

酵素反応におけるセンサを用いたガス産生判定の試み

北池 秀次¹、庄野 正行²

(徳島大学技術支援部¹、徳島大学大学院医歯薬学研究部 法医学分野²)

KITAIKE Syuji、 SHONO Masayuki:

Attempt to determine gas production using sensors in enzymatic reactions

Within the realm of gas production assessments, the Durham tube has posed a quandary, given its challenging propensity to ascertain both the opalescence of the solution and the minutiae of gas generated. In this scholarly endeavor, we embarked on an exploration of an uncomplicated, non-intrusive interface for discerning the fermentation state, incorporating sudachi, through the application of a gas sensor module.

1. はじめに

当研究会で以前にスダチの抗酸化力について報告¹⁾させていただいた。強い抗酸化能を持つスダチは、健康機能性だけでなく食品の素材開発として数多くの研究で報告されるようになり、酵母の増殖を阻害する²⁾とされている。微生物学の分野では、発酵によるガス産生を確認する実験器具として、ダーラム発酵管、キューネ発酵管等を用いてガス産性能を調べてきた。これまでガス産生試験において、ダーラム管は溶液の混濁具合や産生ガスが微量の場合は判定が難しいこと、キューネ発酵管は産生ガスと反応液がうまく分離せず発生気体を取り出し難いことが問題点として挙げられている。本研究ではガスセンサモジュールを活用し、スダチを添加した発酵状態を非接触で簡易的に判定するインターフェースを検討したので報告する。

2. 方法

(1) ガス産生検出用インターフェースの構築

ガスセンサモジュールは二酸化炭素及び総揮発性有機化合物を検出できる CCS811³⁾を使用し、試験管キャップを加工して設置した(図1)。

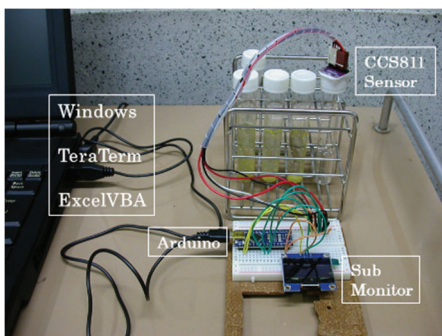


図1. ガス産生検出インターフェースの構成図

マイコンボードは Arduino を用いて WindowsPC と直接通信させ、ガスセンサモジュールで得られるデータの受信及び処理を行った。受信はターミナルエミュレーターの TeraTerm、処理は ExcelVBA を用いてガス産生を判定した。

(2) 器具及び供試菌、培地

供試菌はドライイースト 0.5g(日清)を用いて5%の懸濁液を調製した。培地は試験管にダーラム管を入れ、グルコース(和光)を基質として pH 指示薬の Bromothymol Blue(富士フイルム和光)を加え、2%の基質溶液とした。オートクレーブ(121℃、15分)で滅菌後、急冷してダーラム管の気泡を除去した。発酵に際し、添加する材料はスダチ 1g(徳島県産)を用いた。

(3) 酵素反応の確認

基質濃度及び温度を一定にして、供試菌とともに発酵させる添加物にスダチの外果皮を含む搾汁液、外果皮を含まない搾汁液を用いて発酵阻害作用を比較検討した。実験に際し、予めガスセンサモジュールの校正を行い、温度 28℃で1秒ごと3時間までのエタノール濃度及び二酸化炭素濃度を測定し、単糖類のグルコースによるエタノール発生速度と、従来の BTB 反応による pH 変化、試験管の気泡を併せて確認した。

3. 結果

酵母体内で、酵素複合体のチマーゼによってグルコースを二酸化炭素とエタノールへ分解する時に生じるエタノール濃度の経時変化を図2に示した。供試菌単

体では、3時間で3000ppbを超えて発酵が促進したが、スダチの外果皮を含む搾汁液を加えたものは、外果皮を含まない搾汁液よりもエタノール発酵が1/3程度抑制された。

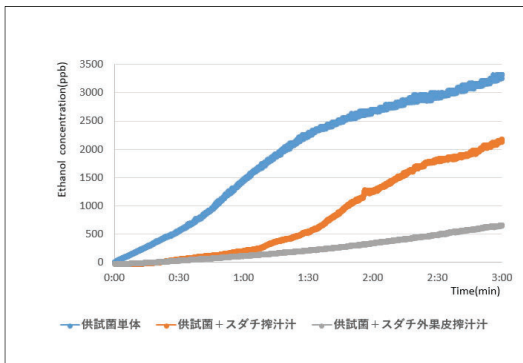


図 2. エタノール濃度の経時変化

酵素反応において二酸化炭素濃度は、エタノール発酵と同様にスダチの外果皮を含む搾汁液を加えたものは、外果皮を含まない搾汁液に比べ600ppm程度、二酸化炭素の発生が抑制された (図3)。

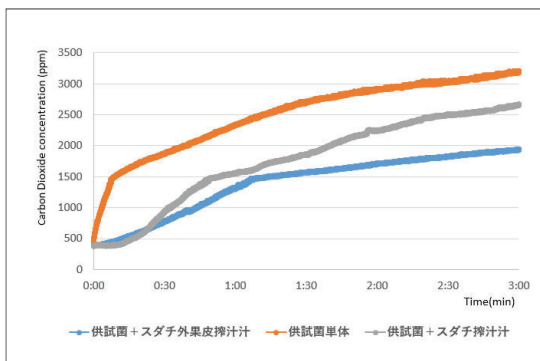


図 3. 二酸化炭素濃度の経時変化

図 4 はエタノール濃度の近似値をとったもので、スダチの外果皮を含む搾汁液を添加した時のエタノール発生速度は、0.0055 と顕著に値が小さくなっていった。

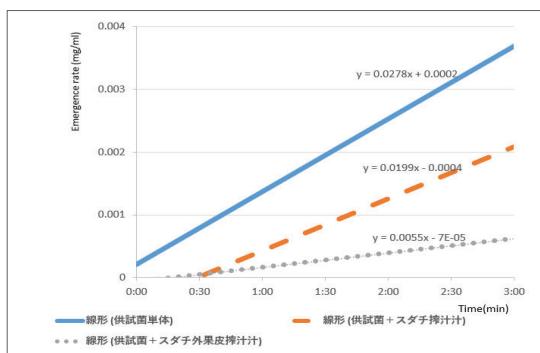


図 4. エタノール発生速度

BTB反応は、供試菌が放出した二酸化炭素により培地内が緑色から黄色へ変色し、pHが酸性となった。また、発酵の働きを気泡として観察できた。ダーラム管

は、基質濃度から24時間後には液体培地の上部へ浮上したが、スダチの外果皮を含む搾汁液(3)のダーラム管は浮上していない。しかし、ガスセンサモジュールは微量ガスを検出し、インターフェースは陽生と判定した (図5)。

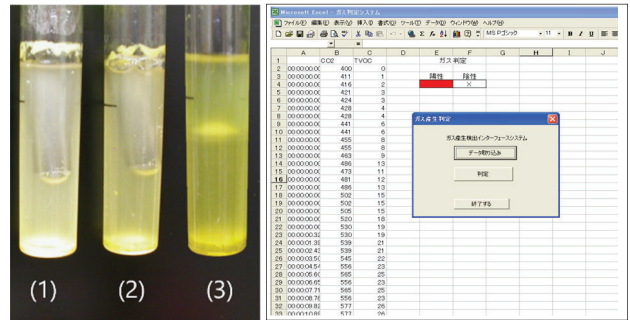


図 5. 供試菌単体 (1)、供試菌+スダチ搾汁液 (2)、供試菌+スダチ外果皮搾汁液 (3)、ExcelVBAによるガス産生判定

4. 考察

ガスセンサモジュールを活用したインターフェースを用いて、二酸化炭素濃度とエタノール濃度は同時間で上昇し、結果から相関があることを確認した。産生されたガスが微量の場合、これまでダーラム管では補足できず観察が困難であったが、本インターフェースでは微量の浮遊ガスでも明瞭に判定することができた。また、スダチの外果皮成分は、発酵を阻害することが改めて示唆された。

このようなガスセンサモジュールを用いたインターフェースは、酵素反応の判定を容易にすることが可能となった。今後、例えば酵素抑制剤の開発を検討する際、発酵食品に加えて発酵度合いを細かく調整できることで、発酵食品の機能性に繋がることを期待される。

参考文献

- 1) 北池秀次、庄野正行 (2020) 蛍光顕微鏡を用いた簡易抗酸化力評価の検討 生理学技術研究会報告 第 42 号 : 88-89
- 2) 日本政策金融公庫 (2012) すだちワインの開発技術の窓 No.1866
- 3) KS2002 EASY Plug CCS811 CO2 Air Quality Sensor Keyestudio Wiki
- 4) 柳内敏靖、他 (1993) 製麴における炭酸ガスの影響 J. Brew. Soc. Japan Vol.88 : 471-481
- 5) 梅野豊明、鈴木 与 (1962) 米麴の製麴時における炭酸ガスの発生量について 日本醸造協会雑誌 57 巻 2 号 : 171-175