スラリー状態にある回収ビール酵母の物理的損傷の評価

川村公人^{1*}, 中嶋光敏²¹ アサヒグループホールディングス(株) 豊かさ創造研究所² 筑波大学北アフリカ研究センター(兼)筑波大学大学院生命環境科学研究科

Effect of Physical Stress on Characteristics of Recovered Beer Yeast

Kimito Kawamura^{1*} and Mitsutoshi Nakajima²¹ Research and Development Laboratories for Sustainable Value Creation, Asahi Group Holdings, Ltd.,
1-21 Midori 1-chome, Moriya, Ibaraki 302-0106² Alliance for Research on North Africa / Graduate School of Life and Environmental Science,
University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572

The effects of preservation temperature and agitation speed on the characteristics of recovered brewery yeast were evaluated after fermentation using a jar fermenter while yeasts were kept in starvation. Morphological changes and leakage of yeast cell sap were investigated by SEM and chemical analyses, respectively. Yeast cells were gradually damaged with incremental increases in temperature. Initially, the damage caused by agitation was not significant compared to the drastic damage observed at later stages, especially when the temperature was increased. These results indicate that high temperature induces leakage of sap and agitation induces morphological changes in yeast cells.
(Received Dec. 16, 2011 ; Accepted Jan. 20, 2012)

Keywords : Beer yeast, Viability, Physical stress, Shear stress, Temperature stress**キーワード** : ビール酵母, 耐久性, 物理的ストレス, 剪断応力, 温度ストレス

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いたアルコール発酵は, ビール醸造プロセスにおいて, その品質を決定する上で最も重要な役割を担っている。

ビールは, 麦芽などから製造される麦汁と呼ばれる発酵性糖液に酵母を添加(麦汁添加)し, 所定条件で発酵させて製造される。発酵を終えたビールは熟成のために貯酒工程へ送られるが, 酵母は回収され次の発酵に使用される。酵母は通常, 発酵タンク底部に沈殿するため高粘度のスラリー状態で酵母タンクへ回収される。その後麦汁添加へ向けて, タンク内で均質化など条件を整えられる。ビール香味品質の多くは発酵工程で形成されるため, 発酵工程における酵母の働きは極めて重要である。

酵母の代謝系は多岐にわたり複雑で, 発酵条件のわずかな違いで微量な代謝生成物量に変動が生じ, ビール香味品質が変化する。そこで厳密な温度コントロール等, 精緻なハンドリングが実施されているが, 麦汁添加に用いる時の酵母状態の違いによる変動は避けられないのが現状である。これは酵母が外部環境に敏感に反応し, 代謝生成物の種類や濃度が容易に変化する生化学的理由と, 凝集した酵

母スラリーが非ニュートンの流体挙動を示すために, 安定した発酵に必要な酵母の均質化ならびに酵母保存時の冷却が不十分となるという, 物理的ハンドリングの困難さによる工学的理由によるためと考えられる。

発酵過程における代謝生成物のうち, 製品中へ移行する成分にはヒト閾値が低い物質が多く, 酵母ハンドリングの困難さに起因する酵母状態のばらつきが香味品質に大きな影響を与えることとなる。そこで製造現場では, これら微量な代謝生成物の具体的制御方法の確立が強く求められている。これまで酵母の代謝系と香味との関係は一部明らかにされてきた¹⁾ が, 酵母ハンドリングの問題に起因する微量物質の制御は依然として困難な状態である²⁾³⁾。

したがって, 本報ではスラリー状態にある回収ビール酵母の物理的損傷について評価することとした。

対象とした系は, 発酵終了後の酵母を回収し, 次の麦汁添加まで一時的に貯蔵し均質化する酵母貯蔵工程とした。この工程における酵母は発酵性糖液が残存しない発酵終了液に懸濁しているため, すでに飢餓状態となっている。この状態で酵母は数時間~数日間タンク内で保持されるため, 温度の影響を受けながらタンク内の攪拌の影響を受けるという酵母にとって厳しい条件となる工程である。

物理的損傷の評価は, 飢餓状態で温度および攪拌ストレ

¹ 〒302-0106 茨城県守谷市緑 1-1-21² 〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

* 連絡先(Corresponding author), kimito.kawamura@asahigroup-holdings.com

Fig. 1 Jar fermenting equipment

スの条件を変えながら、酵母が経時的に受けるダメージによる影響を酵母の諸特性から評価する連続ストレス試験により実施した。

実験方法

1. 供試材料

供試材料には、発酵終了後のスラリー状の回収ビール酵母 (*S. cerevisiae*) 10L を用い、予め設定した6水準の試験条件ごとに、それぞれ1L 分注して実験に供した。供試酵母は、遠心分離操作 (4℃, 6000 rpm, 15 分) 後の固体体積分率 60% (v/v) のものを冷却された状態のまま同一醸造場内で試験に供した。採取から試験開始までの時間は4時間とした。試験終了後の酵母は試薬等混入のため、廃棄した。

2. 実験操作

前述の酵母を Fig. 1 に示す 2L 容ジャーフェーマンター ((株)丸菱バイオエンジニアリング製 Bioneer200) 4 基にそれぞれ 1L ずつ充填したものを、所定温度となるように冷媒を用いて温度調節しながら攪拌機を 48 時間連続回転させる、連続ストレス試験を実施した。

対照として、採取した酵母を 2L ビーカーに 1L 充填したものを 2 基準備し、それぞれ 4℃ と 25℃ の恒温槽に静置し、攪拌機による剪断力を与えず温度のみの影響を評価した。

今回用いたジャーフェーマンターは内部に邪魔板付の二段パドル翼を有しており、上段翼は 45° の傾斜を持つ平板パドル翼を酵母液面レベルに、下段翼は垂直タービン翼を液中間部に設置した。さらに、底部にもマグネット回転体が設置されており、その表面形状から簡単な攪拌機能を有している。

温度調節は、この底部マグネット回転体へ装置底部の冷媒循環系から冷水を循環することで制御した。

3. 実験条件

今回実施した実験条件を Table 1 に示す。実験温度について、4℃ における酵母の物理的耐久性が高いと考えられ

Table 1 Experimental conditions

Run #1						
Agitation speed (rpm)	0	0	300	300	600	900
Temperature (℃)	4±2	25±2	15±2	25±2	15±2	15±2
Run #2						
Agitation speed (rpm)	0	0	300	300	900	900
Temperature (℃)	4±2	25±2	15±2	25±2	15±2	25±2

ているが⁴⁾ 用いたジャーフェーマンターでは 4℃ の均一条件が実現できなかったため、最低試験温度を 4℃ とし、攪拌の無いコントロールサンプルとした。最高試験温度は一般的な発酵最高温度である 25℃ とした⁵⁾。

攪拌回転数について、Run #1 では 15℃ の同一条件で回転数を 3 水準 (300, 600, 900 rpm) に設定し、同一温度における剪断力の違いが酵母に及ぼす影響評価を試みた。同時に高温領域 (25℃) では剪断力の有無が酵母に及ぼす影響評価を試み、低回転 (300 rpm) と回転無しの影響を調べた。

Run #2 では 1 回目の試験より得られた結果に基づき、実験温度および攪拌回転数を 2 水準として、異なる時期に現場から採取した酵母を用いて工学特性の再現傾向を確認するとともに、異なる温度における剪断力の違いが酵母に及ぼす影響評価を試みた。

4. サンプルング

評価に用いたサンプルは 6-12 時間間隔で採取した。サンプルは、装置の攪拌および冷却を止めずに上部サンプリングノズルより 50 ml ディスポーザブルピペットを攪拌液内へ挿入し、攪拌液の中央部より吸引採取した。サンプル採取量は、試験終了時点まで攪拌翼が液中に浸漬状態となるように毎回 40 ml とした。

5. 評価方法

酵母の評価は下記の (1)~(4) の方法を用いた。

(1) 経時的酵母スラリー上清タンパク質量測定

細胞の損壊により、酵母細胞内液中のタンパク質がスラリー中に漏出し、スラリー中のタンパク質含量が増加すると考えられるため、スラリー上清タンパク質量を評価系に用いた。酵母の上清タンパク質量は、サンプルを遠心分離操作 (4℃, 6000 rpm, 15 分) 後上清液を分離し、アドバンテック東洋(株)製セルロースアセテート膜 0.45 μm で濾過したサンプルを Bradford 法に基づき分光光度計を用いて 595nm における吸光度を測定し、BSA (Bovine Serum Albumin) を標準液とした BSA 換算総タンパク量として求めた⁶⁾⁷⁾。各サンプルは 3 点平均で求めた。

(2) 経時的酵母死細胞率測定

細胞の損壊により酵母の死細胞率が計測可能となるため、酵母死細胞率を評価系に用いた。死細胞率の測定は、生細胞中の還元酵素がメチレンブルーを脱色することを利用し、染色された細胞を死細胞と判定するメチレンブルー

Fig. 2 Effects of temperature and agitation speed on protein concentration in recovered yeast slurry; Run #1

法を採用した⁸⁾。染色に際し、酵母濃度は 2×10^7 cells/ml となるように調整した。酵母数の測定は、Digital Bio 社製 Disposable Haemocytometer C-Chip を用いた細胞計数法にて、左右 80 区画中の計測細胞数を 5 倍した値に対する 400 区画中の染色細胞数を 2 点計測し、その平均をとり有効数字 2 桁で求めた⁹⁾¹⁰⁾。

(3) 経時的酵母スラリー pH 測定

細胞の損壊により、酵母細胞内液がスラリー中に漏出し、酵母スラリー pH が上昇するため、現場における簡易測定法として経時的懸濁液 pH で評価できるか確認した。

pH の測定はサンプルを遠心分離操作 (4°C, 6000rpm, 15 分) 後、上清液を分離し、アドバンテック東洋(株)製セルロースアセテート膜 0.45 μ m で濾過した後、(株)堀場製作所製 pH/イオンメーターを用いて計測した。

(4) 酵母の形態観察

連続ストレス試験開始 29 時間後のビール酵母を、低真空走査型電子顕微鏡 (KEYENCE(株)製 VE-9800) を用いた加速電圧 3.0kv における 5000 倍撮影により観察した。

実験結果

1. 酵母スラリー上清タンパク質量測定結果

本項目における連続ストレス試験は 2 回実施した。Run #1 では下記の 3 項目を調査した。

- (1) 同一温度 (15°C) における攪拌強度 (3 水準) と酵母への物理的損傷 (以下、酵母ダメージ) との関係
- (2) 高温 (25°C) における攪拌の有無と酵母ダメージとの関係
- (3) 低温 (4°C) と高温 (25°C) の温度差と酵母ダメージとの関係 (攪拌無しの場合)

連続ストレス試験 (Run #1) から得られたタンパク質量

測定結果を Fig. 2 に示す。4°C のコントロールは攪拌が無く酵母からタンパク質が漏出していないことを確認した。それ以外のサンプルについて、試験開始後 24 時間までは温度あるいは攪拌強度が酵母ダメージに及ぼす影響があることは確認されたが、その要因が温度支配なのか攪拌支配なのかを判断することはできなかった。しかし試験開始 44 時間後では、25°C サンプルのタンパク質濃度が急激に増加した。また、15°C サンプルにおいて、900rpm のサンプルのみが 300rpm, 600rpm のサンプルと比較し高い値を示している現象が確認された。

これらの結果より、15°C では、24 時間までは攪拌による差は確認できなかったが、44 時間後では 900rpm サンプルの酵母ダメージが最も高いと考えられた。25°C では、24 時間までは攪拌された方が高い酵母ダメージを示したが、48 時間では攪拌の有無にかかわらず双方に高い酵母ダメージが確認された。攪拌をしない 4°C と 25°C 保持試験との比較では 25°C において酵母のダメージが大きくなることが認められた。

さらに、試験条件を変更した連続ストレス試験 (Run #2) を実施し、攪拌の影響を評価した。

Run #2 では、以下の 2 項目を調査した。

- (1) 25°C における攪拌 (2 水準 + 攪拌無し) と酵母ダメージとの関係
- (2) 15°C における攪拌 (2 水準) と酵母ダメージとの関係再現試験

連続ストレス試験 (Run #2) から得られたタンパク質量測定結果を Fig. 3 に示す。Run #1 の場合とは異なる時期に現場から採取された酵母であるため初期値および測定値は異なるが、同様の傾向が確認された。特に 25°C の攪拌条件における酵母スラリー上清タンパク質量において、攪拌を

Fig. 3 Effects of temperature and agitation speed on protein concentration in recovered yeast slurry; Run #2

Fig. 4 Effects of temperature and agitation speed on damaged yeast cell ratio in recovered yeast slurry; Run #1

行ったサンプルでは攪拌の強弱にかかわらず時間に対して一様に増加することが確認された。攪拌が無い場合も25°Cのサンプルは高い値を示した。15°Cの試験結果はRun #1と同様な結果が得られた。特にRun #2では900 rpmの値は300 rpmの値と比較し、常に高い値を示した。

2. 酵母死細胞率測定結果

連続ストレス試験から得られたRun #1における死細胞率測定結果をFig. 4に示す。

これより、4°Cのコントロールは攪拌が無く酵母はほとんどダメージを受けていないことがわかる。15°C条件では実験開始30時間までは酵母ダメージが明瞭でなかったが、

40時間以上では900 rpmの酵母が最も大きなダメージを受けていると考えられた。600 rpmおよび300 rpmの酵母もダメージを受けていると考えられた。25°Cでは24時間以降、攪拌の有無にかかわらず酵母は急速にダメージを受けていると考えられた。

さらにRun #1と同様、Run #2における死細胞率を測定した。結果をFig. 5に示す。この結果より、異なる酵母に対して、高温条件では酵母に与えるダメージは攪拌強度に無関係で、弱い攪拌でも影響を受けた。比較的安定と考えられる15°Cでも攪拌が強ければ、酵母はダメージを受けていると考えられた。

Fig. 5 Effects of temperature and agitation speed on damaged yeast cell ratio in recovered yeast slurry; Run #2

Fig. 6 Effects of temperature and agitation speed on pH of recovered yeast slurry; Run #2

3. 酵母スラリー pH 測定結果

酵母が受けるダメージを簡易的に把握可能か確認するために Run #2 の分析に用いた酵母スラリーの経時的 pH 変化を調査した。結果を Fig. 6 に示す。

本試験において、どの保存条件においても pH の上昇が確認された。特に試験開始 6 時間後、25°C サンプルでは低速撹拌以上のサンプルで、15°C サンプルでは高速撹拌サンプルで、最も大きな pH 上昇が確認された。しかし 12 時間を過ぎた頃から撹拌速度が大きい 25°C サンプルの pH が低下し 15°C サンプルの pH が相対的に高くなった。さらに 18 時間を過ぎた頃から 15°C サンプルの pH が低下し撹拌していない 25°C サンプルが最大 pH を示すことが確

認された。最終的にこれらサンプルの pH は、撹拌していない 4°C 保存のサンプルと同等の高い値を示した。これらの結果より、時間の差はあるが、酵母が受けるダメージは pH 変化で簡易的に把握可能であると考えられた。

4. 酵母形態観察結果

Fig. 7 (A), (B), (C), (D), (E), (F) に、試験開始前、および試験 29 時間後の酵母の電子顕微鏡観察写真を示す。今回試験に用いた酵母は Fig. 7 (A) コントロールに示すように、表面はなめらかで損傷の痕跡は認められなかった。低温 (4°C) で撹拌無しの場合は、Fig. 7 (B) に示すとおり細胞表面が粗くなり、わずかな凹凸が観察された。中温 (15°C) で低撹拌の場合は、Fig. 7 (C) に示すように細胞表

Fig. 7 Electron micrographs of yeast cells after 29 h of continuous stress test ($\times 5000$)

A, before the test (control) ; B, temperature ; 4°C ; agitation speed ; 0 rpm ; C, temperature ; 15°C ; agitation speed ; 300 rpm ; D, temperature ; 15°C ; agitation speed ; 900 rpm ; E, temperature ; 25°C ; agitation speed ; 0 rpm ; F, temperature ; 25°C ; agitation speed ; 900 rpm.

面の粗さに加え、一部に細胞内液が漏出したような軟式テニスボール状の陥没が確認された。中温 (15°C) で攪拌が強い場合は Fig. 7 (D) に示すように細胞表面の粗さおよび軟式テニスボール状の陥没に加え、酵母細胞表面に攪拌に

よる剪断力の影響とみられる擦過傷および細胞膜の剥離が確認できた。高温 (25°C) で無攪拌の場合は、Fig. 7 (E) に示すように、細胞表面に波状の模様が強く出現し、軟式テニスボール状の激しい陥没が多く確認された。ただし攪

Fig. 8 Morphological changes of recovered yeast cells

拌による剪断力の影響とみられる酵母細胞表面への擦過傷や細胞膜の剥離は認められなかった。高温（25℃）で高撹拌の場合は、Fig. 7 (F) に示すように細胞表面に波状の模様が強く出現し、軟式テニスボール状の激しい陥没が多くみとめられるとともに、一部、細胞質の表面形状が細胞膜を通して見えるものや、撹拌による剪断力の影響とみられる酵母細胞が裂けた痕跡が認められた。

考 察

ジャーファーマンターを用いたビール酵母の連続ストレス試験結果を以下の通り考察する。

酵母が外部から受ける物理的ストレスの影響は、酵母スラリー上清タンパク質量、酵母死細胞率、酵母スラリー pH で評価できると考えられた。

酵母保存条件を変えた連続ストレス試験の結果、酵母を 4℃ で保管し撹拌が無い条件では酵母が受けるダメージが少ないと考えられた。また、酵母を 15℃ で保管する場合、撹拌の強弱により酵母が受けるダメージに差が認められ、弱撹拌の方が酵母のダメージが少ないと考えられた。さらに酵母を高温 25℃ で保管した場合、強撹拌および弱撹拌のいずれも同程度の酵母のダメージが認められたが、撹拌無しでは酵母のダメージは小さくなった。また、15℃、25℃ の 2 水準比較において、酵母が受けるダメージは温度が低い方が小さいことが示された。

上記より、ビール酵母は低温域では外部から受ける物理的ダメージは少なく、中温域では撹拌による外力、すなわち撹拌による剪断力による影響を受けやすく、高温域では撹拌の有無にかかわらず温度が酵母ダメージに及ぼす影響が大きいことが示された。

以上の結果より、ビール工場において酵母タンク内に酵母を一時的に貯蔵し均質化する場合、低温域での貯蔵が望ましく、その際に必要となる撹拌によって与えられる剪断力は小さい方が、酵母が受けるダメージが低いことが示された。

酵母形態の電子顕微鏡観察の結果、酵母が受ける温度および撹拌による剪断力により、酵母がダメージを受けてい

ることが観察された。酵母細胞がダメージを受けた際の形態変化は、Fig. 8 に示す経緯を辿るものと推察した。

酵母を 15℃、25℃ の環境下に長時間置くことにより、まず細胞膜に変化が現れ細胞内液が懸濁液中に漏出を始め、さらに酵母細胞液の漏出が続くと酵母細胞の形状が変化し、外部からの剪断力の影響を受けやすくなる。ただし 15℃ の保存条件における酵母が受ける剪断力の影響は 25℃ 保存時における剪断力の影響より小さく、低剪断条件では酵母細胞膜表面に擦過痕は確認されず高剪断条件で擦過痕が確認されたことから、本試験条件における 15℃ 保存酵母の細胞膜は一定の強度を維持しており、剪断による細胞破壊を受けにくいことが推察された。

一方、25℃ の保存条件では 15℃ の結果と比較し、外部からの剪断力によるダメージを受けやすいことが示唆された。

25℃ の保存条件では外部からの剪断力が働かない条件においても一定時間経過後は細胞液の漏出の結果、一定のダメージを受けることが確認された。

酵母細胞がダメージを受ける際、まず温度および時間の影響を受け、細胞内液を漏出する細胞が生じ始める。その際、細胞内液の漏出が始まるため死細胞率が増加するが、形態的に変形していない酵母細胞が視認されることから、この時点では外部からの剪断力によるダメージを受けにくい酵母細胞が存在するものと考えられた。その後一定レベルまで細胞内液の漏出が進んだ酵母細胞数が増加した段階では、外部からの剪断力によるダメージを受けやすくなり、それまで死細胞としてカウントされていなかった酵母細胞も剪断力の影響を受けて死細胞としてカウントされることが考えられた。また、その際の外部からの剪断力の強度は酵母細胞が受けるダメージの強度に関係があると考えられた。この外部ストレスに基づきダメージを受けて死細胞としてカウントされる酵母細胞が増加していく様子は、前述の生化学評価と同様の結果となった。

なお今回の検討において、酵母の形態変化とメチレンブルー法を用いた酵母の死細胞との関係は明らかにできなかった。

一般的に、酵母が受ける外的ストレスは、下記に示すように要因別に複数存在すると考えられる。

・物理的ストレス：

外部から受ける力により細胞膜が物理的に破壊

・化学的ストレス：

細胞形成物質が混入した化学物質の影響で変質

・生物的ストレス：

飢餓状態における自己消化誘発と細胞膜の破壊

・上記3要因が複合して発生するストレス：

たとえば生物的ストレスを受けた結果、細胞膜の物理強度が低下し、通常では影響を受けないレベルの軽い外力で容易に破壊するなど。

したがって、最終的にはこれらの内容を詳細に調べて結論を下す必要があるが、本実験により、酵母の物理的損傷に与える保存温度と攪拌速度の影響について示すことができた。

以上の結果より、下記の酵母の適切なハンドリング法を提案する。

- (1) 酵母は回収後、ダメージを受ける前に速やかに冷却し、細胞内液漏出酵母の発生数を抑制すること
- (2) 酵母タンク内で攪拌が必要な場合、攪拌強度は低く設定すること
- (3) 酵母は物理的ダメージを受けやすくなる一定時間経過前に使用すること

しかしながら、酵母を速やかに冷却するためにはタンク内酵母を完全混合状態とし、冷却面での熱伝達率を上昇させる必要がある。一方、冷却面での流速を上げると、酵母スラリーが受ける剪断力の増加が避けられないと考えられる。今後、この問題を解決するための装置開発ならびに開発した装置を用いた酵母が受けるストレス評価に対する研究が求められる。

要 約

発酵終了後に回収されたスラリー状のビール酵母に対して、ジャーファーマンターを用いた連続ストレス試験を実施した。本酵母は飢餓状態にあり、この酵母に対する保存

温度および保存中に攪拌が及ぼす影響を評価した。酵母スラリー中のタンパク質濃度、pH 調査による細胞内液漏出物を用いた生化学的評価および形態観察結果から、以下の結論を得た。

4℃の低温において酵母は保存温度および攪拌強度によるダメージを受けにくく、酵母保存温度の上昇に伴い酵母はダメージを受けやすくなること。一定時間経過までは攪拌強度が酵母に及ぼすダメージは少ないが、一定時間経過後は攪拌強度が酵母に及ぼすダメージが確認され、そのダメージの大きさは温度が高い場合、攪拌強度が大きい場合に、より大きくなることが示された。

文 献

- 1) Narziß, L., Die Technologie der Gärung, Abriß der Bierbrauerei, **5**, 1, Mauer, C., Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 199-218 (1986).
- 2) Lense, K., Die Hefe, Katechismus der Brauerei-Praxis, **15**, 1, Schmidt, H., Verlag Hans Carl, Nürnberg, 64-86 (1989).
- 3) 宮地秀夫, 発酵, ビール醸造技術, **1**, 1, 石井 勉, 株式会社食品産業新聞社, 東京, 291-325 (1999).
- 4) Karl-Ullrich, H., Gär- und Reifungsverfahren bei der Untergärung, Handbuch der Brauerei-Praxis, **3**, 1, Johanna Boy, Getraenke-Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, 179 (1994).
- 5) Kunze, W., Yeast, Technology Brewing and Malting 3rd international edition, **3**, 1, Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei Berlin (VLB), Berlin, 83-89 (2004).
- 6) Hill, V., Herwig, W. C., ASBC Journal, **40**, No.2, 46-50 (1982).
- 7) Siebert, K. J., Kundson, E. J., MBAA Technical Quarterly, **26**, 139-146 (1989).
- 8) Johansson, C. G., Hage, T., 3.2 Yeast Viability, Analytica — Microbiologica — EBC, **2**, European Brewery Convention, Fachverlag Hans Carl, Nuernberg, 147-150 (2005).
- 9) Johansson, C. G., Hage, T., 3.1 Yeast Mass Determination, Analytica — Microbiologica — EBC, **2**, European Brewery Convention, Fachverlag Hans Carl, Nuernberg, 133-138 (2005).
- 10) Kay, S., Microbiology Method Yeast 4 Microscopic Yeast Cell Counting, ASBC Methods of Analysis, **2009**, Technical Committee of the American Society of Brewing Chemists, the American Society of Brewing Chemists, United States, 1-4, (2009).

(平成23年12月16日受付, 平成24年1月20日受理)