

## バイオセンサによる有機酸濃度の測定

山口征治<sup>X</sup>、林 巧<sup>X</sup>、河内恭三<sup>\*</sup>、江藤幹愛<sup>XX</sup>

\* (株) 東芝 府中工場  
東京都府中市東芝町 1

XX 電気化学計器 (株)  
東京都武蔵野市吉祥寺北町 4-13-4

### 概 要

近年省エネルギーの観点から注目されてきている下水泥の嫌気性消化プロセスを合理的に運転管理して行く上で、有機酸濃度は重要な指標であるが、簡単に測定できるセンサがないため、メタンガス発生量や pH の値を運転指標として用いているのが現状である。そこで、このような汚泥消化のプロセスに適用することをめざして、バイオセンサを用いた有機酸濃度測定システムの開発を行っている。

有機酸濃度測定用バイオセンサは、酵母菌 *T. brassicae* を多孔性膜の間に封入固定した微生物膜をポーラロ式酸素電極上に重ね、さらにその上をガス透過性膜でおおったものである。このような有機酸センサについて、酢酸溶液を試料として、測定範囲と直線性を確認し、応答時間、温度、pH、各種有機酸に対する感度など基本的特性を把握するとともに、センサによる感度の違い、経時変化についても調べた。

さらに得られた基礎的データに基づいて、前処理部まで含めた測定システムを試作し、酢酸標準液での評価を行い良好な結果を得た。今後はフィールドにおける評価、改良を行って実用化に結びつけたいと考えている。

### キ ー ワ ー ド

下水汚泥 嫌気性消化 有機酸濃度 バイオセンサ 酵母菌 酸素電極 ガス透過性膜  
測定範囲 直線性 応答時間 温度特性 pH特性

#### 1. ま え が き

汚泥の嫌気性消化法は古くから用いられているが、特に最近ではバイオテクノロジーの発展により、メタン細菌など消化反応にかかわる細菌類やその固定化に関する研究が進み、水処理プロセスまで含めたトータル的な下水処理法としての嫌気性バイオリアクタの開発も盛んに研究されてきている。

一方、バイオテクノロジーとエレクトロニクス技術を結合したバイオセンサの研究も近年盛んに行われてきており、すでに実用化の域に達しているものもある。

水質測定には従来から理化学的なセンサが多く用いられてきた。これに対してバイオセンサは、分子識別素子として酵素、微生物などを用い、その生化学反応を利用して従来の理化学的センサでは測定が困難であった有機物等の測定を行うセンサである。

本研究ではバイオセンサを用いた有機酸濃度測定システムを開発することを目的としている。

この報告書ではセンサの基本的諸特性及び嫌気性消化プロセスに適用することをめざして試作した測定システムについて報告する。

## 2. バイオセンサの構成

1), 2), 3)

バイオセンサの基本的な原理、構成についてはすでに数多くの文献に述べられているので省略し、ここでは本研究で用いた有機酸濃度測定用バイオセンサ（以下有機酸センサと略称する）について述べる。

### (1) 構造

有機酸センサは図1に示すように、酵母菌 *T. brassicae* を多孔性膜（親水性アセチルセルロース膜）の間に封入固定した微生物膜をポーラロ式酸素電極上に重ね、その上をガス透過性膜でおおったものである。

### (2) 微生物膜中の菌体量について

酵母菌培養液を純水で希釈して吸光度一定となるように調整し、この菌体を分取して多孔性膜の間に封入して微生物膜を作成するが、この菌体量（容量）を変えて出力を比較した結果を図2に示す。

菌体量の増加とともに出力は増大するが、ある値から飽和し、さらに減少してきている。これは内生呼吸のみで活性があるため、ベース電流値が下がり、酢酸に対するピークとの差が少くなり、出力としては減少するものと考えられる。菌体量としては、3～5 mlが適当である。

### 3. 有機酸センサの諸特性

センサの基本的諸特性を把握するため、恒温水ジャケット付フローセルにセンサを取付け、ポンプにより試料または洗浄水を流す流れ測定式の試験装置を用いた。

また、試料としては、嫌気性消化プロセスにおいて酸発酵期に生成される揮発性有機酸のうち最も多く生成されるのは酢酸であるので、<sup>4)</sup> 有機酸の代表として酢酸を測定対象として試験を行った。

#### (1) 測定範囲と直線性

測定の都度センサを試料中に挿入するバッチ測定で、電流減少の定常値を読みとる方式では測定範囲上限は60 mg/l程度であるとの報告<sup>5)</sup>があるが、流れ測定式で試験した結果の一例を図3に示す。試料注入時間2分、流量1.2 ml/分、30℃の測定条件で100～400 mg/lの範囲で検量線の直線性を確認することができた。

#### (2) 応答性

試料注入時間が2分の場合の応答例を図4に示す。立上りは約2分程度であるが、立下りは遅く、ベース電流値まで完全に戻るまでには20分以上を要している。

このように一度微生物膜内に達した酢酸が資化されて出力に影響しなくなるまでに長時間を要する点はバイオセンサ特有の現象であると考えられる。したがって、単位時間当たり測定回数はこの立下り時間に左右されるので、これをいかに短縮するかが重要な点である。

#### (3) 温度特性

微生物センサは生化学反応を利用しているので温度依存性が大きい。すなわち、常温付近では温度が上昇すると微生物の活性が高まり、呼吸による酸素消費量も多くなるため出力が大となる。したがって恒温水槽などを用いて温度一定状態に保って測定を行うことが必要である。温度20～30℃で、100、200 mg/lの試料測定時の温度特性を図5に示す。

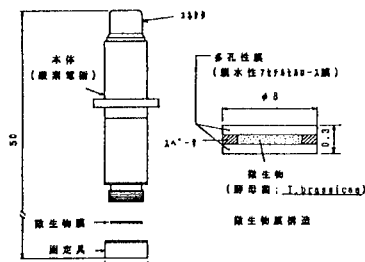


図1. 有機酸センサの構造

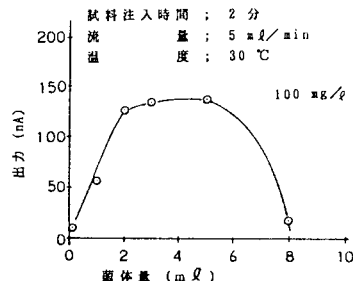


図2. 微生物膜中の菌体量と出力の関係

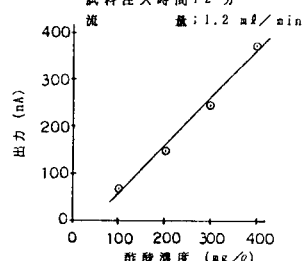


図3. 検量線の一例

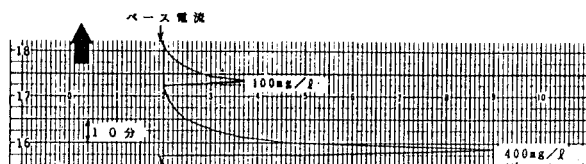


図4. 応答例(チャート)

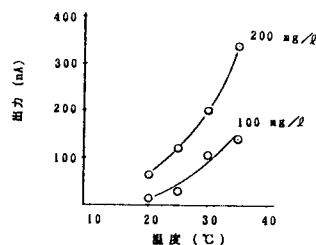


図5. 温度特性

室温 25℃前後の環境で使用することを考えてセンサ部の温度は 30℃に保つことにした。

(4) pH 特性

100 mg/ℓ の試料について、pH を 1～7 の範囲で調整し、各 pH での出力を調べた結果を図 6 に示す。酢酸の pKa 値 (25℃) は 4.7 であるので、pH 7 ではイオンとして存在し、ガス化しないので出力はゼロとなっている。pH は 3 以下に調整して測定を行う必要がある。

(5) 微生物膜の違いによる出力差

微生物膜の特性のパラツキはどの程度あるかを調べるため、同一製作ロットの 5 個について出力比較を行った結果を図 7 に示す。酢酸濃度 100 mg/ℓ の測定で C. V 6.8% であった。

製作ロットが異なる場合には、さらに特性の差が大きくなることも考えて、センサからの出力信号を受ける測定回路部には、微生物膜の特性の違いをカバーできる調整機能を持たせる必要がある。

(6) 各種有機酸に対する感度

酢酸を用いて諸特性を調査してきたが、他の有機酸に対する感度はどうかを調べた結果の一例を表 1 に示す。酢酸に対する感度を 100% として、それとの比率 (%) で示してある。

表 1. 各種有機酸に対する感度比 (酢酸を 100% として)

酢酸	酪酸	アピロリン酸	n-酪酸	乳酸	コハク酸	酒石酸
100%	32%	140%	151%	0%	0%	0%

(7) 連続試験

一つのセンサについて長期的に出力の変化を調べた結果を図 8 に示す。この試験は、30 分に 1 回酢酸標準液を測定し、測定時以外はゼロ液を流しておいたものである。図 8 は各日の一定時刻の測定値をプロットしたものである。長期的にみた出力の変動はかなりのあるが、各時点での検量線の直線性は保たれていた。図 9 に検量線の経時変化を示す。

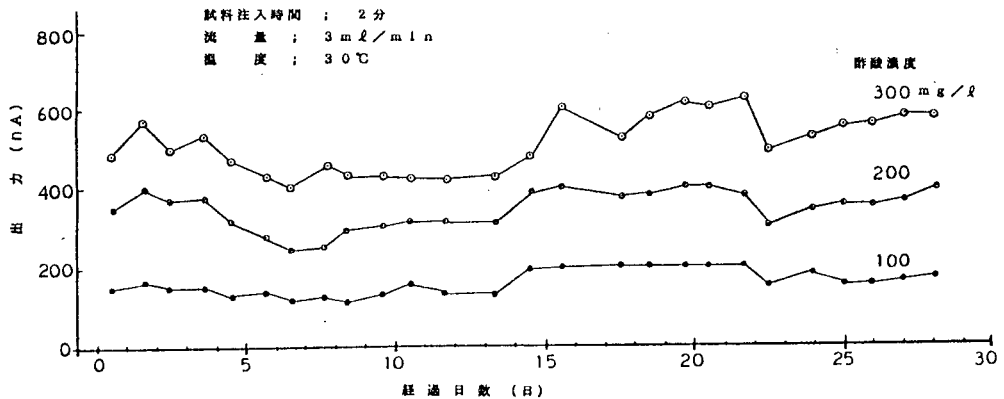


図 8. 連続試験, 出力の経時変化

これらの結果よりみて、有機酸センサは 1 ヶ月以上連続使用可能であり、また測定システムとしては、標準液による校正は 2 回/日程度必要である。

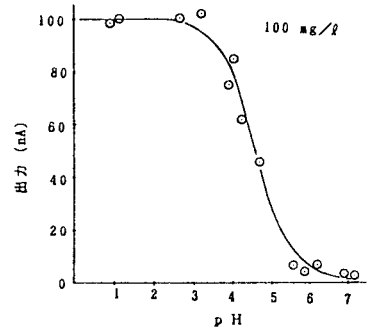


図 6. pH 特性

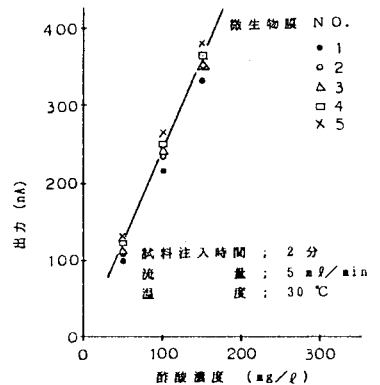


図 7. 微生物膜の違いによる出力差

#### 4. 測定システム

汚泥液試料の前処理部まで含めた測定システムを試作した。図10に測定システムのフロー図を示す。

センサの汚れ付着防止のため、測定部に導入する試料は固形分を除去する前処理が必要で、サンプリングした汚泥液をUF膜により濾過する前処理部を設けた。

測定部については、必要な試料液量をできるだけ少なく、またバッファ液（pH調整液）の消費量も少なくするために、オートサンプラにより試料を測定セルに自動的に注入する方式を採用した。

この測定部で酢酸標準液を測定した検量線の一例を図11に、また2つのセンサについて行った繰り返し性試験の結果を表2に示す。

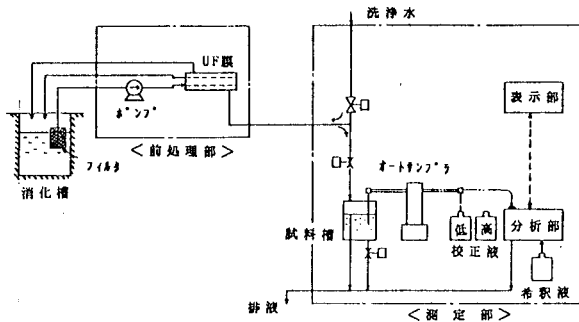


図10. 測定システムフロー図

また、下水処理場の汚泥消化槽からサンプリングした汚泥液の有機酸濃度をこの測定システムで測定し、さらにL.C.法で測定して比較した結果を図12に示す。良い相関性が認められた。

#### 5. あとがき

以上微生物膜を用いた有機酸センサの諸特性と試作した測定システムの概要について述べた。応答時間、各種有機酸に対する感度、感度の経時変化などいくつかの課題はまだあるが、さらに改良検討を行い、測定システムとしては長期フィールドテストによる評価を行って、実用化に向けて開発を進めていきたいと考えている。

なお、この研究は建設省土木研究所と「バイオセンサの開発に関する共同研究（プロセス監視制御用バイオセンサの開発）」として実施しているものである。

#### 【参考文献】

- 1) 軽部征夫, (1986), バイオセンサ, 共立出版
- 2) 浅野泰一, 鈴木周一, (1987), 微生物センサ, 環境と測定技術, 14, 1, 85~95
- 3) M. Hikuma, T. Kubo, T. Yasuda, I. Karube, S. Suzuki, (1979), Anal. Chim. Acta, 109, 33~38
- 4) 佐藤和明, (1978), 嫌気性消化における揮発性有機酸構成成分の挙動, 第14回衛生工学研究討論会講演論文集, 44~49
- 5) 江藤幹愛, 小林文恵, 伊藤哲, 浅野泰一, 引馬基彦, 安田武夫, 軽部征夫, 鈴木周一, (1982), 微生物センサによる酢酸の定量, 日本化学会第46秋季年会講演予稿集, 3Y09

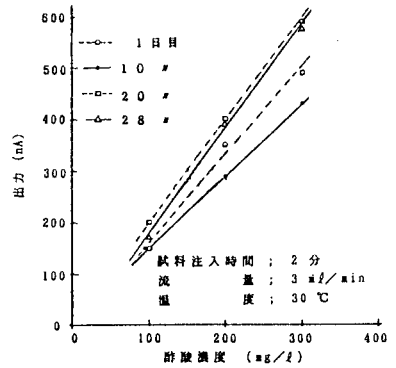


図9. 検量線の経時変化

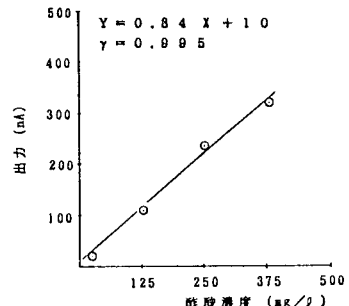


図11. 検量線

表2. 繰返し性

	NO.1 センサ	NO.2 センサ
1 回目	162 nA	103 nA
2 回目	163	108
3 回目	162	96
4 回目	162	103
5 回目	160	96
6 回目	161	104
7 回目	160	96
8 回目	166	107
9 回目	163	100
10 回目	161	102
平均値 ( $\bar{X}$ )	162.00	101.50
標準偏差 ( $\sigma$ )	1.784	4.430
変動係数 (CV)	1.09	4.36

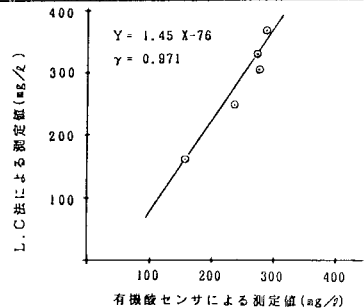


図12. L.C法による測定値との相関