

プラズマ重合法によるセンサー用酵素固定化膜の作製

吉村菊子[®], 北出達也, 上村和子, 砂取広之,
高井絹代, 北村桂介, 穂積啓一郎*

(1990年6月20日受理)

プロパルギルアルコールをモノマーとするプラズマ重合膜で限外濾過膜の細孔内に酵素を包括する方法により, グルコースオキシダーゼ固定化膜とウレアーゼ固定化膜を作製した. 前者は酸素電極に取り付けてグルコースセンサー, 後者はアンモニア電極に取り付けて尿素センサーとした. 固定化酵素の量を変えて電極応答の検量線を求めると, 両者とも直線が得られるが, その傾きはグルコースセンサーでは酵素量に比例し, 尿素センサーでは酵素量が少なくなると, 正の方向に逆転する場合が見られた. 最適 pH は, 両者ともに遊離の酵素よりもやや塩基性寄りになった. 又尿素センサーでは, 前述した尿素濃度の変化に伴う電位の変化の理論との逆転が, pH 6.0~7.0 で生じることが分かった.

1 緒 言

酵素固定化膜の作製には様々な方法が試みられているが, 親水性プラズマ重合膜もこれに応用が可能である. プラズマ重合法では, コーティング基材を有機モノマーガスの低圧グロー放電下に置くため, 基材に含まれた酵素の失活が問題となり, このため重合膜に化学修飾を施した後酵素を結合させたり¹⁾²⁾, プラズマ反応を酵素を含むモノマー水溶液の重合開始の引き金にだけ用いるプラズマ開始重合を利用したりしてきた³⁾. 最近三重結合を持つ最も単純なアルコールのプロパルギルアルコール (PA) をモノマーとすれば, 極めて低い高周波電力で重合が進行するため, 酵素の失活が少なく, グルコースオキシダーゼ (GOD) 固定化膜の作製が可能であることを確認した⁴⁾. この PA プラズマ重合膜 (PPPA) は, 高い親水性を示し⁵⁾⁶⁾, 水溶液に接して低分子溶質の膜透過が容易で, かつ必要なときに必要な種類の酵素固定化膜を, 短時間で作製できる利点がある. 本報では, GOD 固定化膜を酸素電極に取り付けたグルコースセンサーと, ウレアーゼ固定化膜をアンモニア電極に取り付けた尿素センサーを作製, それぞれの動作特性について比較検討した.

2 実 験

2・1 プラズマ重合と基材の空気プラズマ処理

プラズマ重合は, 既報[®]の内部電極型反応装置を使用

し, 圧力約 0.1 Torr, 高周波電力 (13.56 MHz) 3~5 W で行った.

空気プラズマ処理は, 既報⁷⁾と同様に 1 Torr, 3 W で行った. 処理効果は, 水に対する接触角として評価した⁵⁾.

2・2 酵素固定化膜の作製

酵素固定化膜は, Fig. 1 のように, 多孔性基材として限外濾過膜を用い, PPPA で両面をコーティングして, 孔内に酵素を封じる構造にした.

GOD 固定化膜の基材には, 濾過膜としてよく用いられるミリポア (MP) フィルターを利用した. 膜材料はセルロースの混合エステルで親水性であるが, 孔は異方性で, 平均孔径が明らかな光沢面の表と, 孔径がこれより大きくやや粗面の裏とがある. Fig. 1(A) のように, まず基材の表面を PPPA でコーティングし, 次に一定量の酵素溶液を裏面から均一に塗布し, 乾燥後この面にも PPPA をコーティングした. 使用前には, 一夜冷蔵庫中でリン酸緩衝溶液 (pH 7) に浸漬し, 蒸留水で洗浄した.

ウレアーゼ固定化膜には基材として, ポリカーボネート製のニュークリポア (NP-PC) フィルターを用いた. NP の孔は等方性で, 裏表同じ孔径を有するが, 厳密には膜面に光沢面と粗面があり, 表・裏が区別される. 固定化の方法は GOD と同じであるが, NP は疎水性であるため酵素の含浸前に, Fig. 1(B) のように, 裏面を約 15 秒間空気プラズマ処理して親水性を高めた.

* 京都薬科大学: 607 京都府京都市山科区御陵中内町 5

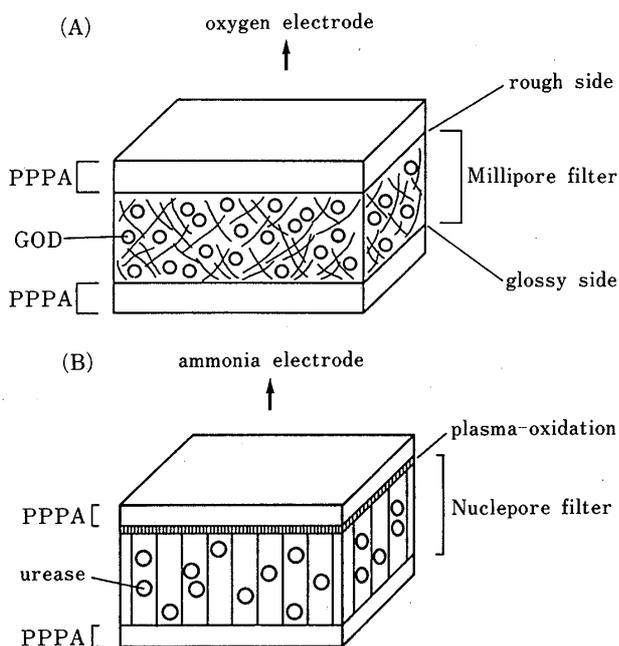


Fig. 1 Plasma-polymerized propargyl alcohol (PPPA)-coated enzyme membranes
(A) glucose oxidase (GOD); (B) urease

使用前の浸漬と洗浄は、GOD 固定化膜と同様に行った。

コーティング膜厚は、既報⁵⁾の方法で算出した重合速度と時間から求め、MP-VS は表裏とも 4000~7000 Å⁴⁾、MP-GS は表 22000 Å、裏 12000 Å、NP-PC は表裏とも 1500 Å とした。

2・3 グルコースセンサー

ガルバニ電池式酸素電極の隔膜に、GOD 膜の裏面を密着させ、ナイロンネットと O-リングで押さえてグルコースセンサーとし、その出力を記録した。ピーカーにリン酸緩衝溶液 25 ml を入れ、磁気かき混ぜ機でかき混ぜながらベースラインを引き、次にグルコース標準溶液 50 μl を添加して、酵素反応に伴う溶存酸素の消費を、電解電流として記録した。平均室温を 25°C とし、応答開始後 20 秒から 40 秒までの 20 秒間の記録紙上の直線のこう配を使う速度法と、約 30 分後に到達する定常状態のペンの位置を使う定常法とで測定した。いずれも、10% 亜硫酸ナトリウム水溶液での応答を、試料中の溶存酸素が 100% 除去された状態と考え、除去率 0% のベースラインからの距離を百分率で求めた。

酸素電極：東亜電波工業製 溶存酸素計付属部品 OE-243 型。

2・4 尿素センサー

ウレアーゼ膜の裏面をアンモニア電極の隔膜に密着させ、電極キャップで止めて尿素センサーとした。これを電位差計、記録計につないだ。リン酸緩衝溶液 25 ml でベースラインをとり、尿素標準溶液 0.5 ml を添加して、電位の変化を測定した。

アンモニア電極：オリオン製 アンモニア電極 95-12 型。

電位差計：オリオン製 pH/mV メーター-811 型。

2・5 試薬類

PA：ナカライテスク製、一級。

GOD：シグマ製、タイプ II、23000 U/g。

ウレアーゼ：ナガセ生化学工業製、1500 U/mg

0.1 M リン酸緩衝溶液： Na_2HPO_4 と $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ で目的の pH に調製。

MP-VS ($\phi=250 \text{ \AA}$)、MP-GS ($\phi=2200 \text{ \AA}$)：ミリポア製。

NP-PC ($\phi=150 \text{ \AA}$)：ニュークリポア製。

3 結果と考察

3・1 固定化用多孔性基材

酵素固定化膜では、膜内に保持される酵素の量や固定化の状態、反応関連物質の透過性などが、センサーとしての応答に大きく寄与する。そこでまず基材には、網目状の親水性ポリマーの MP フィルターが選ばれた。なるべく薄いプラズマ重合膜で酵素を確実に固定するため、最小の孔を持つ MP-VS を基材として、GOD について試みたが⁴⁾、酵素膜個々については、感度に多少差を生じた。又、このセンサーの pH 特性を調べるためには、応答が早く、短時間に一連の実験が終了できるよう、孔径のやや大きい MP-GS を用いた。この酵素固定化膜は、約 2 か月間活性を持続した。

ウレアーゼについても、まず GOD と同様に MP フィルターで固定化を行ったが、これを用いた尿素センサーの応答は、酵素膜ごとに大きな差があり、基材と酵素との相互作用によるものか、プロトン受容性の尿素の膜透過特性によるものか、いずれにしても適当な組み合わせでないように思われた。そこで、ポリカーボネート膜に正確な径の垂直孔を中性子で打ち抜いた、NP フィルターの利用を試みた。しかし、この膜は MP に比べて孔径が小さくかつ疎水性で、水溶液の吸収が困難なため、酵素溶液の含浸直前に、空気プラズマ処理で基材表面を親水化し、酵素溶液の浸透を促進した。プラズマ処理時間と接触角の変化を Fig. 2 に示した。未処理の接

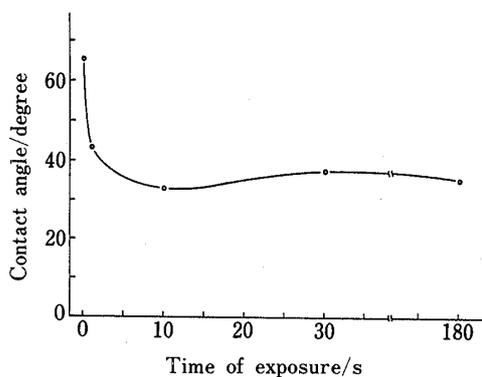


Fig. 2 Contact angle to water drop on Nuclepore filters after exposure to air plasma

A drop volume: 10 μ l

Table 1 Response characteristics of urea sensor using immobilized urease membranes coated by PPPA

Urease (U/cm^2)	0.039
PPPA film thickness (\AA)	1500+1500
Time for conditioning (min)	
Renewed membrane	35~45
Subsequent use	15~30
Base line	
Mean (mV)	74.2
S. D. (mV)	9.5
Slope (mV/ $\Delta\log[\text{urea}]$)	-2~+7
Substrate: NP-PC; Buffer: 0.1 M sodium phosphate, pH 7	

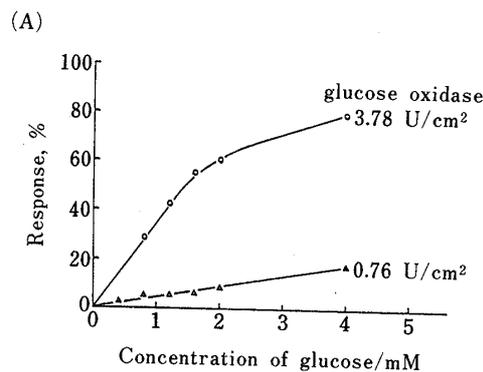
触角 65° から, 1 秒間照射で 43° , 10 秒間で 33° まで低下したが, それ以上時間を延長しても効果はなかった。従って, プラズマ処理は 10~30 秒とした。

ウレアーゼ固定化膜を用いた尿素センサーの応答特性を Table 1 に示す。NP は空孔率が小さく, MP の 1/10 ほどのウレアーゼしか取り込めなかったが, 平均孔径が小さい分だけ短いコーティング時間で作製でき, 又アンモニア電極への装着時や洗浄後に, 電位が安定するまでの時間が短縮された。

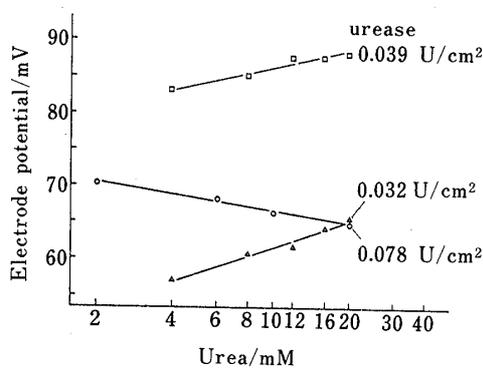
3.2 検量線

GOD, ウレアーゼ共に量を変えて固定化し, これを用いて定常法で検量線を求めた。Fig. 3 の(A)はグルコースセンサー, (B)は尿素センサーの代表例で, 図中の酵素活性は, 固定化膜作製時に含浸させた酵素量を, 膜の単位面積当たりで求めた計算値である。

(A)では, GOD $0.76 \text{ U}/\text{cm}^2$ のときに 4 mM 以下,



(A)



(B)

Fig. 3 Response curves of PPPA-coated enzyme membranes

(A) glucose sensor (substrate: MP-VS); (B) urea sensor (substrate: NP-PC); Buffer: 0.1 M sodium phosphate, pH 7.0

$3.78 \text{ U}/\text{cm}^2$ のときに 2 mM 以下のグルコース濃度で, 比例した応答が得られた。GOD の量を多くすると, 感度も大きくなるが, グルコース濃度の高いところで酸素消費が飽和に達し, 検量線は不平化する。

(B)では, ウレアーゼ $0.078 \text{ U}/\text{cm}^2$ のとき, 尿素濃度 20 mM まで, 感度はあまりよくないが, 尿素濃度の対数に比例した電極電位の低下が見られたが, $0.039 \text{ U}/\text{cm}^2$ 以下では, 逆に電位の上昇という異常現象が見られた。しかも, この異常現象の場合でも, 電位と尿素濃度の対数とは直線関係が認められた。

3.3 応答の pH 依存性

試料溶液の pH が, グルコースセンサーや尿素センサーに及ぼす影響を, Fig. 4(A), (B)に示した。

まずグルコースセンサーの場合, 応答の大きさは定常法, 速度法のいずれでも, pH 6.5~7.5 において最大になった。遊離の GOD は, pH 5.5~6.0 で最も活性が高

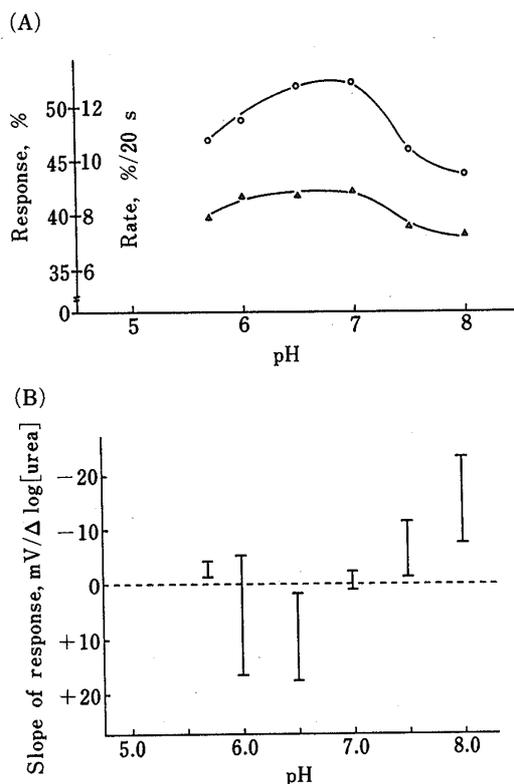


Fig. 4 Effect of pH on response of sensors

(A) Glucose sensor — Substrate: MP-GS; GOD: 10.17 U/cm²; Glucose: 2 mM. ○: response in steady-state; △: reaction rate in time range of 20~40 s after initiation of response. (B) Urea sensor — Substrate: NP-PC; Urease: 0.032 or 0.039 U/cm²; Buffer: 0.1 M sodium phosphate

いことが知られているが、本法で固定化すると、これらの値よりもやや塩基性寄りに、最適 pH があることが分かった。このような最適 pH の変化は、高分子に取り囲まれた環境の変化がもたらしたものとして、固定化酵素一般に見られる現象である。

一方、尿素センサーの場合は、0.039 U/cm² 以下のウレアーゼを用いることにより、pH 6.5 のときスロープは必ず正の値、つまり尿素濃度の増加に伴い電位が正方へ増加し、pH 6.0 と pH 7.0 では正負両方が認められ、それよりも酸・塩基のどちらに寄っても、今度は必ず負の値をとるようになった。特に pH 7.0 は、遊離のウレアーゼの最適 pH であるにもかかわらず、スロープが最小になった。内部のアンモニア電極としては、固定化酵素膜内が塩基性であるほうが望ましく、酵素活性が失なわれない程度の塩基性の試料溶液がよいと考えられる。以上の実験結果から、尿素センサーとしての最適

pH は、7.5~8.0 あたりの領域であると判断される。

以上、PPPA によるグルコースセンサー用 GOD 固定化膜と尿素センサー用ウレアーゼ固定化膜を作製し、製法上の問題や応答特性について検討した。本報では、酵素固定化膜の新しい作製方法の提案に焦点をしばり、検出方式の異なる典型的な酵素を例として用い、得られた結果の相違点を述べた。酵素の種類、多孔性基材の選択、プラズマ重合膜の膜厚、試料溶液の pH など、相互に関連する事柄は多いが、本法で作製した酵素固定化膜は、センサーに応用できることが示唆された。グルコースセンサーでは、定常法を用いると、約 30 分の応答時間を要したが、実際には速度法を用いることにより、かなり測定時間を短縮することができる。尿素センサーでは更に、正常な応答を示す条件の確立と、NP へのウレアーゼ含浸量の不足による感度不足を補う工夫が必要である。基材の孔径と重合膜の膜厚の組み合わせが、応答の大きさや速度に与える影響や、精度や寿命などのセンサーとしての基礎特性も既に検討しており、追って報告する予定である。プラズマ重合膜のモノマーにも、検討の余地が大きく、PPPA 以外のものに変えれば、更に特徴的な酵素固定化膜の作製が可能であると予想される。

(1986 年 10 月日本分析化学会第 35 年会, 1987 年 10 月日本分析化学会第 36 年会及び 1989 年 6 月第 50 回分析化学討論会において一部発表)

文 献

- 1) 山本直登, 坪村 宏: “バイオセンサー”, 鈴木周一編, p. 72 (1986), (講談社).
- 2) G. Kampfrath, R. Hintsche: *Anal. Lett.*, **22**, 2423 (1989).
- 3) 長田義仁: “プラズマ重合”, 長田義仁編, p. 221 (1986), (東京化学同人).
- 4) K. Yoshimura, T. Kitade, K. Kitamura, K. Hozumi: *Microchem. J.*, 投稿中.
- 5) 穂積啓一郎, 北村桂介, 北出達也, 吉村菊子: 高分子論文集, **42**, 881 (1985).
- 6) K. Yoshimura, T. Kitade, K. Kitamura, K. Hozumi: *J. Appl. Polym. Sci.*, **38**, 1011 (1989).
- 7) 吉村菊子, 芦田眞優美, 西本由美, 阪井朝子, 北出達也, 北村桂介, 穂積啓一郎: 分析化学, **38**, 443 (1989).

☆

Preparation of immobilized enzyme membranes for sensor materials by plasma polymerization technique. Kikuko YOSHIMURA, Tatsuya KITADE, Kazuko UEMURA, Hiroyuki SUNATORI, Kinuyo TAKAI, Keisuke KITAMURA and Keiichiro HOZUMI (Kyoto Pharmaceutical

University, 5, Misasagi Nakauchi-cho, Yamashina-ku, Kyoto-shi, Kyoto 607)

Immobilized glucose oxidase (GOD) and urease membranes were prepared by impregnating porous substrates with respective enzymes and coating of plasma-polymerized propargyl alcohol (PPPA) on both surfaces of the porous substrates. The GOD membrane was attached to an oxygen electrode to work as a glucose sensor and the urease membrane was assembled with an ammonia electrode to be an urea sensor. Working curves of the two electrodes showed different behaviors depending upon the amount of enzymes immobilized, porous substrates chosen, and pH of the sample solutions. In the case of glucose sensor, a small disk of Millipore-VS membrane was employed as a substrate to impregnate with 0.76 or 3.78 U/cm² of GOD that was subsequently immobilized by the plasma-coating. The sample solu-

tions were regulated at pH 7 using a phosphate buffer solution. The urease membrane was prepared by impregnating Nuclepore-PC with 0.032~0.039 U/cm² of urease and plasma-coated as above. Although the enzyme is most active at pH 6~7, the sample solution was better controlled at pH 8 to facilitate the transportation of ammonia towards the ammonia electrode.

(Received June 20, 1990)

Keyword phrases

electrochemical sensors for glucose and urea; immobilized enzyme membrane for a sensor material; plasma-polymerized propargyl alcohol; glucose oxidase; urease.