VOC 計測のためのホルムアルデヒドガス用酵素電極

三 林 浩 二^{1,*1} 西 尾 元 気^{2,*2}

¹東京医科歯科大学学生体材料工学研究所

²東海大学大学院工学研究科電気工学専攻

J. Japan Inst. Metals, Vol. 69, No. 8 (2005), pp. 680-683

Special Issue on Smart Materials

© 2005 The Japan Institute of Metals

Enzyme Electrode for Formaldehyde Vapor as VOC Chemicals

Kohji Mitsubayashi^{1,*1} and Genki Nishio^{2,*2}

¹*Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 101-0062*

²*Course of Electrical Engineering Graduate School of Engineering, Tokai University, Hiratsuka 259-1292*

An enzymatic gas sensor (called “bio-sniffer”) for formaldehyde vapor was constructed by immobilizing formaldehyde dehydrogenase (FALDH) to hydrophilic polytetrafluoroethylene (H-PTFE) membrane with Platinum-coated electrodes. The platinum electrodes (300 nm) were formed by sputter deposition onto both sides of the H-PTFE membrane (thickness = 80 μm , pore size = 0.2 μm). The oxidation current of NADH (reduction form) being produced by FALDH enzyme reaction with NAD⁺ (oxidized form) could be measured by amperometric analysis between two Pt electrodes. The bio-sniffer was used to measure formaldehyde vapor with the calibration range from 40 to 3000 ppb, including the maximum permitted concentration of 80 ppb, with high selectivity being attributable to the substrate specificity of FALDH as gas recognition material.

By applying the FALDH sniffer for formaldehyde vapor from building timbers, the bio-sniffer could evaluate the concentration of formaldehyde, thus being in agreement with the results in the commercial available detector tube. The bio-sniffer with high gas selectivity would be effective and convenient non-invasive approach to evaluate the formaldehyde concentration in the gas phase.

(Received February 22, 2005; Accepted May 2, 2005)

Keywords: enzyme electrode, bio-sniffer, formaldehyde vapor, formaldehyde dehydrogenase, Platinum-coated electrode, hydrophilic polytetrafluoroethylene membrane, gas-selectivity, VOC (Volatile Organic Compounds)

1. 緒 言

近年、住宅の高気密、高断熱化が進むなか住宅建材や家具に含まれる Volatile Organic Compounds (VOC: 揮発性有機化合物) による生体への影響が危惧されている¹⁻⁴⁾。特に接着剤や木材保存剤、化学塗料などから放出されるホルムアルデヒドガスはシックハウス症候群を誘発する主要な VOC で、許容濃度は日本の厚生労働省、WHO とともに 80 ppb と定めている⁵⁾。しかしながら、人のホルムアルデヒドガスに対する嗅覚閾値は 410 ppb と高く、嗅覚にてホルムアルデヒドを許容濃度以下で検出することは容易でない。

既存のホルムアルデヒドガス計測法である吸光光度法⁶⁾や蛍光法などの手法は操作が煩雑かつ装置が高価で、室内でのホルムアルデヒドガスの濃度変化を簡便かつ連続的に評価することは容易でない。また、半導体式などの市販ガスセンサにおいては簡便な連続計測が可能であるものの、ホルムアルデヒドに対するガス選択性が不十分で建築資材⁷⁻⁹⁾のほか、生体臭や飲食品からの臭気など、多様な匂い成分を含む家屋

内にて、ホルムアルデヒドガスの濃度を選択的に計測するには適していない。このような状況のもと、簡便かつ選択的に VOC 成分を計測可能なセンサおよび計測技術が求められている。

一方、生体には酵素や抗体など、化学物質を特異的認識するタンパク質が存在し、これら生体認識材料を利用したバイオセンシングが医療分野を中心に広く利用されている。そこで本研究では、生物の代謝酵素の一つであるホルムアルデヒド脱水素酵素をホルムアルデヒドガスの認識素子として用い、親水性の多孔質膜にスパッタ成膜した白金電極に本酵素を固定化し、スティック形状のホルムアルデヒドガス用の酵素電極を作製し、実際に建築用木材から放出されるホルムアルデヒドガスの簡便計測に適用し、その有効性を調べた。

2. 実 験 方 法

2.1 ホルムアルデヒドガス用酵素電極(バイオスニファ)の作製および特性評価

生物の代謝酵素にはアルデヒドを認識する複数の酵素が存在する¹⁰⁻¹²⁾。本実験では特に、ホルムアルデヒドに対する基質特異性が高い、ホルムアルデヒド脱水素酵素 (FALDH,

*1 Corresponding author, E-mail: m.bdi@tmd.ac.jp

*2 東海大学大学院生 (Graduate Student, Tokai University)

EC1. 2. 1. 1, FUNAKOSHI 社製)をガス認識素子として用いてガス計測用酵素電極(バイオスニファ)を作製した。

作製したバイオスニファの構造図を Fig. 1 に示す。本センサは親水性多孔質の両面に白金電極を形成し、その一面に FALDH 酵素膜を重ね合わせた積層構造を有している。センサの作製ではまず、親水性の多孔質ポリテトラフルオロエチレン膜(H-PTFE membrane: JGWP14225, thickness=80 μm , pore size=0.2 μm , NIHON MILLIPORE LTD., TOKYO, JAPAN)の表裏面に白金電極(膜厚: 300 nm)をスパッタリングにてそれぞれ直接積層し、スティック形状(長さ: 70 mm, 幅: 3 mm)に切断加工した。次に、電極の両端にそれぞれセンサ感応部(5 mm)と端子部(5 mm)を設けるため、電極中央部にスチロール樹脂系接着剤(Konishi Co., Ltd., OSAKA, JAPAN)を塗布・含浸して、電極中央部を被覆した。なお作製した電極は親水性の多孔質膜の両面に白金層が積層されていることから、白金電極の表面より接着剤を塗布し、白金層および多孔質層内に容易に浸透し全体をモールドすることで、塗布した部分を不感応化し、この部分を電気的なリード線として使用することができる¹³⁾。最後に、ホルムアルデヒド脱水素酵素(FALDH: EC1. 2. 1. 1)と光架橋性樹脂(PVA-SbQ, Type: SPP-H-13(Bio), Toyo Gosei Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan)の混合液(質量比 1:1)を^{14,15)}、感応部に重ね合わせた H-PTFE 膜に塗布し、蛍光灯照射にて光架橋にて包括固定化し作製した。

ホルムアルデヒド用バイオセンサでは Fig. 2 の酵素反応および電極反応式に示すように、酸化型 NAD^+ を補酵素とし FALDH によるホルムアルデヒドの脱水素反応で生ずる還元型 NADH を白金電極にてアンペロメトリックに検出し、ホルムアルデヒドを計測することが可能である。なお NADH 計測ではまず最適な印加電位を調べるため、作製した電極のサイクリックボルタモグラム(CV)を計測した。測定では、電位走査幅を 0–1200 mV に設定し、NADH 2.0

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ を混合したリン酸緩衝液(pH 8.0, 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)中にセンサ感応部を浸し、電位走査幅を 2 mV/s にて CV 実験を行い、この結果をもとに白金電極の NADH 定量特性および FALDH センサでの酵素反応にて必要な NAD^+ 濃度を求めた。

次に、FALDH センサをバイオスニファとしてホルムアルデヒドガス計測に適用した。実験では、ガス発生装置より一定濃度のホルムアルデヒドガスを発生させサンプルバック(110 mL)に充填し、補酵素である NAD^+ を含むリン酸緩衝液(pH 8.0, 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)にてセンサ感応部を湿潤させたセンサ感応部をサンプルバックに挿入し、ホルムアルデヒドガスに対するスニファの出力応答を、ポテンシオスタットと AD 変換器を介してコンピュータにて計測することとした。また複数の有機ガス物質をセンサに負荷し、FALDH スニファのガス種に対する選択性についても調べることにした。

2.2 建築用合板より放出されるホルムアルデヒドガスの計測

ホルムアルデヒドは主要な VOC であることから、実際に住宅建材から放出されるホルムアルデヒドガスの計測に FALDH スニファを適用した。実験では、建築用資材である建築用合板のうち、3 種の内装用合板(A, B, C, ホルムアルデヒドの発散速度: $\text{F☆☆☆☆}=5 \mu\text{g}/\text{m}^2 \text{h}$ 以下, 厚さ: 9 mm)と 2 種の型枠用合板(D, E, ホルムアルデヒドの発散速度: $\text{F☆☆☆}=5\text{--}20 \mu\text{g}/\text{m}^2 \text{h}$, 厚さ: 12 mm)の計 5 種類の合板について、それぞれ縦: 30 mm, 横: 30 mm で切り出した後、各々の合板をサンプルバック内(1000 mL, TEDLAR, 155 $\times$ 250 mm)に 3 時間放置(温度: 25 $^{\circ}\text{C}$, 湿度: 30%)し合板から放出する気体を採取し、本スニファを用いてホルムアルデヒドガスの計測を行った。なお比較のため、市販のガス検知管(No. 91L, detective range: 100–5000 ppb, GASTEC Corp., Kanagawa, Japan)を利用して同時に計測し^{16,17)}、バイオスニファの出力の妥当性を評価した。(なお検知管については、反応に伴うカラムの色の変化を目盛りにもとづき読み取るものとした)。

3. 結果と考察

3.1 ホルムアルデヒド用バイオスニファの特性評価

センサ特性の評価ではまず、酵素反応生成物である NADH の白金電極による電気化学計測について調べた。Fig. 3 は電位走査幅を 0–1200 mV, 電位走査速度を 2 mV/s に設定し、NADH 2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ に対する白金電極のサイクリックボルタモグラムを示したものである。この図からわかるように、アノード電位の増加(200–1000 mV)に伴う NADH の酸化電流の増加が観察された。一方、NADH を含まない溶液ではアノード電位 800 mV 未満では酸化電流の増加は観察されなかったことから、この結果をもとに作製したセンサでは、+700 mV での定電位電流計測にて NADH を検出することとした。次に本電極にて NADH に対する定量特性を調べた。Fig. 4 は印加電位を +700 mV と設定し、FALDH の酵素反応生成物である NADH に対する出力応答

Fig. 1 Structure of a bio-sniffer for formaldehyde vapor using FALDH.

Fig. 2 Enzyme and electrochemical reactions for detecting formaldehyde with NAD^+ .

の定常値をもとに調べた、センサの NADH 定量特性を示したものである。この図からわかるように、NADH の濃度増加に伴う出力電流値の上昇が確認され、次式の回帰式を(相関係数: 0.990)に基づき、 $10\text{--}500\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADH の範囲で出力の増加が確認された。

$$\text{output current (nA)} = 0.642[\text{NADH}(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})]^{1.70}$$

なお NADH 濃度が $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上では、出力電流の飽和値への漸次増加傾向が観察されたことから、FALDH の酵素反応にて補酵素 NAD^+ 濃度が反応律速とならないように、センサ反応部を湿潤させるリン酸緩衝液の NAD^+ 濃度は $2.0\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ と設定することとした。

次に以上の条件のもと、FALDH バイオスニファにてホルムアルデヒドガスに対するセンサ特性を調べた。実験ではガス発生装置にて発生させた一定濃度のホルムアルデヒドガスをサンプルバックに充填し、センサ感应部を NAD^+ を含むリン酸緩衝液にて湿潤させたスニファを挿入し出力電流値を連続計測し、その定常値をもとに FALDH スニファのホルムアルデヒドに対する定量特性を調べた。Fig. 5 は FALDH

バイオスニファのホルムアルデヒドに対する検量特性を示したものである。この図からわかるように、負荷したホルムアルデヒドガス濃度の増加に伴う電流定常値の増加が観察され、次式の検量式のもとホルムアルデヒドガスを $40\text{--}3000$ ppb の範囲で定量することが可能であった(相関係数: 0.999)。

$$\text{output current (nA)} = 2.09[\text{formaldehyde (ppb)}]^{0.846}$$

なお厚生労働省および WHO のホルムアルデヒドの規制値である 80 ppb およびホルムアルデヒドに対する人の嗅覚閾値である 410 ppb をそれぞれ含む範囲内にて、本スニファにてホルムアルデヒドを定量することが可能であることがわかった。

また作製した FALDH スニファのガス種に対する選択性を、複数の揮発性有機化合物ガス(ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、エタノール、メタノール、ベンゼン、アセトン、各 2.0 ppm)を用いて調べた。Fig. 6 は 2.0 ppm ホルムアルデヒドガスに対する出力を 100% とし、FALDH スニファの各ガス成分に対する出力応答を比較したものである。こ

Fig. 3 Cyclic voltammogram of Platinum-electrodes to $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADH solution.

Fig. 4 Calibration curve of Platinum electrodes for NADH solution as enzyme product of FALDH with formaldehyde.

Fig. 5 Calibration curve of the bio-sniffer for formaldehyde vapor.

Fig. 6 Gas-selectivity of the FALDH sniffer by applying various chemical vapors of 2.0 ppm (formaldehyde, acetaldehyde, ethanol, methanol, benzene and acetone).

Table 1 Comparison of formaldehyde vapor between the FALDH sniffer and detector tube.

Sample	Class	FALDH bio-sniffer (ppb)	Detector tube (ppb)
Timber	A F☆☆☆☆	70	100
	B F☆☆☆☆	80	100
	C F☆☆☆☆	70	100
	D F☆☆☆	1200	1000
	E F☆☆☆	2200	2000

の図からわかるように、アルコール類やケトン類には全く応答を示さず、アルデヒド類であるアセトアルデヒドについてもほとんど応答を示さず、FALDH 酵素の基質特異性に基づいた、極めて高いガス選択性を有することが確認された。

3.2 建築用合板より放出されるホルムアルデヒドガスの計測

前節に示したように、ホルムアルデヒド脱水素酵素を用いて作製したバイオスニファでは高いガス選択性を以ってホルムアルデヒドガスを 40 ppb より計測可能であることがわかった。そこで次に、住環境での VOC の発生源の一つと考えられている建築用合板について、その放出ガスに含まれるホルムアルデヒドを計測した。

Table 1 は 3 種の内装用合板 (A, B, C, ホルムアルデヒドの発散速度: F☆☆☆☆: $5 \mu\text{g}/\text{m}^2 \text{h}$ 以下, 厚さ: 9 mm) と 2 種の型枠用合板 (D, E, ホルムアルデヒドの発散速度: F☆☆☆: $5\text{--}20 \mu\text{g}/\text{m}^2 \text{h}$, 厚さ: 12 mm) の計 5 種類の合板について、FALDH スニファと市販の検知管との結果を比較したものである。この表からもわかるように、F☆☆☆☆合板では規制値以下の 80 ppm の濃度が検出され、他方、F☆☆☆合板では規制値 80 ppm を超える高濃度のホルムアルデヒドガスが検出された。また検知管を用いた実験においてもほぼ同様な出力結果が得られ、作製したバイオスニファの妥当性が確認された。なおガス検知管では一つの検知管で 1 回の計測のみ可能で、その都度検知管を交換する必要があるが、バイオスニファではセンサ感応部をリン酸緩衝液にて洗浄することで、酵素活性が維持されている間は繰り返し用いることが可能であった。

4. 結 論

ホルムアルデヒド脱水素酵素をガス認識材料として、親水性の多孔質膜に成膜した白金電極にて新規なガス計測用酵素電極であるホルムアルデヒド用バイオスニファを作製した。本センサをホルムアルデヒドガス計測に供したところ、厚生

労働省および WHO のホルムアルデヒドの規制値である 80 ppb, およびホルムアルデヒドに対する人の嗅覚閾値である 410 ppb をそれぞれ含む、40–3000 ppb の範囲でホルムアルデヒドガスの定量が可能であった。また酵素を認識素子として利用したことで、酵素の基質特異性に基づく高いガス選択性が得られた。

住環境での VOC の発生源の一つである建築用合板について、その放出ガス中のホルムアルデヒド濃度を FALDH スニファにて調べ、市販の検知管と比較したところ、室内用ならびに外枠用合板においてそれぞれ規制値に応じた同様な出力がスニファと検知管で共に計測され、本センサの有効性が確認された。

バイオスニファはその作製が容易で、簡便計測が可能、そして高いガス選択性を有しており、住環境にけるホルムアルデヒドガス計測に適したデバイスである。今後、他の VOC 成分や揮発性化学物質、匂い成分などを対象としたバイオスニファを多様な生体認識素子を利用し開発することで、環境のみならず医療や食品、衛生、通信などの分野へと利用・展開できるものと期待される。

本研究は、東京応化科学技術支援財団ならびに財団法人セコム科学技術振興財団の助成対象であることをここに記し、感謝の意を表します。

文 献

- 1) Architectural Institute of Japan, Countermeasure for Sick-house Syndrome, (Shokokusha K.K., 2002) pp. 21–24.
- 2) Architectural Institute of Japan, Countermeasure for Sick-house Syndrome, (Shokokusha K.K., 2002) pp. 83–88.
- 3) S. Tanab: Chemical pollution in house, (Kodan-sha K.K., 1998) pp. 38–57.
- 4) S. Tanab: Chemical pollution in house, (Kodan-sha K.K., 1998) pp. 61–78.
- 5) H. Yamaguchi, H. Okada, K. Tomioka, Y. Fuse and T. Naritomi: Evironmrnt and Chemical Analysis **26**(1999) 63.
- 6) H.-J. Buschmann: Schollmeyer **E 71**(1990) 551.
- 7) K. Sugimoto: Dictionary of Architectural materials, (Nihon Jitsugyo-Shuppan K.K., 2003) p. 18–19, 34–36.
- 8) K. Sugimoto: Dictionary of Architectural materials, (Nihon Jitsugyo-Shuppan K.K., 2003) pp. 204–205.
- 9) K. Sugimoto: Dictionary of Architectural materials, (Nihon Jitsugyo-Shuppan K.K., 2003) pp. 234–235.
- 10) T. Noguer and J. L. Marty: Anal. Lett. **30**(1997) 1069–1080.
- 11) M. Hammerle and E. A. H. Hall: Biosens. and Bioelectron. **11**(1996) 239.
- 12) T. Noguer and J. L. Marty: Anal. Chim. Acta **347**(1997) 63–70.
- 13) K. Mitsubayashi, K. Yokoyama, T. Takeuchi, E. Tamiya and I. Karube: Anal. Chem. **65**(1993) 3586–3589.
- 14) K. Ichimura and J. Polym. Sci. **22**(1984) 2817–2822.
- 15) K. Mitsubayashi and Y. Hashimoto: Sensors and Actuators B **83**(2002) 35–40.
- 16) K. Syono: Handbook of Gas Analysis, (Gastec Co. Ltd., 1993) p. 213.
- 17) M. Hori, H. Uda and K. Yan: Bunseki **47**(1998) 405.