α -グルコシダーゼを利用したビールの高濃度醸造 (第1報)

α -グルコシダーゼを利用した並行複発酵のビールの 高濃度醸造への応用

水野昭博・天野 仁*・向井伸彦・佐藤和夫・高橋利郎

(独立行政法人酒類総合研究所, *天野エンザイム㈱)

平成14年11月7日受理

High Gravity Brewing Utilizing α -Glucosidase (Part 1)

Application of Parallel Fermentation Utilizing α -Glucosidase to High Gravity Brewing

Akihiro MIZUNO, Hitoshi AMANO*, Nobuhiko MUKAI, Kazuo SATO and Toshiro TAKAHASHI

(National Research Institute of Brewing, 3-7-1, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, 739-0046 ;

* Amano Enzyme Inc., 4-179-35, Sue-Cho, Kakamigahara, Gifu, 509-0108)

This paper describes the development of a new technique that utilizes α -glucosidase to apply parallel fermentation to high gravity brewing. The addition of α -glucosidase at pitching to high gravity wort, whose original extract was 20% Plato or 25% Plato, prevented large increases in glucose concentration during fermentation owing to the glycosyltransfer reaction caused by this enzyme. The effect increased the attenuation degree of the beer and lowered the concentration of acetic acid in the beer.

Key words : α -グルコシダーゼ, 高濃度醸造, イソマルトオリゴ糖

緒 言

ビールの高濃度醸造は、通常よりも高い原麦汁エキス分の麦汁を発酵させて、瓶詰め直前に脱気水を用いて割水を行い、通常のアールコール分の製品とする醸造法である。この高濃度醸造には、省設備で済むこと、製造効率の向上、糖化・麦汁煮沸エネルギーの節減のメリットがある一方、原麦汁エキス分の増加に伴う発酵遅延、発酵度の低下、エステル生成量の増加、仕込室収率・ホップ利用率及び泡安定性の減少、通常の製品とは異なる品質等の問題が指摘されている^{1),2),3),4)}。また、高濃度麦汁のような高浸透圧条件における発酵においては、酵母において *ALD 2* 及び *ALD 3* が誘導され、オフフレーバーである酢酸の生成量が增大することが知られている^{5),6)}。欧米では高濃度醸造は一般に行われているが、上記の製造・品質上の問題が顕

在化しないように、原麦汁エキス分18% Plato以下の麦汁が用いられているようである。さらに、麦汁中の初発溶存酸素量を増やすこと⁷⁾、活性の高い酵母を多量に使用する⁸⁾等の対処が行われている。

我々は、高濃度醸造における発酵遅延・発酵度の低下及び高濃度麦汁の発酵における酢酸生成の増加を解消するために、高濃度麦汁に酵母添加とともに α -グルコシダーゼを添加し、糖組成の変換と同時に発酵を行う型式のビール醸造について検討した。 α -グルコシダーゼを麦汁に添加した場合、麦汁中のオリゴ糖の加水分解反応とともに、非発酵性のイソマルトオリゴ糖を生成する糖転移反応が起こる (Fig. 1)。周知の如く、浸透圧は溶液中の溶質の種類に依存せずその分子数のみに比例するから、加水分解反応においては反応後に浸透圧の上昇を招くが、糖転移反応においては反応前後に浸透圧の変化はない。Kitaら⁹⁾は、

Fig. 1 Mechanism of oligosaccharide conversion in the wort to which α-glucosidase was added at pitching.

Aspergillus niger 起源の α-グルコシダーゼの加水分解反応における各種基質のミハエリス定数等を報告しているが、糖転移反応におけるそれらの報告はなく、α-グルコシダーゼを麦汁に添加した場合の非発酵性オリゴ糖の生成量及び生成した非発酵性オリゴ糖の分解速度等は明らかではない。けれども、Fig. 1 に示した α-グルコシダーゼの糖転移反応による非発酵性オリゴ糖の生成がグルコース生成の緩衝反応となり、急激なグルコース生成による浸透圧上昇を招くことなくグルコースを暫時生成させ発酵させることができれば、発酵度の上昇とともに酢酸生成量の増加を防ぐことが可能ではないかと我々は考えた。この仮説を検証するために、α-グルコシダーゼを酵母添加と同時に高濃度麦汁へ添加し糖組成の変換と発酵を同時に行う、いわば並行複発酵式の高濃度醸造を行ったところ、高濃度醸造における発酵遅延及び発酵度の低下、酢酸生成量の増加を防止できたので報告する。

実験方法

1. 酵母

上面発酵ビール酵母の NCYC 1245 を用いた。

2. 酵素剤

麦汁に添加する α-グルコシダーゼ剤は、*Aspergillus niger* 起源の α-グルコシダーゼ「アマノ」(天野エンザイム㈱)を用いた。対照のグルコアミラーゼ剤は、同じく *Aspergillus niger* 起源のグルコアミラーゼ「アマノ」(天野エンザイム㈱)を用いた。

3. 分析

アルコール分、エキス分及び発酵度の分析は、SCABA 法¹⁰⁾ によった。なお、SCABA 法ではアルコール分は 7w/w % までしか測定できないため、それ以上のアルコール分の試料については適宜希釈して行った。グルコースは、試料を煮沸後、グルコースオキシダーゼを用いた酵素法であるグルコース B-テストワコー (和光純薬工業㈱) を用いて分析した。麦汁の糖組成の分析は、マルトース (DP 2, DP; Degree of polymerization) からマルトヘプタオース (DP 7) は Aminex HPX-42 A Carbohydrate Column 300×7.8mm (日本バイオ・ラッドラボラトリーズ㈱)、分岐オリゴ糖は Amide 80 300×7.8mm (東ソー㈱) を用いて、それぞれ HPLC によった。有機酸は HPLC (㈱島津製作所製有機酸分析システム)、香氣成分は n-アミルアルコールとカプロン酸メチルを内部標準とするヘッドスペース GC、麦汁中の α-グルコシダーゼ活性は、冷エタノール添加による沈殿物を 0.02 N 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解後、糖化力分別定量キット (キッコーマン㈱) を用いて測定した。

4. 2L 発酵管試験

2L 発酵管試験に用いる麦汁は、麦芽重量に対し 200% の仕込水を加え、ステップインフュージョン法 (タンパク質休止 45°C・30 分, 45°C→65°C まで 20 分, 糖化休止 65°C・80 分, 65°C→76°C まで 10 分, 76°C・10 分) により原麦汁エキス分が約 25% Plato の麦汁を製造し、所定の原麦汁エキス分になるように希釈して 2L 発酵管試験に供した。2L 発酵管試験は、Dixon の方法¹¹⁾ を参考にして行った。すなわち、所

定の原麦汁エキス分の麦汁 2 l に対して前培養した酵母湿菌体 5 g を添加し、発酵管（内径 55 mm，長さ 1135 mm；麦汁の液深は約 850 mm）の転倒によるエアレーションを行い、酵素剤を添加する仕込みには α -グルコシダーゼ又はグルコアミラーゼを添加後、15°C の恒温水槽に発酵管を入れて発酵試験を行った。

結果及び考察

1. 原麦汁エキス分濃度が発酵に及ぼす影響

高濃度醸造における発酵遅延、発酵度の低下及び酢酸生成量の増加の現象を確認するために、原麦汁エキス分が 10% Plato から 30% Plato の麦汁を調製して行った 2 L 発酵管試験の結果を Fig. 2 に示した。原麦汁エキス分 25% Plato 及び 30% Plato でのアルコール分の生成は、原麦汁エキス分 20% Plato における

それより少なくなり、真正発酵度（発酵によって消費された真正エキス分の原麦汁エキス分に対する割合（%））は原麦汁エキス分が高くなるほど低下し、原麦汁エキス分 20% Plato では、原麦汁エキス分 10% Plato の場合より 4 % 低下し、実際の醸造上においても問題となると考えられた。また、酢酸生成量は、原麦汁エキス分 25% Plato 及び 30% Plato では顕著に増加した。原麦汁エキス分 30% Plato の場合の酢酸生成量は、アルコール生成量が少いことと関連していると考えられるが、原麦汁エキス分 25% Plato の仕込みの生成量よりは少なかった。また、10% Plato における酢酸生成量が 15% Plato の場合におけるそれよりも多くなったことについては、緒言にも記載したとおり、実際の製造においては製造・品質上の問題が生じないように 18% Plato 程度までの麦汁で高

Fig. 2 Effects of the original extract of wort on 2-L test tube fermentations (A : alcohol content ; B : OD at 600 nm i.e. concentration of yeast in suspension ; C : real degree of fermentation ; D : acetic acid ; E : isoamyl acetate).

Real degree of fermentation is defined as the percentage of the real extract consumed during fermentation relative to the original extract. Symbols show the original extract of wort (OE ; % Plato).

—□—, OE 10% ; —△—, OE 15% ; —×—, OE 20% ; —○—, OE 25% ; —●—, OE 30%

濃度醸造が行われていることから、10% Plato と 15% Plato の原麦汁エキス分では、その酢酸生成量は元々少なく大きな差は無いものと考えられる。以上のように、高濃度醸造を原麦汁エキス分 20% Plato 以上で行う場合には、真正発酵度の低下及び酢酸生成量の増加という問題解決の必要性が確認された。

ビールにおける酢酸の閾値は 175 mg/l¹²⁾、弁別閾値は 60~120 mg/l¹³⁾ とされており、高濃度醸造によって製成したビールを割水した場合、酢酸濃度は閾値以下になる場合もあると推察されるが、使用酵母により酢酸生成量は異なるし¹⁴⁾、高濃度醸造により安定した品質のビールを製造するため、あるいは、割水を行わない高アルコール分タイプのビール製造には、オフ

フレーバーである酢酸生成の増大は問題である。なお、Fig. 1 に示したとおり、酢酸イソアミルの生成量も原麦汁エキス分の増加とともに増大したが、過剰の酢酸イソアミル含量は下面発酵ビールでは品質上問題となるが、上面発酵ビールの酢酸イソアミル含量は元来多く特に問題とならない場合が多いので、これについて今回は問題としなかった。

2. α -グルコシダーゼ添加による麦汁の糖組成の変換

高濃度醸造は、緒言に述べたように、主に品質上の制限要因により、18% Plato 程度までの原麦汁エキス分において行われており、また、前記の確認実験により、20% Plato 以上の原麦汁エキス分では真正発酵度

Fig. 3 Changes in glucose (A), DP2 (B, C) and DP3 (D, E, F) saccharide concentration during 2-L test tube fermentation with 20% Plato wort using α -glucosidase. Symbols show the concentration of α -glucosidase in the wort.

—●—, no addition ; —○—, 100 mg/l ; —×—, 400 mg/l

の低下と酢酸生成量の増加が確認された。高濃度醸造は、その製造方法から、問題なく実施できれば原麦汁エキス分が高い程、製造の効率性は高く、麦汁煮沸等の使用エネルギーは少なくなり享受できるメリットは多い。そこで、我々は、最初に20% Platoの麦汁を用いて、 α -グルコシダーゼを酵母添加と同時に麦汁に添加し、並行複発酵型式の2L発酵管試験を行った。原麦汁エキス分20% Platoの麦汁に α -グルコシダーゼを添加した2L発酵管試験における糖組成の経日変化を、Fig. 3にはグルコースからDP3まで、Fig. 4にはDP4からDP7及び全糖の変化をそれぞれ示し

た。発酵期間中、グルコース濃度は、 α -グルコシダーゼ剤100 mg/l添加では増加することなく減少したが、 α -グルコシダーゼ剤400 mg/l添加では発酵2日目に2.6%と1日目より1%増加した。 α -グルコシダーゼの添加量が多いほど、マルトース及びマルトリオース濃度は発酵初期に急激に減少する一方、非発酵性イソマルトリオ糖であるイソマルトース、パノース及びイソマルトリオース濃度はそれぞれ増加した。しかし、生成したこれらの非発酵性オリゴ糖は、3～4日目以降減少し、最終的にはほとんど無くなった。DP4及びDP5濃度についても、イソマルトオ

Fig. 4 Changes in DP4 (A), DP5 (B), DP6 (C), DP7 (D) and total sugar concentration (E) during 2-L test tube fermentation with 20% Plato wort using α -glucosidase. Total sugar concentration is the total of sugars from glucose to DP7 in the fermenting wort. Symbols are the same as those indicated in Fig. 3.

リゴ糖の生成によると考えられる増加が認められ、発酵4～5日目にそれぞれ初発濃度の約2倍となり以後暫時減少した。DP6とDP7濃度は、ほとんど増加することなく減少した。グルコースからDP7の濃度を合計した全糖の濃度（mM）は、発酵期間を通じて増加することなく減少し、 α -グルコシダーゼの添加量が多いほど、最終的な全糖含量は少なくなった。

向井ら¹⁵⁾はビール品質の多様化を目的としてビール醸造に清酒酵母を用いるために、マッシング時にグルコアミラーゼを使用し、マッシュの糖組成をグルコース主体のものに変換してビール醸造を行った。しかし、マッシング時に麦汁中のマルトース等をグルコースに変換したことにより、麦汁の粘性を高め、麦汁ろ過を困難とし、さらに、麦汁の高い浸透圧により発酵において酢酸生成量の増大を招いた。したがって、糖化工程中に、高濃度麦汁の糖組成をグルコース主体のものに変換することは現実的ではなく、発酵中に麦汁の糖組成を変換する今回検討した方法が有効であると考えられる。

3. α -グルコシダーゼ添加によるアルコール分生成の促進・酢酸生成量の低減

Fig. 5 には、2L 発酵管試験におけるアルコール分、酢酸等の経日変化を示した。 α -グルコシダーゼの添加による酵母増殖量（OD₆₀₀）の顕著な差は認められなかったが、アルコール分生成は促進され、 α -グルコシダーゼ剤100 mg/l 添加で真正発酵度は6%，400 mg/l 添加で9%それぞれ向上した。酢酸含量に

ついては、 α -グルコシダーゼ無添加の仕込みにおいては、発酵初期に増加した後、発酵10日目まではその含量が減少し、以後増加する経過を示した。最終的な酢酸含量は、 α -グルコシダーゼ無添加では64 mg/lであったが、 α -グルコシダーゼ剤100 mg/l 添加により9 mg/l、400 mg/l 添加により24 mg/lとそれぞれ顕著に減少した。これらのことから、アルコール分の生成促進については、 α -グルコシダーゼの加水分解反応によるグルコース供給が、酢酸生成量の減少については、それに加えて糖転移反応によるイソマルトオリゴ糖の生成がグルコース生成の緩衝反応となることが、それぞれ寄与しているものと推察された。発酵中の酵母による酢酸生成は、アセトアルデヒド脱水素酵素の発現が酢酸生成に及ぼす影響等から、アセチル CoA 合成の中間体として生成された酵母菌体内の非解離型酢酸がリークしてくるものと考えられており¹⁶⁾、この酢酸生成は酵母活性・生理と密接に関連していると思われる。このことから、 α -グルコシダーゼ無添加の場合における発酵後半の酢酸生成の増加は、酵母活性の低下により代謝能も低下し酵母菌体内の酢酸蓄積量が多くなった可能性も推察される。逆に、 α -グルコシダーゼを添加した場合の酢酸生成量の減少は、浸透圧の上昇を招かずグルコースを供給することに加えて、絶えず供給されるグルコースが酵母活性の維持に寄与していることも考えられる。この点については、今後検討したい。

更に高濃度の原麦汁エキス分25% Platoの麦汁、

Fig. 5 Changes in alcohol content (A), OD at 600 nm (B), and acetic acid concentration (C) during 2-L test tube fermentation with 20% Plato wort using α -glucosidase. Symbols are the same as those indicated in Fig. 3.

並びに通常原麦汁エキス分である12% Platoの麦汁に α -グルコシダーゼを添加する同様な2L発酵管試験を行った結果をFig. 6に示した。原麦汁エキス分25% Platoの場合では、原麦汁エキス分20% Platoの場合と同様に、 α -グルコシダーゼ添加による発酵促進効果が認められ、真正発酵度は向上し、酢酸生成量は顕著に減少した。原麦汁エキス分12% Platoの場合には、 α -グルコシダーゼ添加による酢酸生成量の減少効果はなかったが、真正発酵度は向上した。

4. 高濃度麦汁中の α -グルコシダーゼの安定性

今回、発酵試験に用いた *A. niger* 起源の α -グルコシダーゼは、Kitaら⁹⁾がpH 3.5~8.0, 55°C (pH 4.0) まで安定であり、70°Cで失活すると報告しており、上面発酵ビール製造における通常の発酵条件では (pH 4.3~5.6, 15~25°C), 麦汁中に添加した α -グルコシダーゼは安定と考えられる。しかし、酵母菌体への吸着、死滅酵母菌体から漏出したプロテアーゼによる分解、あるいは高濃度麦汁の発酵に伴う多量のアルコール分の生成又は発酵麦汁中のポリフェノールとの結合による凝集沈殿も考えられる。データは示さないが、 α -グルコシダーゼ活性は発酵期間を通じて安定に維持され、活性減少は認められなかった。したがって、 α -グルコシダーゼを酵母添加と同時にこの高濃度醸造法において、添加酵母の活性と添加量、発酵温度等の条件を制御すれば再現性良く、醸造を行うことができるものと考えられた。

製成ビール中の α -グルコシダーゼ活性は、パストリゼーションにより失活されなければ、酵素活性が維持されビール中の糖組成が更に変わる可能性がある。この点については酵素剤を麦汁に直接添加するよりは、 α -グルコシダーゼ固定化カラムを用いて発酵中の麦汁の糖組成の変換を行う方法が有効である。しかし、地ビール製造者にとっては、雑菌汚染防止のための厳密な微生物管理を必要とする固定化酵素カラムの使用は困難であり、今回検討した α -グルコシダーゼを麦汁に直接添加する方法が現実的であると考えられた。

5. α -グルコシダーゼとグルコアミラーゼの添加効果の相違

α -グルコシダーゼの糖転移反応が発酵経過、酢酸生成量に及ぼす効果等を確認するために、糖転移反応を生起しないグルコアミラーゼを添加した発酵試験を行った結果をFig. 7とFig. 8に示した。 α -グルコシダーゼとは異なる基質特異性を持つグルコアミラーゼを高濃度麦汁に添加した場合の発酵経過、成分等の比較であるから、グルコアミラーゼ剤の使用量については、活性単位で酵素量を合わせることは行わず、予備試験の結果から顕著にアルコール分生成の促進に効果があつたグルコアミラーゼ剤200 mg/lの添加と、その4分の1量を添加した場合の結果を示した。なお、酢酸生成に及ぼす糖転移反応の効果を明確に確認するために、25% Platoの麦汁を用いた。

α -グルコシダーゼを添加した仕込みにおいては、

Fig. 6 Effects of the original extract of wort and α -glucosidase concentration on the real degree of fermentation (A) and acetic acid formation (B) during 2-L test tube fermentation. Symbols shows the concentration of α -glucosidase in the wort.

□, 0 mg/l; ■, 100 mg/l; ▒, 400 mg/l

アルコール分生成の促進及び酢酸生成量の減少について、原麦汁エキス分 20% Plato の場合と同様な傾向が確認された。 α -グルコシダーゼを用いた場合は、グルコース濃度はほとんど増加が認められず、グルコースから DP 7 を合計した全糖の濃度 (mM) も、発酵期間を通じて増加することなく減少し、 α -グルコ

シダーゼの添加量が多いほど、その減少は速やかであった。25% Plato の高濃度麦汁を発酵させる場合にも、 α -グルコシダーゼ添加の有効性が確認された。一方、グルコアミラーゼを添加した仕込みは、アルコール分の生成については、 α -グルコシダーゼの添加効果以上に促進されたが、グルコアミラーゼ剤を 200 mg/l

Fig. 7 Differences in the effects of α -glucosidase and glucoamylase on the fermentation with 25% Plato wort. Total sugar concentration is the total from glucose to DP7 in the fermenting wort. Symbols show the concentration of α -glucosidase or glucoamylase in the wort.

α -glucosidase : —●—, no addition ; —○—, 100 mg/l ; —×—, 400 mg/l
 Glucoamylase : —●—, no addition ; —○—, 50 mg/l ; —×—, 200 mg/l

Fig. 8 Changes in saccharide concentration from glucose to DP7 during 2-L test tube fermentation with 25% Plato wort using α -glucosidase or glucoamylase. Symbols are the same as those indicated in Fig. 7.

添加した仕込みでは、グルコース濃度は発酵4日目に7.7%まで上昇し、このグルコース濃度の増加により、グルコースからDP7を合計した全糖の濃度(mM)も増加し、酢酸生成量は α -グルコシダーゼを添加した仕込みより多くなった。糖転移反応を起こさないグルコアミラーゼによる発酵初期のグルコース濃度の著しい増加は、発酵を律速することはないが、酢酸生成量の増加に繋がったものと考えられた。逆に、 α -グルコシダーゼの糖転移反応は、グルコースの生成を制限し発酵を律速するが、酢酸生成量の増加の抑制に効果があると考えられた。したがって、グルコアミラーゼの添加において麦汁中のグルコース濃度を制御するためには、グルコアミラーゼの添加量による必要があり、発酵温度等の異なる実際のビール醸造において、

このことを実現することは困難であると思われる。一方、 α -グルコシダーゼの添加においては、麦汁中のグルコースの生成において、糖転移反応という言葉は緩衝反応があるために、グルコアミラーゼ添加のようにグルコース濃度が急上昇するリスクは少ない。この α -グルコシダーゼとグルコアミラーゼの比較試験の結果から、 α -グルコシダーゼを使用した場合の酢酸生成量の低減は、その糖転移反応によって麦汁中のグルコース濃度の急激な上昇を招かず、浸透圧の上昇を引き起こさないことが直接的原因と考えられるが、前述したように、 α -グルコシダーゼにより暫時供給されるグルコースによる酵母活性への影響については、今後検討したい。

なお、日本において、酵素剤は酒税法基本通達によ

り酒類の原料として取り扱わない物品として、「ビール製造の際に麦芽と併用する必要最小量の酵素剤」と使用制限されており、酵素剤を麦汁に添加した場合の製成酒は発泡酒になると思われる。しかし、発酵麦汁に酵素剤を添加することは、ドライビール製造のためのグルコアミラーゼ又は α -アミラーゼの添加、あるいはオフフレーバーであるダイアセチル生成防止のための α -アセト乳酸脱炭酸酵素の添加が、世界中では一般的に行われている^{17),18),19)}。けれども、高濃度麦汁の発酵において、ピッチング時に α -グルコシダーゼを添加して並行複発酵により発酵度を高めるとともに、酢酸生成量の増加を防止するという報告はこれまでに無い。今回、報告した製造方法は、単に市販の α -グルコシダーゼ剤を発酵開始時に麦汁に添加するものだが、単純な操作だけに、地ビール製造者にも実施可能である。地ビール製造における製造効率の低さ、少人数の製造担当者による過重な作業負担等の現状に対して、高濃度醸造法の課題を解決するこの方法は有効であると考えられる。さらに、使用した麦芽の品質等に問題があったり、糖化温度が高過ぎる等の不適正なマッシング条件によって、麦汁中の発酵性糖の含量が少なくなった場合の対処技術としても、今回検討した方法は有効であると思われる。

要 約

ビールの高濃度醸造における発酵遅延・発酵度の低下、酢酸生成量の増加という課題の解決を目的として、 α -グルコシダーゼを酵母添加と同時に麦汁に添加し、糖組成の変換と発酵を同時進行させる並行複発酵形式のビール製造方法について検討した。その結果、 α -グルコシダーゼの糖転移反応により、麦汁中のグルコース濃度を過度に上昇させることなく高濃度麦汁の発酵を行うことができ、ビール中の酢酸濃度の低減に効果があった。また、 α -グルコシダーゼの加水分解反応により、麦汁中のオリゴ糖は分解され、ビールの発酵度を高めることができた。

文 献

- 1) European Brewery Convention : Technology and Engineering Forum, Fermentation & Maturation (Manual of Good Practice), p.85 (2000)
- 2) G. G. Stewart : Brew Guard, **128**, 31-37 (1999)
- 3) D. J. Cooper,, G. G. Stewart and J. H. Bryce : J. Inst. Brew., **104**, 83-87 (1998)
- 4) W. Kunze, : Technology brewing of malting (2nd edition), p. 433-435. VLB, Berlin (1999)
- 5) J. P. Navarro-Avino, R. Prasad, V. J. Miralles, R. M. Benito and M. Serrano : Yeast, **15**, 829-842 (1999)
- 6) S. Akamatsu, H. Kamiya, N. Yamashita, T. Motooshi, N. Goto-Yamamoto, T. Ishikawa, N. Okazaki and A. Nishimura : J. Biosci. Bioeng., **90**, 555-560 (2000)
- 7) S. C. O'Connor-Cox Erin and W. M. Ingledew : J. Am. Soc. Brew. Chem., **48**, 26-32 (1989)
- 8) M.-L. Suihko, A. Vilpola, M. Linko : J. Inst. Brew., **99**, 341-346 (1993)
- 9) A. Kita, H. Matsui, A. Somoto, A. Kimura, M. Takata and S. Chiba : Agric. Biol. Chem., **55**, 2327-2335 (1991)
- 10) Brewing Convention of Japan (BCOJ) : Methods of analysis of beer (second edition), Brewing Society of Japan, Tokyo (1998)
- 11) I. J. Dixon : J. Inst. Brew., **73**, 488 (1967)
- 12) J. S. Hough, D. E. Briggs, R. Stevens and T. W. Young : Malting and Brewing Science volume 2, chemical and physical properties, p. 792, Chapman & Hall (1982)
- 13) Analytica-EBC/European Brewery Convention : Sensory analysis, Flavour terminology and reference standards (IM), p. 6 (1998)
- 14) Y. Shimazu and M. Watanabe : J. Ferment. Technol., **59**, 27-32 (1981)
- 15) 向井伸彦, 水野昭博, 佐藤和夫 : 日本農芸化学大会講演要旨集, p. 330 (2000)
- 16) 後藤 (山本) 奈美, 劉宏芳, 石川雄章, 岡崎直人 : 醸協, **95**, 533-539 (2000)
- 17) M. W. Brenner : Brauwelt, **119**, 42 (1979)
- 18) S. E. Godtfredsen, M. Ottesen, P. Sigsgaard, K. Erdal, T. Mathiasen and B. Ahrenst-Larsen : Eur. Brew. Conv., Proc. Congr., **1983**, 161-168
- 19) B. R. Jensen, I. Svendsen and M. Ottesen : Eur. Brew. Conv., Proc. Congr., **1987**, 393-400