

修士学位論文要約（令和 4 年 3 月）

温度制御機構を有する LAPS 測定システム の開発と微生物代謝測定への応用

渡邊 翼

指導教員：吉信 達夫， 研究指導教員：宮本 浩一郎

Development of LAPS Measurement System with Temperature Control and Its Application to Measurement of Microbial Metabolism

Tsubasa WATANABE

Supervisor: Tatsuo YOSHINOBU, Research Advisor: Koichiro MIYAMOTO

In recent years, due to the internationalization of the market and the growing consumer awareness of food safety, food testing and inspection have been carried out in various situations. The basic method for quantitative measurement of bacterial count is the agar culture method, but it requires a long time for testing. Therefore, we focused on the measurement of pH change caused by microbial metabolism using a chemical sensor as an alternative to the agar culture method. In this study, we developed a LAPS measurement system with a temperature control mechanism to measure cell metabolism while controlling the temperature of the sample and we succeeded in in-situ observation of measurement of the metabolism of *E. coli*.

1. はじめに

近年、食品の安全性に対する消費者意識の高まりにより、さまざまな場面で食品の試験検査が実施されている。1) 菌数の定量測定では寒天平板培養法が多く採用されているが、培養に長時間を要するため検査法の迅速化が求められている。そこで寒天平板培養法に代わる検査法として化学センサを用いた微生物の代謝活動による pH 変化の計測に着目した。

従来の LAPS 測定システムには温度制御機構がなく、測定システム外の恒温槽などに試料を保管しながら実験を行っていた。そのため、恒温槽から実験システムへの移動中における不純物の混入に注意する必要があった。さらに、培養中の変化を測定することができないという課題があった。そこで本研究では試料溶液の温度制御をしながら細胞の代謝を測定するために、温度制御機構を有する LAPS 測定システムを開発した。

2. 原理

2.1 LAPS

LAPS(Light-Addressable Potentiometric Sensor)と呼ばれる半導体センサは測定領域における溶液の水素イオン濃度 (pH) を測定することができるデバイスであり、LAPS は、電解質溶液、絶縁層、および半導体で構成される EIS 構造を有している(図 1)。半導体であるシリコン基板裏面に形成されているオーミックコンタクトと電解質溶液中に設置された参照電極との間にバイアス電圧を印加し、センサ裏面に変調

光を照射すると、外部回路に交流光電流が流れる。

交流光電流は印加するバイアス電圧に伴い変化するため、電流-電圧特性(*I-V*特性)は曲線を描き、絶縁層であるシリコン窒化膜(Si_3N_4)は pH 応答性を示すため、*I-V*特性曲線は溶液の pH に応じてバイアス電圧軸方向にシフトする。

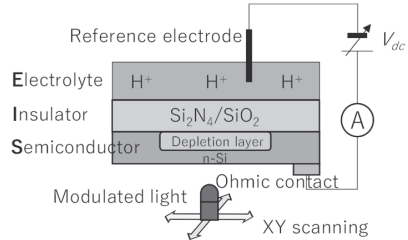


図 1 LAPS の模式図

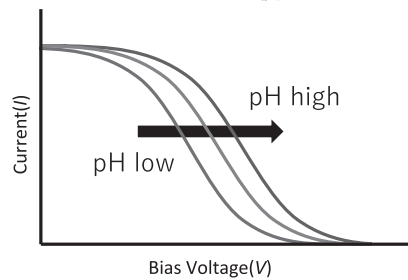


図 2 *I-V* 特性曲線

2.2 温度制御機構

測定溶液の温度制御の方法として、本研究で温

水の熱を利用した。本研究で構築した温度制御機構を図3に示す。温水の熱を利用して、試料溶液と試料溶液と接する空間は加熱され、測定溶液の温度は制御される。温水は温水プール内に設置したヒータで温度を一定にし、シリコンチューブを通してポンプによって送液する。温水プール内に設置してあるヒータは、ヒータ制御回路を介してLabVIEWのプログラムにより通電を制御する。

測定溶液の温度と温水の温度を熱電対で1秒おきに測定する。測定した試料溶液と温水の温度が設定温度より低い場合のみヒータONとなり、それ以外の条件では全てOFFとなる。

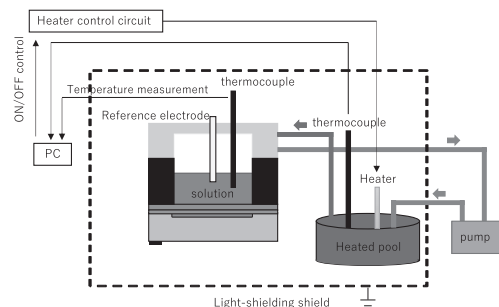


図3 温度制御機構

3. 実験

3.1 温度制御機構の性能

図3の温度制御機構の性能を評価するため、温度制御機構を24時間稼働させた。設定温度は表1に示す。

表1 設定温度

Set temperature of the solution °C	28	32	37	42	47
Set temperature of hot water °C	29	38	48	58	67

3.2 大腸菌の代謝測定

試料溶液の温度が高い状態で24時間にわたって*I-V*特性曲線を取得すると、時間経過にしたがって変曲点バイアス電圧にドリフトが存在した。そこで差分によるドリフトの校正を行うために、2つの試料溶液部を有する差分測定用溶液セルを作り、左溶液セルに大腸菌を含まない培養液を、右溶液セルに大腸菌を含む培養液を入れた。

測定溶液の温度を36°C、37°C、38°Cに制御し、24時間にわたって1時間おきにそれぞれの溶液セルで*I-V*曲線を測定し、その変曲点シフトを計算した。

4. 結果

試料溶液の温度測定結果を図4に示す。本温度制御機構はそれぞれの設定温度で±1°Cの範囲で

試料溶液の温度制御を行うことができた。

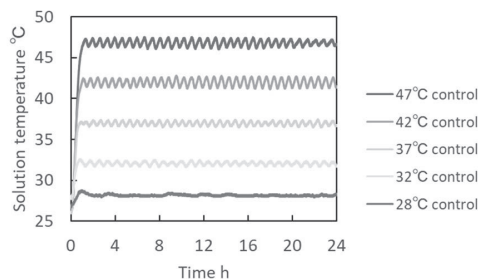


図4 試料溶液の温度変化

取得した*I-V*特性曲線から算出した変曲点バイアス電圧シフト量の差分を図5に示す。試料溶液の温度を37°Cで制御を行った時が最も変曲点バイアス電圧の低下速度が大きく、低下量も多かった。大腸菌は37°Cで培養を行った時が最も活発に代謝活動を行うと言える。また、36°Cよりも38°Cの方が変曲点バイアス電圧低下時の傾きの絶対値が大きく、最小値も小さくなった。つまり、大腸菌の培養に適した温度は37°C>38°C>36°Cであるとと言える。

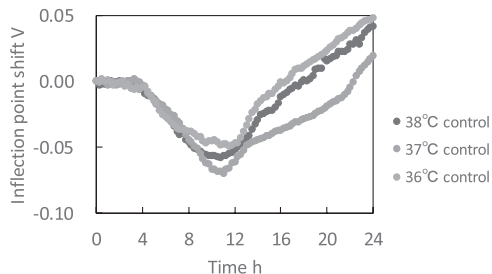


図5 変曲点バイアス電圧シフト量の差分

5. まとめ

本研究で、温度制御機構を有するLAPS測定システムを開発した。本研究で開発したLAPS測定システムは、溶液の温度を制御しながら大腸菌の代謝を測定することができ、培養中の大腸菌の代謝活動の観測が可能になった。さらに、本研究で開発したLAPS測定システムを用いて培養温度が1°Cだけ異なる場合の、大腸菌の代謝活動の違いを観察することができた。

文献

- 1) 田中庸行, ”食品微生物検査の信頼性確保を目指して,” 日本食品微生物学会雑誌 *Jap. J. Food Microbiol.*, 26(3), pp. 172-176, 2009.