

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4875367号
(P4875367)

(45) 発行日 平成24年2月15日(2012.2.15)

(24) 登録日 平成23年12月2日(2011.12.2)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 1/20 (2006.01)		C 1 2 N 1/20	B
C 1 2 N 11/00 (2006.01)		C 1 2 N 11/00	
C 1 2 R 1/01 (2006.01)		C 1 2 N 1/20	B
		C 1 2 R 1:01	
		C 1 2 N 11/00	

請求項の数 10 (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-11426 (P2006-11426)	(73) 特許権者	507214083
(22) 出願日	平成18年1月19日(2006.1.19)		メタウォーター株式会社
(65) 公開番号	特開2007-189952 (P2007-189952A)		東京都港区虎ノ門四丁目3番1号
(43) 公開日	平成19年8月2日(2007.8.2)	(74) 代理人	100099623
審査請求日	平成21年1月16日(2009.1.16)		弁理士 奥山 尚一
		(74) 代理人	100096769
			弁理士 有原 幸一
		(74) 代理人	100107319
			弁理士 松島 鉄男
		(74) 代理人	100114591
			弁理士 河村 英文
		(74) 代理人	100118407
			弁理士 吉田 尚美
		(74) 代理人	100125380
			弁理士 中村 綾子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 硝化細菌固定化膜の保存液

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

硝化細菌固定化膜の保存液であって、固定化された硝化細菌の基質及び必須栄養素、並びにオキサル酢酸を含有したホウ酸緩衝液から成ることを特徴とする硝化細菌固定化膜の保存液。

【請求項 2】

上記硝化細菌固定化膜がバイオセンサに用いられるものであり、該バイオセンサが水質計測器に利用されるものであることを特徴とする請求項 1 に記載の硝化細菌固定化膜の保存液。

【請求項 3】

上記水質計測器の計測対象水が流水であり、水道原水、下水、排水のいずれかであることを特徴とする請求項 2 に記載の硝化細菌固定化膜の保存液。

【請求項 4】

上記硝化細菌が、アンモニア酸化細菌及び亜硝酸酸化細菌からなる群から選択される少なくとも一の硝化細菌であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかーに記載の硝化細菌固定化膜の保存液。

【請求項 5】

上記硝化細菌が、アンモニア酸化細菌であり、上記基質としてアンモニウムイオンを含むことを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかーに記載の硝化細菌固定化膜の保存液。

【請求項 6】

上記硝化細菌が、亜硝酸酸化細菌であり、上記基質として亜硝酸イオンを含む請求項 1 ~ 4 のいずれかーに記載の硝化細菌固定化膜の保存液。

【請求項 7】

上記アンモニウムイオン源として、塩化アンモニウム及び硫酸アンモニウムのいずれか少なくとも一を含むことを特徴とする請求項 5 に記載の硝化細菌固定化膜の保存液。

【請求項 8】

上記亜硝酸イオン源として、亜硝酸ナトリウム及び亜硝酸カリウムのいずれか少なくとも一を含むことを特徴とする請求項 6 に記載の硝化細菌固定化膜の保存液。

【請求項 9】

四ホウ酸ナトリウム十水和物を含むことを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれかーに記載の硝化細菌固定化膜の保存液。

10

【請求項 10】

ホウ酸イオン濃度が、1.25 mMであることを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれかーに記載の硝化細菌固定化膜の保存液。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、上下水道の各処理プロセスの水や河川水、湖沼水などの環境水を対象として、水中の化学成分をモニタリングすることを目的としたバイオセンサ応用水質計測器に用いられる硝化細菌固定化膜の保存液に関する。

20

【背景技術】

【0002】

バイオセンサは、溶液中の物質を測定対象とする水質計測器に用いられている。そして、測定対象を認識する分子識別素子として、酵素・抗体などの生体機能高分子、又は、微生物・細胞など生体そのものを利用して、バイオセンサは、これらの生体材料を多孔性高分子膜に包括又は共有結合させることにより固定化した膜と、電気化学的検出器などのトランスデューサとを組み合わせ、試料液中の化学成分の測定を行う。バイオセンサでは、試料液を、上記生体材料を固定化した膜に接触させ、生化学反応を起こさせる。そして、生成又は消費される物質の濃度変化を、検出器の出力（電流、電圧など）変化に変換して測定する。一方、既知濃度の被測定物質の標準液によって検量線を予め準備する。このようにして、試料液に対し得られたセンサ出力から、試料液中の目的物質の濃度を算出することができる。

30

【0003】

例えば、特許文献 1 には、生体材料として有害物質に極めて弱い微生物である硝化細菌をアルギン酸ゲルによってセルロース膜上に包括固定化した硝化細菌固定化膜を用い、トランスデューサとして溶存酸素電極を用いた水中の毒物検出用バイオセンサが開示されている。このバイオセンサでは、硝化細菌の呼吸速度を連続モニタリングして、検水中に毒物が混入したときの硝化細菌の呼吸速度低下率を基に毒物検出を行うことができる。

【0004】

40

上記のような硝化細菌を用いたバイオセンサにおいては、センサ出力の安定性を確保するとともに、毒物に対する応答の変動を回避するため、硝化細菌固定化膜を 1 ~ 2 ヶ月に 1 回交換する必要がある。そのため、特許文献 2 に記載されているように、新しい硝化細菌固定化膜は、使用するまでの間、通常硝化細菌固定化膜用の保存液とともにビニールパックの中に封入して 5 ~ 10 程度の低温で保存している。

【0005】

硝化細菌固定化膜の供給体制及びセンサ保守頻度の観点から、硝化細菌固定化膜の保存期間は 3 ヶ月以上であることが望ましい。上記特許文献 2 のリン酸イオンを含むアンモニア酸化細菌固定化膜の保存期間についても、さらに保存期間を長くするように望まれていた。

50

【 0 0 0 6 】

【特許文献1】特開平7-85072号公報

【特許文献2】特開2003-329667号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 7 】

本発明はこのような問題に鑑みてなされたものであり、硝化細菌固定化膜を、3ヵ月以上の長期にわたって保存することを可能とした、新規な硝化細菌固定化膜の保存液を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

10

【 0 0 0 8 】

本発明者らは鋭意検討を重ねた結果、硝化細菌固定化膜の保存液に含まれるリン酸イオンに問題があることを見出し、本発明の硝化細菌固定化膜の保存液に至った。

【 0 0 0 9 】

すなわち、上記目的を達成するために、本発明は、硝化細菌固定化膜の保存液であって、固定化された硝化細菌の基質及び必須栄養素、並びにオキサル酢酸を含有したホウ酸緩衝液から成ることを特徴とする。

上記硝化細菌固定化膜は、一般的にバイオセンサに用いられ、該バイオセンサは、水質計測器に利用される。

【 0 0 1 0 】

20

上記水質計測器の計測対象水は、一般的には、流水であり、水道原水、下水、排水のいずれかである。

上記硝化細菌は、アンモニア酸化細菌及び亜硝酸酸化細菌からなる群から選択される少なくとも一の硝化細菌であることが好ましい。

上記硝化細菌が、アンモニア酸化細菌の場合には、上記基質としてアンモニウムイオンを含むことが好ましい。また、上記硝化細菌が、亜硝酸酸化細菌の場合には、上記基質として亜硝酸イオンを含むことが好ましい。

【 0 0 1 1 】

上記アンモニウムイオン源として、塩化アンモニウム及び硫酸アンモニウムのいずれか少なくとも一を含むことが好適である。上記亜硝酸イオン源として、亜硝酸ナトリウム及び亜硝酸カリウムのいずれか少なくとも一を含むことが好適である。

30

本発明に係る保存液は、一般的には、四ホウ酸ナトリウム十水和物を含む。

【発明の効果】

【 0 0 1 2 】

本発明によれば、硝化細菌固定化膜を、3ヵ月以上の長期にわたって保存することを可能とし、バイオセンサ応用水質計の実用性をより高めることのできる硝化細菌固定化膜の保存液が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 3 】

以下に、本発明に係る硝化細菌固定化膜の保存液を、好適な実施の形態を参照してさらに詳細に説明する。

40

図1及び図2は、バイオセンサ及び硝化細菌固定化膜の一実施の形態を示す。

【 0 0 1 4 】

図1は、バイオセンサの一実施の形態を示す。図に示すように、バイオセンサ10は、溶存酸素電極11と、フローセル12と、硝化細菌固定化膜20とを備えている。フローセル12には試料液の流路12aが設けられている。硝化細菌固定化膜20には、硝化細菌が固定化されている。固定化される硝化細菌としては、アンモニア酸化細菌及び亜硝酸酸化細菌などを挙げることができる。

そして、硝化細菌固定化膜20の一方の面は、流路12a中の試料液と接し、もう一方の面は溶存酸素電極11と接するように配置されている。

50

【0015】

ここで、図2に硝化細菌固定化膜20の構成について、一実施の形態を示す。図に示すように、硝化細菌固定化膜20は、円形の多孔質のセルロース膜21、22から成る。セルロース膜21、22は、両面テープ23によって貼り合わされている。そして、硝化細菌が固定化された所定の大きさの円形状菌体固定化部24を、中心部に供える。なお、両面テープ23は、菌体固定化部24と重ならないように、中心部が所定の大きさにくりぬかれたドーナツ状をなしている。

菌体固定化部24の菌体固定化量は、 $2.5 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^9$ 個/mm²となるように調製することが好ましく、この範囲内に調整することにより、固定化膜の保存性の均質化を図ることができる

10

【0016】

本発明に係る硝化細菌固定化膜の保存液は、図1及び図2について説明したような硝化細菌固定化膜を保存するために用いられる。なお、このような実施の形態に係る硝化細菌固定化膜に用途が限定されるものではない。

また、バイオセンサは、水質計測器に用いられ、このような水質計測器は、計測対象水中の化学物質を計測するために用いられる。計測対象水は、一般的には、流水であり、水道原水、下水、排水のいずれかである。

【0017】

そして、本発明に係る硝化細菌固定化膜の保存液は、固定化された硝化細菌の基質及び必須栄養素、並びにオキサル酢酸を含有したホウ酸緩衝液から成る。すなわち、本発明に係る硝化細菌固定化膜の保存液は、リン酸イオンを含有しないホウ酸緩衝液から成る。

20

【0018】

硝化細菌の固定化剤としては、アルギン酸ナトリウム水溶液(ゾル)が用いられている。アルギン酸ナトリウム水溶液(ゾル)は、一価陽イオンであるナトリウムイオンが、多価陽イオンであるカルシウムイオンと置換されて、アルギン酸分子が架橋され、ゲル転移が進行する。しかし、膜保存液中のリン酸イオンとアルギン酸ゲル内のカルシウムとが、化学反応によりリン酸カルシウムを形成して、カルシウムがアルギン酸ゲル外へ流出するため、架橋構造が破壊される。本発明者らは、鋭意検討した結果このようなことを突き止めた。

【0019】

このようなことから、本発明に係る硝化細菌固定化膜の保存液は、ホウ酸緩衝液から成り、硝化細菌の基質及び必須栄養素、並びにオキサル酢酸を含有し、リン酸イオンを含有しない。

30

【0020】

上記基質は、固定化される硝化細菌に対応して選択する。例えば、アンモニア酸化細菌を用いる場合には、アンモニウムイオン、亜硝酸酸化細菌を用いる場合には、亜硝酸イオンを用いる。

【0021】

アンモニウムイオン源として、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウムを含むこと好ましく、亜硝酸イオン源として、亜硝酸ナトリウム、亜硝酸カリウムを含むことが好ましい。

40

【0022】

上記ホウ酸緩衝液は、一般的には、四ホウ酸ナトリウム十水和物を用いて調製する。上記ホウ酸緩衝液のホウ酸イオン濃度は、1.25mMであることが好ましい。

【0023】

必須栄養素とは、基質以外の栄養素であって、鉄イオン、マグネシウムイオン、炭酸イオン、銅イオン、コバルトイオン、マンガンイオン、モリブデンイオン、亜鉛イオン、カルシウムイオン、リン酸イオンを含むが、本発明に係る硝化細菌固定化膜の保存液では、銅イオン以下を添加せずとも良い。

【0024】

ホウ酸緩衝液中のオキサル酢酸の濃度は、固定化された硝化細菌の活性及び菌体量に応

50

じて調整する。オキサリ酢酸の濃度としては、0.5 ~ 2 mMであることが好ましいが、特に1 ~ 2 mMとすることが好ましい。オキサリ酢酸濃度を0.5 ~ 2 mMに調整することにより、アンモニア酸化細菌の培養齢に左右されることなく安定した高い保存性を得ることができる。

【0025】

本発明に係る硝化細菌固定化膜の保存液は、リン酸イオンを含有しないので、硝化細菌固定化膜の固定化剤であるアルギン酸ゲル中のカルシウムイオンと反応して流出することがない。すなわち、硝化細菌の固定化剤であるアルギン酸ゲルを破壊しない。これによって、硝化細菌が菌体固定化部から流出することがなく、硝化細菌固定化膜を3ヶ月以上にわたって保存することが可能としている。

10

【0026】

このように、本発明に係る硝化細菌固定化膜の保存液により、硝化細菌固定化膜の保存可能期間を3ヶ月以上とすることが可能となり、バイオセンサ応用水質計の実用性をより高めることができる。

【0027】

次に、本発明に係る硝化細菌固定化膜の保存液を、実施例にさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

【実施例】

【0028】

アンモニア酸化細菌*Nitrosomonas europaea* (ATCC 25978)を表1に示す高圧蒸気滅菌した培地を用いて培養した。培養条件は、前培養液10%接種/温度30 / 振とう機回転数150 rpmとし、培養期間は6日間とした。

20

【0029】

【表1】

成分	重量
エチレンジアミン四酢酸鉄	1mg
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	34g
リン酸二水素カリウム	700mg
炭酸水素ナトリウム	500mg
硫酸アンモニウム	2.5g
硫酸マグネシウム七水和物	100mg
塩化カルシウム二水和物	5mg
蒸留水	1L
pH	8.0

30

【0030】

培養期間を6日経過した後、上記のアンモニア酸化細菌*Nitrosomonas europaea* (ATCC 25978)の培養液を遠心分離して上澄みを除去した。

40

回収した菌体に1.0%アルギン酸ナトリウム水溶液を適量加えて懸濁し、所定の生菌個数濃度に調整した菌体濃縮液を得た。

そして、図2について説明したようなセルロース膜22の中心部に、菌体濃縮液を滴下して菌体固定化量を 4×10^7 個/mm²となるように調整し、余剰のアルギン酸ナトリウム水溶液を吸引除去した。

さらに、塩化カルシウム水溶液(30 g/L)を適量滴下して、余剰の塩化カルシウム水溶液を吸引除去し、菌体を固定化した側を内側にして、ドーナツ状の両面テープ23を介してセルロース膜21と貼り合わせた。

そして、最後に塩化カルシウム水溶液(30 g/L)に15分間浸漬し、アルギン酸ナトリウムを完全にゲル化させて菌体を固定化させた。

50

【 0 0 3 1 】

上記のようにして得られたアンモニア酸化細菌固定化膜を、保存液とともにビニールパックの中に封入して5～10で保存した。

【 0 0 3 2 】

保存性の良否判定

硝化細菌固定化膜の保存性良否判定では、任意の期間、冷蔵保存後の硝化細菌固定化膜をバイオセンサに装着し、センサ立上り時間（評価開始時点からセンサ出力が0.35mV以下になるまでの経過時間）が24時間以内の場合を「良」とし、24時間以上の場合を「不良」としていた。

【 0 0 3 3 】

しかしながら、センサ保守時間の観点からは、センサ立上り時間による良否判定を4時間以内に行えれば好適である。すなわち、センサ立上り時間の判定基準を、実施例では24時間から4時間以内、すなわち3時間として判定した。

表2に保存液組成とセンサ立上り時間との関係を示す。

【 0 0 3 4 】

【表2】

保存期間 (月)	オキサル酢酸濃度				
	0mM	0.5mM	1mM	2mM	5mM
1	3h	1h	0h	0h	0h
1.5	18h	0h	4h	0h	5h
2	24h	0h	8h	7h	1h
2.5	102h	0h	6h	7h	6h
3	—	26h	22h	50h	17h
3.5	—	102h	166h	104h	57h
4	—	106h	118h	122h	76h

※ 判定基準が3時間の場合、下線太枠下部に追加して、新たに網掛け部が不良判定となる。

【 0 0 3 5 】

アンモニア酸化細菌固定化膜の保存液として、リン酸緩衝液を主体とした保存液（表3）と、本発明のホウ酸緩衝液を主体とした保存液（表4）を用いて、バイオセンサ立上り時間を評価した。

【 0 0 3 6 】

10

20

30

【表 3】

成分	重量
エチレンジアミン四酢酸鉄	1mg
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	34g
リン酸二水素カリウム	700mg
炭酸水素ナトリウム	500mg
塩化アンモニウム	230mg
硫酸マグネシウム七水和物	100mg
塩化カルシウム二水和物	5mg
オキサリ酢酸	132mg
蒸留水	1L

10

【表 4】

成分	重量
エチレンジアミン四酢酸鉄	0.125mg
四ホウ酸ナトリウム十水和物	475mg
硫酸マグネシウム七水和物	12.5mg
炭酸水素ナトリウム	250mg
塩化アンモニウム	230mg
オキサリ酢酸	132mg
蒸留水	1L

20

【0037】

菌体固定化量を 4×10^7 個/mm² に調整した硝化細菌固定化膜を冷蔵保存し、2、3、4ヶ月冷蔵保存後に硝化細菌固定化膜をバイオセンサに装着して、センサ立上り時間を評価した。また、ロット間でのデータ再現性を比較検討するため、3ロットについて、上記評価試験を行った。なお、両保存液の基質濃度(60mg/L)及びオキサリ酢酸濃度(1mM)は同一とし、センサ立上り時間の良否判定基準は3時間とした。

30

【0038】

表5に両保存液を用いた場合のセンサ立上り時間比較結果を示す。センサ立上り時間を3時間とした厳しい判定基準下でも、リン酸緩衝液を主体とした保存液を用いた場合の膜保存可能期間は2ヶ月であったのに対し、ホウ酸緩衝液を主体とした保存液を用いた場合のそれは3ヶ月であった。

【0039】

【表 5】

保存期間	本発明に係る保存液			従来の保存液		
	No.1ロット	No.2ロット	No.3ロット	No.1ロット	No.2ロット	No.3ロット
2ヶ月	0h	0h	0h	0h	0h	0h
3ヶ月	0h	0h	0h	14h	42h	144h
4ヶ月	24h	39h	65h	106h	—	—

40

【0040】

50

本発明の保存液を用いて3ヶ月冷蔵保存し、バイオセンサによる評価試験を行った後の硝化細菌固定化膜の染色状態を調べた。菌体固定化部からの菌体の流出は認められず、固定化剤であるアルギン酸ゲルの破壊が起きなかったことから、保存可能期間が伸長したものと考えられる。

【0041】

以上の結果から、本発明の保存液を用いることにより、硝化細菌固定化膜の保存可能期間を、センサ立上り時間を3時間とした厳しい判定基準下でも3ヶ月以上とすることが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】バイオセンサ（微生物センサ）の一実施の形態を示す模式図である。

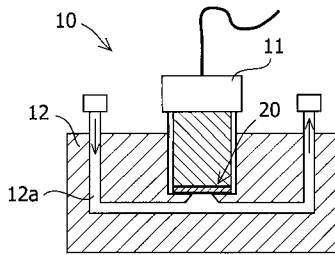
【図2】硝化細菌固定化膜の一実施の形態を示す模式図である。

【符号の説明】

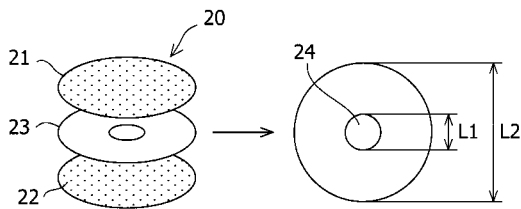
【0043】

- 10 バイオセンサ
- 11 溶存酸素電極
- 12 フローセル
- 12 a 試料液流路
- 20 硝化細菌固定化膜
- 21 セルロース膜
- 22 セルロース膜
- 23 ドーナツ状両面テープ
- 24 菌体固定化部

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 R 1:01

(74)代理人 100130960

弁理士 岡本 正之

(74)代理人 100125036

弁理士 深川 英里

(74)代理人 100142996

弁理士 森本 聡二

(74)代理人 100154298

弁理士 角田 恭子

(74)代理人 100156443

弁理士 松崎 隆

(72)発明者 乾 貴誌

神奈川県横須賀市長坂2丁目2番1号 富士電機アドバンステクノロジー株式会社内

(72)発明者 田中 良春

神奈川県横須賀市長坂2丁目2番1号 富士電機アドバンステクノロジー株式会社内

審査官 幸田 俊希

(56)参考文献 特開2003-329667(JP,A)

特開2000-088791(JP,A)

特開2004-248516(JP,A)

特開平05-010921(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 / 3 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)