

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21859

研究課題名（和文）アコースティック・エミッションを用いた微生物の活動モニタリング技術の開発

研究課題名（英文）Development of activity monitoring of microbes using acoustic emission

研究代表者

蔭山 健介（Kageyama, Kensuke）

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：30272280

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者は、空中、水中、生体中の超音波を高感度で検出可能なセンサであるエレクトレットコンデンサーセンサ（ECS）の開発を行ってきた。開発したECSを用いることで、微生物の活動に伴い生じる発泡AEの検出を試みた。その結果、ショ糖溶液中でのイースト菌の発酵、もろみ中の酵母の発酵、藻類の光合成に伴う発泡に起因するAEを多数検出することができた。そして、測定されたAEの発生挙動は発酵や光合成の活性と関連があり、検出されたAE数は発酵による培養液の糖度の変化や藻類の乾燥重量と強い相関を示した。これらの結果から、ECSを用いたAE測定は簡便に微生物の培養状況を把握する手法として有用であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物は、有機物を分解することで生命活動に必要なエネルギーを獲得しており、その副産物を用いて発酵食品のような物質生産が行われている。例えばアルコール発酵などは、バイオエタノールとして燃料にも使用され始めており、発酵生産技術の改良は重要な課題である。ECSを用いて微生物の活動に起因するAEを測定することで、微生物の培養状態をリアルタイムにモニタリングできれば、活動状態に応じた管理を行うことで発酵生産効率の向上に大きく寄与すると考えられる。また、ブルーカーボンのような野外での水生植物の生育状態を把握することにも貢献できると予想される。

研究成果の概要（英文）：The applicant has developed an electret condenser sensor (ECS), which is a sensor capable of detecting ultrasonic waves in air, water, and living organisms with high sensitivity. By using the developed ECS, we have attempted to detect foamed AE produced by microbial activity. As a result, we were able to detect many AEs caused by the fermentation of yeast in sucrose solution, the fermentation of yeast in mash, and foaming associated with photosynthesis of various algae. The measured AE generation behavior was related to the activity of fermentation and photosynthesis, and the number of AE detected showed a strong correlation with the change in sugar content of the culture solution due to fermentation and the dry weight of algae. These results suggest that AE measurement using ECS is useful as a simple method for understanding microbial culture conditions.

研究分野：非破壊評価

キーワード：培養モニタリング エレクトレット アコースティック・エミッション センサ 発酵 光合成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、マイクロギャップを有する薄型のエレクトレットコンデンサセンサ(ECS)の開発を行い、空中や生体において広帯域の振動(10 Hz~100 kHz)の振動の送受信が可能であることを明らかにした。

また、植物に取り付けたセンサにより生体情報を計測する技術として、維管束植物の木部内部で気泡が急激に膨張する現象(キャビテーション)に伴い発生する植物 AE を検出する手法がある。研究代表者は、植物 AE は植物生体情報としてとらえることができると考え、ECS を用いてアセロラ幹部やトマト茎部での植物 AE 測定を行ったところ、従来の圧電素子と同等の検出感度を有し、取付時に植物に与えるダメージを大幅に軽減できることを明らかにした(図2)。そして、ECS を用いて低コストで植物 AE を検出することで植物の活動状態を可視化できる植物の活動モニタリング技術を開発している。

このように ECS は、空中、液中、生体中での微弱な発泡に伴う AE の検出に優れていると考えられるため、微生物の活動に伴うガスの発生により泡が生じれば、それに伴う AE を検出することで、微生物の活動状態を知ることができるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

微生物は、有機物を分解することで生命活動に必要なエネルギーを獲得しており、その副産物を用いて発酵食品のような物質生産が行われている。例えばアルコール発酵などは、バイオエタノールとして燃料にも使用され始めており、発酵生産技術の改良は重要な課題である。微生物の活動をリアルタイムにモニタリングできれば、活動状態に応じた管理を行うことで発酵生産効率の向上に大きく寄与すると考えられる。アルコール発酵の過程においては CO<sub>2</sub> が発生するように、微生物の活動においてはなんらかの気体が発生する場合が多く、このとき発酵培地中で気泡が発生する。一方、液中での酸化還元反応においても気泡が発生するが、気泡の発生、合体、消滅時には超音波領域の周波数を含む突発的な弾性波、すなわちアコースティック・エミッション(AE)が生じることが知られている。

研究代表者は、空中、水中、生体中の超音波を高感度で検出可能なセンサであるエレクトレットコンデンサセンサ(ECS)の開発を行ってきた。開発した ECS を用いることで、植物茎部で蒸散によって生じる微弱な発泡現象(キャビテーション)に伴う AE を検出可能である。そこで、この ECS を用いることで、微生物の活動に伴い生じる発泡 AE を検出できるのではないかと考えた。

本研究の主な目的は、以下の2点である。

- (1) 液中で発生する超音波検出に優れたECSを用いて、酵母のアルコール発酵や藻の光合成などの微生物の活動に伴う発泡AEの測定技術を開発する。
- (2) 発泡AEの発生挙動と微生物の活動量との関連を明らかにする。さらに、微生物の活動状態を24時間リアルタイムでモニタリング可能な技術の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

研究方法の概要を以下に示す。

- (1) 培養液中でのAE測定に適したECSの製作

図1に製作した ECS 素子の構造図とマイクロギャップ部の拡大図を示す。シリカ凝集体をエレクトレットとし、エレクトレット電極を PCB に巻き付けて ECS 素子とした。図2(a)に ECS 外観を示す。そして、ECS 素子を 3D プリンターで製作した ABS 樹脂製のケース内にエポキシ樹脂を用いて固定し、シリコン樹脂で封入することで防水仕様とした。その外観を図2(b)に示す。

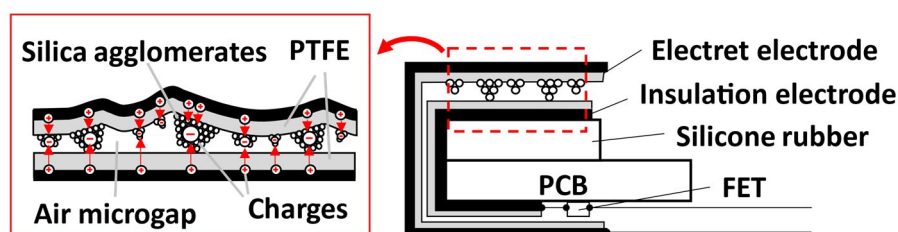
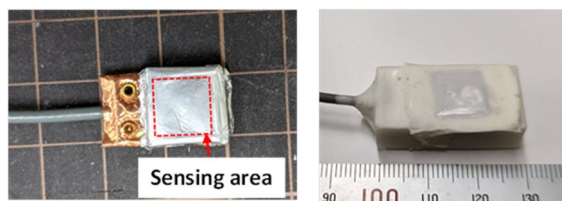


図1. 製作した ECS の断面構造



(a)

(b)

図2. 製作した ECS 素子の外観と防水処理後の ECS の外観

## (2) ECSを用いた液中での発泡AE測定技術

植物茎部でのAE測定に用いているECSを改良して、培養液中に長期間浸漬可能なECSを製作した。そして、炭酸水中に吊り下げてECSを浸漬させ、センサ近傍での炭酸ガスによる気泡の発生、合体、消滅に伴う発泡AEを検出した。

## (3) アルコール発酵に伴うAE測定

イースト菌をショ糖溶液中で発酵させ、その培養液にECSを投入して発酵時にAEを検出した。また、糖度計を用いて発酵による糖度の変化も測定して、糖度とAE発生挙動との関連を調べた。次に、日本酒の醸造施設(美吉野醸造(株))において、日本酒の製造時に、容器内に複数のECSを設置することで、アルコール発酵に伴う炭酸ガスによる気泡の発生、合体、消滅に伴う発泡AEを検出した。そして、発泡AE測定技術による新たな発酵モニタリング手法の可能性を探った。

## (4) 藻の光合成に伴うAE測定

屋外の藻類培養施設((株)ユーグレナ)において、ユーグレナ藻の培養時に培養槽内に複数のECSを投入することで、光合成により生じる溶存酸素による気泡の発生、合体、消滅に伴う発泡AEを検出した。次に、照明を設置した恒温器において、藻類の培養容器を設置し、容器内に複数のECSを設置することで光合成に伴う酸素ガスによる発泡AEを検出した。そして、一定期間生育した藻類の乾重量測定を行い、発泡AEの発生挙動との関連を調べた。そして、これらの結果から、発泡AE測定技術を用いて、藻類の培養状態をモニタリングする可能性を探った。

## (5) おが粉の分解に伴うAE測定

おが粉にぬか、酵素、水を混合させ、よく攪拌することで好気性発酵を生じさせる。これを利用している発酵温浴施設において、培地中に複数のECSを設置することでセルロース分解に伴う水蒸気由来するAEを検出することを試みた。

## 4. 研究成果

## (1) ECSを用いた液中での発泡AE測定技術

弱炭酸水中にECSを投入し、AE測定を行った。その結果、ECSに多数の気泡が付着して成長、分離しているのが目視で把握できた。気泡の合体や分離が観察されたときの気泡径と検出されたAEのウェーブレットスペクトルから得られるピーク周波数を算出した。その結果、AEのピーク周波数は、液中で径を有する気泡の固有振動数と推定された。すなわち、検出されたAEは気泡の合体によるもので、AEのピーク周波数から気泡径を推定できることが分かった。従って、AE数から発泡の頻度が把握できるだけでなく、ピーク周波数を用いることで発泡している気泡の径も推定でき、液中での発泡状態のモニタリング技術として有用であると考えられる。

## (2) アルコール発酵に伴うAE測定

各ECSにおいてイースト菌の発酵時に検出されたAEの累積数をCAEとして、その挙動を図3(a)に示す。培養槽上部のCH3およびCH4は、培養槽下部のCH1およびCH2より顕著にAEの発生数が多かった。一方、培養液中の糖度SCと温度の挙動を図3(b)に示す。糖度は測定開始から単調に減少し、測定開始後15h以降ではSCは減少しなくなったことから、15hで発酵が終了したことが分かる。図4(a)に攪拌時までのCAEの合計値とSCの関係を示す。CAEとSCには強い相関が認められるが、SCの減少開始時と終了ではCAEの挙動は異なっている。これは、気泡生成までの時間差が影響している。そこで、攪拌時より3h先までのCAEと攪拌時のSCを比較した図を図4(b)に示すが、測定開始時と終了時も含めてCAEとSCには強い相関が認められ、R二乗値は0.97となった。これらの結果から、

3 h 程度の時間差を考慮すれば, AE 測定により発酵による反応量を定量化できる可能性が示された。

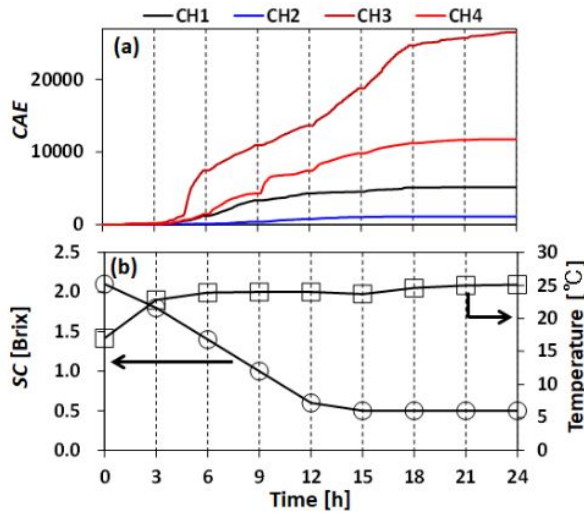


図3. イースト菌発酵時の CAE と SC の挙動

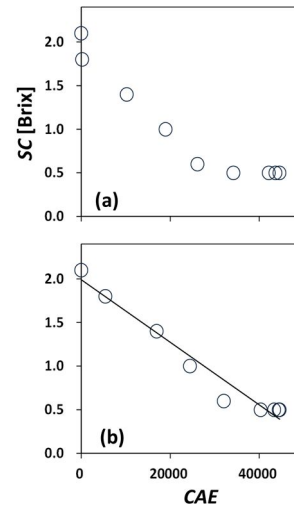


図4. CAE と SC の関係

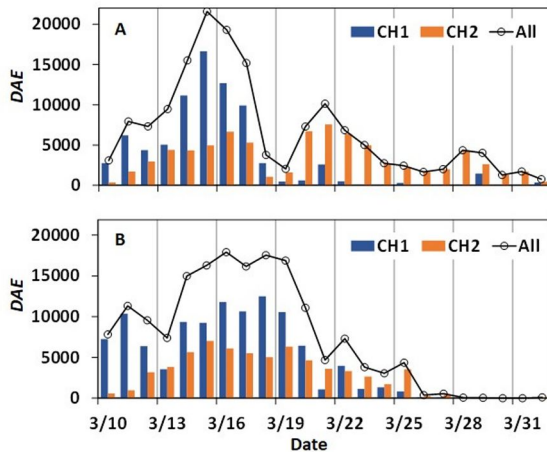


図5. もろみ中の AE 発生挙動

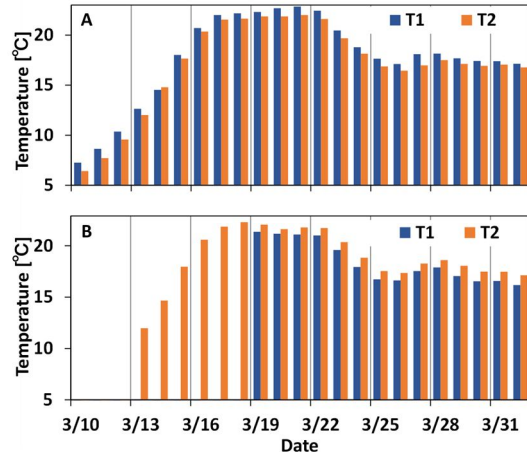


図6. もろみ中の温度の挙動

測定した AE の 1 日の発生数を DAE とし, その挙動を図5に示す。変動があるが, 測定開始後 AE 発生数は増加し, 3/15-3/16 にピークを示してその後減少する傾向を示した。また, A, B どちらのタンクも測定開始時は下部の ECS (CH1)の方が多くの AE が検出され, 後半は上部の ECS (CH2)の AE 数が増える傾向を示した。日本酒は上面発酵のため, 上部での発酵が盛んではないかと思われたが, 実際にはまず下部から発酵が開始してその後上部に移っていきと考えられる。そして, 測定終了時まで A, B で検出された AE 数はそれぞれ, 155305 および 171354 イベントであり, B の方が 10.3%多かった。一方, 測定終了時の A, B のアルコール濃度は, それぞれ 19.1 および 19.4 %であり B の方が高かったが, その増加率は 1.6%しかなく, AE 数の増加率より低下した。これらの結果から, ECS 受感部に付着した気泡が分離せずに長期間残存するなどタンク全体と ECS で気泡の合体・分離挙動に大きな差が生じていることが懸念され, さらに詳細な実験が必要である。

一方, もろみの日別の平均温度の挙動を図6に示す。いずれの温度も測定開始後から 3/19 まで単調に上昇しその後変動しながらゆるやかに低下した。一方, 測定開始から 3/15 までは外気温が上昇しており, その後低下に転じていたが, タンク内の温度が低下に転じるのには 6-7 日間の時間差が生じていた。一方, DAE は 3/15 にピークが生じており, 温度測定は発酵が生じてもタンク内の温度を上昇させるまでの時間差が大きいことを示している。すなわち, AE 測定は, 温度測定より発酵状態の変化を迅速に検出できる可能性がある。しかし, 今回の測定では, AE 数とアルコール濃度との相関を示せてはならず, 今後, AE 発生挙動ともろみの発酵との間の定量的な関係を調べることで, 発酵状態の変化に対す



る応答性を明らかにする必要がある。

### (3) 藻の光合成に伴うAE測定

屋外培養施設において、AE 測定を行ったところ日中に多数の AE が検出され、晴天時において AE 数は大きく増加した。このことから、光合成に伴い放出される溶存酸素に起因して発泡が生じて AE が検出されていると思われる。また、複数の ECS で検出される AE を除外することで降雨による水滴衝突など外乱ノイズの影響を排除できることも分かった。これらの結果から、ECS を用いた AE 測定は野外における培養モニタリング技術として有用ではないかと期待される。

次に、恒温室内で検出された AE の時刻別の発生挙動例を図7に示す。大半の AE は照明点灯時 (Daytime) に生じており、屋外培養施設と同様の結果が得られた。また、2 時間おきに 5 分間のエアレーションを行ったが、エアレーション時に多くの AE が発生した。夜間ではエアレーションを行っても AE はほとんど検出されなかったことからエアレーションによって生じた気泡が核となって溶存酸素から生じた微細な気泡が合体して AE が検出されたのではないかと考えられる。そして、藻類の乾燥重量の測定日における日別の AE 数と乾燥重量との関連を図8に示す。AE 数は乾燥重量と強い相関を示した。これらの結果から、ECS を用いた AE 測定は、藻類培養時の基礎生産量を簡便に把握する手法として期待できる。

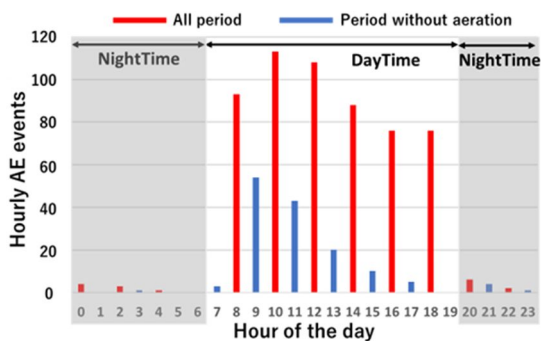


図7．培養時の時刻別 AE 発生挙動の例

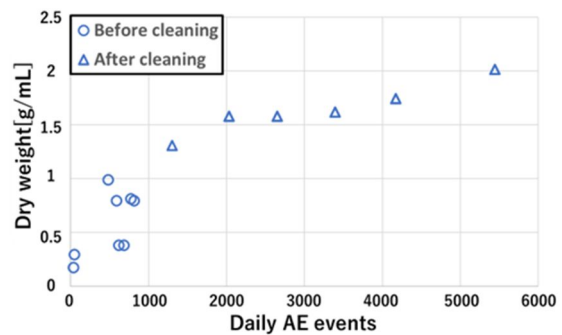


図8．日別 AE 数と藻類の乾燥重量との関係

### (4) おが粉の分解に伴うAE測定

温浴施設の浴槽では、ECS により突発的な AE を検出することができた。この測定では、培地は液状ではなく粉状のため培地中に気泡が発生して AE の発生源となった可能性は低い。一方、培地の温度上昇に伴い、水蒸気が多量に発生するため、ECS 受感部に水滴が付着、蒸発する際に AE が発生した可能性がある。また、おが粉が発酵により分解する際、セルロースが剥離することで AE が発生することも考えられる。今回の測定では AE の発生源については特定できなかったが、このような固体培地でも発酵により AE が生じることが明らかとなったことで、AE 測定を肥料や各種発酵食品の製造時における発酵制御に応用することが期待できる。次に、1 時間あたりの平均温度と AE 数の挙動について測定開始後 1 週間までの結果を図9に示す。温度の挙動は大きくばらつき、粉末上の培地では温度プローブとの接触状態が安定していないためと推測される。一方、AE 発生数はいずれに日も午前 0-4 時の間にピークを示した。今回の測定では、ECS が経時劣化したことから AE 発生数の定量的な比較はできないものの、AE 数のピーク時刻は、温度よりもばらつきが小さいことから、AE 測定は安定して応答の優れた発酵状態のモニタリングが行える可能性がある。

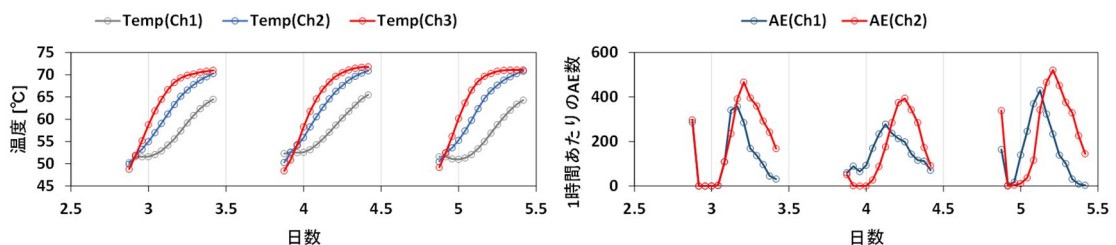


図9．浴槽内部の温度と AE 数の挙動

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kageyama Kensuke, Kawarai Yuma	4. 巻 143
2. 論文標題 エレクトレットセンサを用いた発酵時に生じるアコースティック・エミッションの検出	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines	6. 最初と最後の頁 68 ~ 75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1541/ieejsmas.143.68	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川井 建
2. 発表標題 極薄PTFE層を有するワイヤ電極の電荷保持特性とエレクトレットセンサへの応用
3. 学会等名 第38回センサ・マイクロマシンと応用システムシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 駆
2. 発表標題 シリカ微粉末を用いたエレクトレットとそれを用いた超音波センサの特性評価
3. 学会等名 第39回センサ・マイクロマシンと応用システムシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 畑 孝輔
2. 発表標題 極薄PTFE複合エレクトレットの帯電条件が電荷保持特性に及ぼす影響
3. 学会等名 第37回センサ・マイクロマシンと応用システムシンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 測定方法および測定装置	発明者 蔭山健介	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-148684	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------