

酵母菌の増殖・発酵過程の電気抵抗変化の起因 ——有孔膜隔離の2槽セルでの分離培養の場合——

嶺田正路*・蛭名良雄**・橋本 基**

Origin of Resistance Change in the Growth and Fermentation Process of Baker's Yeast ——Cultivation in Two Compartment Cells Separated by Nuclepore Membrane——

Masamichi EKIDA, Yoshio EBINA and Hajime HASHIMOTO

Abstract

The purpose of this paper is to make clear the origin of electrical resistance change in the growth and fermentation process of baker's yeast. Culture cells are freshly made in order to cultivate yeast in one compartment while keeping yeast free from the other compartment. The two compartments CH1 and CH2 are separated from each other by a nuclepore membrane with about 1 micron pore size. CH1 is the cultivation cell, and CH2 is used to monitor the resistance change in the solution ions due to the components diffusing through the intermediate membrane. The electrical resistances R1 and R2 of CH1 and CH2, respectively, are simultaneously measured by four electrodes. To see the role of carrier ion components; yeast extract (YE) and glucose (GL), added in the typical broth (GPYE), are changed as parameter components. The time course of R1 is similar to the present author's previous result. This indicates that R1 originates dominantly from a large yeast cell body which works as a scatterer of carrier ions in the earlier period of growth, and this supports the mechanism previously proposed by us. However, contrary to our conjecture, R2 increases in all steps of the growth and fermentation process. This increase can not be understood from our previous mechanism of resistance decrease. Experiments using base type solution, except for important nutritional YE and involving GL, are carried out. This time, R1 and R2 decrease during all periods of cultivation. From the findings mentioned above, we propose that the change of carrier ion components affect R1 and R2 more than the conversion of GL to ethanol in the fermentation process. Furthermore, we insist that the change of carrier ion components are important for the resistance change even in the growth stage.

1. はじめに

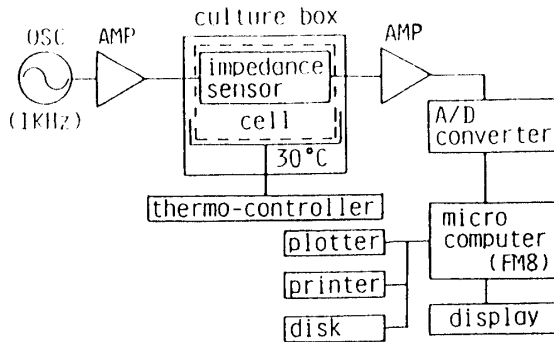
筆者らは前報¹⁾で、酵母菌の増殖・発酵過程における

電気抵抗（我々が従来用いている4電極法で測定されるのはインピーダンスというより、ほぼ純抵抗と考えられる。そこで本論文では、抵抗と表記する。以下Rと略記する。）、濁度、pHの同時測定の結果及び考察を報告した。この計測法の菌体量モニタへの応用を考えた場合問題となるのは、酵母菌と培養液が混った状態

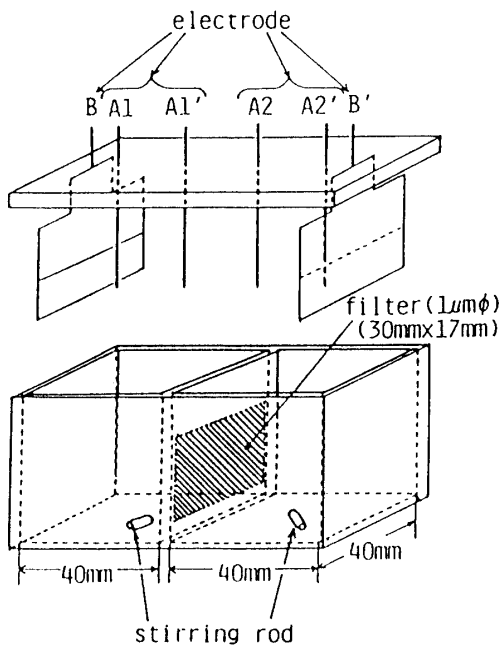
*大学院電気工学専攻

**電気工学科

の1槽容器で行なっている点である。これでは因子が多過ぎて、菌体量が計測されたRとどのような関係があるのか明白にしにくい。そこで、我々は、培養液は自由に透過するが菌体は通さないフィルターを中間に入れて分離した2槽の培養セルを作成し、片方の槽のみに酵母菌を接種し、2槽のRを同時に測定することによって、菌数増加(菌体量増加)によるRの変化と培養液成分(あるいはキャリアイオン)変化によるRの変化を分離することを考えた。得られた結果は、菌を含む槽(チャンネル1, 以下CH1)において増殖・発酵過程が進行している場合、菌を含まない槽(チャンネル2, 以下CH2)のRは、予想に反し、減少傾向を示さなかった。



(a) The block diagram of the experimental system



(b) Arrangement of cultivation cell and electrodes

A1, A1', A2, A2': platinum wire(0.7mmφ)

B, B': stainless steel plate(35mm×15mm)

Fig. 1 The experimental system and cultivation cell

本報告の目的は、2槽培養容器の試作と、それぞれのRの同時計測、そして、CH1, CH2の培養液のRの変化を、培養液のイオン組成の変化(あるいは等価的なキャリアー数、移動度などの変化)及び、散乱体としての菌体量増加などで説明を試みることにある。

2. 実験方法

2.1 計測システム

前報^{1,2)}で用いた計測システムを用いたが、少し変更した所があるので、Fig. 1(a)にそのブロック図を再記する。RはCH1及びCH2中での電位差として検出する。その信号は、増幅器、A/D変換器を通してマイクロコンピュータ(FM8)に取り込み、ディスクにデジタルデータとして保存し、必要に応じて、コンピュータに取り込み処理した。なお、A/D変換データ(8ビット)をコンピュータに取り込む際、偶発ノイズ、攪拌ノイズ除去のため次の工夫をした。1分間に取り込むデータ100個のうち最大値・最小値からそれぞれ30個までを除去し、残りの40個を加算平均し、その平均値を5分ごとに更に加算平均した。培養セルは温度コントローラで30±0.1°C一定に保った。各槽の培養液(20ml)は約40分で温度一定となる。

培養セルとR測定用電極をFig. 1(b)に示す。培養セルは、酵母菌(約4×5μm)が通過できないように有孔膜(図の斜線部、ニュークリポア・コーポレーション社製、ニュークリポア膜メンブレン45mmφディスクタイプ、孔径1.0μm)で2槽に分離した。片方の槽(CH1)には酵母菌を接種した培養液、他方の槽(CH2)には酵母菌を接種していない培養液を、それぞれ20ml入れ、20時間連続培養した。培養後に、CH2の培養液に酵母菌がほとんど入っていないことを光学顕微鏡下で確認した。

Rの計測は、Fig. 1(b)に示すように我々が従来用い、その精度を確認している4電極法³⁾の変形で行なった。発振器から1KHzの正弦波電圧を49.9KΩの定抵抗を通してほぼ定電流(0.14mA)とした後、1対の板状電極(B-B')を通して培養液に流す。培養液の抵抗は、大きい場合でも100Ω程度であるので、理論的にこの方法ではほぼ定電流となる。2対の電極間(A₁-A₁', A₂-A₂')でCH1, CH2, 両槽のRに比例する電位差(v(t))を測定した。データ表示は、時刻t=0での初期値をv₀とし、v(t)の変化量をv₀に対して%表示した。つまり、

$$(v \text{ の変化量}) = (v(t) - v_0) / v_0 \times 100 \quad (1)$$

であり、v(t)=R(t)×I(I:定電流値)であるので、これは時刻tでのRの変化率(以下R%と略記)を示すこ

となる。それぞれの電極は、液面変化の影響を抑えるため、一部を残して (A-A': 下から3mm, B-B': 35mm×15mm) エポキシ樹脂系接着剤で被覆した。又, CH1, CH2各槽には、マグネット攪拌子を入れ、培養中常に攪拌した。

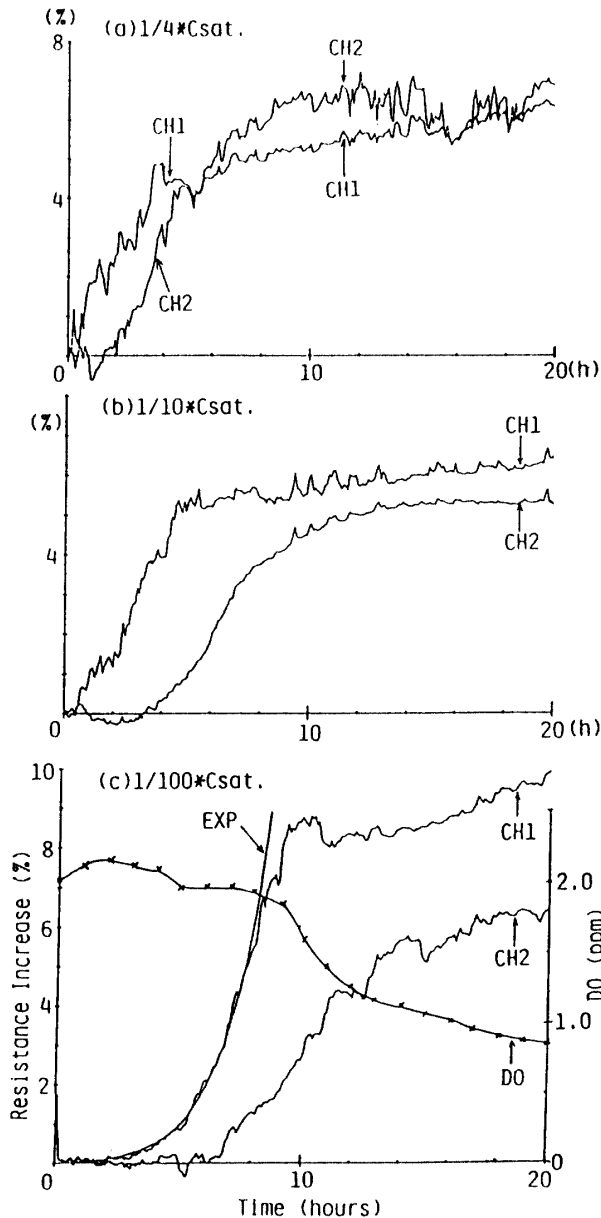


Fig. 2 Time course of resistance change in the compartment 1(CH1) and compartment 2(CH2).

Baker's yeast is cultured in CH1. Cultivation broth (GPYE) involves glucose (50 g/l), peptone (1 g/l), NaCl (3 g/l), $MgSO_4$ (0.4 g/l), $(NH_4)_2SO_4$ (1.3 g/l), yeast extract (6 g/l), and distilled water. The initial yeast concentration of (a), (b) and (c) are 1/4, 1/10 and 1/100 of C_{sat} , respectively. Do means the oxygen gas in the solution.

2.2 培養

実験で使用した菌は, *Saccharomyces cerevisiae*, いわゆるパン酵母であり, 培養液は, Glucose, Pepton, Yeast extract, NaClなどを含むGPYE液¹⁾及び, Glucose, NaClを含むBase type培養液である。培養実験では, 菌発育の初期状態をそろえるため, 菌をGPYE液で一夜培養 (20時間) し, 停止期の状態となった溶液を飽和菌濃度 (C_{sat} と略記)の溶液とした。この溶液を片方の槽 (CH1)に入れ, CH1, CH2共に20mlにする。なお, CH1, CH2にはあらかじめ希釈培養液が入っている。そしてセル内の温度がほぼ平衡状態になった後 (40分後) に測定を開始した。

3. 結果及び議論

3.1 酵母菌の増殖・発酵過程の抵抗変化

3.1.1 増殖・発酵過程 (初期菌濃度を変えた場合)

Fig. 2(a), (b), (c)に, GPYE液を培養液とし, 初期菌濃度を C_{sat} の1/4, 1/10, 1/100とした時のCH1, CH2のR%の時間経過の例を示す。Fig. 2(c)では更に, 同じ条件で実測したCH2の溶存酸素濃度 (DO) を×印で示した。菌体を含むCH1の槽に着目すると, Fig. 2(a), (b), (c)に共通するのは, 測定開始後Rが指数的な増加を始め, ある時間経過した後指数的増加が止まる点である。また, 初期菌濃度が小さい程立ち上がりやゆるやかで変化の急激な期間が長い。この挙動は, 前報²⁾のグルコース濃度が低い (50g/L以下) 場合とはほぼ同じである。培養初期では, 以前の研究^{1), 2)}により, (イ) 菌体量増加を表わす濁度の曲線とR%曲線との間に強い相関がある。(ロ) 遠心分離した菌体を適当量, NaCl水溶液に入れ濃度を変えてRを測定した結果, Rは菌濃度にはほぼ比例して大きくなる。という結果を得ている。なお, Fig. 2(c)に指数関数から得られる $e^{Kt}-1$ (変化率) を実曲線でプロットした。(K=0.042 (1/5分), tは5分を1とした。) これらより, 特にFig. 2(c)から, CH1のRの増加は, 菌体量 (菌体数) の増加が直接関与していることが推測される。

次に, 菌の入っていないCH2を見てみよう。予想に反し, どの初期菌濃度においても, CH1のRが増加し始めてある時間 ((a) 1時間, (b) 3時間, (c) 6時間位) が経過した後に増加し始め, 単調増加している。前報¹⁾の結果から予想されるのは, CH2では計測のどの時点でもRの減少が起ることである。

ここで, Fig. 2のCH1, CH2で得られるR%の時間経過の起因を考えてみよう。CH2のRに変化を与えるのは培養液中のキャリアイオンの電荷数, その数, 移動

度の変化である。すなわち、前報¹⁾の表2に示したRを増加、減少させる要因がCH1で考えられる。これらの変化のうち、CH1にある菌体が(a)イオン性栄養物を取り込むことによるキャリアイオンの減少、(b)Rを減少させるイオン性物質(酸性代謝物など)を放出することによるキャリアイオンの増加などが起こり、これらの影響がCH2に及ぶためであると思われる。すなわち、(b)より(a)の要因の影響が大きく、徐々にCH1のRが大きくなる。これと同時に(あるいは少し遅れて)CH2に元から存在していたGPYEが有孔膜を介して、CH1のRが大きな液と交換拡散し、しだいにCH2のRが大きくなってゆくものと思われる。しかし、この変化がCH2に目える程になるためには、CH1の菌体量が、指数増殖の後期になりある程度以上に増える必要があると思われる。従って、培養初期では、キャリアイオンの散乱体としての菌体量の増加によるRの変化だけが目に見える変化としてCH1に表われる。このように考えると、CH1に遅れてCH2でもRが増加することが理解できる。菌体の散乱効果によるRの増加が培養液組成変化の効果によるRの減少より大きいと仮定すると、CH1ではR%が正で大きく変わるが、CH2では、CH1に比べてR%値が小さくなっていることが、理解できる。

指数増殖後期では、Fig. 2(c)、DO曲線に見られるように、DOも少なくなり、発酵が始まると考えられる。前報¹⁾ではCH1のみに相当するデータからグルコースがエタノールに変換されることによるRの減少が大きく表われると考えていた。しかし、この記述は不十分なデータから速断した感がある。すなわち、以下に述べる事が考えられるのでR%の減少が、グルコースがエタノールへ変換される事によるとは言いきれない。それは、イオンが多数ある電解液中に絶縁物微粒子が入っているモデルを考えればよい。絶縁物微粒子のRが少し変化しても、それらの粒子間にあるRの十分小さい電解液のため、Fig. 1(b)の計測法ではRが大きく変化するとは考えにくい。むしろRが小さい電解液組成が少し変化することによる変化の方がより大きく表われると考えるのが合理的である。

3.1.2 Base type培養液中のRの変化

前報¹⁾で培養初期のR%が正で大きく表われるのは、イーストエキス(以後Y.E.と略記)による菌体量の増加によるものと考えた。このY.E.の存在が決定的な役割を演じていることは、Y.E.を含まない培養液で同様の実験を行ない、両者を比較することからわかる。そこで、本報告でも、これを確かめるため、同様の実験を行い、CH1、CH2のRの変化を見ることを試みた。

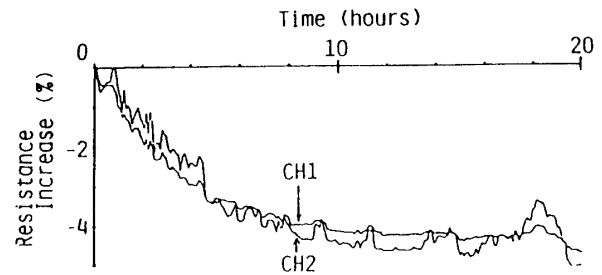


Fig. 3 The time course of resistance decrease in CH1 and CH2. Baker's yeast is cultured in CH1. The cultivation broth is a base type solution composed of glucose(50 g/l), MaCl(3 g/l), and distilled water. The initial cell concentration is 1/4 of C_{sat} .

Fig. 3に、培養がグルコース+NaCl溶液(Base type溶液)の場合について、初期菌濃度を C_{sat} の1/4とした時のR%の測定例を示す。CH1、CH2共に、ほぼ同時にほとんど同じ形でRが減少している。この状態での発酵過程では、濁度の同時計測から、酵母菌の増殖がほとんどないことを確認している。Y.E.がないため、酵母菌は呼吸、発酵を行ない、増殖は行なわない。従って、培養液中のグルコースは二酸化炭素とエタノールと水に変換されているものと思われる⁴⁾。この過程における変換では、エタノールはグルコースより幾分抵抗が小さく、二酸化炭素は水と反応して弱酸の炭酸イオンになり、Rが減少する。全体として見てもRは減少要因しかなく、何れにしても菌接種後、Rが減少するのは当然と思われる。Fig. 3の結果は、Fig. 2の増殖が飽和に近づいていると思われる培養後期でのRの変化と矛盾しているように見える。しかし、Fig. 2のR%の増加傾向は、DOが不足しているが、まだY.E.が残っているために、代謝によるキャリアイオンの増加(呼吸+発酵)があると共に、まだ菌が少しづつ増加してイオンを取り込むことによるキャリアイオン減少があるため、Rの減少傾向が大きく見られないと考えれば良い。この確認には、DOが減少した時DOを加え、菌の増殖が続くかどうかを確かめれば良いが、これはまだ確認実験を行っていない。

次に上記の仮説、すなわち、Rの小さい培養液組成成分変化と菌の増殖がR変化に効いていることを確かめるために、次節の実験を行なった。

3.2 培養液の成分を変化させた時の酵母菌の増殖・発酵過程のR変化

3.2.1 Y.E.の濃度を変えた場合

Y.E.は前述したように、菌の増殖に直節関与してい

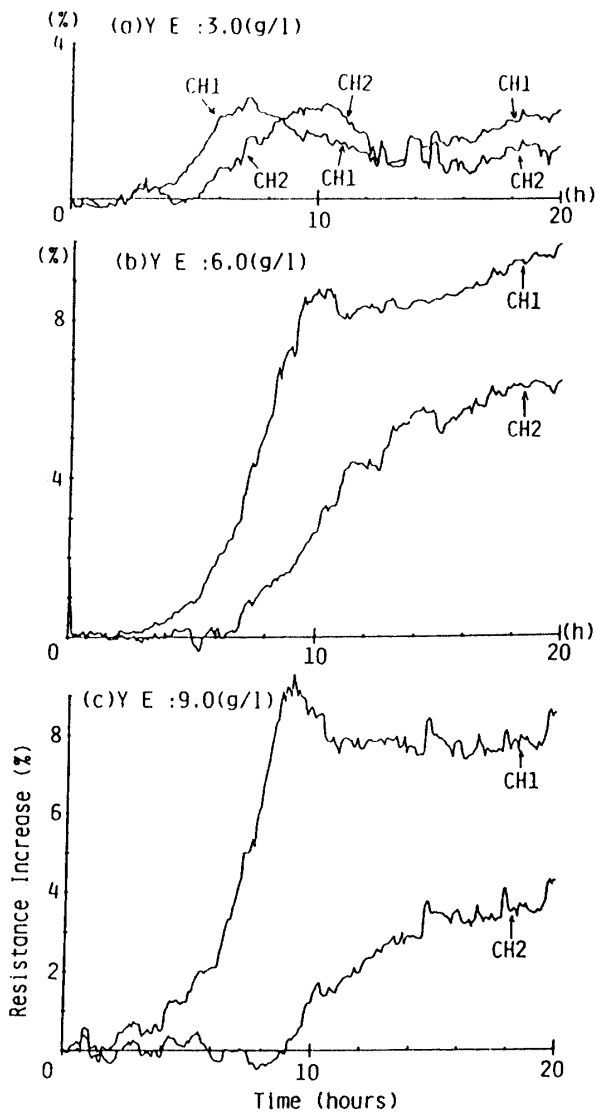


Fig. 4 The time course of resistance increase in CH1 and CH2. Baker's yeast is cultured in CH1. Cultivation broth (GPYE) is shown in the caption of Fig. 3 except for yeast extract. The concentration of yeast extract added in (a), (b) and (c) are 3, 6 and 9 g/l, respectively. The initial yeast concentration is 1/100 of C_{sat} .

るので、この成分の濃度を変えることにより、菌増殖の割合が変わってくるはずであり、菌の増殖がRの変化に効いてくるとしたらR%曲線が変わってくるはずである。Fig. 4(a), (b), (c)に初期菌濃度を C_{sat} の1/100とし、Y.E.の濃度をそれぞれ、3.0, 6.0, 9.0g/lとしたGPYE液を用いた場合の例を示す。CH1では、Y.E.濃度によらず、R%の変化速度はほぼ同じである。これは、CH1の菌体量の増加速度がほぼ一定であることを示していると思われる。CH1のR%の立ち上がりから、

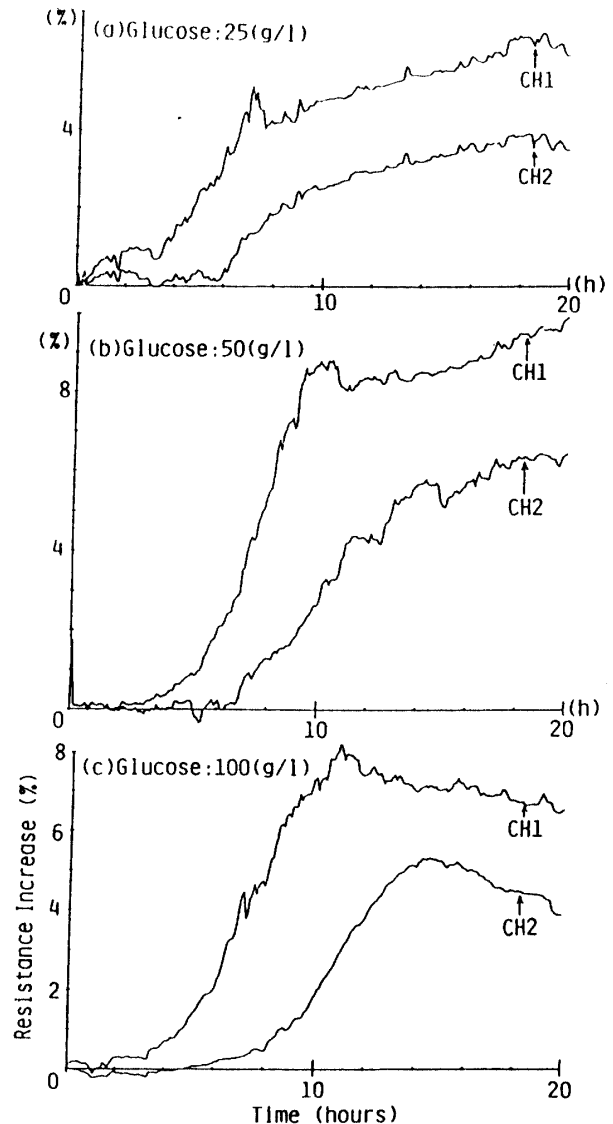


Fig. 5. The time course of resistance in CH1 and CH2. Baker's yeast is cultivated in CH1. The component of culture broth is the same as that in the legend of Fig. 2 except glucose. The glucose is a parameter is this case. (a), (b) and (c) correspond to the concentration of glucoses 25, 50 and 100 g/l, respectively. The initial yeast concentration is 1/100 of C_{sat} . Yeast extract is 6 g/l.

CH2のR%の立ち上がりまでの時間が、Y.E.濃度が大きくなるほど長い。これらは、Y.E.濃度が濃いほど、キャリアーイオンが多いことになり、菌によるCH1のイオン取り込みなどによるRの増加が、CH2で変化が目で見える程になるのに時間がかかるためとすれば理解できる。

3.2.2 グルコース濃度を変えた場合

グルコースは菌のエネルギー源となっており、前述

のように発酵状態では、間接的($\text{CO}_2 \rightarrow \text{H}_3\text{CO}_3$)、直接的(アルコールのRがグルコースより少し小さいこと)なR減少要因となる。グルコース濃度を変えた時、Rの減少がはたして見られるかどうかを見るために、Fig. 5(a), (b), (c)に、Y.E.を6.0g/l一定とし、グルコース濃度をそれぞれ、25, 50, 100g/lとしたGPYE液での初期菌濃度 $1/100C_{\text{sat}}$ の時の測定例を示す。(a),(b)はR%の絶対値の大きさを別にすると、CH1, CH2共に、ほとんど同じ時間変化を示している。しかし、(C)は培養後期でCH1, CH2共に減少している。これは、グルコース量が多いため CO_2 , エタノールの生成によるR減少要因が大きく表われたためとも考えられるが、グルコースが多過ぎるため、グルコースが分解される際に前2者と異った機構が働いたためとも考えられる²⁾。

4. まとめ

菌数の増加(菌体量増加)によるRの変化と培養液成分(あるいはキャリアイオン)変化によるRの変化を分離するために、我々は、菌体を通さないフィルターで分離された2槽培養セルを試作し、それぞれの槽のRの同時計測を行なった。その結果は以下に示す通りである。

- (1)酵母菌の増殖・発酵過程におけるRは、CH1, CH2共に増加傾向がある。CH1では培養初期にRの増加傾向が顕著であり、指数的に増加する。これは前報¹⁾²⁾とほぼ同じである。CH2では、CH1のRの指数増加後期にRが増加し始める。
- (2)酵母菌の増殖・発酵過程においてRの変化に影響を与える要因は次のように考えられる。CH1においては、(A)菌体が増加することによりキャリアイオン散乱効果が増大すること、(B)菌がキャリアイオンを取り込むこと、によるR増加要因、(C)酸性代謝物の増加(呼吸によるもの+発酵によるもの)、(D)グルコースがRの少し小さいエタノールに変換されることによるR減少要因、が考えられる。CH2においては、CH1における(A)の要因を除いた要因が挙げられる。
- (3)(2)の仮説を確かめるため次の実験をした。(イ)(A)、(B)を確かめるために、Y.E.濃度を変えて培養実験、

検討した。Y.E.濃度が濃くなるとCH1のR%変化速度は一定だが、R%がピークに達した時点でのR%の絶対値が大きくなる。これは、Y.E.濃度が大きいほど到達しうる菌体量が大きく変化することを示していると考えられ、以前の研究¹⁾も加え、これらは(A)の間接的な証拠になる。又、Y.E.濃度が大きいほどCH1のR%の立ち上がりからCH2のR%の立ち上がりまでの時間が長く、これは、(B)の間接的な証拠となる。(ロ)(C)を確かめるために、Base type培養液での培養実験とグルコース濃度を変えた培養実験を行なった。このうちBase type培養液での培養実験では、菌は呼吸・発酵だけを行っており、この状態では(C)の要因が主に働いていると考えられるが、CH1, CH2共に、ほぼ同時に同様に、Rは減少した。これは(C)の証拠になる。グルコース濃度を変えた培養実験では、(C)の証拠となるようなRの減少は明確には表われなかった。

以上、得られた結果、考察を示したが、R%挙動の起因追求はまだほとんど考察段階であり、問題点もまだ多数ある。例えばCH2のRが増加傾向にあることを、菌がキャリアイオンを取り込むことによるR増加要因の方が、菌がイオン性物質を放出することによるR減少要因より大きくRに反映されるためと仮定し説明したが、これは確認していない事項である事などである。今後、このような問題点を十分検討する必要がある。

最後に、本研究にあたり、卒業研究として実験を手伝って頂いた正木良明氏に謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) 三池秀敏, 三角博好, 有田英徳, 橋本 基, 蛭名良雄: 電子通信学会論文誌, J69-C No. 10, 1334-1340 (1986)
- 2) H. Miike, Y. Assashiba, H. Hashimoto and Y. Ebina: Jpn. J. Appl. Phys., 23, 386-387 (1984)
- 3) 橋本 基, 三池秀敏, 蛭名良雄, 宮地隆興: 医用電子と生体工学, 19, 1, 35-39 (1981)
- 4) 山口和夫, 山口辰良: “最新応用微生物入門”, 技報堂出版 (1980), p.76-89

(昭和62年4月15日受理)