



## 生死細胞オートアナライザー Vi-CELL XRによる 酵母の生存率、細胞濃度測定

### Abstract

発酵過程における酵母の生存管理は、酵母がかかわるバイオ燃料、食料、飲料の製造などあらゆるバイオプロセスにとって不可欠です。酵母の発酵機能をモニタリングするには、正確な細胞数測定および細胞生存率を評価する必要があります。一般的に、酵母の生存率の測定は、細胞染色および血球計算盤を用いて評価します。生存している酵母細胞が染色されない一方、非生存（死細胞）かつ代謝系が機能していない細胞は、任意の色素に染まります。測定者は、光学顕微鏡を用い、数百の細胞を数え上げて、染色された細胞とカウントした総数との比（生存率%）を計算します。この方法は過度な労力がかかる上、計測に主観的判断を伴うため、精度誤差が生じます。このアプリケーションでは、Vi-CELL XRを用いて酵母細胞の計数とその生存率決定が自動化できることを示します。また、酵母細胞の自動計数において、測定結果の再現性が良く、正確かつ容易な測定が可能であることも示します。

### Introduction

19世紀末、パスツールの研究は、グルコースからのアルコール製造に酵母が直接関与していることを明らかにしました<sup>1</sup>。酵母による発酵作用は、ビールやワイン、そしてエタノール生産の産業で利用されています。酵母の発酵能力を最適化するためには、細胞生存率 (%) および細胞濃度をモニタリングしなければなりません<sup>2,3</sup>。生死細胞オートアナライザー Vi-CELL XRは、トリパンブルーを用いた生存率測定を自動化しました。

Vi-CELL XR ソフトウェアには、種々の細胞を解析するためのパラメータ (Cell Type) を簡単に変更、保存する機能があります。ソフトウェアは、生細胞と死細胞とを正確に識別して定量化するために必要な最適化条件が書き込まれるファイルを有しています。この機能を使用して細胞毎に解析の最適条件を自由に変更することができます。酵母細胞はサイズ分布が広く、染色が困難で、細胞濃度が高く、さらに、発酵過程で著しい量のデブリスを含むため、細胞計数の難易度が高くなります。したがって、正確で精密な細胞生存率および細胞濃度を測定するためには、酵母の Cell Type を最適化することが重要です。本アプリケーションノートでは、Vi-CELL XRを用いた酵母細胞の生存率分析に最適な方法を紹介します。



### Equipment Used

生死細胞オートアナライザー Vi-CELL XR  
Vi-CELL XR 試薬パック

## Yeast Sample Preparation

### Filtration (ろ過)

酵母による発酵サンプルを50ミクロンのフィルターでろ過し、大きなデブリスをきれいに除去することが重要です。

### Dilution (希釈)

培養に用いた培地、または使用したい緩衝液を希釈液として用い、サンプルを濃度 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ 細胞/mLに希釈します。Vi-CELLを使用する前に素早く細胞濃度を確認する方法として、コールターカウンター(ZシリーズまたはMultisizerシリーズ)を使用する方法もあります。

## Instrument Settings

### Creating an Optimized Yeast Cell Type (Yeast Cell Type設定の最適化)

Yeast Cell Typeの設定をデフォルト設定(初期設定)にして酵母サンプルをVi-CELL XRで分析を行いました。その結果、酵母サンプルに発酵過程由来のデンプン粒が含まれ、細胞が完全に染色されていないことがわかりました。そのため、Yeast Cell Typeの条件を表1のように変更しました。



図1. デフォルトのYeast Cell type (左) と新しく最適化したYeast Cell typeのパラメータ (右)

表1. Cell Typeパラメータの最適化

Cell Typeパラメータ	デフォルト値	最適化値	修正の理由
最小径	3	2	すべての酵母細胞の計数を確実にするため、サイズ範囲を減少させた。
最大径	20	11	非酵母細胞(デブリス)が除外されるように、最大サイズを減少させた。
吸引サイクル	1	3	酵母細胞がサンプル・カップに付着しないようにするため、吸引サイクルを増やした。
トリパンプルー混合サイクル	3	9	染色時間を延ばすために、トリパンプルー混合サイクルを増やした。
細胞輝度	85	90	酵母細胞がイメージ内で非常に明るいため、細胞輝度を最大値90まで高めめた。
最小真円度	0	0.65	最小真円度は、死細胞のみに適用され、この値を増加することで類似の大きさを持つデブリスを死細胞として除外した。
デクラスター度	高	低	サンプル中の酵母細胞同士は十分に分離していたため、デクラスター度をLow(低い)に変更した。

## Analysis

解析した酵母による発酵サンプルは、3通りの発酵ポイント(2時間、18時間、および26時間)でサンプリングしました。すべてのサンプルを500倍に希釈し、各期間のサンプルの解析を、それぞれ連続して5回(レプリケート)行い、解析には新たに最適化したYeast Cell Typeを適用して、Vi-CELL XRで計測しました。表3の予想結果は、これらの酵母株を用いて共同研究しているバイオプロセス・エンジニアのフィードバックに基づいています。

## Results

Vi-CELL XRによる測定結果を表2および表3に要約しました。酵母発酵サンプルの生存率(%)および細胞濃度は予想した結果と一致しました。加えて、Vi-CELL XRを使用することで、生細胞濃度、平均径、細胞真円度、およびサイズ分布を解析することができます。留意すべき重要な点は、5回のレプリケートを行った各サンプルをVi-CELL XRによって解析した結果、結果のばらつきが低い点、および予想と見事に一致している点です。

表2. Vi-CELL XRの測定結果: 各試料の繰返し回数n=5、希釈率=500倍

酵母サンプルID	発酵時間	総細胞濃度 ( $1 \times 10^6$ 細胞/mL)	総細胞数のばらつき (%CV)	生存率 (%)	生存率のばらつき (%CV)
1	26時間	1,133	2%	68%	1%
2	18時間	1,146	2%	74%	2%
3	2時間	787	2%	72%	2%

表3. 予想された結果

酵母サンプルID	予想された結果	予想と合致したか?
1	サンプル1はサンプル2よりも生存率(%)が低い。	はい
2	サンプル2はサンプル1よりも生存率(%)が高い。	はい
3	サンプル3はサンプル1および2よりも総細胞数が少ない。	はい

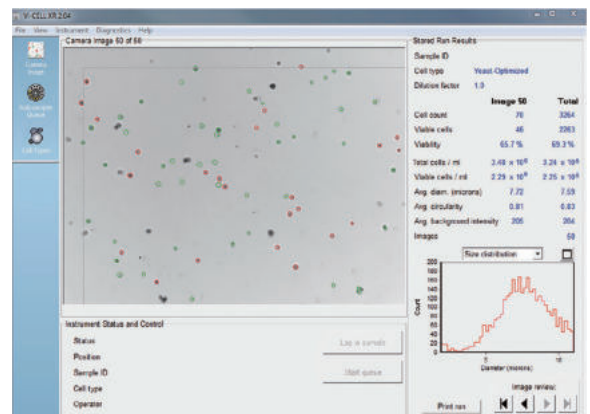


図2. Vi-CELL XR ソフトウェアの画像。生細胞を緑色、死細胞を赤色の円で表示します。

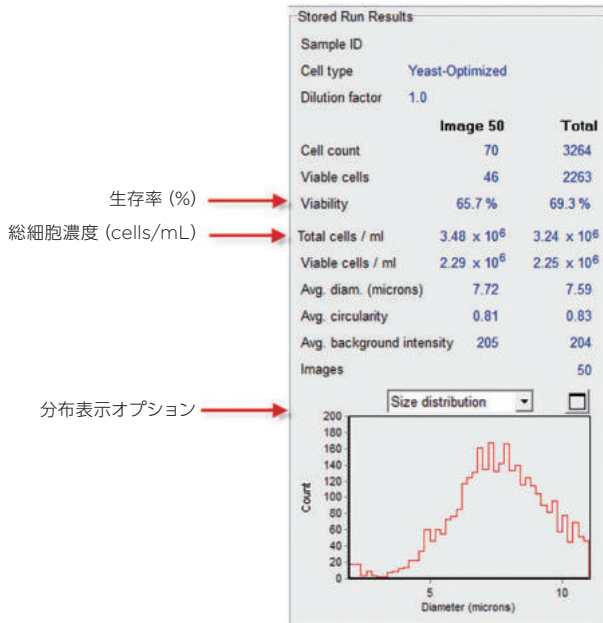


図3. Vi-CELL XRの解析結果

## Why the Vi-CELL XR is Superior to Manual Trypan Blue for Yeast Analysis

すでに述べたように、細胞生存率を測定する標準的な方法はTrypan Blue Dye Exclusion法です。トリパンプルー染色試薬 (0.4%) を等量の細胞と混合します。インタクトな細胞膜を有する生細胞は、トリパンプルー染色試薬に染まりませんが、透過性の膜を有する死細胞は濃青色に染まります。しかし、マニュアル法 (手動法) では、測定者が血球計算盤と顕微鏡を用い目視で染色された細胞と染色されていない細胞を数え、生存率 (%) を計算しなければなりません。このことは、多くの労力を要する上、測定に主観的判断が入り精度誤差の要因となります。

細胞数を計測するためのTrypan Blue Dye Exclusion法をマニュアルで行った場合と自動で行った場合の評価は、Industrial BioDevelopment Laboratory (IBDL) がすでに実施しています。IBDLの評価では、複数の人が血球計算盤を用い、細胞数を計測したときの計測値に有意なばらつきがあることを示しています。これはサンプル調製のばらつきや、個々の細胞の生死判定の決定に関するばらつきによるものと考えられています。Vi-CELL XRによって測定した細胞濃度と生存率は、実験過程を通して再現性があり、人が計数した際に生じる幅広いばらつきの影響を受けることなく、マニュアルで測定された平均値に近似していました。したがって、Vi-CELL XRの使用は、正確かつ再現性のある、有効な細胞数計測ツールであると結論します<sup>4</sup>。

表4. マニュアル法とVi-CELL XRによって測定された平均総細胞濃度と生細胞濃度の比較<sup>4</sup>

測定	マニュアル法 ( $\times 10^6$ 細胞/mL)	Vi-CELL XR ( $\times 10^6$ 細胞/mL)
総細胞濃度	$4.71 \pm 1.94$	$4.23 \pm 0.52$
生細胞濃度	$4.53 \pm 1.95$	$4.13 \pm 0.51$

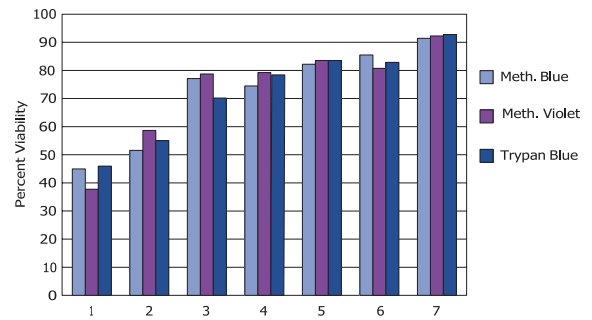


図4. 酵母細胞の生死判定に使われるメチレンブルー、メチレンバイオレットとの比較<sup>5</sup>

## Trypan Blue Vital Dye is Suitable for the Viability Measurement of Yeast

細胞の生死判定に使われた染色試薬、トリパンプルーは、酵母細胞において広く使用されているメチレンブルーやメチレンバイオレットの結果と同等であることが示されています。

## Conclusion

Vi-CELL XRは、発酵過程に用いられる酵母細胞の生存率測定を自動化できます。Vi-CELL XRは、マニュアル法に伴う測定の主観的判断を取り除き、各計測に対して客観的な結果を提供します。Yeast Cell Typeを最適化することによって、細胞ではない物体を結果から除外し、目的の細胞をカウントすることができます (図5)。



図5. Vi-CELL XR解析画像。生細胞を緑色、死細胞を赤色の円で表示し、デブリスを除外していることが分かります。

## The Vi-CELL XR

Vi-CELL XRは、幅広く認められているTrypan Blue Dye Exclusion法を自動化します。Vi-CELL XRは、イメージング技術、専用のアルゴリズム、および流体制御などの先端技術を組み合わせています。Vi-CELL XRのコア技術は、カスタマイズされた分注システムです。このシステムを使い、サンプルの吸引、試薬の処理、およびその後の機器のクリーニングを完全に自動化しています。細胞懸濁液を吸引し、トリパンプブルー色素と混合した後、イメージング用のフローセルに圧送します。Vi-CELL XRは、特定の解析に対して最大で100画像を分析しており、マニュアル法と比較し、15～30倍の細胞を解析し、測定結果をレポートします。また、これらの解析を2.5分以内に行います。結果をExcel®にエクスポートしたり、文書として印刷したりすることもできます。Excel®データ・ファイルの一例を図6に示します。

## References

1. Pasteur, L. Memoirs: New Contributions to the Theory of Fermentations. *Quarterly Journal of Microscopical Science*. 2.52; 351-356; (1873).
2. Erten H, Tanguler H and Cakiroz H. The effect of pitching rate on fermentation and flavour compounds in high gravity brewing. *Journal of the Institute of Brewing*.113.1; 75-79; (2007).
3. Nagodawithana T, Castellano C and Steinkraus K H. Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count, and sugar concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentations. *Applied Microbiology*. 28.3; 383-391; (1974).
4. Louis K S, Siegel A C and Levy G A. Comparison of Manual versus Automated Trypan Blue Dye Exclusion Method for Cell Counting. *Application Note—Industrial BioDevelopment Laboratory* (www.ibdl.ca) [http://www.ibdl.ca/Application%20Notes/appnote\\_TE.cfm](http://www.ibdl.ca/Application%20Notes/appnote_TE.cfm)
5. Szabo S E, PhD. Comparison of the efficacy of various yeast viability stains. *BeckmanCoulterApplicationNoteTA-204*. <http://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=Ta-204.doc>

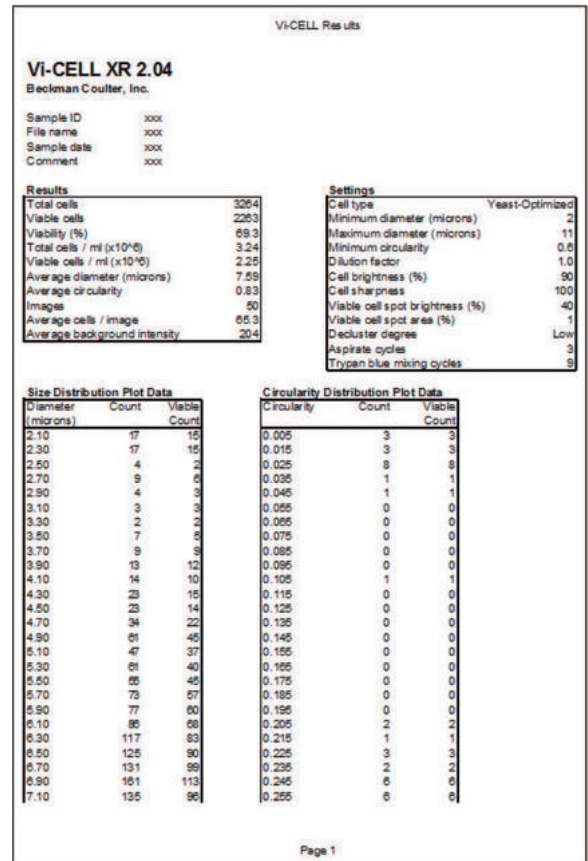


図6. Vi-CELL XRエクスポート結果の例

## ベックマン・コールター株式会社

本社：〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー

お客様専用 ☎ 0120-566-730 ☎ 03-6745-4704 ☎ FAX 03-5530-2460  
 e-mail bckkcas@beckman.com URL http://www.beckmancoulter.co.jp