ビール製造技術に関する化学的ならびに微生物学的研究[†]

天 羽 幹 夫

(朝日麦酒株式会社中央研究所)

わが国のビール産業は、戦後の生活の西欧化とともに年に 10% 前後の成長を続け、ビール生産高は 1978 年度には 444 万 kl となり、世界で第 5 位のビール生産国となっている。この間、ビール会社は各社とも、生産能力の増強と製造設備の近代合理化を進め、良質な原料の確保と製品品質の向上ならびに均一化のため多大な努力が積み重ねられて今日に至っている。

原料の麦芽やホップの成分が、仕込一発酵一貯酒一濾過などの諸工程を経て最終製品ビールに至るまでの変化は、微視的にはきわめて多種多様な化学的または生化学的反応の連続であり、それらの複雑な諸変化の実体の究明は、ビール製造技術の合理化のため、そしてまた製品品質の向上維持のため不可欠の要件である。一方、市場に出荷したビール製品は、消費される時点までに、徐々に変化し、酸化臭、老化味、混濁、噴き性などの問題が発生する。市場へ出荷後のこれらの変化の実体とその原因の解明も非常に重要である。

私どもは、上記の視点に立って、多くの協力者とともに、ビール製造技術の近代化とビール品質に関連した諸問題の化学的および微生物学的研究に努めてきた。過去約 20 年間に取扱った技術的研究の概要を以上に述べる。

I. ビール酵母の生育と生理

ビール醸造に使用される酵母菌株は、分類学的には *Saccharomyces cerevisiae* Hansen (上面発酵ビール) と *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen (下面発酵ビール) のいずれかに属する。

両菌種の区別は、メリビオースの発酵性の有無が主眼点であるが、その他ビタミン要求性、マルトリオース

発酵性、発酵液中の浮上または沈降性なども相異なる。

Lodder らの酵母の分類 *The Yeasts* (1970)⁽¹⁾ では、*S. uvarum* をメリビオース発酵性酵母の代表とし、その中に *S. carlsbergensis* を吸収合併しているが、異論も多い⁽²⁾のでここでは *S. carlsbergensis* を用いることとする。

わが国を始め、ドイツ、アメリカ、デンマーク、ソ連などのビールの主体は下面発酵ビールであり、いずれも *S. carlsbergensis* を用いて発酵生産されている。ビール醸造用に純粋培養して使用される酵母を培養酵母とよび、野生酵母と区別するが、培養酵母は 10°C 前後の低温での麦汁発酵に馴致され、香味の点から選抜された優良菌株であり、細胞学的には多くの菌株が triploid または tetraploid で細胞型も大きく、胞子形成能は退化している場合が多い⁽²⁾。

(1) ビタミン要求性

ビール酵母のビタミン要求性の研究は、1947 年に米国の Schultz and Atkin⁽³⁾ が多くの菌株について調査を行い、いくつかのビタミン要求型に分けたのが最初で、その後、Kirsop⁽⁴⁾、Streutker⁽⁵⁾、Windisch and Herbst⁽⁶⁾ などが各国のビール醸造菌株についてそれぞれ報告している。しかし、これらの研究はいずれも 25°C ~ 30°C のような生育適温で調べたもので、下面発酵ビールの発酵温度 (最高が 10°C 前後) とは、かなりかけ離れた条件である。そこで私どもは、実際の低温発酵現場におけるビタミン要求性を把握するために、培養酵母および野生酵母約 30 菌株につき Wickerham の合成培地を用いて 12°C および 30°C に培養してビタミン要求性を比較した⁽⁷⁾。結果の一例を Table I に示したが、一般的に下面発酵ビール酵母 (*S. carlsbergensis*; A-1~A-7) は 25°C ではビオチン (Bt) のみを必須とし、パントテン酸 (P) を欠除した培地にも adaptive に生育できるが、上面発酵酵母 (*S. cerevisiae*; A-8~B-2) は 25°C でビオチン以外にパントテン酸も必須に要求する。つき

[†] Chemical and Microbiological Studies on the Beer-production Processes. Mikio AMAHA (Central Research Laboratories, Asahi Breweries Ltd., Tokyo, Japan 143).

Table I. Vitamin Requirements^a of Yeasts at 25°C and 12°C

Culture designation	Species	25°C	12°C
A-1	<i>Sacch. carlsbergensis</i>	Bt ; † P ^b	Bt, I ; † P ^b
A-2	<i>Sacch. carlsbergensis</i>	Bt ; P	Bt, I ; P, (B ₁), (Py) ^{††}
A-3	<i>Sacch. carlsbergensis</i>	Bt ; P	Bt, I, P ; (Py), (N), (F)
A-4	<i>Sacch. carlsbergensis</i>	Bt ; P, (I) ^{††}	Bt, I ; P, (B ₁), (Py)
A-5	<i>Sacch. carlsbergensis</i>	Bt ; P, (I)	Bt, I ; P, (B ₁), (Py)
A-6	<i>Sacch. carlsbergensis</i>	Bt ; P, (I), (Py), (B ₁)	Bt, I ; P ; (B ₁), (Py)
A-7	<i>Sacch. carlsbergensis</i>	Bt ; P, (I), (Py)	Bt, I ; P, (B ₁), (Py)
A-8	<i>Sacch. cerevisiae</i>	Bt, P ; (I), (Py)	(Not tested)
A-9	<i>Sacch. cerevisiae</i>	Bt, P	Bt, P ; (I), (B ₁), (Py), (N)
A-10	<i>Sacch. cerevisiae</i>	Bt, P	Bt, P, I ; (B ₁), (Py)
B-1	<i>Sacch. cerevisiae</i> (diploid)	Bt, P ; (I), (Py)	Bt, P ; (I), (Py), (B ₁)
B-2	<i>Sacch. cerevisiae</i> (haploid)	Bt, P, Py ; (I)	Bt, P, Py ; (B ₁), (I)
B-3	<i>Sacch. batatae</i>	Bt ^b , (P)	Bt, I ; (P), (B ₁), (F)
B-4	<i>Sacch. chevalieri</i>	P ; (I), (B ₁)	Bt, P, I ; (B ₁), (Py), (N), (F), (PAB)
B-5	<i>Sacch. cerevisiae</i> (Saké)	P ; (Bt)	P, I ; (Bt), (B ₁)
B-6	<i>Brettanomyces</i> sp.	Bt, B ₁	Bt, B ₁ , I ; (P), (N), (PAB)
B-7	<i>Sporobolomyces holsaticus</i>	(Py)	(Py)

^a Bt, biotin ; P, calcium pantothenate ; I, inositol ; B₁, thiamine ; Py, pyridoxin ; N, nicotinic acid ; F, folic acid ; PAB, *p*-aminobenzoic acid.

[†] Vitamins listed before the semicolon are absolutely required for growth.

^b P, Bt—Adaptation (delayed growth in the absence of pantothenate or biotin).

^{††} Vitamins in brackets are partially required for growth.

に 12°C で培養すると下面発酵母はすべての菌株がイノシトール (I) をも必須に要求し、さらにパントテン酸やサイアミン (B₁) およびピリドキシン (Py) などへも partial な要求性がみられた。このような低温でのビタミン要求性の増大は、ビール醸造工程での酵母の増殖速度と関連して注目すべき現象である。清酒酵母においても低温での生育にはイノシトールが必須であることが、その後、竹田と塚原⁽⁸⁾により報告されている。

酵母におけるイノシトールの生理的意義に関しては、有馬ら^(9,10)、林ら⁽¹¹⁾、Becker and Lester⁽¹²⁾などの報告があるが、酵母が 12°C のような低温でイノシトールをとくに要求する現象は、微生物の膜リピッドの組成と低温への適応という観点からさらに生化学的検討が望まれる。

(2) ビールの糖組成と酵母の糖発酵性

麦汁およびビールの炭水化物組成は、1950年代からペーパークロマト法で、単糖類、二糖類、三糖類などの分別定量が行われ^(13,14,15)、最近はさらにカラムクロマト法などによって DP 14~16 のデキストリンに至るまで詳細に分別定量されている⁽¹⁶⁾。ニゲロース、コージビオースなど特殊糖類の存在については麻生と渡辺⁽¹⁷⁾、その他⁽¹⁵⁾の報告がある。筆者ら⁽¹⁸⁾は、1960年頃の各国のビール 32 種類の炭水化物組成をペーパークロマト法で比

較検討した。各国ビールの組成は、一般に全糖分 (グルコースとして) が 2.3~4.4%、単糖類は通常 0.05% 以下、二糖類は 0.1~0.5%、三糖類は 0.2~0.5%、四糖類は 0.14~0.63% であり、二糖類と三糖類の含量比や発酵性残糖量 (全糖の 10~30%) などは各銘柄の特徴の一つとなっている。

ビール工場の発酵工程から発酵中の試料を毎日採り、麦汁中の各種糖類が酵母によって発酵されて減少する様相を調査した結果の一例を Fig. 1 に示した。冷麦汁 (初温は 6.5°C) に酵母を添加し主発酵を開始すると、まず

Fig. 1. Changes of Carbohydrate Composition of Wort during the Primary Fermentation in a Brewery.

二糖類中のショ糖(約 0.5%)が酵母のインベルターゼで転化し単糖類がやや増加するが、この単糖類(グルコースとフラクトース)はすぐ発酵されて消失し、ただちに二糖類(マルトースが主体)の発酵が始まり、ついで三糖類(マルトトリオースが主体)も発酵されて減少してゆく。四糖類以上のオリゴデキストリンは通常ビール酵母では発酵されず、そのままビールに移行する。

一方、発酵工程の発酵液中の酵母を毎日遠沈して集め、菌体の発酵力の変化をワールブルク検圧法で追跡してみた⁽²⁰⁾。酵母菌株Cを用いた場合の発酵および貯酒工程における酵母細胞数、出芽状況、呼吸能 Q_{O_2} 、および各種糖類または麦汁を基質とした発酵能 Q_{CO_2} を Table II に示した。麦汁を基質として与えた場合の Q_{CO_2} (乾燥菌体 1mg が 1 時間に発酵する CO_2 の容量)は、主発酵の第 3 日目に最高値 235 μ l を示し、それ以後漸減し 8 日目には 142 μ l にまで低下した。

この間、個々の糖類に対する発酵能を調べてみると、発酵初期(第 1 日～第 2 日)ではグルコース(G)に対する発酵能が最大で、マルトース(M)およびマルトトリオース(MT)に対する発酵能はまだかなり小さいが、第 2 日～3 日にかけて M および MT に対する発酵能が急激に増大し、やがて後期に向かって漸減する。G, M, および MT の三者を 0.5% ずつ同時に基質として与えた場合の Q_{CO_2} は各糖類を単独に与えた場合の Q_{CO_2} よりも常に大きな値を示し、麦汁を基質とした Q_{CO_2} の 80

～90% 値となった(Table II)。

これらの結果は、発酵性糖類 G, M, MT に対する取込み機構がおのおの独立して存在し競合しないことを示すものと考えられる。また麦汁中の糖類が前述(Fig. 1)のように G, >M, MT の順に発酵消失してゆく事実は、これらの各糖類の取込みに関与する“permease”の存在とその生合成の順を仮定して説明されている⁽²¹⁾が、最近、酵母菌体からグルコースまたはマンノースを特異的に結合する蛋白質(hexose-binding protein)が実際に分離され精製されている^(22,23)。

ビール酵母が、マルトテトラオースやイソマルトースを発酵しないこと、また 25°C に比べて 10°C では麦汁や各種糖類に対する発酵能が 1/3～1/4 に低下することなどもワールブルク検圧法で容易に実証された⁽²⁰⁾。Hlaváčková⁽²⁴⁾は、実用ビール酵母の選択のためワールブルク検圧法による発酵能の測定を推奨しているが、測定に際し、基質の種類と濃度、温度、細胞の age などの諸条件の影響に十分な配慮が必要である。

最近アメリカなどで light beer と称し、総カロリーを通常のビールの 2/3 または 1/2 に減らした低カロリービールが市場に進出しているが、これらは発酵中のビールにアミログルコシダーゼを少量添加することによりデキストリンを糖化し発酵させ、最終濾過前にさらに炭

Table II. Changes in the Fermenting Activities of Brewer's Yeast Strain C towards Wort, Glucose, Maltose, and Maltotriose during the Primary Fermentation and Lagering in Brewery A

	Primary fermentation				Lagering	
	1st day	3rd day	5th day	8th day	3rd day	8th day
Number of cells in beer ($\times 10^6$ /ml)	11	38	57	48	19	18
Mean dry weight of single cell ($\times 10^{-6}$ mg)	6.5	6.1	6.0	7.8	5.7	4.1
Percent budding cells	80%	30%	3%	less than 1%	0%	0%
$Q_{O_2}^{air}$ endogenous	3.2	8.0	10.5	11.3	12.0	12.0
$Q_{CO_2}^{N_2}$ glucose 1%	161	166	122	78	120	97
$Q_{CO_2}^{N_2}$ maltose 1%	67	141	107	80	96	88
$Q_{CO_2}^{N_2}$ maltotriose	20	91	85	67	92	85
$Q_{CO_2}^{N_2}$ {glucose 0.5% + maltose 0.5% + maltotriose 0.5%}	—	184	160	127	—	—
$Q_{CO_2}^{N_2}$ wort	225	234	185	142	165	152
CO_2 evolved with wort per single cell (μ l/hr)	14×10^{-6}	14×10^{-6}	11×10^{-6}	11×10^{-6}	9×10^{-6}	6×10^{-6}

酸水で薄めて製品とする場合が多い⁽¹⁹⁾。

最近の遺伝工学の発展とともに、*S. diastaticus* のようなデキストリン発酵性酵母とビール酵母からスフェロプラスト融合などの新しい手法によってデキストリン発酵性の雑種をつくり有用株を選抜して低カロリービールの醸造に役立てようとする試みが目下行われている^(25,26)。

(3) 呼吸欠損酵母と有機酸代謝

Saccharomyces 属の酵母は、増殖時に呼吸能を欠損した変異株 *respiration-deficient mutants* (RD-株) を派生することが多い。この RD-株は呼吸正常株と比べて平板培養上の生育が非常に遅く、コロニーが小さいので *petite* 株ともよばれる。酵母 RD-株の細胞学的または遺伝生化学的諸問題については、多くの総説⁽²⁷⁻²⁹⁾ がある。

ビールの醸造中に、酵母は通常 3~4 倍に増殖するが、この間に、自然発生的に通常 1% 前後の RD-株が発生する。この RD-株は、いわゆる細胞質遺伝因子 ρ を欠損した ρ^- 株である。正常株のミトコンドリアに存在する環状 DNA が欠落して ρ^- の RD-株となることが確認^(28,30,31) されている。ビール酵母の RD-株の多くは、生育が遅く diacetyl など好ましくない香気成分を比較的多量に蓄積する場合が多いので、ビール醸造に際し、RD-株の異常な派生(数%以上)を警戒する^(32,33)。発酵中に沈降してくる酵母を回収する方式でくり返し使用していると RD-株が次第に増加し、RD-株の多くはマルトリオースの発酵能が欠如しているので、ビールの発酵度が低下したという事例も報告⁽³⁴⁾ されている。

私どもは、ビールの有機酸組成と関連して、各種ビール酵母の有機酸生育能を比較検討した際に、ビール酵母の RD-株が、合成培地中で培養すると乳酸とともに一未知酸をかなり多量(親株の約 10 倍)に生産することを偶然に見出した(Fig. 2)⁽³⁵⁾。そこでこの RD-株を合成培地に大量培養し、未知酸をシリカゲルクロマト法で分画精製し、Zn 塩として結晶状に分離して検討した結果、この酸は二塩基性のヒドロキシ酸で左旋性の α -methylmalic acid, すなわち citramalic acid (CMA) であることを確認した。この酵母の呼吸正常親株を呼吸阻害剤の存在下に、あるいは嫌気条件下に培養しても CMA の蓄積はみられない⁽³⁷⁾。また他のビール酵母の RD-株、あるいはパン酵母、ブドウ酒酵母、清酒酵母においても RD-株はいずれもかなり多量(10~50mg/100 ml) の CMA を生成した⁽³⁸⁾。したがって左旋性のシト

Fig. 2. Silica Gel Chromatograms of Organic Acids produced by the Respiration-competent ("Normal") and Respiration-deficient ("Petite") strains of *S. carlsbergensis*. Dotted line: normal strain. Solid line: RD-petite mutant. Peaks: 1, acetic acid; 2 and 3, fumaric and pyruvic acids; 4, succinic acid; 5, lactic acid; 6, unknown acid (citramalic acid); 7, glycolic acid; 8, malic acid.

Fig. 3. Biosynthetic Pathways of Citramalic Acid in Yeast^(38,39).

ラマル酸 (−)-CMA の生成は、酵母の RD-株に特有の生理的性質と考えられた。

RD-株の (−)-CMA 生成機構については斉、相田ら^(39,40)が無細胞抽出液を使って追求し、Fig. 3のようにビルビン酸とアセチル-CoA の縮合によって (−)-CMA が生成することを証明している。この縮合反応を触媒する酵素は、その基質特異性からしてロイシン生合成の第一段階に関与する α -isopropylmalate synthetase と同一の酵素と判定されている。

自然界における (−)-CMA の存在は、1954 年に Hulme⁽⁴¹⁾ がリンゴの皮から分離同定したのが最初の報告であり、Barker ら⁽⁴²⁾が *Clostridium tetanomorphum* のグルタミン酸代謝中間産物として報告したのは、光学異性の (+)-CMA である。最近、香月ら⁽⁴³⁾は *Bacillus* sp. で、Kisumi ら⁽⁴⁴⁾は *Serratia marcescens* で、それぞれ (−)-CMA が有機酸代謝の中間産物として存在することを実証している。各種醸造飲料中、ワインは

CMA を α -isopropylmalic acid とともに比較的多く含有している⁽⁴⁵⁾。

II. 大型発酵タンク内の酵母の挙動とワンタンクプロセスの開発

当社は世界に先駆けて屋外の大型発酵貯酒兼用タンク(容量 350~500kl)を開発し、1965 年以来、自社の 8 工場を始め、ヨーロッパの 2, 3 のビール工場などを含め、200 基以上のアサヒ型屋外タンクが設置されているが、幸い今日まで、全く事故がなく順調に稼動している。

Fig. 4 は当社の名古屋工場の屋外タンクで、高さが約 12m, 外径が 6.75m, 容量は約 350kl である。アサヒ型屋外タンクの構造、材質、仕様などについては、第 1 回技術賞を受けた高柳、原田^(46~48)が報告しているので、ここでは省略する。1967 年マドリッド市における欧州醸造技術会議で発表⁽⁴⁶⁾して以来、屋外大型発酵タンクの利点が漸次ひろく認められ、1970 年代になってからは欧米各国のビール会社でも屋外タンク方式が、工場の増設または新設に不可欠の要素となってきたのが実状である。

しかしながら大型発酵タンクの実用化に際して事前に解決または確認すべき技術的問題点がいくつかあった。その一つは酵母の生理への影響で、液層 8~10m のタンク内で 1 気圧近い水圧を受けながら、ビール酵母の増殖や発酵が順調に均一に進行するだろうかという疑問である。そこで私どもは、従来の室内横型タンク (73kl, 液深は 2.5m) と屋外大型タンク (380kl, 液深 8m) とに同一の麦汁を分け入れ、同一の条件で発酵と貯酒を行い、その間の酵母の挙動と発酵経過をくり返し比較調査した。

屋外タンクの上中下三部より分析試料をとり、タンク内の部位による差 (stratification) の存否を調べたが、エキスの減り方、pH、浮遊酵母数などは、タンク内上下

Fig. 4. Outdoor Fermenting Tanks at the Nagoya Brewery of Asahi Breweries Ltd. Height, 12.0m; diameter, 6.75m; capacity, 350kl.

の間に有意差はなく、また従来型のタンクと比較しても有意差はなかった。Table III は、屋外タンクおよび従来型タンク内で増殖した酵母の生存率、RD-petite 発生率、発酵力 (Q_{CO_2})、細胞容積などを比較したデータの一例であるが、両タンクの間にとくに有意な差はない。また発酵経過中における diacetyl, H_2S , acetaldehyde, イソamilアルコール、酢酸エチルなどの揮発性成分の生成と変化の様相も両タンクの間にほとんど差がなく、約 10m の液深をもった屋外タンクにおいても酵母の生理が何ら影響を受けないことを確認した⁽⁴⁹⁾。

1960 年代の後半から世界的にビール産業も安定成長期に入り、設備投資の効率化と生産原価の低減が技術上の重要課題となってきた。とくに 1973 年の石油危機以来、省エネルギー、省力化を目標としてビール醸造技術の合理化の工夫が各国で進められてきたが、品質を低下することなく醸造日数を短縮することは容易ではない。

われわれは屋外タンクの開発の当初より、発酵と貯酒を同一のタンクで連続して遂行する方式、すなわち、"one-tank process" (ドイツ語で Eintankverfahren)^(50, 51, 54)の検討を行ってきた。

Table III. Comparisons of Yeast Properties during the Primary Fermentation between the Outdoor Tank and the Conventional Tank

Yeast properties ^a	Outdoor tank after				Conventional tank after			
	1 day	2 days	3 days	7 days	1 day	2 days	4 days	7 days
Viability (%)	97.1	99.0	98.8	97.7	97.4	98.6	98.0	97.2
"Petite" mutants (%)	1.0	0.9	0.6	1.2	0.9	0.8	0.5	1.0
Virgin cells (%)	50.0	52.0	58.0	55.0	52.0	53.0	55.0	54.0
Q_{CO_2} (μ l/hr/mg)	410.0	475.0	381.0	260.0	370.0	414.0	392.0	243.0
Nitrogen content (%)	10.7	9.1	8.2	7.1	10.2	9.8	8.5	7.0
Average cell volume (μ^3)	172.0	157.0	118.0	155.0	205.0	153.0	140.0	194.0

^a Yeast cell samples were taken from the upper and lower parts of each tank and examined separately. The average values of the two vertically different samples are shown in this table.

一方、ビールの発酵および貯酒工程における香味の変化、すなわち“ビール熟成”とは生化学的にいかなる反応であるかがかなり解明されてきた⁽⁵²⁾ので、それらの知識をふまえて私どもは Fig. 5 に示したようなワンタンクシステムを開発し実用化した⁽⁵³⁾。すなわち、アサヒ型屋外発酵タンクを用いて、主発酵を従来通り行い、発酵期間の末期(7~8日目)に、タンクの底から若いビールを取り出し、遠心分離機にかけて酵母の約3/4を除き、プレートクーラーで冷却してからビールを再び Fig. 5 に示したパイプを通してタンク内の中央部へ上方に向けてもどし、そのまま貯酒工程に入って熟成と安定化を低温で行うという方式である。このワンタンクプロセスの一例が Fig. 6 であるが、発酵8日目に第1回の circulation (Fig. 5 の Cycle I) を行って酵母を減らし、そのまま貯酒に入って、4日目に Cycle II (遠心分離機を通さず) によって再び circulation を行い熟成を促進する。

ワンタンクプロセスと従来の移し替え貯酒方式とのビールの熟成速度の比較をするために、若ビールの未熟臭の指標として、acetaldehyde, vicinal diketones (V. D. K.), H_2S の三揮発性成分の貯酒期間中の変化を調べ

Fig. 5. Schematic Diagram of the Asahi One-tank System.

Fig. 6. Changes in the Number of Suspended Yeast Cells at Three Vertically Different Location of Outdoor Fermenting Tank during Fermentation and Lagering. $\square$, $\blacksquare$, upper portion; $\circ$, $\bullet$, middle portion; $\triangle$, $\blacktriangle$, lower portion. Open symbols show the one-tank process, and closed symbols the conventional process. Arrows show the circulation process.

たのが、Table IV である。ワンタンクプロセスの方が従来の移し替え方式に比べて熟成が約5日間早く進行していると判定される。circulation によって H_2S などの消失が促進されることは、circulation 操作中に排気ガスの中に H_2S など含硫化合物がかなり認められたことによって裏付けられている⁽⁵³⁾。最終製品ビールの品質については、一般分析値、高級アルコール、エステルなど香気成分の分析値、および官能試験の結果において、ワンタンク方式と従来の移し替え方式とで有意差がないことも実証された。ここで重要なことは、ワンタンク方式の経済的利点 (Table V) である。1977年の東京を基準とした試算では Table V のように、設備投資は、ワンタンク方式では貯酒期間を5日間短縮することにより、タンクの所要本数が12%節減される。運転費は、ワンタンク方式では移し替えをしないので、タンク洗浄が1回省略され、洗浄用水、洗剤、労力、排水負荷などが半

Table IV. Changes of the Amounts of Three Immature-flavor Components during Lagering Period (In the one-tank process, circulation via cycle II was conducted on the 4th day for 24 hours)

Components	Process	Lagering period (days)				
		0	5	10	15	20
Acetaldehyde (ppm)	One-tank	7.6	3.5	2.8	2.6	1.9
	Conventional	7.6	4.2	3.4	3.2	2.5
V. D. K. (ppm)	One-tank	0.17	0.07	0.06	0.04	0.03
	Conventional	0.17	0.09	0.08	0.05	0.03
H_2S (ppb)	One-tank	35	10	6	6	4
	Conventional	34	14	10	7	7

Table V. Economic Benefits of the One-tank Process in Comparison with the Conventional process

	One-tank (%)	Conventional (%)
(1) Investment cost	88	100
(2) Running costs		
Water usage	50	100
Sewage disposal	50	100
Detergents	50	100
Man-hours	72	100
Beer loss	50	100
Electric power	141	100
Total running costs	65	100

減する。タンク底に残るビールのロスも半減する。しかし半面、circulation のための電力が増加 (141% になる) するので、その経費増を差し引き、運転費は従来方式の約 65% に節減される。なお、経費面のメリット以外に、私どものワンタンク方式では、熟成期間中の浮遊酵母数を自由に調節することができ、またビールの circulation の時期や回数を変えることによって熟成日数を比較的自由にコントロールできるのが利点の一つである。また液層の深いタンクでは貯酒の末期に上層と下層で CO₂ 含量などの相異が生じやすいが、circulation によって均一化を図ることが可能であり、大型タンクにより良質で均一なビールの製造が保証される。

III. 製品ビールの品質関係の研究

(1) 製品ビールの酸化と空寸空気

壺詰 (缶詰) した製品ビールは、空寸部に残留する空気によって徐々に酸化を受け、いわゆる酸化臭、酸化混濁などが発生する^(55,56)。そこでビールの壺詰 (缶詰) に際し、空寸部に残留する空気量を極力減らすための努力、工夫が絶えずなされている⁽⁵⁸⁾。私どもは、壺詰ビールの酸化されてゆく動態をまず把握するために、空寸空気中の O₂ 含量の変化をガスクロマト法により追跡し、各種保存条件などの影響を調べた^(56,57)。アスコルビン酸を添加したビールと添加しないビールを室温に保存し、壺詰直後から 43 日まで、空寸部の O₂ 含量 (%) の変化を調べた一例が Table VI である。アスコルビン酸添加区の方が O₂ 吸収が早くなっている。アスコルビン酸は自ら O₂ を消費することにより、少なくとも部分的にビールの酸化を防ぐ効果がある。Fig. 7 は、壺詰ビールを各種温度で保存した場合の空寸部 O₂ の減少速度

Table VI. Effect of Ascorbic Acid Added to Beer on the Oxygen Content of Neck-space Air of Bottled Beer (Ascorbic acid : 30mg per 633ml beer)

Days after bottling	Oxygen (%)	
	Without ascorbic acid	With ascorbic acid
0 ^a	25.5	24.0
1	22.7	16.6
6	16.3	10.2
9	12.5	9.5
17	8.9	6.6
29	9.4	6.6
43	8.5	7.1

^a Immediately after pasteurization.

Fig. 7 Effect of Storage Temperature on the Rate of Oxygen Consumption in Canned Beer.

を比較した結果であるが、0°C 保存に比べて、12°, 25°, 48°C のビールの O₂ 消費速度 (酸化速度) は、1 : 3 : 8 : 20 の比になる。壺や缶に動揺をあたえると空寸部 O₂ の吸収消費が早くなることも容易に実証された。

なお、壺詰直後は、空寸空気中の O₂ 含量が大気中の O₂ 含量よりもかなり大きい値 (25% 前後) を示すことが多いが、その理由については別々に論じた⁽⁵⁶⁾ ので参照されたい。

ビールの酸化混濁は、ビール中のポリフェノールが O₂ によって酸化重合してダイマー、トライマーとなって蛋白質と結合し不溶化するためと考えられている。そこで製品ビールの混濁発生を防止するには、空寸 O₂ を減らすこと、ポリフェノールを除くこと、あるいは蛋白質を減らすことがいずれも有効である。貯酒のビールにタンニン酸を添加して蛋白質を凝固沈殿させ除去する方法も実用されているが、この処理をしたビールには、タン

ニン酸に混在する gallic acid が検出されることを実証し, gallic acid の定量法とともに報告した⁽⁵⁹⁾.

(2) ビール凍結時の白色沈殿物

寒冷地や冷蔵庫内で、曇詰(缶詰)ビールが、 -5°C 以下の低温にさらされるとビールが凍結するが、再び室温にもどされて融解した場合、ビールは混濁し曇底にかなり多量の白色沈殿物(1l 中 20~200mg)を生成することが多い (Fig. 8). この沈殿物は凍結したビールに独得のもので、いわゆる“タンパク沈殿”ではなく、非デンプン系炭水化物から成り、その主成分は β -グルカン(大麦の胚乳部から由来する)であることを私どもは実証した^(60,61).

凍結ビール沈殿物を温湯に溶かし、エタノールで沈殿させてNを含まない精製標品とし、つぎに 20% 硫酸分画をくり返してグルコースだけから成る画分 (G-1) とペントースを約 20% 含む画分に分ける。主成分の G-1 は、 890cm^{-1} に強い吸収を示し、超遠心分析で単一のピークを与え、平均分子量は一応 114,000 と算出された。G-1 は、部分加水分解物、メチル化糖の分離同定、過ヨウ素酸酸化などから、 β -1,4- および β -1,3-グルコシド結合を 3~4:1 の比率で含む直鎖状の β -グルカンであり、その基本構造は、Perlin and Suzuki⁽⁶²⁾ が大麦の β -グルカンについて提出したモデル構造を適用して下のごとく示すことができた。

ビール中の β -グルカンは、上図のようにやや曲った直鎖構造であるから、デンプン系のアミロースの“老化”

(A) (B)

Fig. 8. Precipitates in Frozen Beer. Left bottle: frozen at -8°C for 10 days and then thawed at room temperature. Right bottle: kept at room temperature.

と同様に、隣接の分子との間に水素結合を形成して会合し、沈殿を生ずるものと思われるが、なぜ -8°C ~ -10°C という温度で沈殿生成が最大となるのかは不明である。なお、このビール凍結沈殿は、 β -1,4-グルカナーゼ(セルラーゼ)および β -1,3-グルカナーゼによって分解を受けるので、それらの酵素を少量ビールに添加することによって沈殿の発生を防ぐことができる⁽⁶⁰⁾.

大麦穀粒中に、 β -グルカンは 2.4~3.6% も存在し、胚乳の cell-wall の主成分を構成し、分子量は 100 万以上と推定されている^(63,64). 大麦品種と β -グルカン含量、製麦工程での変化、ビール製品工程中の変化、ビールの粒度や濾過速度との関係などについては、最近多くの報告がある^(65,66,67,68).

朝鮮戦争の折に、国連軍用に使ったオランダ某社の缶ビールが、冬期戦場で凍結して白色沈殿を生成しクレームが多かったとのことであるが、これはまさに β -グルカンの凍結沈殿であろう。

(3) 製品ビールの噴き原因とその防止

曇詰ビールを開栓した瞬間に、曇内に急激な発泡が起り、曇口からビールが泡とともに噴出または溢出する現象を噴き(gushing)とよぶ。16 世紀に英国でビールの曇詰が開始されて以来、噴きの問題はビール業界の宿命的な難題とされてきたが、原因物質が不詳のため防止方法も確立されていなかった。われわれは、1970~1971 年度に収穫時の雨のため湿害を受けたビール大麦の試料 28 点を日本全国から集め、平板培養法で 47 株のカビを分離し、それらの分離株を人工培地(Richard solution)に培養してその濾液をビールに加えて噴き誘発活性を調べた結果、*Nigrospora*, *Stemphylium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* などに属するカビ菌株が噴き誘発物質を生成することを見出した⁽⁶⁹⁾. そこでつぎに、*Nigrospora* sp., *Stemphylium* sp., および *Fusarium graminearum* の生成する噴き因子の分離精製を試み、いずれも peptide, または peptidoglycan であることを実証した⁽⁷⁰⁾.

とくに *Nigrospora* sp. 207 号菌のつくる噴き誘発物質(*Nigrospora* Gushing Factor, NGF)については、Richard 液に大量培養⁽⁷¹⁾を行い培養濾液から溶媒分画、ゲル濾過クロマトなどを経て、超遠心的および電気泳動的に単一の精製品(白色粉末)を得た。このものは非常に強力な活性をもち、正常のビールに添加すると 0.05ppm で噴き活性を発揮した⁽⁷⁰⁾. NGF は、分子量約 16,500 の

ポリペプチドでそのアミノ酸組成は、half-cystineが多いこと（全アミノ酸残基の10%を占める）、ロイシン、バリンなどに疎水性アミノ酸が多いこと、そしてチロシン、ヒスチジン、トリプトファン、およびメチオニンが欠如していることが特徴である（Table VII）。熱に対して安定で、2時間煮沸しても活性が残存し、また蛋白分解酵素にも抵抗力があり、プロナーゼでは分解されるが、パペインなどでは失活しない。

大麦の穀粒に *Nigrospora* 207 号菌を人工的に接種生育させて乾燥したものは、正常麦芽に対して10:1の割合で混ぜてビールを試醸すると強い噴き性をもったビールができ、このビールを正常ビールに5%混合してもなお噴き性を示した⁽⁷⁰⁾。そこで大麦穀粒上に生育したときに生産される噴き因子を、人工培地（Richard 液）の場合と同様の過程を経て抽出精製したところ、DEAE-Sephadex カラムで B-I、B-II の2つの活性画分に分離した。B-II は人工培地からの噴き因子 NGF と同一と思われたが、B-I は電気泳動的にも多少異なり、噴き活性も NGF よりもやや強力であった。これら三者のアミノ酸組成を Table VII に示した⁽⁷²⁾。

つぎに NGF の化学構造と噴き活性との関係を探索す

Table VII. Amino Acid Composition of Gushing-inducing Factors Produced by *Nigrospora* sp. No. 207 in a Modified Richard Solution (NGF) or on the Barley Grains (B-I and B-II)

Amino acid	Amino acid residue(g/100g protein)		
	NGF	B-I	B-II
Aspartic acid	13.2	9.4	12.0
Threonine	8.7	8.1	8.3
Serine	3.3	3.2	3.4
Glutamic acid	6.8	11.2	11.5
Proline	10.6	12.5	12.9
Glycine	4.4	4.1	4.2
Alanine	10.8	9.8	9.9
Half-cystine	9.8	9.5	9.9
Valine	7.0	6.6	6.6
Methionine	0	0	0
Isoleucine	2.8	2.9	2.8
Leucine	11.0	11.1	10.7
Tyrosine	0	0	0
Phenylalanine	5.5	7.1	5.8
Tryptophan	0	0	0
Lysine	3.1	3.2	2.8
Histidine	0	0	0
Arginine	3.7	3.7	3.5
Amide-NH ₂	(2.0)	(2.3)	(2.5)

るために、NGF 分子の化学修飾を行い、活性への影響を調べた⁽⁷³⁾。その結果、(1) NGF には8個のジスフィルド結合があるが、これをメルカプトエタノールによる還元または過ギ酸による酸化によって破壊すると、噴き活性が失われる。(2) 遊離アミノ基は4~5個存在するが、これのマレイル化およびグアニジル化は活性に影響しない。TNBS 化は30% 失活を起す。(3) 遊離のカルボキシル基は6~7個あるが、これをメチル化またはアミド化すると活性が消失する。(4) アルギニンのグアニジノ基は4個あるが、これをフェニルグリオキサールで修飾すると完全に失活することなどが明らかとなった。したがって NGF は、8個のジスフィルド結合などで固く折りたたまれた一定のコンホメーションを維持しているときに最大の噴き活性を発揮しうものと考えられる。

つぎに、*Nigrospora* と同様に強力な噴き誘発活性を示した *Penicillium* sp. 7001 株の噴き因子について研究を進めた。この青カビは、阿部重雄教授により *Penicillium chrysogenum* と同定されたので、同株と近縁の *P. notatum* および *P. cyaneo-fulvum* など5菌株を培養して調べたところ、4菌株が強い噴き活性を示した⁽⁷⁴⁾。すなわちカビのビール噴き誘発物質をつくる能力は、マイコトキシンの生産性と同様に各菌株の固定した特性の一つとなっているように考えられる。

7001 株を Richard 液 (30I) に培養し、濾液から硫酸塩析、溶媒抽出などを経て約90mgの白色粉末(PGF)を得た。このものは水に難溶であるが、メタノールに溶かしてビールに添加すると0.3ppmで340ml当り約100~120mlの噴き活性を示し、加水分解するとバリン(V)とフェニルアラニン(P)とチロシン(T)を5:3:1の比で与えた。このPGFのFD-MSスペクトルは、492, 508, 531および547の4つの分子イオンピークがみられ、一方原子吸光分析でNa原子の存在が認められた (Table VIII)。

たまたま PGF の融点測定中に、かなりの部分が昇華することがわかったので、260°C で昇華をくり返して白

Table VIII. Molecular Components of the Gushing Factors (PGF) produced by *Penicillium chrysogenum* strain 7001

Molecular weight	Amino acid (mol)	Na
1) 492 (SPGF)	Val(2), Phe(2)	—
2) 508	Val(2), Phe(1), Tyr(1)	—
3) 531	Val(2), Phe(1), Tyr(1)	+
4) 547	Val(2), Tyr(2)	+

色線状の昇華物 (SPGF) を得た。SPGF も 0.3ppm の濃度で 80~100ml の噴き活性を示す。加水分解すると V と P を 1:1 の比で与え、マスペクトルは分子イオン 492 のみであるから、SPGF は V (2 モル) と P (2 モル) から成る環状テトラペプチドと推定され、さらに Fig. 9 のマスペクトルなどから、そのアミノ酸配列は $[-V-V-P-P-]$ であると判定され、Fig. 10 の化学構造が適合した。したがって SPGF は、1952 年に住木、宮尾がペニシリウム属およびアスペルギルス属の孢子を乾溜して命名した fungisporin^(77,78) と同一物と思われる (fungisporin はその後 Studer⁽⁷⁹⁾ が合成し、環状テトラペプチドであることを証明している)。そこで結局、ペニシリウム 7001 株のつくる噴き因子 PGF は、Table VIII に示したように、SPGF 分子の P が T におき換えられたもの、それらが Na を包接したものなど少なくとも 4 種類の環状テトラペプチドの混合物であると考えられた。その後、私どもは、実際に $[-D-V-L-V-D-P-L-P-]$ および $[-D-V-L-V-D-P-L-T-]$ を合成し、いずれも 0.3 ppm で SPGF と同等の噴き活性を示すことを証明することができた⁽⁷⁶⁾。

Fig. 9. Mass Spectrum of Sublimate of *Penicillium* Gushing Factor (SPGF).

Fig. 10. Chemical Structure of a Gushing factor, SPGF, produced by *P. chrysogenum* 7001. (This structure is identical with that of fungisporin⁽⁷⁹⁾)

私どもの 1973 年の報告⁽⁷⁰⁾以降、ビールの噴きの防止のために麦芽のカビフローラの検査の重要性が一般的に認識され、北欧その他から、いくつかの報告が提出されている⁽⁸⁰⁻⁸³⁾。

例えば、Gyllang and Martinson⁽⁸⁰⁾ は、製麦工程中に *Aspergillus fumigatus* や *Asp. amstelodami* が高度に汚染すると噴き性の強い麦芽ができることを見出している。

製品ビールの市場における噴き発生の実態は、かなり多様かつ多面的であるが、棟方⁽⁸⁴⁾は長年の市場観察に基づいて市場での噴きのタイプを夏型と冬型に二大別した。開栓前に曇ビールを 20°C 以上の温度に保存または振盪した場合に起るのが夏型噴きで、5°C 以下の低温で保存または振盪すると起るのが冬型噴きである。麦芽のカビ汚染によって起る噴きは夏型で、欧州に多い様であり、一方冬型の噴きは 10°C 以下にビールを冷やして飲む習慣のアメリカ、カナダ、日本に多い。冬型の噴きはビール中のシュウ酸カルシウムの微結晶が原因だとする説⁽⁸⁵⁾もあるが、実験的根拠は薄い。

私どもは数年前からこの冬型噴きの原因追究にも着手し、ビールの寒冷混濁防止用に添加するパバインが原因の一つであることを実証した⁽⁸⁶⁾。紙数の関係で詳述しないが、パバインがビール蛋白質に作用してペプチドを生じ、その一部が、時日の経過とともにさらにポリフェノールと結合するなど変化して噴き誘発の核になるものと推定される。この冬型噴きの防止策としては、パバインとは基質特異性の違う種の酸性プロテアーゼを少量併用すれば、ビール品質に影響なく、噴き発生を防ぐことができる⁽⁸⁶⁾。

ビールの噴きの発生メカニズムについては、古く Krauss (1935)⁽⁸⁷⁾ の nuclei theory があり、ビール中に CO₂ 遊離の核が多数生成することによるといわれているが、核の実体についてはなお不明である。私どもは各種の噴き誘発物質を分離または合成し、それらの化学構造や物性の面から噴きのメカニズムを明らかにしたいと考えている。なお、ビールの噴きについて、総説もある⁽⁸⁸⁻⁹¹⁾。

終りに過去 30 余年にわたり、ご薫陶を賜りました恩師坂口謹一先生ならびに故朝井勇宣先生に対しまして深い感謝を捧げます。また本研究に当り、ご指導とご援助をいただいた東大農学部関係の藤巻正生先生、有馬啓

先生、田村三郎先生、相田 浩先生、田村学造先生、鈴木昭憲先生に対しまして厚くお礼申し上げる。また終始ご鞭撻をいただいた当社の幹部役員および先輩の方々と、実際の研究の遂行に献身的な努力をしてくださった当社の多くの研究所員ならびに工場の各位に対し深甚なる謝意を表する。

- (1) J. Lodder: "The Yeast, A Taxonomic Study," 2nd Ed., North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1970.
- (2) S. E. Windisch and I. Neuman: Fermentation Technology Today, ed. by G. Terui, Proc. 4th Int. Symp. on Fermentation, 877 (1972); I. Neuman: *Monatsschr. Brau.*, **25**, 226 (1972).
- (3) A. S. Schultz and L. Atkin: *Arch. Biochem.*, **14**, 369 (1947).
- (4) B. Kirsop: *J. Inst. Brew.*, **61**, 466 (1955).
- (5) R. T. Streutker: *Wellerstein Lab. Commun.*, **22**, 27 (1959).
- (6) Windisch and A-M. Herbst: *Brauerei Wiss. Beil.*, **11**, 133 (1958).
- (7) M. Amaha and M. Takeuchi: *J. Inst. Brew.*, **68**, 339 (1961).
- (8) 竹田正久, 塚原寅次: 醸造協会誌, **57**, 1109 (1962).
- (9) K. Arima, M. Dohi, K. Nagaoka and G. Tamura: *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 1 (1970).
- (10) M. Dohi and K. Arima: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1403 (1978).
- (11) E. Hayashi, R. Hasegawa and T. Tomita: *J. Biol. Chem.*, **251**, 5759 (1976).
- (12) G. W. Becker and R. L. Lester: *J. Biol. Chem.*, **252**, 8684 (1977).
- (13) P. Gjertsen: *J. Inst. Brew.*, **59**, 296 (1953).
- (14) W. D. McFarlane and H. R. Held: *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, **67** (1953).
- (15) 日本醸造協会編: 新版醸造成分一覧, 昭和 52 年, p.192.
- (16) B. S. Enevoldsen and F. Schmidt: *Proc. Eur. Brew. Conv., Salzburg*, 135 (1973).
- (17) 麻生 清, 渡辺敏幸: 農化, **35**, 1073, 1078 (1961).
- (18) M. Amaha and S. Suzuki: *Bull. Brew. Sci.*, **10**, 33 (1964).
- (19) J. L. Owades and G. W. Bierman: *Master Brew. Assoc. of Americas Technical Quarterly*, **15**, 38 (1978).
- (20) M. Amaha: *Bull. Brew. Sci.*, **12**, 43 (1966).
- (21) D. J. Millin: *J. Inst. Brew.*, **69**, 389 (1963).
- (22) J. Horák and A. Kotyk: *Eur. J. Biochem.*, **9**, 343 (1973).
- (23) H. C. Bhandari and M. Hayashibe: *J. Biochem.*, **82**, 1197 (1977).
- (24) F. Hlaváček and M. Kahler: *Brauwelt*, **103**, 783 (1963).
- (25) G. G. Stewart, J. Errat, I. Garrison, T. Goring and I. Hancock: *Master Brew. Assoc. of Americas Technical Quarterly*, **16**, 1 (1979).
- (26) I. Russel and G. G. Stewart: *J. Inst. Brew.*, **85**, 95 (1979).
- (27) S. Nagai, N. Yanagishima and H. Nagai: *Bacteriol. Rev.*, **25**, 404 (1961).
- (28) 長尾美奈子, 杉村 隆: 化学と生物, **4**, 527 (1966).
- (29) 三宅節子: 蛋白質 核酸 酵素, **13**, 1053 (1968).
- (30) C. J. Avers: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **58**, 620 (1967).
- (31) E. S. Goldring, L. I. Grossman and J. Marmur: *J. Bacteriol.*, **107**, 377 (1971).
- (32) H. J. Czarnecki and E. L. Van Engel: *Brew. Dig.*, **34**, 52 (1959).
- (33) J. G. Kleyn and N. L. Vacano: *Am. Brew.*, **26** (1963).
- (34) H. Gyllang and E. Martinson: *Proc. Eur. Brew. Conv., Estril*, 265 (1971); [F. Delvaux, D. Eyben and E. Robberechts; *Proc. Eur. Brew. Conv., Nice*, 349 (1975).
- (35) T. Sai and M. Amaha: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **11**, 355 (1965).
- (36) T. Sai and M. Amaha: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **13**, 15 (1967).
- (37) T. Sai: *Bull. Brew. Sci.*, **12**, 35 (1966).
- (38) T. Sai: *Bull. Brew. Sci.*, **14**, 61 (1968).
- (39) T. Sai, K. Aida and T. Uemura: *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 1398 (1968).
- (40) T. Sai, K. Aida and T. Uemura: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **15**, 345 (1969).
- (41) A. C. Hulme: *Biochem. Biophys. Acta*, **14**, 36 (1954).
- (42) H. A. Barker: In "The Bacteria," Vol. 2, ed. by I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier, Academic Press Inc., New York, 1961, p.151.
- (43) S. Suzuki, Y. Takeuchi, K. Sasaki, and H. Katsuki: *J. Biochem.*, **80**, 867 (1976).
- (44) M. Kisumi, S. Komatsubara and I. Chibata: *J. Biochem.*, **82**, 95 (1977).
- (45) T. Sai: *Bull. Brew. Sci.*, **16**, 21 (1970).
- (46) S. Takayanagi and T. Harada: *Proc. Eur. Brew. Conv., Madrid*, 473 (1968).
- (47) 高柳 正: 化学と生物, **6**, 470 (1968).
- (48) 原田恒雄: 日本醤油研究所雑誌, **2**, 132 (1976).
- (49) T. Harada, A. Nakagawa and M. Amaha: *Proc. the Institute of Brewing 12th Conv., Perth*, 39 (1972); T. Harada and A. Nakagawa: *J. Ferment. Technol.*, **50**, 676 (1972).
- (50) F. B. Knudsen and L. W. Larsen: *Master*

- Brew. Assoc. of Americas Technical Quarterly*, **11**, 1 (1974).
- (51) H. O. Mieth : *Brauwelt*, **115**, 1349 (1975).
- (52) C. A. Masschelein and J. van de Meerssche, *Master Brew. Assoc. of Americas Technical Quarterly*, **13**, 240 (1976).
- (53) M. Amaha, S. Nakakoji and Y. Komiya : *Proc. Eur. Brew. Conv., Amsterdam*, 545 (1977).
- (54) 広野辰彦 : 第 10 回醸造に関するシンポジウム講演集, 1978, p.6.
- (55) N. S. Curtis : *J. Inst. Brew.*, **69**, 216 (1963).
- (56) 天羽幹夫 : 醸造協会誌, **59**, 748 (1964).
- (57) S. Suzuki and M. Amaha : *J. Inst. Brew.*, **68**, 508 (1962).
- (58) S. Okamura and T. Maeda : *Rept. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd.*, No.20, 37 (1977).
- (59) K. Kitabatake and M. Amaha : *Bull. Brew. Sci.*, **14**, 17 (1968).
- (60) S. Takayanagi, M. Amaha, K. Satake, Y. Kuroiwa, H. Igarashi and A. Murasa : *J. Inst. Brew.*, **75**, 284 (1969).
- (61) H. Igarashi and M. Amaha : *J. Inst. Brew.*, **75**, 292 (1969).
- (62) A. S. Perlman and S. Suzuki : *Can. J. Chem.*, **40**, 50 (1962).
- (63) K. Schuster, L. Larziss and J. Kumada : *Brauwissenschaft*, **20**, 125, 185 ; 280 (1967).
- (64) D. T. Bourne and J. S. Pierce : *J. Inst. Brew.*, **76**, 328 (1970).
- (65) 原田篤也, 三崎 旭編 : 総合多糖類科学, 下巻, 講談社サイエンティフィク, 1974, p.439.
- (66) G. M. Ballance and D. J. Manners : *Carbohydr. Res.*, **61**, 107 (1978).
- (67) I. S. Forrest and T. Wainright : *J. Inst. Brew.*, **83**, 279 (1977).
- (68) M. A. Anderson, J. A. Cook and B. A. Stone : *J. Inst. Brew.*, **84**, 233 (1978).
- (69) 吉田重厚, 中川 淳, 江藤正和, 北畠克顕, 天羽幹夫 : 醸酵工学会誌, **53**, 184 (1975).
- (70) M. Amaha, K. Kitabatake, A. Nakagawa, J. Yoshida and T. Harada : *Proc. Eur. Brew. Conv., Salzburg*, 381 (1974).
- (71) K. Kitabatake and M. Amaha : *Bull. Brew. Sci.*, **20**, 1 (1974).
- (72) K. Kitabatake and M. Amaha : *Bull. Brew. Sci.*, **22**, 9 (1976).
- (73) K. Kitabatake and M. Amaha : *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1011 (1977).
- (74) S. Fukushima, K. Kitabatake and M. Amaha : *Bull. Brew. Sci.*, **22**, 37 (1976).
- (75) 福島修二, 天羽幹夫 : 昭和 53 年度農芸化学学会大会講演要旨集, 1978, p.262.
- (76) 福島修二, 川崎一郎, 天羽幹夫 : 昭和 54 年度農芸化学学会大会講演要旨集, 1979, p.125.
- (77) 住木諭介, 宮尾興平 : 農化, **26**, 27 (1952).
- (78) K. Miyao : *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn*, **19**, 86 (1955) ; **24**, 23 (1960).
- (79) R. O. Studer : *Experientia*, **25**, 899 (1969).
- (80) H. Gyllang and E. Martinson : *J. Inst. Brew.*, **82**, 182 ; 350 (1976).
- (81) H. Gyllang, L. Sätmark and E. Martinson : *Proc. Eur. Brew. Conv., Amsterdam*, 245 (1977).
- (82) A. Haikara, V. Mäkinen and R. Hakulinen : *Proc. Eur. Brew. Conv., Amsterdam*, 35 (1977).
- (83) N. Nishikawa and M. Kohgo : *Bull. Brew. Science*, **21**, 9 (1975).
- (84) H. Muneakata, T. Honjo, S. Koshino and M. Hosaka : *Bull. Brew. Sci.*, **6**, 1 (1961).
- (85) M. W. Brenner : *Proc. Amer. Soc. Brew. Chem.*, 5 (1957).
- (86) M. Amaha, G. Horiuchi and S. Yabuuchi : *Master Brew. Assoc. of Americas Technical Quarterly*, **15**, 15 (1978).
- (87) B. Krause : *Sven. Brygarefoeren. Manadsbl.*, **51**, 221 (1936).
- (88) P. Gjertsen, B. Trolle and K. Andersen : *Proc. Eur. Brew. Conv., Brussels*, 320 (1963).
- (89) R. J. Gardner : *J. Inst. Brew.*, **79**, 275 (1973).
- (90) 北畠克顕 : 化学と生物, **15**, 604 (1977).
- (91) M. Amaha and K. Kitabatake : Gushing in Beer, Chapter 32 in "Brewing Science" ed. by J. R. A. Pollock, Academic Press, New York, in preparation.