

東日本支部・温故知新（12） 発酵用DOセンサーの温故知新

石川 陽一

蒸気滅菌可能なDOセンサーは培養の解析や制御などに欠かせないが、最近の動向を含め歴史をたどってみたい。

当社は1979年にオリエンタル酵母工業と隔膜式DOセンサーを共同開発し、販売を開始した。それ以前は繰り返し蒸気滅菌可能なセンサーがなく、多くの研究者がベックマンの777型DOセンサーを利用していた。これは、ポーラログラフ式で電極にゲル状電解液を塗り、ガス透過性隔膜で被覆し、隔膜をOリングで固定したものであるが、蒸気滅菌ができないため、アルコール消毒をしてフラスコ底部に垂直につけたノズルに取り付けるなどの工夫をして使用していた。しかし、このDOセンサーは培養槽に取り付けられなかった。

各製薬会社には、経験豊富な杜氏のような発酵管理者がいて、攪拌回転数を制御するなど勘に頼ってDO制御を行っていた。そのためDOセンサーのニーズは大きかった。

開発コンセプト

隔膜式DOセンサーの開発に当たり、下記コンセプトを立てた。

1. ガルバニ式 隔膜式センサーとしてはポーラログラフ式が一般的だった。ポーラログラフ式は、陰極に-700 mVを印加し、隔膜を透過して電解液に溶解した

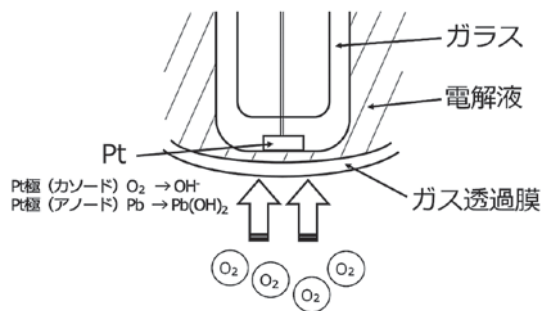


図1. 隔膜式センサー測定原理

酸素を陰極(Pt極)で還元し、還元電流を計測する(図1)。

しかしこの場合、-700 mVを印加するためのアンプが必要になる。それに比べ貴金属を陰極に、卑金属を陽極にしたガルバニ式センサーは、自ら還元電位を作り出す。そのため-700 mVを印加しなくても両極間に抵抗を接続することで抵抗の両端に酸素濃度に比例した電圧が得られ、記録計に接続できることから、ガルバニ式センサーをターゲットにした。ガルバニ式DOセンサーは日本人の発明である。

2. 圧力対策 蒸気滅菌時に電解槽に内圧がかかると、ガス透過性隔膜にストレスがかかり隔膜が破損するので、電解槽に電解液注入口を兼ねた小孔をあけてセンサー内外の圧力を同圧にすることで圧力の影響を受けないようにした。

3. 分解可能 開発の過程で試作したDOセンサーは、蒸気滅菌するとすぐ壊れてしまい、都度部品の選定や設計変更を要した。そこで壊れたら壊れた部品だけを交換できるように、電解槽とアノードを一体化するなどセンサーの構成部品を単純化し、かつ分解・組み立て可能にした。この改造で、130°Cで50回繰り返し滅菌しても壊れないセンサーが完成した(図2)。

この開発により、センサーの販売を開始したが、この隔膜式センサーは国内需要より輸出が多かった。しかし、数年すると海外でもポーラログラフ式のセンサーが販売され、当社の独占状態はなくなった。

蛍光式DOセンサー

隔膜式センサーは電気化学センサーであるため、表1のような欠点がある。そのため、蛍光特性を測ることで酸素を計測するセンサーを開発した。



図2. 隔膜式DOセンサー

表1. 蛍光式DOセンサーと隔膜式DOセンサーの比較

蛍光式DOセンサー	隔膜式DOセンサー
酸素を消費しない	酸素を消費する
攪拌不要	攪拌必要
攪拌速度の影響を受けない	攪拌速度の影響を受ける
非接触で測定可能	培養槽に挿入して使用
蒸気滅菌により0点変動しない→毎回校正する必要がない	蒸気滅菌により出力が変動する→滅菌の度に校正が必要
シングルユース化が可能	滅菌して再利用する
圧力の影響を受けない	ガス透過膜が押されるため圧力の影響を受ける場合がある(均圧孔型は受けない)
蛍光体を50回に1回程交換	ガス透過膜と電解液を時々交換
壊れにくくメンテナンスが容易	性能が変化するため注意が必要

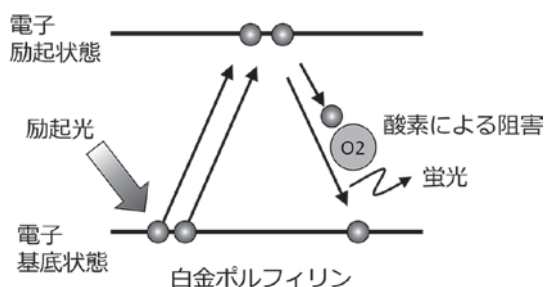


図3. 蛍光式DOセンサー原理

蛍光式DOセンサー原理 白金ポルフィリンを505 nmの励起光で励起すると、580 nmの蛍光が発光される。この蛍光は酸素に阻害される(図3)ため、酸素濃度が高いと蛍光強度は低下する。したがって、蛍光強度を測定することで酸素濃度に変換できる。しかし、蛍光強度は酸素濃度だけでなく、光源や受光器の劣化、蛍光物質の汚れや劣化などの影響を受けて変化してしまい、酸素濃度を正確に測定できない。そこで、パルス状の励起光で蛍光物質を励起してから蛍光を発するまでの時間の遅れ、すなわち位相差を計測したり、蛍光の減衰速度を計測する(図4)などによって酸素濃度を測定している。蛍光式DOセンサーは隔膜式センサーと同様、気体も液体も測定できる。

蛍光物質を励起する方式として、LEDなどの光源から蛍光体を直接照射する方法と、光ファイバーを通じて照射する方法がある。

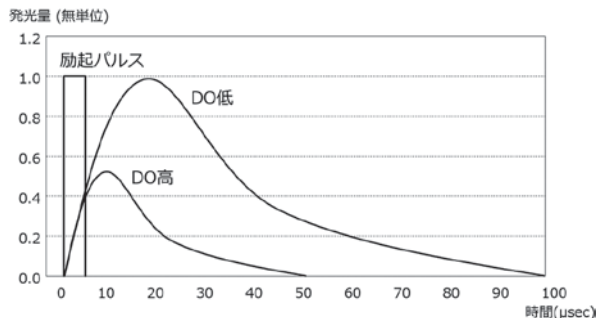


図4. 蛍光の減衰速度

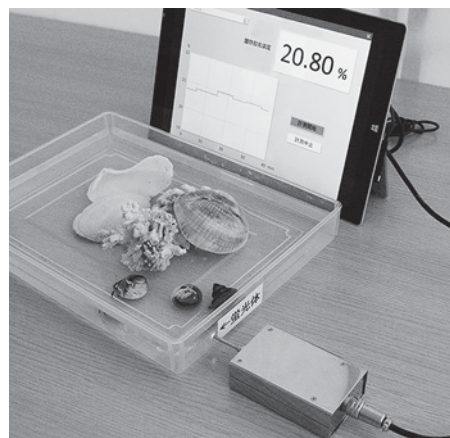


図5. 蛍光式DOセンサーを用いた測定例

DOセンサーの応用

蛍光式DOセンサーの応用 蛍光式DOセンサーは、直径3~5 mm、厚さ0.1 mm程度の蛍光体に励起光を与えているが、蛍光物質と計測器を分離できる。そのためシングルユースリアクターに蛍光体だけを固定し、外部から励起光を与えるなどの使い方が可能になり、フラスコや96ウェルなどでのDO計測装置が市販されている。

図5は、我が家のヤドカリの水槽内壁に蛍光体を貼付け、DOを測定している例である。

今後の期待

DOセンサーは、各種装置が市販され、今後も蛍光式センサーを中心にアプリケーションが広がると思われる。pHセンサーも蛍光式が市販され、当社でも製造しているが、取り扱いやすさ、安定性、測定範囲などで十分な性能ではなく、今後の改善が期待される。