酵母の非線形誘電応答の測定システムとその特性

非会員 吉 武 博 信 (大阪市立大学)

正 員 村 治 雅 文 (大阪市立大学)

正 員 建 部 渉 (大阪市立大学)

Measuring System of Nonlinear Dielectric Properties for Yeast Cells and its Characteristics

Yoshitake Hironobu, Non-member, Muraji Masafumi, Member, Tatebe Wataru, Member (Osaka City University)

In general, electromagnetic waves are reflected and refracted on the different kind of boundary phase such as solid/liquid. When ac voltage is applied to cell suspensions, the electric current wave is effected by the biological activity of cell membranes so that it becomes to include some harmonic components specific to the cells. This phenomenon is called nonlinear dielectric properties. Here we describe the nonlinear dielectric properties of *Saccharomyces cerevisiae* in some growth phase. The results showed that there were little harmonics late induction phase but apparent even-numbered harmonics for yeast suspensions in early stationary phase.

キーワード：酵母、非線形誘電応答、高調波、定常期、生体活動

1. はじめに

果物などの生体系を交流で励振するとき、流れる電流ととの間には周波数の変化により振幅、位相の変化が現れる。これは細胞膜と細胞液から構成されている生体系が、電気的には C-R 回路と等価であると見なすことができるため、そのような周波数特性を示すと理解できる。この現象は誘電応答と呼ばれており、果物の熟度の非破壊的な計測に利用されつつある⁽¹⁾。

また、固体と液体間もしくは異なった液体の境界面では、電磁波は一般に複雑な反射、屈折をする^{(2),(3)}。細胞懸濁液を交流で励振し、溶液中の電流波形を周波数解析するとき、その周波数スペクトルは生体系固有のパターンを示す。これは細胞膜の生体活動が溶液中の電流に影響を及ぼしているものと考えられる。この現象を D. B. Kell らは非線形誘電応答と名づけ、乾燥酵母などにおける固有の周波数スペクトルについて報告している^{(4),(5),(6)}。それによると休止状態の酵母では第3高調波が、活動的な酵母からは偶数高調波が検出されている。またバクテリア (*Micrococcus luteus*) の実験においては嫌気的条件下で奇数高調波、好気的条件下で偶数高調波を得ており、呼吸作用と高調波との関係を示している。

ここでは筆者らの試作した非線形誘電応答の測定システム、それにより測定した乾燥酵母に対する非線形誘電応答の特性、および培養酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の

増殖過程の違いに対する特性について述べる^{(7),(8),(9)}。

2. 実験方法および測定手順

〈2・1〉システムの構成 図1に非線形誘電応答測定システムの概略図を示す。このシステムはコンピュータ (NEC: PC98)、D/A コンバータ (CANOPUS: DAC-98)、コモンラインを分離させるための絶縁回路、測定セル、増幅器および A/D コンバータ (CANOPUS: ADXG-16) で構成されている。測定に用いる励振の周波数、および待ち時間はコンピュータで設定する。コンピュータから出される波は1サイクルを40ステップに分割したデジタル信号であり、D/A コンバータによりアナログに変換する。絶縁回路では33 kHzの変調波を用いて一旦PWM波とし、フォ

図1 システムの構成図

Fig. 1. A block diagram of measuring system of nonlinear dielectric properties

図2 システムの回路図

Fig. 2. A circuit diagram of the measuring system

トカプラ結合によりコンピュータ側との絶縁をする。その後復調し、フィルタにより高調波を除いたフローティング電圧を励振電極に与える。測定電極で得た波形は増幅器で増幅し（10倍）、A/Dコンバータでデジタル信号に変換した後コンピュータに取り込む。図2は試作したシステムの主要部の回路構成図である。

〈2・2〉測定セル 図3に測定セルの形状を示す。セル容積は1mlで、セル定数は 1.6 m^{-1} である。図のように両端に励振電極を、中央に測定電極を等間隔に配置した。励振電極、測定電極にはそれぞれ金、銀を使用した。この選択の場合に雑音レベルの低い波形が得られた。

〈2・3〉データ取り込みとフーリエ変換 図4にデータ取り込みの流れを示す。検出された増幅電圧を励振周波数の20倍のサンプリングレートでデジタル信号に変換する。コンピュータでは連続して512点のデータを取り込みこれを1ブロックとし、続けて29ブロックを同様に取り込む。1ブロック、512点のデータはFFTボード（CANOPUS: FLASH-16II/SS）でフーリエ変換する。同様に得た29ブロックについてもフーリエ変換し、それら30ブロックを平均して1回のパワースペクトルデータとする。

〈2・4〉応答特性の測定手順 図5に測定の手順を示す。試料懸濁液を測定セルに入れ、装置の定常化を考慮して5秒の待ち時間の後、励振が印加される。〈2・3〉で述べた流れにしたがって試料に対するパワースペクトルを得る。次に同じ懸濁液を遠心分離した（10000 rpm, 1 min）上澄み液を同様の方法でFFT解析しコントロールのスペク

トルを得る。サンプルのスペクトルからコントロールのそれを引いて非線形誘電応答の特性とする。

〈2・5〉試料酵母の培養 試料酵母は市販の乾燥酵母および培養した *Saccharomyces cerevisiae* DKD-5DH（*a*, *trp1*, *leu2*, *his3*）を用いた。寒天培地（Yeast Extract 0.3%, Peptone 0.5%, Glucose 1.0% Agar 2.0%）および液体培地（Yeast Extract 0.3%, Peptone 0.5%, Glucose 1.0%）は一般的に用いられる YEPG 培地である。培地は HCl 水溶液で 5 pH に調整した。培養は増殖過程を的確

図4 データ取り込みの流れ

Fig. 4. A flow diagram to obtain the data

図3 測定セル

Fig. 3. A electrochemical cell

図5 非線形誘電応答特性の測定手順

Fig. 5. A protocol for measuring nonlinear dielectric properties

図6 培養酵母の成長曲線

Fig. 6. Growth curve of *Saccharomyces cerevisiae* used in this experiments

図7 酵母濃度に対する非線形誘電応答の特性

Fig. 7. Dependence of nonlinear dielectric properties upon the concentration of yeast cells

に把握するために2段階の培養（前培養、主培養）を行った。前培養は寒天培地により 25℃、1日間培養したものを 0.9% NaCl 水溶液 5 ml に溶かし、その 50 μ l を液体培地 10 ml に入れ 25℃、好氣的条件下で約 19 時間培養した。主培養は前培養したものから 1 ml をとり 30 ml の液体培地で 25℃、好氣的に培養した。主培養の過程は吸光度計でモニターした。図6は培養酵母の増殖をモニターした成長曲線である。増殖と死滅する酵母が釣り合っている定常期への移行期の試料、および増殖準備期間である誘導期の試料として同曲線における S 点、I 点での培養液を用いた。それぞれにおける酵母の濃度（個数）は 9.8×10^7 / ml、 6.8×10^6 / ml であった。

3. 実験結果

〈3・1〉クエン酸溶液中での乾燥酵母による特性 クエン酸溶液（酵母エキス 1%、クエン酸 5 mM、塩化マグネシウム 2.5 mM、pH 4.5：以下“クエン酸溶液”とする）に乾燥酵母を懸濁し、本システムで非線形誘電応答の特性を測定した。以下では各実験条件における高調波の出現特性を述べる。ただし第6高調波以上については測定でのばらつきが大きいので、ここには加えていない。

〈3・1・1〉酵母濃度の違いに対する特性 クエン酸溶液中の酵母濃度の変化に対する特性（周波数：14 Hz、電界：1.25 V/cm）を図7に示す。第3高調波はプラス側に、第4高調波は濃度が増すにつれプラス側からマイナス

側に移行した。第5高調波は濃度が増すにつれマイナス側からプラス側に移行した。第2高調波については大きな出現はなかった。これらの高調波は酵母濃度 0.2 g/100ml 以上において主に出現した。

〈3・1・2〉励振周波数に対する特性 酵母濃度：1 g/100ml、電界：1.25 V/cm にした場合の周波数に対する特性を図8に示す。奇数高調波（第3、第5）はプラス側に現れた。また、第4高調波はマイナス側に現れたが、第2高調波については大きな出現はなかった。これらの高調波は主に 14 Hz ~ 33 Hz で出現し、40 Hz 以上に対しては高調波が収束していった。

〈3・1・3〉励振電界に対する特性 濃度：1 g/100ml、励振周波数：14 Hz とした場合の励振電界に対する特性を図9に示す。電界 0.8 V/cm ~ 1.25 V/cm では、奇数高調波（第3、第5）はプラス側に現れ、偶数高調波はマイナス側（第2は僅かであるが）に現れた。また電界 1.5 V/cm 以上では、奇数高調波（第3、第5）はマイナス側に、偶数高調波（第2、第4）はプラス側に遷移した。

〈3・1・4〉非線形誘電応答の位相特性 酵母濃度：1 g/100ml、電界：1.25 V/cm における非線形誘電応答の周波数に対する位相特性を図10に示す。奇数高調波（第3、第5）はコントロールに対して進み、第4高調波はコントロールに対して遅れる傾向を示した。また第2高調波は大きな位相の変化が見られなかった。

図8 励振周波数に対する非線形誘電応答の特性

Fig. 8. Dependence of nonlinear dielectric properties upon the frequency of applied voltage source

図9 励振電界に対する非線形誘電応答の特性

Fig. 9. Dependence of nonlinear dielectric properties upon applied field strength

図 10 非線形誘電応答の位相特性

Fig.10. Dependence of phase difference of each harmonic upon applied frequency

〈3・2〉 YEPG 溶液中での乾燥酵母の特性 乾燥酵母を YEPG 溶液に懸濁し、非線形誘電応答を 2 つの実験条件において測定した場合の高調波の出現特性を述べる。図 11 (a) は乾燥酵母を YEPG 溶液に懸濁し、30 分経過した後の特性を示す。全ての高調波がプラス側に出現し、特に第 4 高調波が大きく出現した。図 11 (b) は乾燥酵母を YEPG 溶液に懸濁し、3 時間経過した後の特性である。第 4 高調波の出現が小さくなり、第 3 高調波がプラス側に大

(a) after 30 min suspended

(b) after 180 min suspended

図 11 乾燥酵母を YEPG 溶液に懸濁した場合の非線形誘電応答の特性

Fig.11. Nonlinear dielectric properties of dry-yeast suspended in YEPG

きく現れ、第 5 高調波の符号が反転した。

〈3・3〉 培養酵母による非線形誘電応答の特性 主培養した酵母の増殖過程の違いに対する応答についてまとめたものを図 12 (a) および (b) に示す。(a) は培養酵母における定常期に移行し始め (図 6 の s 点) の特性である。偶数高調波 (第 2、第 4) がプラス側に出現し、奇数高調波は殆ど出現しなかった。(b) は培養酵母の誘導期 (図 6 の I 点) の応答を示す。偶数高調波のうち第 2 がマイナス側、第 4 がプラス側に出現し、奇数高調波は殆ど出現しなかった。

4. 考 察

クエン酸溶液に懸濁した乾燥酵母の活動は殆ど休止状態であり、また YEPG 溶液に懸濁した乾燥酵母は活動 (増殖) 中であると考えられる。乾燥酵母をクエン酸溶液に懸濁したときの本システムにおける非線形誘電応答は、周波数、励振電界の変化に対して窓のような特性を示している。周波数に対しては 14 ~ 33 Hz、電界は 0.8 ~ 1.25 V/cm の窓を持っていると言える。これらの結果から、本システムは濃度 1.0 g/100ml (個数: 3.4×10^8 /ml)、周波数 14 Hz 付近、電界 1.25 V/cm の場合、非線形誘電応答がよく観測される特性を持つことが分かった。

YEPG 溶液に懸濁した乾燥酵母 (30 分後) による特性は第 4 高調波がプラス側に出現した。これは酵母が休止状態であるクエン酸溶液中の高調波の出現と違っており、増殖中の酵母の特徴であるといえる。また、3 時間後の同じ懸濁液の応答は第 4 高調波が減少し、第 3 高調波がプラス側に大きく出現した。このような高濃度で狭い培養条件で

(a) early stationary phase

(b) late induction phase

図 12 培養酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の非線形誘電応答の特性

Fig.12. Nonlinear dielectric properties of cultured *Saccharomyces cerevisiae*

は、栄養分の減少や老廃物の蓄積により、3 時間経過すると酵母の活動が死滅期へ移っていく段階にあり⁽¹⁰⁾、クエン酸溶液で得られた休止状態での応答への移行途中であると考えられる。

クエン酸溶液に懸濁した乾燥酵母に対する応答の位相特性では、位相の変化が現れているのはスペクトルの差が出現した高調波（第3、第4、第5）であった。このことから、非線形誘電応答は酵母の生体活動に起因した非線形な要因により発生していることが示唆される。

最後に、培養酵母において定常期へ移行を始めた時期の非線形誘電応答は、乾燥酵母を YEPG 溶液に懸濁した時と同様に第4 高調波が強く出現した。また、第2 高調波も大きく出現しており先に述べた乾燥酵母に対する D. B. Kell らの報告とも一致しており、酵母が増殖中である時の典型的な特性といえる。誘導期は酵母増殖の準備期間であることを考えると、これは休止状態から増殖状態への移行パターンととらえることができる。しかし、この時期の培養酵母は個数が少なく、得られたデータは安定していなかったため、システムの改善が必要である。酵母の活性状態による高調波出現パターンの違いは、細胞内の酵素活性の変化が一つの要因と考えられる。今後、これに着目して高調波出現のメカニズムを探りたい。

5. おわりに

試作した非線形誘電応答の測定システムの概略について述べた。本システムによる実験結果から、乾燥酵母は休止状態で第3 高調波が、活動状態（好気的条件下で増殖中）では第4 高調波が良く出現することが確かめられた。これは先に引用したバクテリア（*Micrococcus luteus*）の実験（嫌気性では奇数高調波、好気性では偶数高調波）と何らかの関わりがあるのかもしれない。今後検討して行きたい。培養酵母では増殖の最盛期に偶数高調波が顕著に現れた。また、乾燥酵母に対する誘電応答の特性が、培養中の酵母の特性と一致することが確かめられた。この結果により、試作した測定システムは活動中の酵母からの生体情報が得られているものと判断でき、酵母の培養をモニターする一方方法として本システムが有用であると考えられる。

最後に本実験を進めるにあたり助言、指導を頂いたウエールズ大学 Dr. D. B. Kell 教授および Dr. A. M. Woodward 氏に、また実験に協力頂いた本学卒業生三重和宣氏（現在近鉄勤務）に感謝いたします。

（平成9 年12 月15 日受付、同10 年6 月4 日再受付）

文 献

- (1) A. R. Varlan, W. Sansen : "Nondestructive Electrical Impedance Analysis in Fruit : Normal Ripening and Injuries Characterization", *Electro- and Magnetobiology*, **15**, 3, 213-227, (1996)
- (2) K. Yoshikawa, M. Shoji, S. Nakata, S. Maeda : "An excitable liquid membrane possibly mimicking the sensing mechanism of taste." *Langmuir*, **4**, 759-762, (1988)
- (3) S. Nakata, K. Yoshikawa, M. Shoji, H. Kawakami, T. Ishii : "Characteristic response to taste stimuli of the intensities of higher harmonics in an electrochemical oscillatory system", *Biophysical Chemistry*, **34**, 201-210, (1989)
- (4) A. M. Woodward, D. B. Kell : "On the nonlinear dielectric properties of biological systems *Saccharomyces cerevisiae*", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **24**, 83-100, (1990)
- (5) A. M. Woodward, D. B. Kell : "Dual-frequency excitation: A novel method for probing the nonlinear dielectric properties of biological systems, and its application to suspensions of *S. cerevisiae*", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **25**, 395-413, (1991)
- (6) A. M. Woodward, D. B. Kell : "On the relationship between the nonlinear dielectric properties and respiratory activity of the obligately aerobic bacterium *Micrococcus luteus*", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **26**, 423-439, (1991)
- (7) 吉武博信・村治雅文・建部渉・藤井知生 : 「酵母菌懸濁液に対する非線形誘電応答について」平6 電気学会関西支連大, No. G1-36
- (8) 吉武博信・村治雅文・建部渉・藤井知生 : 「酵母菌懸濁液に対する非線形誘電応答における高調波成分の位相特性」平7 電気学会大会, No. 517
- (9) 三重和宣・村治雅文・建部渉 : 「酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 懸濁液における非線形誘電応答と生長期との関係について」平9 電気学会大会, No.208
- (10) W. Tatebe, A. M. Woodward, D. B. Kell : "Nonlinear Dielectric Properties and their Relationship to the Physiological State (resting or active) of *Saccharomyces Cerevisiae*", *Memoirs of the Faculty of Eng. Osaka City Univ.*, **35**, 53-57, (1994)

吉 武 博 信（非会員）1968 年生。1995 年3 月大阪市立大学大学院工学研究科前期博士課程修了。同年4 月ダイキン工業（株）に入社、1998 年4 月大阪市立大学大学院工学研究科後期博士課程入学、現在に至る。バイオセンシングに関する研究に従事。

村 治 雅 文（正員）1963 年生。1989 年3 月大阪市立大学大学院工学研究科前期博士課程修了。同年4 月東ドイツ ZIMET 研究員。90 年4 月大阪市立大学大学院工学研究科後期博士課程入学、94 年9 月同単位取得による退学、同年10 月大阪市立大学工学部助手、現在に至る。生物物理学、生物環境学に関する研究に従事。電気学会会員。

建 部 渉（正員）1937 年生。1962 年3 月大阪市立大学大学院工学研究科修士課程修了。同年4 月大阪市立大学工学部助手、66 年同講師、94 年同助教授、98 年4 月同教授、現在に至る。93 年英国ウエールズ大学アベリユストウス校、文部省在外研究員（短期）。最近は、電磁生体工学に関する研究に従事。工学博士。電気学会、計測自動制御学会、日本生物工学会、日本農芸化学会、IEEE などの

会員