



**VLB**  
BERLIN

Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin e.V. / Seestraße 13 / 13353 Berlin

## **Bericht zur Evaluierung des Hefe-Zellzählsystems von Oculyze**

Das Startup Oculyze entwickelte ein App-System zur Bestimmung von Hefezellkonzentrationen, bestehend aus einem Smartphone Mikroskop mit einer entsprechenden Kammer und einer automatisierten Bilderkennung. Dabei werden von der Oculyze-App mikroskopische Bilder aufgenommen und an einen Server verschickt. Mit der entsprechenden Software wird automatisiert die Zellkonzentration und, bei vorheriger Methylenblaufärbung, die Viabilität (Lebend/Tot-Anteil) der jeweiligen Hefepopulation bestimmt. Der Anwender erhält das Ergebnis in wenigen Sekunden auf der App.

Die VLB-Berlin wurde als externes und unabhängiges Institut für die Systemvalidierung, zur Darlegung der korrekten Funktionsfähigkeit des Oculyze-Zellzählsystems beauftragt. Dabei sollten folgende Leistungen abgedeckt werden:

- Bestimmung der Zellkonzentration und Viabilität verschiedener Hefepopulationen mit folgenden Methoden:
  - o Oculyze-System
  - o Händische Auswertung mit der Thomakammer am Mikroskop von Personal mit entsprechender Expertise
  - o weiteres automatisiertes System, dass für die Bestimmung der Zellkonzentration und Lebend/Tot Analyse von Brauhefen ausgelegt ist  
→ NucleoCounter YC-100
- Analyse von min. drei verschiedenen Brauhefestämmen in jeweils drei verschiedenen Ansätzen
- Analyse von allen Hefestämmen und Ansätzen in wässriger Lösung und Würze  
Die Messungen in Würze sind für die Beurteilung des Einflusses von Trubpartikeln der Würze auf die Messung der Zellkonzentration.

Versuchs- und Lehranstalt für  
Brauerei in Berlin (VLB) e.V.  
Seestraße 13 / 13353 Berlin

T +49 30 450 80-0 (Zentrale)  
F +49 30 453 60 69  
brewmaster@vlb-berlin.org  
[www.vlb-berlin.org](http://www.vlb-berlin.org)

**GESCHÄFTSFÜHRER**  
Dr.-Ing. Josef Fontaine

  
Mitglied der Arbeits-  
gemeinschaft industrieller  
Forschungsvereinigungen

**BANKVERBINDUNGEN**  
**Deutsche Bank Privat- und**  
**Geschäftskunden AG**  
IBAN: DE71 1007 0024 0241 0132 00  
Swift Code (BIC): DEUTDE33HAN  
**Postbank NL Berlin**  
IBAN: DE51 1001 0010 0015 1001 09  
Swift Code (BIC): PBNKDE33

**Commerzbank AG**  
IBAN: DE69 1008 0000 0891 6470 00  
Swift Code (BIC): COMDE33HAN

Ust-IdNr: DE 136 621 351  
Steuernummer: 27/640/50721  
Vereinsregister-Nr.: 24043 NZ  
Amtsgericht Berlin-Charlottenburg



Die Hefepopulationen der jeweiligen Ansätze wurden mit den jeweiligen Systemen dreimal gemessen bzw. analysiert. In den folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden drei verschiedene untergärige Hefen verwendet, welche als ug1, ug2 und ug3 codiert sind. Die Hefen wurden in YEPD-Medium angezogen. Dieses Medium setzt sich wie folgt zusammen:

- 1% YeastExtract
- 1% Prptone
- 5% Dextrose

Aus einer 24 h Vorkultur (Standkultur bei 26 °C) wurden von der jeweiligen Hefe zwei verschiedene Hauptkulturen angesetzt. Dazu wurden 100 ml YEPD-Medium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit 1,2 ml der Vorkultur angeimpft und bei 26 °C unter kontinuierlichem Schütteln bei 80 rpm inkubiert. Um die Messungen die Viabilität deutlicher darzustellen, wurden die Hefen unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt, um die Viabilität zu verringern. Bei den analysierten Hefepopulationen handelt es sich um folgende Ansätze:

1. Ansatz: Hauptkultur 2 d bei 26 °C unter kontinuierlichem Schütteln bei 80 rpm
2. Ansatz: Hauptkultur 9 d bei 26 °C unter kontinuierlichem Schütteln bei 80 rpm
3. Ansatz: der 2. Ansatz wurde für weitere 24 h bei 37 h als Standkultur inkubiert. Für die Hefen ug2 und ug3 wurde ein Teil der Hefesuspension anschließend durch Hitzebehandlung abgetötet und mit den restlichen (nicht abgetöteten Zellen) vermischt.

Die Zellen wurden jeweils vor den Messungen in Leitungswasser gewaschen. Dafür wurden ca. 45 ml der Hefesuspension für 5 min bei 1800 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Leitungswasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Das nun



resuspendierte Pellet wurde für die Analysen verwendet. Des Weiteren wurden die Hefezellen auch in Würze analysiert. Dazu wurde eine 11,5 °P Würze aus der Studienbrauerei der VLB-Berlin mit Hefezellen aus der gewaschenen Hefesuspension mit einer Konzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml angeimpft. Das Animpfvolumen wurde mit der Zellkonzentration aus der Thomakammerzählung über die Formel [1] berechnet.

$$[1] \quad c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$c_1$ : Konzentration der Hefezellen in wässriger Lösung

$V_1$ : zu berechnendes Volumen (Zugabe zur Würze)

$c_2$ : gewünschtes Volumen in der Würzelösung

$V_2$ : Volumen der Würzelösung mit der gewünschten Hefekonzentration

Die Viabilität gibt den prozentualen Anteil an lebenden Zellen in einer Zellpopulation an. Dieser wird nach der Formel [2] berechnet.

$$[2] \quad \text{Viabilität [\%]} = 100 - \left( \frac{\text{Anzahl bzw. Konzentration der toten Zellen} \times 100}{\text{Anzahl bzw. Konzentration der gesamt Zellen}} \right)$$

Anzahl bzw. Konzentration der gesamten Zellen: lebende + tote Zellen

Daher muss neben den Messungen der Gesamtzellkonzentration auch der Anteil an toten Zellen bestimmt werden.

Im Folgenden sind die angewendeten Methoden kurz beschrieben.

### **NucleoCounter:**

Die Methode basiert auf der Einlagerung des fluoreszierenden Farbstoffs Propidium Iodid in die doppelsträngige DNA im Zellkern der Zelle. Das NucleoCounter-System bestimmt über ein Fluoreszenzmikroskop die Anzahl, der durch den Farbstoff Propidium Iodid fluoreszierenden Zellen. Für die Bestimmung der Zellkonzentration



müssen die Hefezellen zunächst mit dem beigefügten Aufschlussreagenz behandelt werden, um die Zellwand- bzw. -membran für den Farbstoff permeabel zu machen. Dieses Reagenz wurde auch zur Verdünnung der Hefesuspension verwendet, um in den linearen messbaren Bereich des Systems zu gelangen. Die Analyse erfolgt durch eine sog. NucleoCassette, welche direkt als Pipette fungiert und den immobilisierten Fluoreszenzfarbstoff enthält. Über das Fluoreszenzmikroskop im jeweiligen System können nun die fluoreszierenden Zellen ausgewertet werden.

Für die Bestimmung der Zellkonzentration in der wässrigen Lösung, wurden die Zellen 1:100 im Lysepuffer verdünnt.

Für die Bestimmung der Viabilität ist die Bestimmung des Totzellenanteils in der Hefepopulation nötig. Hierfür muss eine zweite Messung durchgeführt werden, wobei die Hefepopulation vorher nicht mit dem Aufschlussreagenz behandelt wird. So werden nur die toten Zellen in der Hefepopulation bestimmt. Ist der Totzellenanteil sehr hoch, muss auch hier verdünnt werden, wobei Leitungswasser verwendet wurde. Der Totzellenanteil konnte für die Ansätze 1 und 2 unverdünnt bestimmt werden. Für den Ansatz 3 der Hefen ug2 und ug3 wurde die Zellsuspension 1:10 in Leitungswasser verdünnt. Die Viabilität wurde nach beiden Messungen nach Formel [2] berechnet.

Für die Bestimmung der Zellkonzentration und der Viabilität einer Hefepopulation mit dem NucleoCounter YC-100 sind zwei Messungen mit zwei NucleoCassetten nötig sind.

### **Thomakammer-Zählung:**

Die Thomakammer ist eine Zählkammer bzw. Hämozytometer, mit der man unter einem Lichtmikroskop Zellen in Suspension auszählen und die Konzentration bestimmen kann. Die Thomakammer ist eine plangeschliffene Glasplatte (Vergleichbar mit einem dickeren Objektträger) mit drei Stegen, wobei die beiden äußeren Stege etwas höher liegen als der mittlere. Auf diesem mittleren Steg



befindet sich ein eingezühtes Gitter aus senkrechten Linien mit definierter Fläche und Tiefe. Dieses Gitter besteht aus 16 Großquadraten die wiederum in 16 Kleinquadrate unterteilt sind. Durch das feste Auflegen eines Deckglases über alle drei Stege, befindet sich zwischen dem Deckglas und den Quadraten des mittleren Steges ein Hohlraum mit einem definierten Volumen. Durch das befüllen dieses Hohlraums mit einer Hefesuspension, können die Hefezellen in den jeweiligen Quadraten mikroskopisch ausgezählt werden. Entsprechend der Anzahl der ausgezählten Quadrate, kann mit Hilfe einer entsprechenden Formel die Zellkonzentration bestimmt werden.

Für die Bestimmung der Viabilität der Hefepopulation, werden die Hefezellen mit Methylenblau angefärbt. Dazu werden die Proben in einem Verhältnis von 1:1 mit der Methylenblau-Lösung vermischt. Dieser Farbstoff dringt in die Zellen ein. Lebende Zellen können diesen Farbstoff abbauen und erscheinen daher unter dem Lichtmikroskop farblos. Tote Zellen hingegen erscheinen blau, da sie den Farbstoff nicht mehr abbauen können. Durch das Auszählen der gesamten Zellen und der blauen (toten) Zelle, kann die Viabilität der Hefepopulation nach der Formel [2] berechnet werden.

Die Daten der Thomakammer-Zählung während des Validierungsprojektes beziehen sich auf die Auszählung von 100 Kleinquadraten. Die Berechnung der Zellkonzentration erfolgte nach der Formel [3].

$$[3] \quad \text{Zellkonzentration [Zellen/ml]} = \frac{\text{Anzahl der ausgezählten Zellen}}{100} * 4 * 10^6 * VF$$

Die Methylenblau-behandelten Zellen können direkt für die Bestimmung der Zellkonzentration und Viabilität verwendet werden. Um einen auszählbaren Bereich für die Zellzählung zu haben, wurde die wässrige Hefesuspension 1:5 mit



Leitungswasser verdünnt. Die anschließende Behandlung mit MethylenBlau ergab eine weitere Verdünnung 1:1, so dass die Zellen der wässrigen Lösung mit einer Verdünnung von 1:20 unter der Thomakammer ausgezählt wurden. Die Hefezellen in der Würzelösung wurden direkt mit der Methylenblau-Lösung vermischt, so dass sich hier ein Verdünnungsfaktor von 2 ergab.

### **Oculyze-System:**

Das Prinzip des Oculyze-Systems wurde zu Beginn bereits beschrieben. Es automatisiert sozusagen die Thomakammerzählung. Mikroskopische Bilder der Hefen werden aufgenommen und bezüglich der Zellkonzentration automatisiert ausgewertet. Mit Methylenblau angefärbte Zellen können ebenfalls durch die Bilderkennung differenziert werden. Dabei erfolgt ebenfalls eine automatisierte Bestimmung des Totzellenanteils und Berechnung der Viabilität der jeweiligen Hefepopulation. Beide Werte können parallel bestimmt werden.

Die jeweiligen Proben die für die Zählung mit der Thomakammer vorbereitet wurden, wurden auch für die Zählung mit dem Oculyze-System verwendet.

Die Daten der jeweiligen Messungen mit der entsprechenden Meßmethode sind in Tabelle 1 (Messungen der Zellen in Waser) und Tabelle 2 (Messungen der Zellen in Würze) dargestellt. In der Abbildung 1 sind die jeweiligen Mittelwerte und die Standardabweichungen graphisch abgebildet.



**Tabelle 1:** Bestimmung der Zellkonzentration und Viabilität von drei verschiedenen Hefen in verschiedenen Ansätzen mit drei unterschiedlichen Hefezellzählssystemen (Hefezellen in Wasser)

Ansätze*	NucleoCounter		Thomakammer		Oculyze	
	Zellkonzentration [Zellen/ml]	Viabilität [%]	Zellkonzentration [Zellen/ml]	Viabilität [%]	Zellkonzentration [Zellen/ml]	Viabilität [%]
ug1						
1	1,15E+08	98,46	1,46E+08	99,45	1,36E+08	98,95
	1,22E+08	98,58	1,30E+08	96,62	1,70E+08	99,58
	1,18E+08	98,59	1,27E+08	97,17	1,77E+08	99,60
2	1,45E+08	98,25	2,12E+08	99,43	1,87E+08	99,64
	1,57E+08	98,34	2,19E+08	98,36	1,91E+08	99,25
	1,61E+08	98,33	2,07E+08	98,65	2,19E+08	100,00
3	1,57E+08	98,93	1,98E+08	98,99	2,00E+08	99,29
	1,57E+08	98,82	2,00E+08	98,40	2,19E+08	99,57
	1,51E+08	98,73	1,77E+08	98,42	1,54E+08	99,53
ug2						
1	1,77E+08	99,33	1,66E+08	99,04	2,31E+08	99,07
	1,83E+08	99,37	1,88E+08	97,66	2,01E+08	100,00
	1,83E+08	99,41	1,73E+08	99,54	2,14E+08	99,33
2	1,82E+08	99,38	2,11E+08	98,86	2,39E+08	99,70
	1,69E+08	99,31	2,24E+08	99,64	2,14E+08	99,33
	1,77E+08	99,40	2,51E+08	100,00	2,22E+08	99,68
3	1,84E+08	80,75	2,73E+08	64,10	2,54E+08	70,14
	1,89E+08	80,84	2,40E+08	59,50	2,35E+08	71,12
	1,86E+08	78,12	2,34E+08	60,68	2,53E+08	70,34
ug3						
1	1,42E+08	96,36	1,56E+08	97,20	1,85E+08	99,61
	1,50E+08	96,50	1,86E+08	96,34	1,75E+08	95,51
	1,48E+08	96,42	1,84E+08	97,39	1,81E+08	98,03
2	1,43E+08	97,08	2,11E+08	97,91	1,97E+08	98,55
	1,46E+08	97,02	2,00E+08	98,20	2,04E+08	97,89
	1,38E+08	96,92	2,12E+08	96,79	2,06E+08	100,00
3	1,45E+08	74,30	2,22E+08	59,64	1,99E+08	68,10
	1,39E+08	75,05	2,17E+08	62,58	1,97E+08	68,84
	1,49E+08	74,28	2,05E+08	60,59	2,00E+08	71,79

\*Ansätze:

- 1: Hefe-Hauptkultur nach 2 d aerober Inkubation (unter Schütteln)
- 2: Hefe-Hauptkultur nach 9 d aerober Inkubation (unter Schütteln)
- 3: Hefe-Hauptkultur von Ansatz 2 plus 1 d aerober Inkuabtion bei 37 °C (Standkultur); für die Hefen ug2 und ug3 wurde ein Teil der Hefesuspension anschließend durch Hitzebehandlung abgetötet und mit den restlichen (nicht abgetöteten Zellen) vermischt



**Tabelle 2:** Bestimmung der Zellkonzentration und Viabilität von drei verschiedenen Hefen in verschiedenen Ansätzen mit drei unterschiedlichen Hefezellzählsystemen (Hefezellen in Würze)

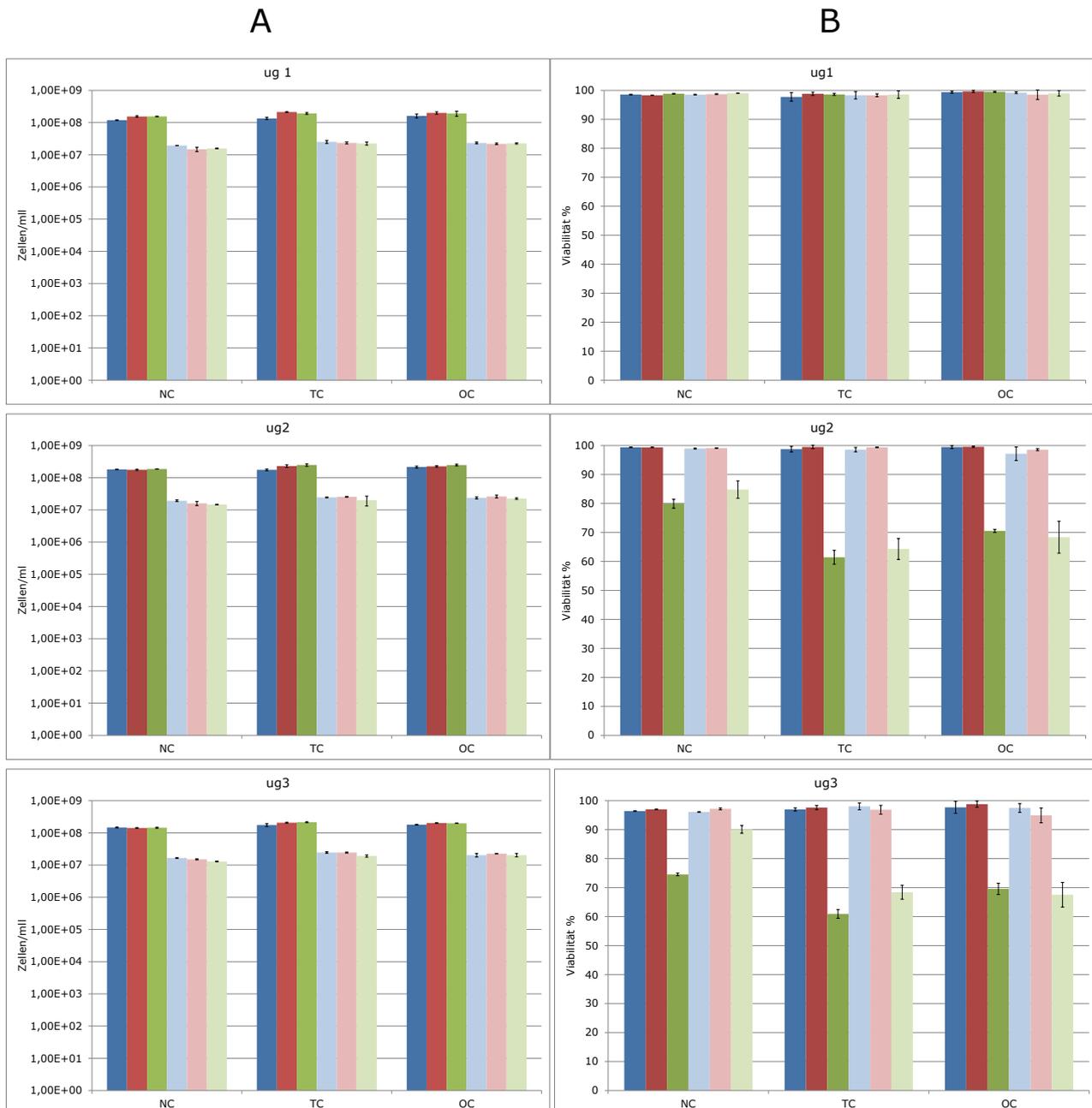
Ansätze*	NucleoCounter		Thomakammer		Oculyze	
	Zellkonzentration [Zellen/ml]	Viabilität [%]	Zellkonzentration [Zellen/ml]	Viabilität [%]	Zellkonzentration [Zellen/ml]	Viabilität [%]
ug1						
1	1,95E+07	98,63	2,54E+07	96,85	2,21E+07	99,43
	1,90E+07	98,45	2,73E+07	98,83	2,47E+07	98,84
	1,96E+07	98,44	2,23E+07	99,28	2,27E+07	99,37
2	1,23E+07	98,55	2,38E+07	97,98	2,17E+07	96,71
	1,51E+07	98,81	2,15E+07	98,88	2,30E+07	98,76
	1,67E+07	98,72	2,48E+07	98,84	2,05E+07	100,00
3	1,54E+07	99,04	2,02E+07	99,21	2,14E+07	98,67
	1,60E+07	99,10	2,50E+07	99,36	2,24E+07	100,00
	1,56E+07	98,91	2,18E+07	97,06	2,34E+07	98,17
ug2						
1	1,86E+07	98,89	2,52E+07	99,05	2,33E+07	94,50
	2,05E+07	99,12	2,44E+07	99,77	2,21E+07	98,71
	1,86E+07	98,83	2,39E+07	99,00	2,56E+07	98,32
2	1,39E+07	99,11	2,63E+07	99,39	2,40E+07	98,21
	1,86E+07	99,22	2,49E+07	99,36	2,90E+07	98,56
	1,57E+07	99,00	2,49E+07	99,36	2,56E+07	98,88
3	1,48E+07	86,72	1,24E+07	61,29	2,14E+07	62,00
	1,44E+07	86,37	2,55E+07	63,29	2,39E+07	71,86
	1,46E+07	81,33	2,22E+07	68,29	2,23E+07	71,15
ug3						
1	1,64E+07	96,06	2,39E+07	99,33	1,83E+07	99,22
	1,63E+07	96,22	2,38E+07	96,97	2,30E+07	96,35
	1,73E+07	95,96	2,61E+07	97,85	1,96E+07	96,89
2	1,57E+07	97,43	2,36E+07	98,64	2,27E+07	97,48
	1,48E+07	96,82	2,53E+07	96,21	2,27E+07	94,97
	1,49E+07	97,29	2,46E+07	95,77	2,24E+07	92,36
3	1,27E+07	89,27	2,10E+07	70,95	2,20E+07	64,29
	1,29E+07	91,63	1,85E+07	68,00	2,14E+07	66,00
	1,32E+07	89,38	1,80E+07	66,22	1,76E+07	72,36

\*Ansätze:

1: Hefe-Hauptkultur nach 2 d aerober Inkubation (unter Schütteln)

2: Hefe-Hauptkultur nach 9 d aerober Inkubation (unter Schütteln)

3: Hefe-Hauptkultur von Ansatz 2 plus 1 d aerober Inkuabtion bei 37 °C (Standkultur); für die Hefen ug2 und ug3 wurde ein Teil der Hefesuspension anschließend durch Hitzebehandlung abgetötet und mit den restlichen (nicht abgetöteten Zellen) vermischt



**Abbildung 1:** graphische Darstellung der Bestimmung der Zellkonzentration (Reihe A) und Viabilität (Reihe B) von drei verschiedenen Hefe populationen in verschiedenen Ansätzen. Die Messungen erfolgten mit unterschiedlichen Meßsystemen;  
NC: **NucleoCounter**; TC: **Thomakammer-Tählung**; OC: **Oculyze-System**

■ Ansatz1 in Wasser   ■ Ansatz2 in Wasser   ■ Ansatz3 in Wasser  
■ Ansatz1 in Würze   ■ Ansatz2 in Würze   ■ Ansatz3 in Würze



Bezüglich der Bestimmung der Zellkonzentration sind die Messungen des Oculyze-Systems vor allem mit den Zählungen und Berechnungen der Thomakammer-Methode vergleichbar. Im Vergleich zum NucleoCounter war die Zellkonzentration hier teilweise geringer als mit den anderen beiden Systemen. Dies ist darauf zurück zu führen, dass hier vermutlich das Signal von zusammenhängenden Zellen (wie z. B. sprossende Zellen) als eins gezählt wird, während bei einer direkten Zählung wie bei dem Oculyze-System und der Thomakammer-Zählung diese differenziert werden können.

Bezüglich der Viabilität zeigen die unterschiedlichen Messmethoden in Bereichen hoher Viabilität kaum Unterschiede. Die Standardabweichung ist geringfügig. Bei Hefekulturen mit geringer Viabilität, wie sie für die Hefen ug2 und ug3 in Ansatz 3 gezeigt wurde, sind Unterschiede zwischen den Messungen des NucleoCounters und der Methylenblau-Bestimmung zu erkennen. Auch hier liegen die Messungen mittels Thomakammer und Oculyze-System enger zusammen verglichen zum NucleoCounter-System. Auch hier könnte die Ursache im methodischen Unterschied liegen. Auch ist zu erkennen, dass bei der Methylenblau-Bestimmung die Standardabweichung der Viabilitätsbestimmung größer wird, je geringer die Viabilität bzw. je höher der Anteil der toten respektive blauen Zellen ist. Dies ist eventuell auf die unterschiedliche Intensität der Blaufärbung bei einem hohen Totzellenanteil zurückzuführen.

Dem entsprechend sind die Ergebnisse der Zellzählungen des Oculyze-Systems sehr gut mit denen der Thomakammer-Zählung vergleichbar, da beide auf dem gleichen Messprinzip beruhen. Die Messung des Oculyze-Systems erfordert jedoch kein Labor-Equipment wie ein Mikroskop und kein für mikroskopische Untersuchungen geschultes Personal. Auch wird die Zählung des Oculyze-Systems genau wie bei der Thomakammerbestimmung, die auf einer persönlichen Auszählung beruht, nicht durch Trubstoffe der Würze beeinflusst.



**VLB**  
BERLIN

Fazit:

Die Ergebnisse des Oculyze Systems sind mit der mikroskopischen Thomakammer-Zählung, sehr gut vergleichbar, da beide Messungen auf dem gleichen Prinzip beruhen. Für das Oculyze-System wird kein Labormikroskop und dafür geschultes Personal benötigt. Bei der Thomakammerzählung müssen persönlich die lebenden und toten Zellen beachtet und ausgezählt werden. Anschließend muss eine persönliche Berechnung erfolgen. Das Oculyze-System ist aufgrund der automatisierten Auswertung schneller. Die Zellkonzentration und die Viabilität können mit dem Oculyze-System in einer Messung bestimmt werden. Verglichen mit dem NucleoCounter-System ist es auch kostengünstiger. Bei dem NucleoCounter müssen zwei unabhängige Messungen für die Gesamtzellkonzentration und Totzellen-Anteil durchgeführt werden, wobei zwei NucleoCounter-Kassetten verwendet werden, welche auch nicht wieder verwertbar sind. Die Oculyze-Kammer kann nach gründlicher Reinigung und Trocknung mehrmals wieder verwendet werden.

Genau wie bei allen Messmethoden ist jedoch auch hier eine dreifache Messung zu empfehlen, die jedoch verglichen mit den Vergleichssystemen schneller und kostengünstiger durchgeführt werden kann.

Das Oculyze-System bietet daher eine sehr gute Alternative zur Bestimmung der Zellkonzentration und Viabilität von untergärigen Brauhefen ohne aufwendiges Laborequipment.

Wir danken dem Team von Oculyze für ihr Vertrauen und die gute Zusammenarbeit während des Evaluierungsprojektes.

Für weitere Fragen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung und freuen uns weitere Zusammenarbeit in der Zukunft.

Mit freundlichen Grüßen

Isil Cöllü



**VLB**  
BERLIN

## Kontakt

Dipl.-Ing. Isil Cöllü

Seestraße 13, 13353 Berlin, Tel: 030 450 80 179, e-mail: [coellue@vlb-berlin.org](mailto:coellue@vlb-berlin.org)