The degree of supercooling (the difference between the critical decomposition temperature and the crystallization temperature of the gas hydrate) was decreased with decreasing aging temperature at which the flon-water mixtures were kept with agitation for a given period before cooling. The aging period did not affect the degree of supercooling. The agitation rate seemed to have no effect on it. The relationship between the degree of supercooling and the aging temperature was determined.

高精度恒温槽を用いた酵素サーミスタの温度応答特性[†]

金木則明・坂井宏光・横田健之助
竹内隆男・島田浩次・原 弘

室蘭工業大学工学部 化学工学科^{††}

近年、有機物を簡便に定量できるバイオセンサの1つとして酵素サーミスタが数多く研究されている^{1,3,4)}。しかし酵素サーミスタは酵素反応に伴う微小な反応熱を検出して試料を定量しなければならないため、温度を精度良く測定することが要求される。そのためには高精度な恒温槽が必要である。

本実験では遅れ時間の大きい恒温槽を高精度にするために恒温槽を二重槽構造にして、マイクロコンピュータを用いてプロセスの遅れを無視できるサンプリング制御操作について検討した。また、この精密恒温槽を用いてペルオキシダーゼを固定化した酵素サーミスタを構築し、医薬品に有用なグアヤコールを定量化し、2, 3の結果がえられたので報告する。

1. 実験

1.1 恒温槽

本実験に用いた恒温槽はFig. 1の酵素サーミスタ概略図中に示されている。恒温槽は精密制御するために第I槽と第II槽からなる二重槽構造になっている。第I槽は25×28×38cmの大きさのアスベスト製の空気浴槽になっており、槽内温度をPID調節計(DF 263, 千野)により±0.1Kの精度で制御した。第II槽は10×10×10cmの大きさのステンレス製水槽でマイクロコンピュータ(PC8801 Mark II, 日本電気)で制御した。温度測定はブリッジ回路に組込んだサーミスタ(石塚電子(株)製)を使用し、その出力はデジタルメータ(TR 6851, タケダ理研)で測定し GPIB (NEC 8897, 日本電気)を介してマイクロ

ンピュータに入力した。なおサーミスタは感度および応答を考慮して外径0.6mmのカテーテル型マイクロサーミスタを使用し、白金抵抗体で検量され10⁻⁵Kの精度で温度測定可能である。マイクロコンピュータからの制御信号はD/Aコンバータ(DA-6, CONTEC)を介して自作の電流制御器に入力され、槽内ヒータを制御する。ヒータへの電流は雑音防止を考慮してすべて直流電流とし、最大電流は第I槽で1A, 第II槽で0.2Aである。プログラム言語はBASICを使用した。

1.2 酵素サーミスタ

ペルオキシダーゼは酸化還元酵素でグアヤコールを基質とし、次式で示すような反応の触媒である。

ここでAH₂はグアヤコール、A・はその1電子酸化型を表している。この反応による微小反応熱4Qを測定することによりグアヤコールの定量が可能となる。そこで本実験ではこの微小反応熱を上記の精密恒温槽を用いて検出する酵素サーミスタを構築し、そのセンサ特性について検討した。

ペルオキシダーゼは多孔性ガラスビーズに共有結合法で固定化²⁾して用いた。固定化法はまず80~120 meshガラスビーズ(CPG-10, 小宗化学)を3-アミノプロピルトリエトキシシランの2%アセトン溶液に318K, 2時間浸してアルキルアミンガラスにした。次にペルオキシダーゼ(1.97kat kg⁻¹, Toyobo) 0.15gを0.3M炭酸水素ナトリウム溶液に溶解し、0.06M過ヨウ素酸ナトリウムを加え暗所、室温で30分間攪拌してアルデヒド基を導入した。さらに1.6Mグリセロール溶液を添加して反応を止めた後、0.01M炭酸緩衝液(pH 9.5)に対して281K, 12時

[†] 1987年11月6日受理

^{††} 〒050 室蘭市水元町27-1

Fig. 1 Schematic representation of enzyme thermistor: a, pump; b, injector; c, heat exchanger coil; d, enzyme column; e, thermistor; f, stirrer; g, bridge; h, digital meter; i, microcomputer; j, thermostat I; k, thermostat II; l, DA converter; m, VI converter; n, controller; o, heater

間透析した。このようにして活性化した酵素とアミノアルキルガラスビーズ0.3gとを室温で2時間攪拌した後、4°Cにして水酸化ホウ素ナトリウムを添加してガラスビーズに固定化した。このペルオキシダーゼを固定化したガラスビーズ0.3gを内径3mm、長さ50mmのガラス管に充填し、固定化ペルオキシダーゼカラムを作製した。この酵素カラムとサーミスタを精密恒温槽内で組合わせて酵素サーミスタを構築した。その実験装置の概略図をFig. 1に示す。キャリア溶液は0.1Mリン酸緩衝液(pH 6.5)でチューブポンプにより装置内に一定流量で流した。試料グアヤコールはH₂O₂とともに体積比1:1でシリンジによってインジェクタよりキャリア溶液中に0.1cm³注入し、熱交換コイルを経て酵素カラムに入る。酵素カラム内に供給されたグアヤコールとH₂O₂はペルオキシダーゼにより酵素反応し、その反応熱をカラム出口に取り付けられたマイクロサーミスタで計測し、グアヤコール濃度を定量する。なおマイクロサーミスタからの信号はマイクロコンピュータに入力し、CRTに出力され温度変化として表示可能となっている。

2. 結果および考察

2.1 恒温槽の温度制御

第I槽は311.5±0.1Kの精度で温度制御された。第II槽を1/4感度法によりパラメータ調整してPID制御した。その結果をFig. 2に示す。図は目標値温度313Kで制御したときの第II槽の温度変化を示し、縦軸の0は313Kである。Fig. 2よりPID制御では設定値に対して±1.3×10⁻³Kの精度で温度制御されている。これは調節計のパラメータ調整だけでは振動を生じる。そこで振動を消去

Fig. 2 Temperature dynamics at a set point of 313 K

し、精度を上げるために次にコンピュータ制御した。その制御方法は目標値温度に対してオーバーしない必要最小限の熱を加えて行い、即ちヒータに130mAの電流を連続的に流してメイン電流とし、さらに80mAの電流を制御電流として目標値に対してon-off制御しメイン電流に加えて行った。なお電流値は実験より求めた。この制御をサンプリング周期で大きく影響し、Fig. 2にサンプリング周期0.5, 4sで行った結果を示した。図よりサンプリング周期4sでは±4×10⁻⁴Kの精度で、0.5sでは±1×10⁻⁴Kの高精度で温度制御できた。したがって、サンプリング周期によって制御特性は改善される。以上より外部冷却装置をもたない本恒温槽は目標温度に対して必要最小限の熱を加え、サンプリング周期を短くして監視する温度制御により精度良く制御できる。

2.2 酵素サーミスタ

酵素サーミスタの温度応答はキャリア溶液流量に影響されるがその結果をFig. 3に示した。図は試料0.1Mグアヤコールと0.1M過酸化水素とを体積比1:1でインジェクタに0.1cm³注入したときの温度応答ピーク高ささとキャリア溶液流量の関係を示している。図より温度応答ピーク高さは流量2.5cm³min⁻¹以下までは流量の増加とともに増加し、それ以上で飽和に達する。したがって本実験では流量2.5cm³min⁻¹を最適操作条件として以下この条件で実験を行った。Fig. 4はグアヤコール濃度、30, 40, 50mMに対する酵素サーミスタの温度応答曲線を示している。図より温度応答は試料注入後約1.4minでピークに達し2.4minでピークが終了している。また温度応答ピーク高さは繰返しに対して安定しており、グアヤコ

Fig. 3 Effects of flow rate on temperature response. Sample volume 0.1 cm^3 (guaiacol: $\text{H}_2\text{O}_2 = 1:1$), guaiacol 0.1 M , H_2O_2 0.1 M

ールのそれぞれの濃度で再現性が得られた。Fig. 5 は温度応答ピーク高さとグアヤコール濃度の関係を示している。図中の直線 A および B はグアヤコールの濃度 $5 \sim 100\text{ mM}$ 範囲および $0.1 \sim 10\text{ mM}$ 範囲での温度応答ピーク高さをそれぞれ示している。図より温度応答ピーク高さとグアヤコール濃度関係は直線 A および B ともに直線関係を示している。したがって、本酵素サーミスタはグアヤコールの計測で濃度 $0.1 \sim 100\text{ mM}$ の範囲で有効である。Fig. 5 は pH 6.5 のキャリア溶液での温度応答結果を示しているが pH の影響を調べるために pH 4.0 $\sim$ 9.5 の範囲で実験を行った。その結果、それぞれの温度応答はほぼ同様な特性結果を示したので本酵素サーミスタはこの pH 範囲で余り pH に影響されないで計測できることが明らかになった。また本酵素サーミスタは 10 mM グアヤコールによる繰返し注入の寿命試験の結果、温度応答性能は注入回数 500 回まではほとんど低下しなかった。また固定化ペルオキシダーゼは約 3 カ月間経過しても活性はほとんど低下しなかったことが確認された。 10^{-4} K の温度制御できる恒温槽中で、外乱を小さくした酵素サーミスタによる酵素反応の温度は 10^{-3} K の精度まで計測可能であった。

〔謝 辞〕 本実験を行うにあたり、石塚電子㈱の御厚意により高性能なカテーテル型マイクロサーミスタを提供して頂いたことに対して心から感謝の意を表します。

Fig. 4 Temperature response dynamics in enzyme thermistor at various concentrations of guaiacol. Flow rate 2.5 cm^3 (guaiacol: $\text{H}_2\text{O}_2 = 1:1$), H_2O_2 0.1 M

Fig. 5 Temperature response as a function of guaiacol concentration in 0.1 cm^3 samples at a flow rate $2.5\text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$. A, 100 mM H_2O_2 ; B, 10 mM H_2O_2

Literature cited

- 1) Kiba, N., T. Tomiyama and M. Furusawa: *Talanta*, **31**, 131 (1984)
- 2) Nippon Kagaku kai: "Seibutsukagaku (I)", p.379, Maruzen, Tokyo (1978)
- 3) Satoh, I., S. Kimura and N. Teramura: Preprints of 5th Chemical Sensor Sym., Japan, Tokyo, p. 21 (1986)
- 4) Scheller, F., N. Siegbahn, B. Danielsson and K. Mosbach: *Anal. Chem.*, **57**, 1740 (1985)

Temperature Response Characteristics of Enzyme Thermistor Using Precisely Thermostated Bath

Noriaki Kaneki, Hiromitsu Sakai, Kennosuke Yokota,
Takao Takeuchi, Koji Shimada and Hiroshi Hara

Dept. of Chem. Eng., Muroran Inst. of Tech., Muroran 050

Key Words : Enzyme Thermistor, Guaiacol, Peroxidase, Thermostated Bath, Biosensor

It was proposed that a precise thermostat used for an enzyme thermistor could be easily and accurately controlled by a microcomputer. The enzyme thermistor using the thermostat determined guaiacol, which is useful as a medicine. The temperature of the thermostat was controlled by means of a method of supervision with a short sampling period. The result demonstrated that the thermostat was controlled to an accuracy of $\pm 10^{-4}$ K. In the pH 4.0 to 9.5 region the concentration of guaiacol was determined with the enzyme thermistor in the range of 0.1~100mM. The temperature response was stable during the course of 500 runs with 10mM guaiacol.

下水汚泥のベルトプレス脱水における重力沍過ケーキの強度と脱水特性との関係[†]

五十嵐千秋

(株)荏原総合研究所^{††}

各種汚泥の脱水操作に広く用いられているベルトプレス型脱水機では、重力沍過ケーキの強度が十分でないと、後段の圧搾脱水工程で脱水ケーキのサイドリークや沍布の目詰りが生じることが知られている。このことは、処理速度の低下、脱水ケーキ水分の上昇あるいは洗浄水量の増大等による脱水性能の低下につながるため、汚泥の凝集脱水操作には、重力沍過ケーキの強度に関する知見が不可欠である。

著者らは、有機高分子凝集剤（以下ポリマーと略す）を用いる有機性汚泥の凝集脱水操作では、ブレイク点、すなわち、ポリマーが液中に残留しはじめる添加率において、凝集汚泥の重力沍過速度が極大となり圧搾脱水ケーキ水分が極小となることを、回分脱水試験および実用

規模のベルトプレス脱水試験で見いだしている^{2,3)}。

本研究では、これらの知見にもとづいて、重力沍過ケーキの強度とポリマー添加率の関係を実験的に検討し、ベルトプレス脱水特性と重力沍過ケーキの強度の関係を考察した。

1. 実験方法

試料 供試試料は、都市下水の標準活性汚泥法による処理場から排出された混合生汚泥を用いた。汚泥の性状は、pH 5.1、蒸発残留物 1.21%、強熱減量 70.8%、コロイド荷電量 -0.134 eq/m^3 、CST 2510s であった。ポリマー試料として、Table 1 に示す 4 種類のカチオンポリマーおよび 1 種類のアニオンポリマーを用いた。

脱水試験手順 凝集脱水試験は、既報²⁾と同様の方法を用いた。

重力沍過ケーキの強度の測定方法 重力沍過ケーキの強度の測定には、林ら¹⁾の方法を用いた。すなわち、上記脱水試験手順で作製した重力沍過ケーキ上に、所定

† 1988年1月20日受理；化学工学協会第51年会（大阪，1986年3月），第4回アジア太平洋化学工学連合会議（APCChE '87，シンガポール，1987年5月）にて一部発表

†† 〒251 神奈川県藤沢市本藤沢4-2-1