

Guava® Muse™ セルアナライザーによる アルコール飲料生産における酵母の計数 と生存率測定の実効率化

by Kimvan Tran, Karin Eberhart, and Kamala Tyagarajan

はじめに

酵母の計数と生存率測定は、ワイン、ビール、日本酒などのアルコール飲料の製造プロセスに不可欠です。酵母の正確な定量は、発酵、ピッチング、リピッチング、ボトルコンディショニングなどのステップで特に重要です。ピッチングとリピッチングは発酵プロセスの開始を意味します。発酵プロセスでは酵母が麦汁に導入されますが、この麦汁は、生産初期工程において発芽した穀物をすりつぶして得られる抽出液です。ボトルコンディショニングとは、発酵開始後に望ましい炭酸レベルを与える酵母と糖をボトルに添加することです。バッチ間の一貫性を維持するために、発酵の重要なステップで酵母集団の濃度と生存率をモニタリングする必要があります。このパラメータの正確な調整は、一貫した発酵サイクル時間と酵母由来の芳香成分を生み出すために重要です。酵母のピッチレートが正確にモニタリングされず調節されていない場合、結果として、発酵が停止するか、最終製品の香り、風味、アルコール含有量が大きく変わる可能性があります。それらが発生すると、在庫廃棄や生産効率の低下のために製造者が痛手を被る場合があります。

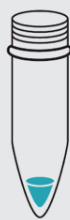
酵母の濃度と生存率を評価するためにアルコール製造業界で使用されている現在の方法には、血球計算盤法が含まれます。血球計算盤法は、ガラススライドチャンバー上で細胞を染色して顕微鏡や低倍率のイメージングで測定する手法ですが、他の手動の方法と同様に非常に少ない細胞を用いて測定するため、測定者のエラーにより最終品の品質・再現性に対し不安定な結果をもたらす場合があります。結果の不一致はピッチレートの決定や、最終的には品質や味わいに大きな影響を与える可能性があります。

ここでは、Guava® Muse™ セルアナライザーとその専用キットを使用して、酵母数と生存率を迅速かつ正確に測定する最新の方法について説明します。Muse セルアナライザーは、シンプルなタッチスクリーンインターフェースを使用した丈夫でコンパクトなポータブル機器と、調製済みの専用キットを組み合わせています。これらの機能により、醸造所やその他の酵母発酵環境で新しいレベルの酵母培養管理が可能になります。

実験ベンチ上のわずか21 cm x 28 cm四方に設置可能なMuse セルアナライザーは、マイクロキャピラリーを使用して酵母の計数を正確かつ迅速に実施し、生存率を評価できる超小型アナライザーです。幅広いタッチスクリーンインターフェイスと直感的に扱えるソフトウェアにより、使用に際してのトレーニングは不要です。最適化されたMuse Count & Viability Kit (200X)は、酵母の計数や生存率の測定に最適です。希釈した酵母サンプルとMuse Count & Viability Assay Kit を混合してチューブを装置にロードすると、酵母の生存率と細胞濃度の結果を含むサマリーが数秒で表示されます。

図1.

PBSで懸濁した細胞を各チューブに添加



Muse Count & Viability Kit (200X)の試薬を各チューブに添加



室温で5分間インキュベート

Guava Muse セルアナライザーのチューブ立てにチューブをセットして測定結果を読み取る



Guava Muse セルアナライザーによる酵母の計数と生存率の測定手順

- PBSで希釈した酵母サンプルをチューブに添加
- Muse Count and Viability Kit (200X) を添加
- サンプルを混合してMuse セルアナライザーで5分以内に測定

図2.

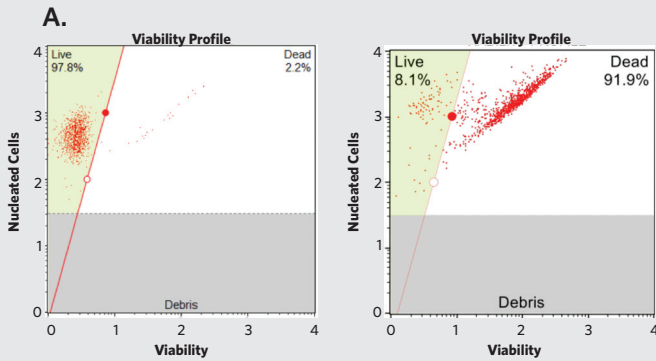
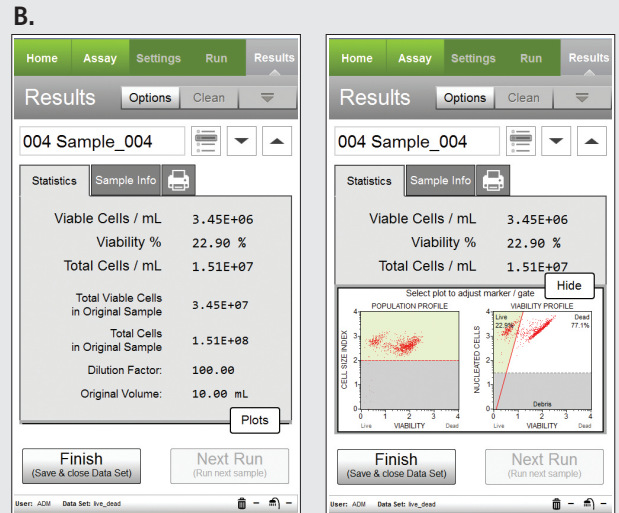


図2は、醸造サンプルの測定結果を示しています。

Aは醸造タンクから直接サンプルを取得して測定した結果で、Bは熱殺菌および低温殺菌後の結果を示しています。両結果を比較すると生存細胞クラスターと死滅した細胞クラスターは分離されていることがわかります。

Bは、Guava® Muse™ ソフトウェアで自動計算された濃度データです。結果はグラフと数値の両方で即座に確認でき、エクスポートと印刷もできるため、バッチ間の一貫性の確認とモニタリングが可能となります。



従来の酵母の定量では、サンプルをメチレンブルーで染色し、血球計算盤グリッド上で手動でカウントしていたため、正確な酵母力価に達するまで手計算する必要がありました。この従来法は、測定者の判断で死細胞と生細胞を区別して生存細胞数を算出するため、個人の判断に依存した主観的な結果になりがちです。画像ベースの自動セルカウンターの場合でも、濃度算出はできますが、限定された視野内の細胞を測定するため、再現性や測定結果にばらつきが生じる可能性があります。

フローサイトメトリーで測定するGuava Muse セルアナライザーは、サンプルごとにすべての細胞と数千個の細胞のデータを測定します。この方法は測定者による主観的判断を排除し、測定物の大きさや見え方によって生じる測定誤差を軽減させます。

酵母の計数と生存率を測定するためのプロトコール

必要な材料:

- 酵母サンプル
- サンプルを希釈するための1.5 mLポリプロピレンチューブ
- ピペット
- Muse Count and Viability Kit (200X) (凍結保存)
- 1X PBS 溶液
- Guava Muse セルアナライザー

Muse Count & Viability kitを室温で完全に解凍します。よく混ぜ、使用前に遠心機で内容物をスピンドアウンします。

1. キットをアッセイで使用する前に、酵母サンプルを1X PBSで希釈します。サンプルは、総細胞濃度が $5 \times 10^4 \sim 7 \times 10^5$ 細胞/mLの範囲になるように希釈して、細胞計数と生存率の測定を最適に実施できるように準備します。適切な力価範囲に到達する必要がある場合は、段階希釈を実行します。たとえば、ストックサンプルを1X PBSで5倍に希釈した後、4 μ Lの希釈済みサンプルを396 μ L 1X PBSを含む1.5 mLチューブに追加して1:100に希釈しアッセイします。
2. 1で希釈したサンプルを穏やかに攪拌します。
3. 2で攪拌したサンプル396 μ Lを1.5 mLのポリプロピレンチューブに移します。
4. ポリプロピレンチューブに移した396 μ Lのサンプルに4 μ LのMuse Count & Viability の試薬を加えます。溶液が均一にピンク色になるまで、穏やかにボルテックスしてよく混ぜます。チューブの底に濃い紫色の試薬が見えなくなるまで混合します。
注: 混合液成分は、常に①細胞を希釈するための1X PBS、②酵母サンプル、③Count & Viability の試薬 の順序で追加します。
5. サンプルの種類に応じて、室温で5~10分間インキュベートします。
注: インキュベーション後、Guava Muse セルアナライザーのCount & Viability Moduleを用いて測定します。

- Guava® Muse™ セルアナライザーにサンプルをロードして測定する前に、穏やかにボルテックスしてサンプルをよく混合します。
注: 染色したサンプルは染色インキュベーション終了後すぐに測定します。Guava Museセルアナライザーによる測定を1時間以上遅らせると、酵母の生存率が低下する場合があります。
- 酵母力価を正確に測定するために、ステップ1で使用したサンプルの希釈率が正しく入力されていることを確認します (例: 上記のステップ1の場合は、500倍の希釈になります)。
- 未使用のMuse Count & Viability試薬は冷凍保管することで再利用できます。この試薬は10回までの凍結溶解であれば使用可能ですが、できるだけ凍結溶解を避け、小分けして保管します。

酵母の濃度と生存率の測定に最適なMuse™ Count & Viability Kit (200X)

アッセイの特長	利点
調製済みの専用試薬	試薬の計量と都度調製が不要
試薬とサンプルの混合から測定時間まで5~10分で完了	サンプル準備に時間を要さない
タッチスクリーンインターフェイスとガイド付きソフトウェア	使いやすくシンプルなユーザーインターフェース
自動計数と結果表示 (わかりやすいデータ表示)	手技差と計算誤差を排除
各サンプルから数千個の細胞を測定	統計的な結果: 高精度の測定
低コストで測定可能	運用コストの低減
生データまたはPDF形式でエクスポートが可能	各測定結果がアーカイブされるためデータ管理と分析が容易

ここで紹介しているプロトコールは、アルコール発酵で一般的に使用される酵母サンプルの多様な株に適用されており、出芽酵母やブレタノマイセスを含む様々な株において幅広い濃度と生存率が測定されています。

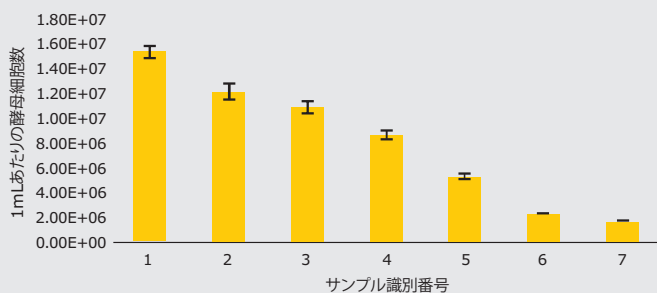
Guava Muse セルアナライザーによる細胞計数および生存率の測定は、一連のサンプルから一貫した結果を導きます。図3は、段階希釈された出芽酵母のサンプルとMuse Count and Viability Kitを用いてトリプレートで分析した測定結果を示しています。図4は、さまざまな濃度から得られた生存率の結果のグラフです。これらのデータは、生存率の測定値が一貫しており、酵母の濃度とは無関係であることを示しています。

Guava Muse セルアナライザーとCount and Viability Kit (200X) を組み合わせることで、酵母の計数と生存率の測定を迅速かつ簡単に行うことができ、しかも、さまざまな種類のサンプルから一貫した正確で再現可能な結果を得ることができます。したがって、Guava Museセルアナライザーを用いた測定では、種に関わらず幅広いサンプル濃度範囲で信頼性と一貫性を保ちながら、数日間にわたって重要な酵母の計数と生存率データを取得できます。

Guava Muse セルアナライザーによる測定は、工業環境で酵母を使用する醸造者などに、経験値または手動カウントに代わる迅速で簡単な代替手段を提供し、効率、信頼性、および製品の一貫性を向上させます。

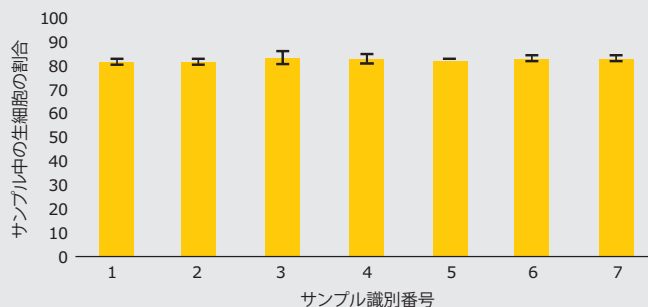
Guava Muse セルアナライザーについての詳細は、Luminexのウェブサイトでご確認ください。
<https://www.luminexcorp.com/ja/muse-cell-analyzer/>

図3.



Muse Count and Viability Kit (200X)を用いて、トリプリケートで分析した段階希釈済みの出芽酵母サンプルの細胞濃度データ。棒グラフは平均値を示し、誤差 (Error bar) はトリプリケート測定で得られた濃度範囲を表します。

図4.



Guava Muse セルアナライザーとMuse Count and Viability Kit (200X)を用いて、トリプリケートで分析した段階希釈済みの出芽酵母サンプルの生存率データ。誤差 (Error bar) はトリプリケート測定で得られた濃度範囲を表します。

ご注文情報

製品名	製品番号
Muse™ Count & Viability Kit (200X)	MCH100104
Guava® Muse™ Cell Analyzer	0500-3115

参考文献

- Alba-Lois L, Segal-Kischinevzky C. Beer & Wine Makers. Nature Educ 2010 3(9):17.
- Madigan MT, Martinko JM, et al. Brock biology of microorganisms (12th ed.). Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall; 2008.
- Steensels J, Daenen L, Verstrepen KJ, et al. Brettanomyces yeasts---From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. Int J Food Micro 2015 206:24 - 38.

Luminex
complexity simplified.

ルミネックス・ジャパン株式会社

〒106-0041 東京都港区麻布台 1-7-2 神谷町麻布台ビル
www.luminexcorp.com

テクニカルサポートお問い合わせ窓口
Tel: 03.5545.7444 (受付時間 9:00 ~ 18:00)
Email: supportjapan@luminexcorp.com

©2019-2020 Luminex Corporation. All rights reserved.

Guava, Museは、米国および他の国々で登録されたルミネックス・コーポレーションの商標または登録商標です。本製品は研究用機器です。体外診断用には使用できません。研究用試薬と併せてお使いください。諸般の理由により、予告なく仕様を変更する場合がございますのであらかじめご了承ください。