on the agar. Similarly, *L. lindneri* DSM 20692 and HC 92 gradually lost culturability, and after the 70 th and 40 th subcultures, respectively, these strains exhibited viable but nonculturable (VNC) characteristics on the agar. These results suggested that the prolonged adaptation to beer and related environments reduces the culturability of beer spoilage *Lactobacillus* strains on detection media, posing a threat to the brewing industry. Strikingly, the majority of nonculturable cells, as counted by esterase staining, showed beer spoilage ability, suggesting that microbiological incidents can occur without the detection of beer spoilage lactic acid bacteria on culture media. Taken collectively, these findings indicate that the risk presented by these microorganisms should be nullified by the use of sufficiently robust quality assurance approaches to ensure product stability.

Key words : ビール混濁乳酸菌, *Lactobacillus paracollinoides*, *Lactobacillus lindneri*, 難培養, 品質管理——

緒 言

ビールはアルコールを含むこと、無酸素状態であること、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等の理由により、生育しうる細菌の菌種は極めて少ない¹⁻³⁾。しかしながら、一旦微生物事故を引き起こした場合、製品の回収に膨大なコストを要するだけでなく、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も多大な損害を与える。このため、ビールに生育し混濁事故を引き起こ

すビール混濁菌は、現在でも世界のビール産業において大きな問題である。

ビールにおける微生物事故は、約 70% の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⁴⁾。従って、これらのビール混濁乳酸菌を迅速に検出および同定することは、ビール工場における製品の品質管理および工場環境調査を行う上で、極めて重要である。ビールの品質管理ならびに工場環境調査では、培地により微生物を検出した後、有害微生物菌種の同定およびビール生育性の調査を行うことが通常である⁵⁾。昨

今に至っては、DNA 解析技術の進歩により、微生物が培地で検出された後の混濁菌種の同定が可能となり、検出菌の混濁性に関する情報が迅速に得られるようになった。その一方で、培地による検出技術には大きな進展がなく、現在でもなお培地によるビール混濁乳酸菌の検出は困難であるとされている⁶⁾。そのため、培地での検出がないにも関わらず、ビール混濁乳酸菌により品質事故に至る例が少なくない。

ビール産業においては、混濁乳酸菌検出のため様々な培地が試みられているが、European Brewery Convention (EBC) により編集された微生物検査法「EBC Analytica Microbiologica II」では、MRS 培地がビール混濁乳酸菌検出培地の一つとして推奨されている⁷⁾。MRS 培地は、様々な種に属す乳酸菌の培養を目的として開発された培地であり⁸⁾、乳酸菌の分離あるいは検出に幅広く利用することができる。本稿においては、MRS 培地で検出ができないあるいは検出に 10 日以上要するビール混濁乳酸菌を難培養乳酸菌と定義する。

Lactobacillus lindneri は、ビール混濁事故例が多い乳酸菌種である⁹⁾。本菌種は、典型的な一次汚染微生物とされ、ビール酵母、貯酒タンクなどから分離されると報告されている^{4,10)}。また、*L. paracollinoides* は、近年新菌種提案されたばかりのビール混濁乳酸菌種であるが^{11,12)}、最近に至ってビール工場環境あるいは回収容器等から分離される事例が増加している¹³⁻¹⁵⁾。これらのビール混濁菌種は、培地での検出が難しいものが多く、ビール工場における微生物管理を困難にする原因となっている^{6,16)}。その一方で、Japan Collection of Microorganisms (JCM) あるいは Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) のような菌株保存機関から入手できる *L. paracollinoides* および *L. lindneri* 株は、MRS 培地あるいは若干の改変を加えた MRS 培地が培養培地として推奨されており、本培地における生育性は比較的良好である。このことは、ビール工場環境等から発見される *L. paracollinoides* 種および *L. lindneri* 種が、ほとんど例外なく難培養性を示すという筆者らの経験と対照的であり、菌株保存機関から入手できる菌株は、ビール混濁乳酸菌検出培地の開発・評価を行う際の生物材料としては必ずしも適さない。

乳酸菌のビール混濁性を決定づける主要因子として、抗菌性を持つホップ成分に対する耐性があげられる。ビール混濁乳酸菌のホップ耐性は複雑な現象とされており、多剤排出ポンプによるホップ成分の菌体外への排出¹⁷⁻²⁰⁾、細胞壁におけるホップ成分の侵入防御^{2,21-23)} あるいは糖代謝に依存しないエネルギー源獲得²⁴⁾ など様々なホップ耐性機構が協調して、ビール中での乳酸菌の増殖を可能としているとされる。また、ビール混濁乳酸菌がホップを含むビール環境に長年棲息することにより、徐々にこれらのホップ耐性機構を獲得していったことが最近提唱され、ビールに深く馴化した状態こそがビール混濁乳酸菌本来の姿であることが示唆されている²⁵⁾。

本研究においては、ビールに対する極度の馴化が、*L. paracollinoides* ならびに *L. lindneri* 種に属するビール混濁乳酸菌株の培地生育性に及ぼす影響を調査し、難培養乳酸菌株に対する対抗施策を開発・評価するための生物材料の取得を試みた。

実験方法

1. 菌株および培養条件

L. paracollinoides JCM 11969^T 株ならびに *L. lindneri* DSM 20692 株は、MRS 培地で復元し、25°C で嫌気培養を行った。また、*L. paracollinoides* LA 4 株¹¹⁾ および *L. lindneri* HC 92 株¹⁹⁾ は、ビール工場環境から分離された株を、MRS 液体培地 (Merck, Germany) を用いて同様に 25°C で嫌気培養し、試験に供した。なお、嫌気培養には、AnaeroPack ケンキ (Mitsubishi Gas Chemicals, Japan) を用いた。

2. ガス抜きビールの調製およびビール馴化

ガス抜きしたピルスナー・タイプのビール (Super Dry, Asahi Breweries, Japan) をガス抜き後、pH 4.2 になるよう 4 N NaOH で調整し、フィルター (孔径 0.45 μ m) 除菌後 10 ml ずつポリプロピレン製のチューブに分注した。分注したガス抜きビールに、約 5×10^5 cells の *L. paracollinoides* 株および *L. lindneri* 株を繰り返し植え継いだ。なお、植え継ぎは、*L. paracollinoides* 株については 4 日間ごと、*L. lindneri* 株については 7~10 日間ごとに行った。

3. MRS 寒天培地における生育性調査

ガス抜きビールで植え継ぎを行った *Lactobacillus* 属株について、培養液 0.1 μ l を MRS 寒天培地に塗

拭した。25°Cで嫌気培養を行い、14日間まで毎日観察し、コロニーの形成の有無を確認した。MRS 寒天培地における生育性の調査は、それぞれの株について10回から20回の植え継ぎ毎を目安に実施した。なお、本研究においては、ビール生育性を示すが、MRS 寒天培地で生育性を示さないあるいは10日以上コロニーの形成に要するものを難培養性を示すビール混濁乳酸菌株と定義した。

4. 最確数法による生菌数の測定

deMan²⁶⁾ および Hurley²⁷⁾ らにより報告された最確数法〔most probable number method (MPN 法)〕を用い、MRS 寒天培地における生育性調査に供した培養液に含まれる生菌数を測定した。それぞれの菌株の培養液について10倍段階希釈系列を作成し、あらかじめpH 5.0に調整し15ml 容ポリプロピレン製チューブに分注しておいたガス抜きビール10mlに、各希釈系列について3本ずつ植菌した。植菌後のガス抜きビールは、25°Cで14日間嫌気培養を行い、それぞれのガス抜きビールにおける生育の有無をもとに、MPN table を用いて生菌数を推定した。

5. 難培養乳酸菌株取得の確認

ガス抜きビールで繰り返し継代培養することによって培地生育性の低下した *Lactobacillus* 属株について、ガス抜きビール植え継ぎ1回目の株とMRS 寒天培地生育性を比較することにより、難培養乳酸菌株取得の成否を確認した。本試験では、MRS 寒天培地への植菌量を培養液0.02μlとし、生菌数の測定にはガス抜きビールを用いたMPN法ならびにエステラーゼ法を用いた。ガス抜きビールを用いたMPN法については、精度を高めるため、それぞれの培養液の希釈系列について5本のガス抜きビールを使用し、ビール生育性を示す菌数を推定した。一方、エステラーゼ法については、菌培養液0.02μlを50ml 滅菌生理食塩水に希釈後、ポリカーボネート製メンブランフィルター(孔径0.4μm, Advantec, Japan)で集菌し、CFDA染色液(5-(and 6-) carboxyfluorescein diacetate (5(6)-CFDA, Invitrogen, U. S. A.) 50μg/ml; PBS buffer (pH 7.4))を染み込ませた濾紙にのせ、30°Cで30分遮光にてインキュベートした。染色後、PBS/Glycerol(各1:1で混合)を染み込ませたナイロンフィルター(Millipore, U. S. A.)にメンブランを移し変え、メーカーの推奨法に従い、μFinder

(Asahi Breweries, Japan)にて計測を行なった。なお、菌数の測定は、当該分析機器に装備されている自動計測ソフトウェアを用いた(<http://mfinder.asahibeer.co.jp/>)。

実験結果及び考察

1. 難培養性を示す *L. paracollinoides* 株の取得

L. paracollinoides JCM 11969^T 株およびLA 4株を、pH 4.2に調整したガス抜きビールで繰り返し植え継ぎ、MRS 寒天培地における生育性を調査した。*L. paracollinoides* JCM 11969^T 株については、植え継ぎ回数が増加するに従って、MRS 寒天培地における生育性が低下することを確認できた。まず、植え継ぎ回数10回目においては、培養開始4日目にコロニーの形成が確認され始めるものの、その数は継時的に増加し14日目には大小まばらなコロニーが観察された(Fig. 1 a)。この現象は、植え継ぎ1回目においてはほとんどすべてのコロニーが4日目に形成され、14日目では均一な大きさのコロニーとして観察されるのと同対照的であった(Fig. 1 b)。これらのことは、ガス抜きビールに繰り返し植え継ぐことにより、*L. paracol-*

A. 10th subculture

B. 1st subculture

Fig. 1 Comparative analysis of the culturability of *L. paracollinoides* JCM 11969^T. Portions of the 10th subculture (A) and the first subculture in degassed beers (pH 4.2) were inoculated on MRS agar and anaerobically cultured at 25°C for 14 days. Similar trends were observed with other beer spoilage strains tested in this study.

Table 1 Effects of repeated subcultures on the culturability of beer spoilage *Lactobacillus* strains

Strains	Number of subcultures ¹	Detection time(days) ²	CFUs ²	MPN ³
<i>L. paracollinoides</i> JCM 11969 ^T	10	4,4	580,725	460
	30	7,7	141,156	750
	70	N.D., N. D.	0,0	1100
<i>L. paracollinoides</i> LA 4	10	4,4	214,188	240
	30	7,8	76,70	240
	60	10,10	11,13	460
<i>L. lindneri</i> DSM 20692	10	4,4	696,788	460
	30	6,6	181,145	460
	70	N. D., 14	0,1	240
<i>L. lindneri</i> HC 92	10	7,7	586,612	1100
	20	8,8	61,59	240
	40	N. D., 14	0,1	1100

¹ *Lactobacillus* strains were repeatedly subcultured in degassed beer (pH 4.2) for the number of times indicated in the table.

² The experiments were conducted in duplicates. The detection time is shown in days and the colony forming unit on MRS agar is indicated as CFU. N. D.: Not detected.

³ The viable cell counts were calculated on the basis of the most probable number (MPN) method, using degassed beer (pH 5.0).

linoides JCM 11969^T 株において、MRS 寒天培地での生育性の低下した細胞が徐々に出現してきたことを示している。次に、植え継ぎ 30 回目においては、最初のコロニーが形成されるのが培養開始 7 日目であり、MPN 法で推定される生菌数と MRS 寒天培地で計測されるコロニー数〔colony forming unit (CFU)〕との間に乖離が認められた (Table 1)。さらに、ガス抜きビール植え継ぎ 70 回目においては、MPN 法で 1100 個の生菌数が存在すると推定されるにも関わらず、MRS 寒天培地では 14 日目においてもコロニーの形成は観察できなかった。*L. paracollinoides* LA 4 株についても、全く同様な傾向が認められ、ガス抜きビール植え継ぎ 60 回目には難培養性を示すことがわかった。以上のことから、今回の試験に供した *L. paracollinoides* 株は、ビールに馴化させていくことにより、培地での生育性が低下していくことが明らかとなった。

2. 難培養性を示す *L. lindneri* 株の取得

L. lindneri DSM 20692 株および HC 92 株をガス抜

きビール (pH 4.2) で繰り返し植え継ぎ、MRS 寒天培地で生育性を調査した (Table 1)。まず、*L. lindneri* DSM 20692 株については、*L. paracollinoides* 株と同様に、10 回、30 回、70 回と植え継ぎを重ねるに従い、ゆっくりと難培養化していく傾向が認められた。一方、*L. lindneri* HC 92 株については、比較的早い段階で難培養化が進行し、植え継ぎ 40 回において既に難培養性を示していた。この差異は、*L. lindneri* HC 92 株が培地で分離されてから比較的すぐに凍結保存をされたことに起因しているのではないかと推測された。すなわち、ビール工場環境から単離されたばかりの株は、MRS 培地等で何度も植え継いだいわゆる実験室株と比較して、より難培養性を示しやすいと考えられる。以上の結果から、難培養化しやすいの差異は、菌株の培地における培養回数などの前歴の影響を受けるものの、*L. lindneri* 株においてもビールへの馴化が MRS 培地での生育性を低下させることがわかった。

3. 難培養株取得の確認

得られた難培養乳酸菌株をガス抜きビール植え継ぎ 1 回目の株と比較することにより、MRS 寒天培地における生育性を詳細に調査した。Table 2 に示すように、植え継ぎ 1 回目の株については、ガス抜きビールを用いた MPN 法で推定した生菌数と MRS 寒天培地における CFU とは非常に良い一致を示し、ビール生育性を示す個々の菌が、MRS 寒天培地でほぼ検出できていることがわかる。また、エステラーゼ染色により算出した生菌数も MRS 寒天培地における CFU と比較的良く一致しており、植え継ぎ 1 回目の株ではエステラーゼ活性を示す細胞が概ね MRS 寒天培地で検出できていることも明らかとなった。なお、一部の菌株について、エステラーゼ活性を示す細胞数が MRS 寒天培地での CFU あるいは MPN 法による生菌数を上回っていたが、これはガス抜きビール中で死滅期に入りつつある細胞数を含めてエステラーゼ法が検出しているためと推察している。

一方、実験方法 2-4 により得られた難培養乳酸菌株 (Table 1) については、いずれの株も 14 日間の観察中、MRS 寒天培地での生育性を示さなかった (Table 2)。その一方で、ガス抜きビールを用いた MPN 法によると、いずれの株についても 100 個前後

のビール生育性を示す乳酸菌が存在していることが推定された。本実験において MPN 法とエステラーゼ法により算出された生菌数がいずれの株についても良く一致していることから、MPN 法により得られた菌数が妥当な生菌数を反映していると考えられ、MRS 寒天培地で検出できないにも関わらず品質事故が発生する可能性が示唆された。

以上のことから、検出培地の評価に良く使用される実験室株とビールに極度に馴化した株とは、由来が同じ菌株でも培地生育性が全く異なることが判明した。これは、筆者らが経験的に感じてきた「ビール工場環境に棲息する乳酸菌は培地で検出しにくく、研究開発の現場で用いられる実験室株とは性状が大きく異なる」という所感と一致する。実際に海外等の事故品から混濁原因微生物を分離しようとしても、ビールでは簡単に植え継げるのに対し、培地での分離は苦勞する事例が多い。さらに、LA 4 株および HC 92 株を始めとする *L. paracollinoides* 株ならびに *L. lindneri* について筆者らは 20 株以上分離しているが、いずれの株も当初は難培養性を示した。しかしながら、培地に繰り返し植え継ぐことにより、もともと難培養性を示したこれらの乳酸菌株も、現在は MRS 培地で容易に生育させることができる。これらの現象の背景として、

Table 2 Comparison of culturability between laboratory strains and VNC strains

Strains	Status ¹	Esterase ²	MPN ³	MRS ²	Detection time ⁴
<i>L. paracollinoides</i> JCM 11969 ^T	Laboratory	157.7±15.0	170	149.3±12.1	4
	VNC	111.3±19.7	130	N. D.	N. D.
<i>L. paracollinoides</i> LA 4	Laboratory	168.3± 5.5	170	136.0±6.9	3
	VNC	138.7±14.0	79	N. D.	N. D.
<i>L. lindneri</i> DSM 20692	Laboratory	228.3± 5.9	130	152.0±16.8	4
	VNC	249.3± 2.5	130	N. D.	N. D.
<i>L. lindneri</i> HC 92	Laboratory	192.0± 7.6	130	122.7±6.0	5
	VNC	321.0±13.0	170	N. D.	N. D.

¹ Laboratory strains: Strains obtained from the first subculture in degassed beer (pH 4.2); VNC strains: Strains obtained in Table 1.

² The esterase counts and colony forming units on MRS agar are expressed as mean value±standard deviation obtained from three experiments. N. D.: Not detected on all of the three agar plates.

³ The MPN method was performed, using three sets of five tubes containing degassed beers (pH 5.0).

⁴ The detection time on MRS agar is shown in days. In this test, the detection time on three agar plates is identical for all the strains. N. D.: Not detected.

A. Nonadapted strains

B. Highly beer-adapted strains

Fig. 2 Putative mechanisms underlying VNC states in beer spoilage lactic acid bacteria. (A) Nonadapted strains in an easy-to-culture state; (B) Highly beer-adapted strains in a VNC state. Some of the hop resistance mechanisms shown in this figure were described in the previous literature^{1,2,25}.

ビール環境に対する極度の馴化がビール混濁乳酸菌の難培養化を誘導することから、図2に示すような機構があるのではないかと筆者らは考えている。すなわち、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 など膜タンパク質が過剰発現すること、さらにはビール環境に適応した代謝機構に過度に依存した状態になることが難培養化の誘引因子であると推測している¹⁶⁾。現在、筆者らはこれらの仮説の検証を行っているところである。

4. 難培養乳酸菌研究の今後の展望

ビール産業においては、発酵を完了した酵母を繰り返して以降の発酵に使用するのが通常である。本研究によって、ビール環境に馴化することによりビール混濁乳酸菌が難培養化することがわかったため、万が一乳酸菌が製造工程に混入してビールに馴化した場合、日々の微生物検査で検知されない可能性が否定できない。また、ビール工場環境においても、十分な衛生管理が行われていない箇所が存在した場合、難培養乳酸菌の温床となりうる。このような難培養ビール混濁乳

酸菌を漏れなく検出し、ビール工場環境から駆逐していくことは、ビール工場の微生物管理において非常に重要な課題である²⁸⁾。

ビール産業における検出培地の開発および評価は、これまで培地で植え継ぎを繰り返した実験室株を用いて行われてきた。しかしながら、冒頭にも述べたように、ビール工場環境に潜む混濁乳酸菌は、実験室株と異なり、培地での検出が難しい。このようなことから、既に単離された易培養ビール混濁乳酸菌株から難培養株が取得できれば、ビール混濁乳酸菌の難培養化という現象を基礎研究的な観点で解明できるだけでなく、新たな検出培地の開発あるいは培養に依存しない直接微生物検出法の評価に役立つと考えて取り組んできた。今回取得した難培養乳酸菌には、*L. paracollinoides* JCM 11969^T 株と *L. lindneri* DSM 20692 株が含まれており、ビール醸造微生物研究者の共有資産となることを期待している。

近年、自然環境に棲息する微生物の大部分が難培養状態にあることが、多くの微生物研究者により認識されつつある²⁹⁻³³⁾。それに伴い、これらの難培養微生物はそれらが棲息している環境に絶対的に適応しており、他の環境では生育できないという“環境絶対適応微生物”という考え方が受け入れられつつある³⁰⁾。即ち、難培養微生物という概念は微生物研究者からみた概念であり、微生物の立場からはある環境にしか棲息できないほどその環境に進化・適応した微生物と考えることができる³⁰⁾。一方、筆者らは、ビール混濁乳酸菌がビール産業におけるホップ使用の普及に従って発生・進化し、ビール環境に深く馴化するようになった微生物群であることを提唱している²⁵⁾。ホップがビール醸造にいつ使われ始めたかについては定説がないが、5世紀から7世紀頃の中世ヨーロッパにおいてビール用ホップの栽培が開始されたと言われている³⁴⁾。そのため、ビール混濁乳酸菌は比較的最近発生してきた微生物群であり、環境馴化の度合いが“環境絶対適応微生物”ほどには達していないため、難培養状態と易培養状態の両方を取りうるのではないかと推測している。すなわち、難培養ビール混濁乳酸菌は、ビールという環境における“環境絶対適応微生物”になる途上の微生物群であると考えられる。従って、同一株由来の難培養性株と易培養性の実験室株を比較研究することにより、これまで謎の多かった難培養微生物につ

いて様々な知見が得られる可能性があり、筆者らはこれらの研究を進めている。

要 約

強いビール混濁性を示す *L. paracollinoides* ならびに *L. lindneri* 株から、MRS 寒天培地で生育性を失った難培養株の取得を試みた。ガス抜きビールで繰り返し継代培養を行った結果、植え継ぎ回数が増加するに従って、試験に供した株はいずれも培地での生育性が低下していった。40 回から 70 回程度の植え継ぎを行った株について、エステラーゼ法ならびに MPN 法によって算出された生菌数と MRS 寒天培地での生育菌数とを比較したところ、ビール生育性を示す菌が 100 個程度存在するにも関わらず、培地で検出できなくなる現象が観察された。これらのことから、ビールに極度に馴化した乳酸菌株は、培地で検出されることがなく品質事故を引き起こすことが示唆された。その一方で、ビール醸造に関わる微生物研究者がこれまで検出培地の開発・評価に供してきたいわゆる実験室株は、MRS 寒天培地でほぼ完全に検出可能であった。そのため、実験室株は、ビール工場環境に棲息するビール混濁乳酸菌の培地での生育性を現実的に反映していないと考察された。以上のことから、今回得られた難培養ビール混濁乳酸菌株は、貴重な生物材料として新たな検出培地の開発あるいは培養を介さない直接微生物検出法の開発・評価に役立つであろうと考えている。

謝 辞

本研究を行うにあたり、ご指導を賜りました東京大学・北本勝彦教授ならびにアサヒビール株式会社・山下博博士に深謝致します。また、難培養ビール混濁乳酸菌に関する様々な事例談を通じて多くの示唆を頂きましたアサヒビール株式会社・八子奈々氏に深く感謝致します。本研究全般にわたり精力的に研究をされ、貴重な実験データを提供頂きました WDB 株式会社・上田真佐江氏ならびに株式会社パナソニック・草間弘恵氏に心から御礼申し上げます。

文 献

- 1) 鈴木康司, 飯島和丸, 坂本幹太, 佐見学, 山下博: 醸協, **101**, (2), 94-103 (2006)
- 2) K. Suzuki, K. Iijima, K. Sakamoto, M. Sami and H. Yamashita : *J. Inst. Brew.*, **112**, 173-

- 191 (2006)
- 3) K. Sakamoto and W.N. Konings : *Int. J. Food Microbiol.*, **89**, 105-124 (2003)
- 4) W. Back : *Brauwelt Int.*, **4**, 326-333 (1994)
- 5) 宮本豊: 醸協, **96**, (7), 455-465 (2001)
- 6) W. Back : Nachweis von Bierschädlingen mittels NBB. In "Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie," Verlag Hans Carl, Nürnberg, Germany, vol.1, pp. 145-155 (1994)
- 7) European Brewery Convention : In "EBC Analytica Microbiologica II", Verlag Hans Carl : Nürnberg, Germany, Section 4, pp. 1-51 (1992)
- 8) J. C. De Man, M. Rogosa and M. E. Sharpe : *J. Appl. Bacteriol.*, **23**, 130-135 (1960)
- 9) W. Back : Einteilung der bierschädlichen Bakterien. In "Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie," Verlag Hans Carl, Nürnberg, Germany, vol.1, pp. 62-67 (1994)
- 10) W. Back, I. Bohak, M. Ehrmann, W. Ludwig and K. H. Schleifer : *Syst. Appl. Microbiol.*, **19**, 322-325 (1996)
- 11) W. Funahashi, K. Suzuki, Y. Ohtake and H. Yamashita : *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **56**, 64-69 (1998)
- 12) K. Suzuki, W. Funahashi, M. Koyanagi and H. Yamashita : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 115-117 (2004)
- 13) K. Suzuki, K. Ozaki and H. Yamashita : *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 712-718 (2004)
- 14) K. Suzuki, M. Koyanagi and H. Yamashita : *J. Appl. Microbiol.*, **96**, 677-683 (2004)
- 15) 鈴木康司, 飯島和丸, 浅野静, 栗山英俊, 北川泰: 醸協, **112**, (2), 印刷中 (2007)
- 16) K. Suzuki, K. Iijima, K. Ozaki, H. Kuriyama, Y. Kitagawa and H. Yamashita : *Proc. Annual Am. Soc. Brew. Chem. Meeting, La Quinta, U. S. A.*, O-10 (2006)
- 17) M. Sami, K. Suzuki, K. Sakamoto, H. Kado-kura, K. Kitamoto and K. Yoda : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **44**, 361-363 (1998)
- 18) K. Sakamoto, A. Margolles, H.W. van Veen and W.N. Konings : *J. Bacteriol.*, **183**, 5371-5375 (2001)
- 19) K. Suzuki, K. Iijima, K. Ozaki and H. Yamashita : *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 5089-

- 5097 (2005)
- 20) K. Iijima, K. Suzuki, K. Ozaki and H. Yamashita : *J. Appl. Microbiol.*, **100**, 1282-1288 (2006)
- 21) J. Behr, M. G. Gänzle and R.F. Vogel : *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 6483-6492 (2006)
- 22) T. Fujii, K. Nakashima and N. Hayashi : *J. Appl. Microbiol.*, **98**, 1209-1220 (2005)
- 23) K. Suzuki, M. Sami, K. Iijima, K. Ozaki and H. Yamashita : *Lett. Appl. Microbiol.*, **42**, 392-399 (2006)
- 24) K. Suzuki, K. Iijima, K. Ozaki and H. Yamashita : *J. Inst. Brew.*, **111**, 328-335 (2005)
- 25) K. Suzuki : Beer spoilage lactic acid bacteria. In "Beer in Health and Disease Prevention," Elsevier, in press (2007)
- 26) J. C. deMan : *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **1**, 67-78 (1975)
- 27) M. A. Hurley and M. E. Roscoe : *Appl. Bacteriol.*, **55**, 159-164 (1983)
- 28) 鈴木康司, 安原貴臣, 本山靖朗, 佐見学 : 北本勝ひこ監修「発酵・醸造食品の最新技術と機能性」, シーエムシー出版, pp. 179-185 (2006)
- 29) J. D. Oliver : *J. Microbiol.*, **43**, 93-100 (2005)
- 30) T. Kudo and M. Ohkuma : *Bio. Industry*, **23**, 5-7 (2006)
- 31) Y. Kamagata : *Bio. Industry*, **23**, 8-14 (2006)
- 32) I. Barcina, P. Lebaron and J. Vives-Rego : *FEMS Microbiol. Ecol.*, **23**, 1-9 (1997)
- 33) D. B. Roszak and R. R. Colwell : *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2889-2893 (1987)
- 34) H. J. Barth, C. Klinke and C. Schmidt : In "The Hop Atlas", Verlag Hans Carl, Nürnberg, Germany, pp. 25-29 (1994)