

## 乾燥酵母の生細胞数測定法

住川 友則\*, 赤崎 哲也\*, 中村 文雄\*

### A Method for Measuring the Number of Viable Cells in Dry Yeast

Tomonori SUMIKAWA\*, Tetsuya AKASAKI\*, and Fumio NAKAMURA\*

\*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

The numbers of yeast cells were measured using a Thoma haemocytometer. A linear correlation was found ( $R^2 = 0.9993$ ) between the weight of dry yeast and the number of the cells. The coefficient of Variation ( $n = 6$ ) was considerably low in the cell number range of 400 to 500. The dry yeast suspended in distilled water at  $40^\circ\text{C}$  had the highest viable cell rate. It was found that the viable cell rate remained stable up to 60 minutes after adding 0.01% Methylene Blue solution.

## 1. 緒 言

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は、食品・バイオ・飼料といったさまざまな分野に利用されている。

関税率表では、活性酵母は税番第 2102.10 号 (統計細分 000) (協定税率 10.5%) に分類され、これに対して、不活性酵母は税番第 2102.20 号 (統計細分 100) (協定税率 3.8%) に分類される。両者の間に税率格差があるため、これらを判別する方法の一つとして、酵母の生死判別法が税関分析指針 VI-8.1 「酵母細胞 (死滅酵母細胞) (Fink 法)」に掲載されているが、その中で酵母数のカウント方法については詳細に規定されていない。また、掲載されている酵母の生死判別法の測定条件は、染色液を混合後 5 分以内に酵母数をカウントすると規定されているが、5 分以内にカウントするのは時間的に困難な場合がある。

そこで、酵母が乾燥状態で輸入される場合に対応するため、乾燥酵母を用いて酵母生菌数の測定方法を検討した。まず第一に、トーマ血球計算盤を用いた菌数の測定について検討した。第二に、乾燥酵母を生の状態に戻す (復水) 最適な温度を検討した。第三に、染色液混合後 5 分を超えた場合の生菌率の変化を測定した。

## 2. 実 験

### 2. 1 分析試料

乾燥パン酵母 (日清製粉社製)

### 2. 2 試薬の調製

0.01% メチレンブルー溶液: 0.2N リン酸水素二ナトリウム溶液 0.25ml と 0.2N リン酸二水素カリウム溶液 99.75ml とを混合し、これに 0.02% のメチレンブルー溶液 100ml を混合し、0.05N 塩酸で pH4.6 に調整した<sup>1)</sup>。

### 2. 3 分析装置及び分析条件

トーマ血球計算盤 (Erma 製)

生物顕微鏡: BX51 (OLYMPUS 製)

(接眼レンズ: WH10X/22, 対物レンズ:

UPlanFl4 倍~100 倍, デジタルカメラ: DP70)

### 2. 4 実験方法

#### 2. 4. 1 菌数の測定

乾燥酵母を 0.5% 程度の濃度になるように、室温の N/10NaOH 溶液に懸濁させ、得られた懸濁液を 2<sup>n</sup> 倍 ( $n=1,2,3,4,5,6,7,8$ ) の 8 段階に希釈した。希釈して得られた懸濁液を、それぞれトーマ血球計算盤を用いて、生物顕微鏡により 200~400 倍で酵母数をカウントした。カウントは、無作為になるよう N 字型に灰色部の 50 区画中の酵母数について行い (Fig.1), その 50 区画中の合計数から、希釈倍率に応じて菌数を算出した。

なお、トーマ血球計算盤の目盛線上の酵母は右辺と下辺の数をカウントし、左辺と上辺の数はカウントしなかった。また、出芽途中の酵母は、合わせて 1 とカウントした。

#### 2. 4. 2 復水温度の検討

乾燥酵母は、いわば仮死状態にあり、乾燥状態のままでは生

\*財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

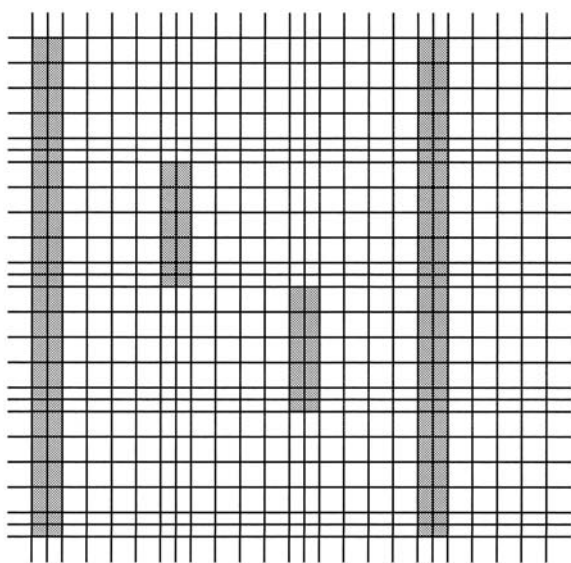


Fig. 1 The count regions on Thoma haemacytometer

死の判定が困難であるため、水分を与え元の状態に戻す復水が必要である。そこで、復水温度の生菌率に与える影響について検討した。

乾燥酵母の復水は、乾燥酵母を 20, 30, 40 及び 50℃の蒸留水に懸濁させ、得られた懸濁液を先の温度に設定した恒温槽で 20 分間放置して行った。ただし、10 分後に一度混合した。

得られた懸濁液をそれぞれ 0.01%メチレンブルー溶液と等量混合した後、生物顕微鏡下でトーマ血球計算盤を用いて、N 字型に 50 区画中の総菌数及び生細胞数をカウントし、総菌数に対する生細胞数の割合を算出して生菌率とした。

生細胞と死細胞の判別は、0.01%メチレンブルー溶液を混合した後、青色に染まらない細胞を生細胞とし、青色に染まった細胞を死細胞とした (Fig.2)。これは、生細胞は、細胞内に浸透したメチレンブルーを還元して無色にする能力があるため、

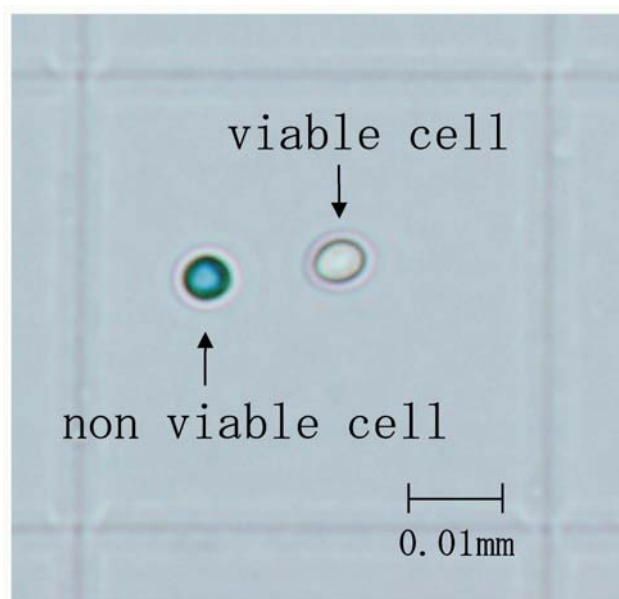


Fig. 2 Dyeing test by 0.01% methylene blue solution

染色されないが、死細胞は、その能力がないため青色に染まる原理を利用したものである (メチレンブルー染色法)<sup>2)</sup>。

### 2. 4. 3 染色液混合後の酵母生菌率の経時変化

0.01%メチレンブルー溶液を 40℃において復水させた酵母懸濁液と混合後、経時的に生菌率を測定した。

## 3. 結果及び考察

### 3. 1 菌数の測定

8 段階に希釈した懸濁液のそれぞれの酵母カウント数から得た乾燥酵母の重量と総菌数の関係を Fig.3 に示す。両者の間に直線的な相関が得られた。また、N 字型 50 区画中の合計カウント数とその繰返し精度 ( $n=6$ ) を Table 1 に示す。合計カウント数の平均値が 100 を超えると、変動係数が 10%未満で再現性は良好であるが、1000 に近づくとき酵母どうしが凝集し、それにより血球計算盤の目盛線がかくれ、正確なカウントが困難となった。したがって、乾燥酵母の菌数を測定する際、その懸濁液は、N 字型 50 区画中の合計カウント数がその変動係数の最も小さく、正確なカウントが行える 400-500 程度となるよう希釈するのが適当と考えられる。

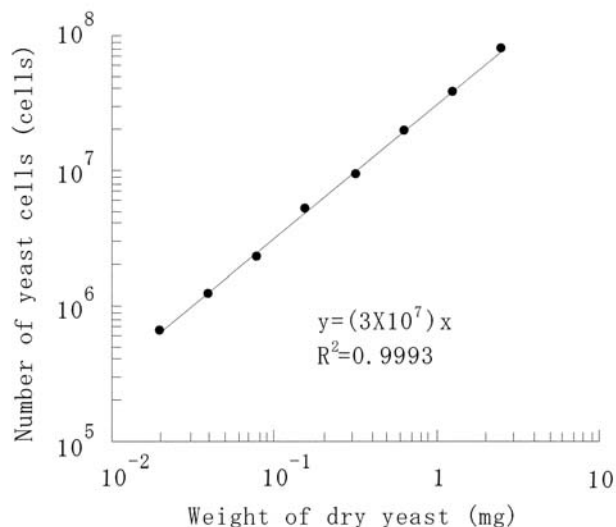


Fig. 3 Relation between the weight of the dry yeast and the number of yeast cells

### 3. 2 復水温度の検討

復水温度と生菌率の関係を Fig.4 に示す。乾燥酵母の生菌率を測定する際は、Fig.4 から分かるように、復水温度を最も生菌率の高い 40℃で行なうよう留意しなければならない。これは、多くの酵母は高温に対して耐性がなく、また、乾燥酵母の復水過程において水温が低いと菌体内成分の漏出がおり、生菌率低下の原因となるためである<sup>3)</sup>。

### 3. 3 染色液混合後の酵母生菌率の変化

0.01%メチレンブルー溶液混合後の経過時間と 40℃で復水した生菌率の関係を Fig.5 に示す。税関分析指針 VI-8.1 「酵母細胞 (死滅酵母細胞) (Fink 法)」において、濃い色素液は細胞を死滅させるとされているが、0.01%のメチレンブルー溶液では、

Table 1 Repeatability of cell counts (n=6)

Weight density (mg/ml)	Mean of cell count	Coefficient of variation (%)
0.0198	8.00	33.54
0.0396	15.00	19.32
0.0792	28.33	12.16
0.1584	64.33	12.50
0.3169	113.83	5.84
0.6338	243.33	5.95
1.2675	467.17	3.70
2.5350	984.50	6.44

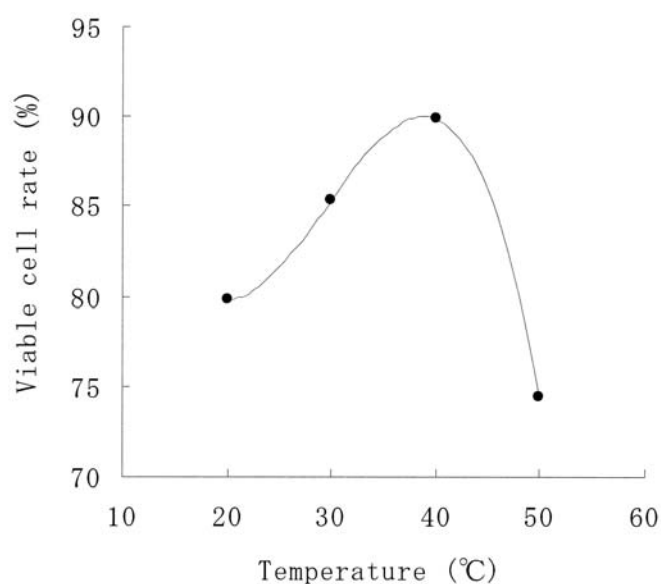


Fig. 4 Effect of condensed water temperature on viable cell rate

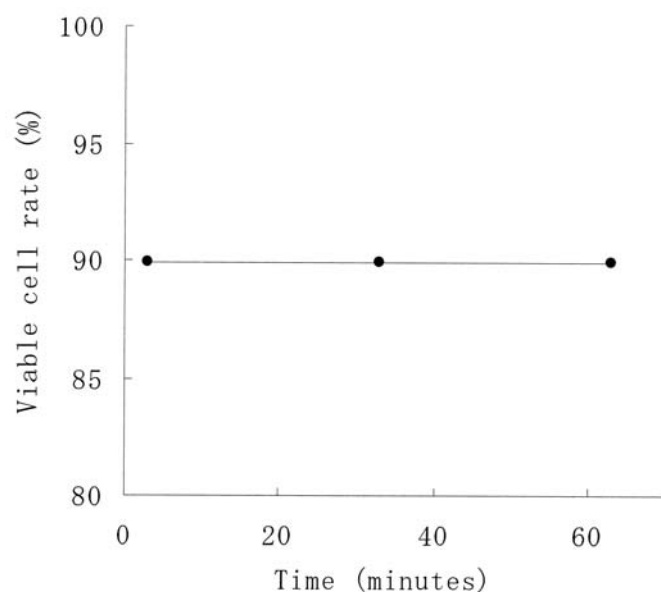


Fig. 5 Change of the viable cell rate after adding 0.01% methylene blue solution

混合後 60 分以内は生菌率にほとんど変化がないことが確認された。ただし、トーマ血球計算盤を使用して菌数を測定する際は、時間が経つにつれて計算盤上の溶液が蒸発して、カウントする区画内に空気が入るに伴い、溶液中に分散している酵母が移動

していくため、速やかに数えるのが望ましい。

#### 4. 要 約

酵母の菌数測定は、トーマ血球計算盤を使用して行った。

乾燥酵母の重量と菌数の間に直線的な相関が得られ、菌数測定において、計算盤 50 区画中の菌数の合計数をその変動係数 ( $n=6$ ) が最も低かった 400-500 となるように希釈することが適当と考えられる。

また、生死判別において、乾燥酵母の復水は最も生菌率が高かった 40℃で行なうことが適当と考えられる。

0.01%メチレンブルー溶液を混合した後、60 分以内は生菌率にほとんど変化がないことを確認した。

## 文 献

- 1) 桃木芳枝, 渡部俊弘, 土橋文江, 横濱道成: “バイオテクノロジーへの基礎実験”, P65 (1994), (三共出版)
- 2) 有村治彦: 日本醸造協会誌, 95, 791 (2000)
- 3) 北野一好: 日本醸造協会誌, 91, 92 (1996)