

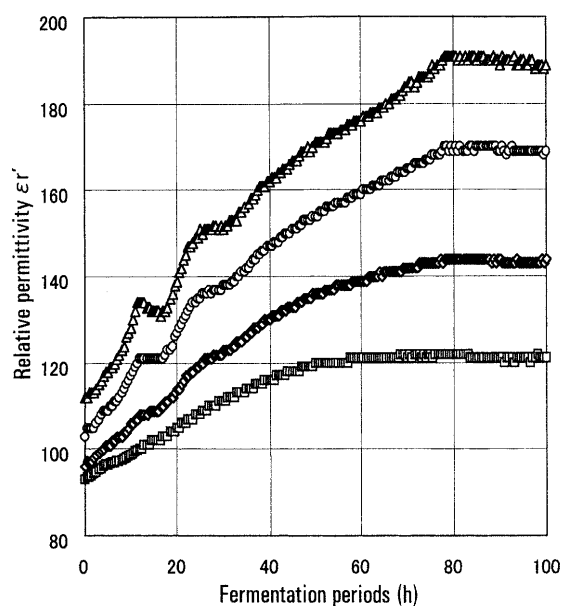


Fig. 9. Changes in the relative permittivity of fermenting wort in beer fermentation at different frequencies. Symbols: Δ , 100 kHz; $\circ$, 177 kHz; $\diamond$, 313 kHz; $\square$, 554 kHz.

される) が計測された。後者は母娘細胞の分離および出芽の準備時期でこの間に酵母の体積の上昇は見られない。また増殖の回数が増えると同調性が低くなり明確な誘電率の増加のサイクルが認めにくくなる。データからオンラインで酵母の増殖のサイクルタイムを計測することができ、実際の工場では適切な麦汁添加、通気や昇温といった工程の制御条件をコントロールすることが可能となり、発酵工程の安定化、造り込みといった方策に有効である。さらにその周波数特性を解析することにより同調性の割合(率)を測定することがてきる。⁶⁾これは増殖中につながつた母娘細胞が離れるときに、その前後で低周波数側(この場合 100 kHz 付近)の誘電率が低下するので同調性が高ければ誘電率の減少がこの時期に顕著に観測される。Fig. 9 に Fig. 8 の実験の際、同時に計測した他の周波数での誘電率を示した。増殖の同調率をパラメータにして誘電率の減少挙動をシミュレーションを行うことにより解析した結果、このビール発酵は最初の 1 回目の同調は 70%、2, 3 回目の増殖ではそれぞれ

60%、30%の同調率であると推定された。

おわりに

本研究は発酵工程でのモニタリング、特に酵母の状態をオンラインで計測しその情報を工程制御に利用することを主眼として取組んできた。実際の現場でのモニタリングを行い発酵中の酵母の挙動をとらえることができるようになったので、その制御を工学的に行うことを取組み始めている。現在のところリアルタイムの制御を構築するには至っていないが、温度を始めとする工程パラメータとの相関の把握、発酵工程の安定化、造り込みの制御のベースになる部分の検討を行っている。また誘電計測により得られる情報を利用することにより従来行えなかった制御を行うことが可能となる。たとえばビールの酵母添加プロセスに誘電センサーを組み込んだシステム⁷⁾を使用することにより、従来よりも高精度かつ酵母の状態(サイズ、死滅)を反映した適正な酵母添加が可能である。ワインや焼酎、日本酒⁸⁾などの酒類やその他発酵食品、酵母菌以外にもカビ⁹⁾などもその応用範囲で、また固形培地への利用も可能であるので十分に誘電測定の特性を引き出して、応用を図ることによりプロセスの制御を行うことができると考えている。

文 献

- 1) Asami, K.: *Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ.*, **55**, 394 (1977).
- 2) Kell, D. B. *et al.*: *Trends in Analytical Chem.* Vol. 9, No. 6, p. 190 (1990).
- 3) Mishima, K. *et al.*: *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 291 (1991).
- 4) 米澤岳志, 小柳尚彦: *食品と化学*, No. 9, p. 97 (1995).
- 5) 日本ヒューレット・パッカード(株) HP ソリューション・ノート E5050-1.
- 6) Asami, K. and Yonezawa, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1245**, 278 (1995).
- 7) 日本アルファ・ラバル(株) Dynapitch 技術資料.
- 8) 上村太郎ら: *日本農芸化学会大会講演要旨集*, p. 347 (1997).
- 9) Higashiyama, K. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **65**, 537 (1999).

糸状菌培養プロセスの菌体濃度オンライン計測

塩谷 捨明*・Somchai Krairak・山村 幸司・中嶋 幹男・清水 浩

本研究室で保有する *Monascus* sp. KB20M10.2 は、キャッサバデンプンと大豆粉からなる安価な培地において黄色色素を生産するが、その生産性は培養状態に大きく

依存している。この培養状態を最適化するためには、プロセスの状態を把握する必要があるが、*Monascus* などの糸状菌培養プロセスにおいては、重要な状態変数である

*著者紹介 (代表) 大阪大学大学院工学研究科応用生物工学専攻(教授)

〒565-0871 吹田市山田丘2-1 TEL. 06-6879-7444 FAX. 06-6879-7444 E-mail: shioya@bio.eng.osaka-u.ac.jp

菌体濃度をリアルタイムで計測することが可能なセンサーがない。細菌や酵母などの培養において広く利用されているレーザー濁度計は、糸状菌の作るペレットを含む培養液では大きなノイズを生じ、実用的ではない。

近年、電気物理的な測定により得られる誘電率と生細胞の濃度に相関があることが示されている。¹⁻³⁾ この測定法は、生細胞の構造が電解質である細胞質が絶縁体である細胞膜によって覆われていることを利用しており、培養液中に存在する固体や死細胞などの影響を受けにくい特徴を有している。したがって、誘電率を用いることで、レーザー濁度計などの光学的計測法では不可能であった糸状菌培養プロセスのオンライン菌体濃度計測が可能になると考えられる。

本報告では、新しく開発された殺菌可能なコロイド誘電プローブを用いた *Monascus* 菌体濃度のオンライン計測にもっとも適した条件を明らかにし、⁴⁾ その適用限界について述べる。

実験方法

使用菌株 *Monascus* sp. (KB20M10.2) を使用した。
測定方法

- ①菌体濃度（乾燥菌体重量法） 20ml 程度の培養液をガラスファイバーフィルター AP20（Millipore 社製）で吸引ろ過し、蒸留水で数回洗浄した後、80°C の乾燥機で48時間乾燥させ、重量を測定した。
- ②オンライン菌体濃度 HP E5050A コロイド誘電プローブ、HP E4285A プレシジョン LCR メーター、HPE2120C HP VEE for Biochem（すべて Hewlett Packard 社製）を用いて、周波数を 75 kHz から 1.1 MHz の間で変化させ、各周波数ごとに20回誘電率を測定し、その平均値を計算した。なお、一般に「誘電率」といった場合、物質の誘電率 ϵ と真空の誘電率 ϵ_0 ($=8.854 \times 10^{-12}$ (F/m)) との比 (ϵ/ϵ_0)、比誘電率 ϵ_r のことを指す場合が多い。本報告中においても、比誘電率 ϵ_r のことを単純に誘電率として用いている。

実験結果および考察

誘電率測定に最適な測定条件の検討 オンラインで菌体濃度を計測するには、培養槽に直接誘電プローブを取り付け、連続的に誘電率を計測するのが、もっとも普通の方法であり、我々もこの方法の採用を試みた。対象とする培養は好気培養であり、エアレーション、攪拌条件などの培養操作条件、また培養中に変化する培養環境の条件変化が誘電率計測に及ぼす影響を充分検討して、

最適な計測条件を求めておく必要がある。

まず最初に 5 l ジャーフェーマンターを用いて、培養槽に直接取り付け付けたプローブで誘電計測した。このとき本培養は 0.75 vvm で曝気を行っているが、いかなる曝気条件でも安定した計測値は得られなかった。これは曝気による気泡が菌体に付着し測定対象の液容積減をもたらし、攪拌によりこの値が変動するため測定値が大きなノイズをもたらす結果と考えられた。したがって、誘電率測定時には曝気をいったん止め、攪拌により菌体の沈降を防ぐような、計測タイムを設ける必要のあることが分かった。このような計測方法を採用にしても、測定における最適な交流電圧の周波数、培養槽の攪拌回転数を決定する必要がある。特に、攪拌回転数が大きすぎると気泡を生じ、それがノイズの原因となるし、小さすぎると、ペレット状の菌体が沈降するため、菌体の分散状態が悪くなる。そこで *Monascus* sp. の回分培養において、時間ごとに攪拌回転数が 100 rpm, 150 rpm, 200 rpm, 250 rpm の誘電率の測定とサンプリングを行い、別に求めた乾燥菌体重量と誘電率についての相関について調べた。その際、ノイズの大きさを表す s/n-ratio（誘電率の平均値/標準偏差）を使用した。

誘電率測定に最適な周波数の決定 ここではまず、周波数の影響を調べた。5 l ジャー培養において最大菌体量に達した後の、培養開始後 83 h および 106 h の s/n-ratio と周波数の関係を調べた。全体的にばらつきがあるが周波数が 200 kHz から 400 kHz の間の時に s/n-ratio が大きい値（相対的にノイズが小さい）をとり、測定にとってより好ましいことが分かった。

一般に交流電圧の周波数を低い方から高い方に変化させていくと誘電率が減少する。これは誘電緩和現象といわれる。この現象は高周波領域では電圧変化が速いため、イオンの移動がこれに追従できず分極の程度が減少するために起こるが、測定周波数が高すぎると分極の程度がきわめて減少し誘電率が小さな値になる。このため標準偏差値自体も小さくなるが、誘電率の値が小さいため、わずかな値のばらつきが大きな測定誤差を生じさせる。一方、イオンの移動速度に比べて電圧の変化が十分遅い低周波領域では分極の遅れがほとんどないため直流電流と同じように分極し、誘電率自体は大きな値をとるが、ジャーフェーマンター内の菌体濃度が完全に均一ではないため測定値に大きなばらつきが生じ標準偏差の値が大きくなる。そのために測定誤差が大きくなる。結局、誘電率の値の大きさと、測定誤差のバランスがとれている 184 kHz から 400 kHz の間が測定に最適な周波数である

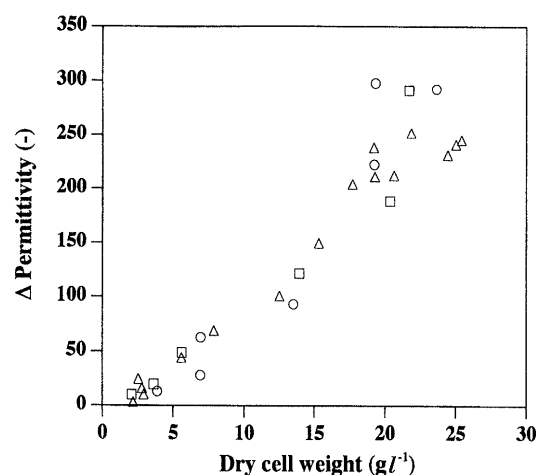


Fig. 1. Relationship between dry cell weight and permittivity of various *Monascus* cell morphologies, such as medium pellet (○), fine pellet (□), and mycelial form (Δ) at 184 kHz.

と考えられ、以後特に断らない限り 184 kHz を用いた。

誘電率の測定に最適な撹拌回転数の決定 周波数 249 kHz における、安定した菌体量の得られる培養開始 60 h (定常期前半), 106 h (定常期中盤), 120 h (定常期後半) の s/n-ratio と撹拌回転数 100 rpm, 150 rpm, 200 rpm, 250 rpm の関係を調べた。これより、撹拌回転数 150 rpm から 200 rpm を頂点とする山型になっていることがわかる。これは撹拌回転数が低いと菌体の一部がジャーフェーマンターの底に沈殿して、ジャーフェーマンター内の均一性が低下するために誘電率の測定値にばらつきがでてくるためと考えられる。逆に、撹拌回転数が高すぎると菌体の均一性は増すが、表層の空気を液中に巻き込むため、結果としてジャーフェーマンター内の均一性が低下するためと考えられる。また、同じ菌体量であっても、定常期の前半、中盤、後半によって、若干最適な撹拌回転数が異なり、培養槽内の粘性の高い中盤では少し高い撹拌回転数が最適であり、若干粘性の落ちる前半および後半においては、少し低い撹拌回転数が最適であった。以上より、誘電率の測定に最適な撹拌回転数は、培養時間により若干異なるが 150 rpm から 200 rpm だと考えられる。この傾向は、測定周波数 184 kHz から 400 kHz の間では変わらなかった。

誘電率計測に及ぼす培養条件の影響 回分培養中は、pH 制御をしないと、pH は対数増殖期の 5 付近から静止期の 7.5 付近まで上昇し、また培養後期には黄色色素の蓄積、培地成分の変化が起こる。このような培養環境の変化に対する誘電率の影響を調べておく必要がある。

pH 変動に対しては、pH 5 から 8 までの間で、同一サ

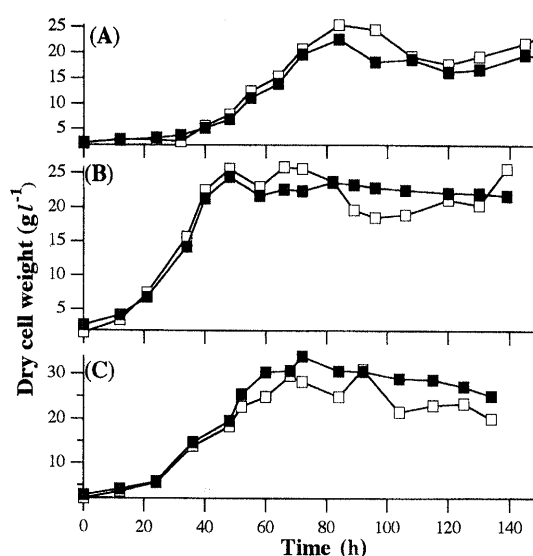


Fig. 2. A comparison between cell concentration obtained by direct measurement of dry cell weight and that obtained by capacitance probe at 184 kHz. (A) Growth of *Monascus* in mycelial form when 3% of homogenized inoculum and cultivated at 500 rpm agitation speed, 0.75 vvm aeration and 28°C. (B) Growth of *Monascus* into predominantly fine pellet form using 3% of the rotary-prepared inoculum type and the cultivation in a 5-l jar fermentor was run at 600 rpm agitation speed, 0.75 vvm aeration and 28°C. (C) Growth of *Monascus* into predominantly medium pellet form using 3% of the reciprocal-prepared inoculum type and cultivated in a 5-l jar fermentor carried out at 500 rpm agitation speed, 0.75 vvm aeration and 28°C. □ and ■ indicate the cell concentrations of *Monascus* by dry cell weight measurement and by permittivity measurement, respectively.

ンプルに対する誘電率計測値に大きな差はなかった。また、食塩濃度にして 0~0.23 M の間で差はなかった。黄色色素の蓄積に対しても、その影響は無視できる程度であった。³⁾

異なる菌体形状における誘電率の測定 糸状菌である *Monascus* sp. は培養条件によって大小のペレットを形成する。そこで、異なる形状の菌体の培養を行い、その誘電率を測定し、乾燥菌体重量との相関について調べ、菌体形状の違い、大きさが誘電率測定においてどういう影響を与えるかについて検討を行った。

直径 1~2 mm 程度の小ペレット、直径 3~5 mm 程度の大ペレットを 500 ml フラスコを使用して、小ペレットは往復型振盪機、大ペレットは回転型振盪機により培養した。菌糸体は前培養後の菌体をホモジナイズした後、5 l ジャーフェーマンターに植菌し培養した後集菌した。これらの菌体について、乾燥菌体重量と誘電率の関係を Fig. 1 に示す。図には、対数増殖期、静止期の菌体のデータも載せている。この図から分かるように、対数増殖期であれば、菌体形状に関係なく乾燥菌体と誘

電率には同一の相関関係が成立し、誘電率計測値から乾燥菌体重量が予測できる。

誘電率計測による培養経過のモニタリング 前培養条件を変えることによりさまざまな形態の菌体を培養することができる。Fig. 2はこのようにして培養した菌体濃度を、今まで述べてきた計測方法による誘電計測値から予測できるかを検討したものである。図から、対数増殖期においてはどのような形態であっても十分な精度で予測できることが分かる。しかし、静止期に入り死滅菌体が含まれてくるようになると、その相関はやや悪くなってくる。これは誘電計測の特徴でもある、誘電率は乾燥菌体量だけではなく菌の生理活性の状態を反映することを示している。すなわち、誘電計測の方が真に活性のある菌体量を代表しているとも言える。

以上、誘電率測定において測定条件さえ整えれば、菌体形状の相違は測定に影響を及ぼさないと考えられる。

お わ り に

本報告では、誘電率の測定を行うことによって、従来不可能であった糸状菌菌体濃度のオンライン計測システムが構築できることを示した。糸状菌の場合、酵母菌のように菌体形状が均一でないため、この中心の穴付近の菌体濃度が絶えず変化する。そのため誘電率測定の際、エアレーションを止め、適度な攪拌によって培養槽内の菌体を均一な状態に保つことが不可欠であり、菌体が完全に電離してしまうような周波数では測定誤差が大きくなるため、適度に菌体が電離する周波数を選択する必要がある。さらに、培地内に気泡が存在すると均一性が著しく低下するため、通常培養時のように、高回転で攪拌し通気も行う条件での測定は、誤差が大きく不可能と考えられる。今回は、1つの周波数に対して、20回の誘電率測定を行った。この測定回数を増やすことによって測定値の正確さが増すと考えられるが、エアレーションを止めるため、本培養への影響を極力抑えるためには、この程度の測定数にせざるを得なかった。結局、*Monascus* sp. のような糸状菌においても、測定条件さえ整えれば、誘電率測定によって、対数増殖期の菌体濃度のオンライン計測が可能であると考えられる。また、原料中に非溶解性固形成分を含む場合も乾燥菌体濃度にかわって有効な菌体濃度を計測できると考えられる。

現在、この方法によって菌体濃度をオンライン計測し、菌体濃度の情報を用いて比増殖速度一定の流加培養を精度良く実現できることがわかっている。この流加培養によれば、最適な比増殖速度の選択によって、回分培養に比べて色素生産量を倍加することができる。このように、誘電率計測による糸状菌菌体濃度測定法は幅広い応用が期待される。

文 献

- 1) Asami, K. *et al.*: *J. Membrane Biol.*, **28**, 169 (1976).
- 2) Mishima, K. *et al.*: *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 291 (1991).
- 3) Asami, K. and Yonezawa, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1245**, 99 (1995).
- 4) Krairak, S. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **69**, 115 (1999).

誘電率計測による酵母細胞分裂サイクルのモニター

浅見 耕司

細胞増殖機構の解析や細胞周期に依存した現象の研究に同調培養法は不可欠である。この方法では、細胞が細胞周期のどの時期にいるのかを知ることが大変重要である。このために、フローサイトメトリーを利用した、細胞のDNA含量の分布を調べる方法が最近よく用いられている。また、酵母のように形態的に細胞周期時期を特定できるものであれば、顕微鏡観測により出芽率（出芽酵母）や隔壁形成率（分裂酵母）から細胞周期時期を決定することができる。しかし、これらの測定には細胞の採取、測定のための前処理、細胞の計数などが必要であり、時間や手間がかかるため、リアルタイムで情報を得ることは困難である。そこで、誘電計測法による同調増殖のリアルタイム・モニター¹⁾を試みたので紹介する。

本題に入る前に細胞の誘電計測の原理を簡単に説明する。生物細胞の懸濁液に交流電場を与え、誘電率をラジオ波と呼ばれる周波数領域 (1 kHz-100 MHz) で測定すると、一般に Fig. 1 に示すような誘電率のスペクトル（誘電緩和または誘電分散）が見られる。²⁻⁴⁾ これは界面分極による誘電分散といわれるもので、次のように説明できる。細胞は導電性の細胞質が電気抵抗の高い細胞膜で覆われたものとみなせるので、等価回路で表すとあらまし抵抗（細胞質）とコンデンサー（細胞膜）の直列結合となる。電場を与えることによりコンデンサーが充電され、細胞は見かけ上大きな等価誘電率（比誘電率にして1000のオーダー）を持つことになる。また、抵抗とコンデンサーで決まる時定数（緩和時間）を持つので、交流

著者紹介 京都大学化学研究所（助教授）

〒611-0011 宇治市五ヶ庄 TEL. 0774-38-3081 FAX. 0774-38-3084 E-mail: asami@tampopo.kuicr.kyoto-u.ac.jp