

ペルオキシダーゼ含有グラファイトペースト電極における酵素-電極間直接電子移動と酵素電極への応用

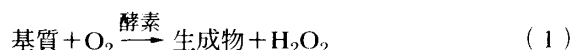
八尾 俊男[®], 羽賀 健一, 和 佐 保*

(1993 年 2 月 4 日受理)

ペルオキシダーゼをグルタルアルデヒドと共に均一に分散させたグラファイトペースト電極は、メディエーター（電子供与体）が共存しなくても、固定化ペルオキシダーゼの活性中心（フェリプロトポルフィリン IX）と電極（グラファイト粒子）との間に直接的な電子移動が起こることによって過酸化水素に応答した。この電極は pH 4.5 の 0.1 M リン酸緩衝液を基礎液として用いた場合に、過酸化水素に対して最大応答を与え、 $2 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-4}$ M の過酸化水素濃度の対数と応答電流の対数との間に良好な直線関係を与えた。上記のグラファイトペーストに、更にグルコースオキシダーゼとウリカーゼのそれぞれを加えて作製した電極は、それぞれ $2 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-3}$ M のグルコースと $1 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-3}$ M の尿酸濃度に比例する応答電流を与えた。

1 緒 言

式 (1) に従う反応を触媒する酸化酵素 (oxidoreductase) には、現在数多くのものが知られ、適当なトランスデューサーに固定化することで、数多くの酵素センサーが、開発されてきている¹⁾。それらの酵素



センサーの多くは、酵素反応で消費された酸素を酸素電極で検出する方法と、生成した過酸化水素を過酸化水素電極（白金電極）で検出する方法に基づいている。

又、酵素に対して電子受容体として働く酸素の代わりに、同様の機能をもったメディエーターを用いた酵素センサーは、かなり低い電位で検出でき、更に酸素濃度に依存しないなどの利点があるので、研究例も数多い²⁾。しかし、酸化酵素の種類によってメディエーター物質が異なる欠点がある。そこで、電極にペルオキシダーゼ活性を更に付与し、式 (1) の反応で生成した過酸化水素を測定する酵素電極も報告されている。ペルオキシダーゼは電子供与体の存在下で、過酸化水素の分解反応を触媒する酵素であり、メディエーター（電子供与体）を必要とし、Fig. 1 の A に示した作動原理により過酸化水素

に応答する^{3)~6)}。本研究では、Fig. 1 の B に示したように、メディエーターを必要とせず、電極と酵素間で直接電子移動が起こることで、過酸化水素に応答する電極を作製することを目的として行った。

一般に、酵素は分子量が数万から百万程度の球状の巨大分子であることから、酵素の活性中心と電極間で直接的な電子移動は起こらないと言われており、酵素と電極間に電子伝達物質としてメディエーターを必要とする。

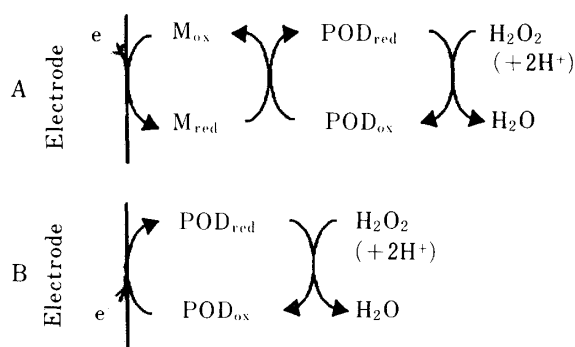


Fig. 1 Working principle of peroxidase-modified electrode with (A) and without (B) mediator

M_{ox} and M_{red} : oxidized form and reduced form of mediator, respectively; POD_{ox} and POD_{red} : oxidized form and reduced form of peroxidase, respectively

* 大阪府立大学工学部応用化学教室: 593 大阪府堺市学園町 1-1

しかし、ペルオキシダーゼは分子量が約 4 万と比較的低分子量の酵素であり、活性中心にフェリプロトポルフィリン IX が安定に保持されている。1977 年に Yarpolov ら⁷⁾はカーボン電極と西洋ワサビ起源ペルオキシダーゼとの間に、過酸化水素が共存すると、直接的な電子移動が起こることを初めて明らかにして以来、種々のペルオキシダーゼと電極間の直接電子移動が確かめられてきた^{8)~11)}。本研究では、酵素と電極との接触確立を高めて、酵素-電極間の直接電子移動が容易に起こるようにするために、グラファイトペーストにペルオキシダーゼとグルタルアルデヒドを均一に混合した電極を作製し、固定化ペルオキシダーゼとグラファイト粒子間の直接電子移動について検討した。更に、過酸化水素酵素電極としての応答特性及びグルコース電極と尿酸電極に応用した結果を述べる。

2 実 験

2.1 試薬及び装置

ペルオキシダーゼ {EC 1.11.1.7; 253 U mg⁻¹, 西洋ワサビ起源; 以下 POD と略記}, グルタルアルデヒド (20% 溶液); 以下 GA と略記} とグラファイト粉末は和光純薬工業製のものをを用いた。グルコースオキシダーゼ (EC 1.1.3.4; 250 U mg⁻¹, *Aspergillus niger* 起源; 以下 GOD と略記) とウシ血清アルブミン (以下 BSA と略記) は Sigma 製のものを, ウリカーゼ (EC 1.7.3.3; 2.1 U mg⁻¹, 酵母起源; 以下 Uc と略記) はオリエンタル酵母工業製を, 流動パラフィン(キシダ化学製のものを使用した。標準血清には, 和光純薬工業製管理血清 I と II, Ortho 製正常及び異常管理血清を用いた。その他の試薬はすべて市販の特級品をそのまま使用した。

測定には参照電極として銀/塩化銀電極を用い, ポテンショスタット, 電解セル及びその他の器具は既報¹²⁾と同じものをを用いた。

2.2 酵素含有グラファイト電極の作製と測定操作

POD 含有グラファイトペースト電極は, グラファイト粉末 0.3 g, POD 6 mg, 20% GA 45 μ l と流動パラフィン 0.18 ml を, めのう製乳鉢で均一に混合し, 得られたグラファイトペーストを内径 5 mm の電極ホルダー¹³⁾に詰めて作製した。グルコース電極と尿酸電極は, 上記組成のグラファイトペーストに, GOD と Uc をそれぞれ 6 mg 加えたグラファイトペーストを, 同様の電極ホルダーに充てんして作製した。

それぞれの電極に最適な pH の 0.1 M リン酸緩衝液 5 ml を電解セルにとり, 電極系を装着して 0 V (vs.

Ag/AgCl) を電極に印加する。一定速度 (700 rpm) で溶液をかき混ぜながら, 電流値が一定に達した後, 基質溶液の一定量を添加し, 電流応答を記録した。測定は室温で行った。

3 結果と考察

3.1 POD 含有グラファイトペースト電極

3.1.1 過酸化水素に対する検出加電圧 2.2 で作製した POD 含有グラファイトペースト電極を, pH 7.0 のリン酸緩衝液 (0.1 M) を入れた電解セルに装着し, 過酸化水素に対する応答電流と検出加電圧との関係を調べた。結果を Fig. 2 に示す。電極はメディエーターを測定溶液に加えなくても, 過酸化水素に反応し, 0 V で最大応答電流 (還元電流) を与えた。なお, POD を含まない同様の組成のグラファイトペースト電極では, 検討した電位領域 (-0.1~0.5 V) では, どの電位でも過酸化水素に反応しなかった。このことから, 過酸化水素が共存すると, POD の活性中心 (フェリプロトポルフィリン IX) とグラファイト粒子間で直接的な電子移動が起こると推察される。

3.1.2 グラファイトペースト組成の検討 POD 含有グラファイトペースト電極が 0 V で過酸化水素に反応することが分かったので, より詳細にグラファイト

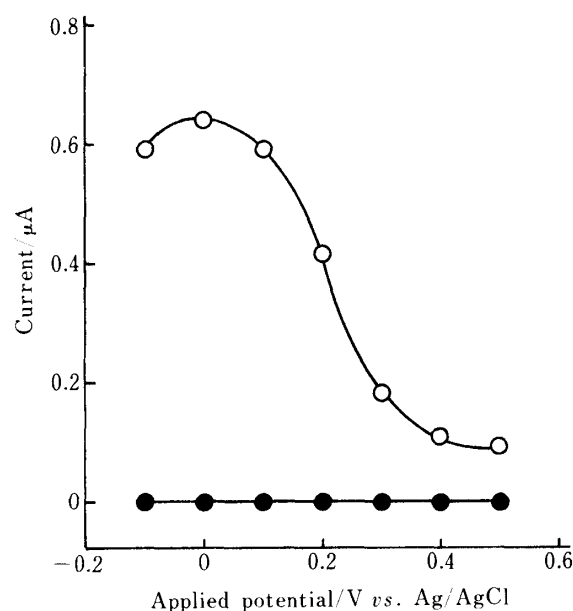


Fig. 2 Current of hydrogen peroxide (0.45 mM) as a function of applied potential

○: graphite paste with peroxidase; ●: graphite paste without peroxidase

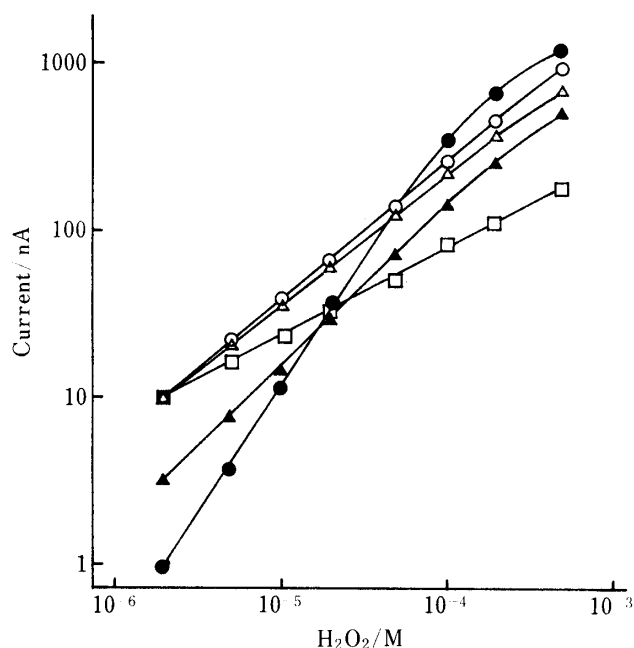


Fig. 3 Effect of glutaraldehyde addition into graphite paste consisting of 0.3 g of graphite, 0.18 ml of liquid paraffin and 6 mg of POD

Amounts of glutaraldehyde (20% solution) added: $\square$, 15 μ l; $\triangle$, 30 μ l; $\circ$, 45 μ l; $\blacktriangle$, 60 μ l; $\bullet$, 75 μ l. The slope (S) of the calibration graph $\{\log(\text{current}) = S \log[\text{H}_2\text{O}_2]\}$ was 0.54 for ($\square$), 0.80 for ($\triangle$), 0.84 for ($\circ$), 0.97 for ($\blacktriangle$), and 1.52 for ($\bullet$), respectively.

ペースト組成と応答との関係について検討した。

グラファイトと流動パラフィンに POD を加え、均一に混合して作製したグラファイトペースト電極では、POD が電極表面から測定溶液に溶解するため、電極の安定性が著しく悪かった。そこで、POD を水に不溶性にするため、グルタルアルデヒドを橋架け剤として加えた。又、BSA は酵素架橋膜を作製する場合の酵素安定化剤として、広く用いられているので、POD と同量の BSA を加えて作製した電極と加えないで作製した電極の過酸化水素に対する応答を比較した。しかし、BSA の存在は過酸化水素に対する応答や電極の安定性にほとんど影響を与えないことが分かった。

しかし、添加した GA 量は過酸化水素に対する応答に影響を与えた。結果を Fig. 3 に示す。GA 添加量を 15 μ l から 45 μ l に増加すると、検量線の傾きは 0.54 から 0.84 と増加したが、低濃度 (2×10^{-6} M) の過酸化水素に対する応答はほぼ同じであった。しかし、GA 量を更に増加すると、この低濃度の過酸化水素に対する応

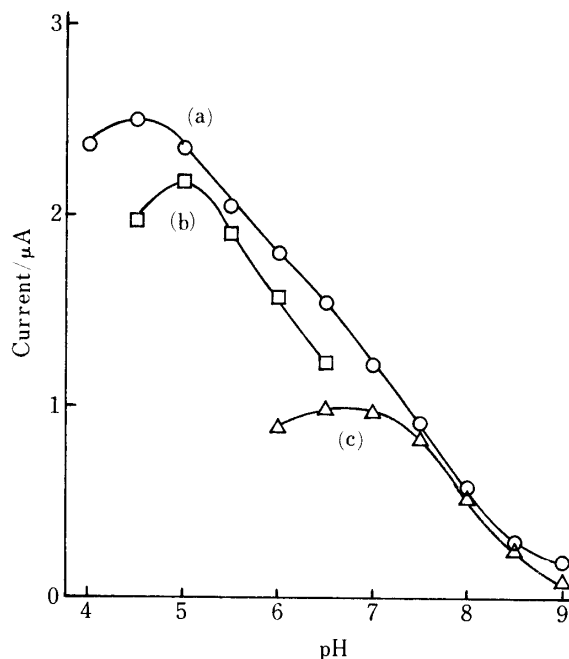


Fig. 4 Effect of pH on the responses to 0.9 mM hydrogen peroxide ($\circ$), 1 mM glucose ($\square$), and 1 mM uric acid ($\triangle$) of graphite paste electrodes modified with POD alone (a), POD-GOD (b), and POD-Uc (c)

答電流が減少したので、検量線の直線の傾きは 0.84 から 1.52 まで 1 を超えて増加した。この理由については、GA 量が増加すると、過剰の GA が過酸化水素の一部を分解し、低濃度レベルの過酸化水素に対する応答が特に減少することによって、見掛け上、直線の傾きが増加することが考えられる。又、GA 量の増加と共に、POD 間の架橋度が増加し、酵素が高分子化することにより、電極との直接電子移動になんらかの影響があることが考えられるが、現在のところ明らかでない。

以上の実験の結果、最適なグラファイトペースト組成としてグラファイト粉末 0.3 g、流動パラフィン 0.18 ml、POD 6 mg と GA 45 μ l を均一に混合したものを、以後の実験に使用した。

3・1・3 最適 pH と過酸化水素に対する応答特性

POD 含有グラファイトペースト電極による、過酸化水素に対する応答の pH 特性を Fig. 4a に示す。pH 4.5 で過酸化水素に対して最大の応答を示し、それ以上の pH で活性は急激に減少した。これはメディエーターとしてヘキサアンノ鉄(II)酸イオンを用いた POD-BSA 架橋膜被覆電極の場合に¹⁴⁾¹⁵⁾、3~10 のかなり広い pH 範囲で過酸化水素に応答したとと比較して、グラファ

イトペースト中に固定化された POD の過酸化水素に対する酵素触媒反応の速度がかなり pH に依存するものと考えられる。pH 4.5 の 0.1 M リン酸緩衝液を基礎液として用いたとき、この電極は $2 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-4}$ M の過酸化水素濃度の対数と応答電流の対数との間に傾き 0.84 の直線関係を与え、直線の相関係数は 0.998 であった。又、電極の過酸化水素に対する応答時間は過酸化水素濃度に多少依存したが、20～30 秒であった。

3・2 他の酵素電極への応用

酵素-電極間直接電子移動に基づいた作動原理をグルコース電極と尿酸電極に展開するため、POD の代わりに GOD と Uc のそれぞれを加えたグラファイトペースト電極を作製した。GOD の活性中心はフラビンアデニンヌクレオチドであり、Uc の活性中心は Cu(II) であるが、電極のグラファイト粒子とそれぞれの酵素活性中心との間に、直接的な電子移動が起こる証拠は認められなかった。そこで、2・2 で述べた方法により、POD と同量のこれら酵素を含んだグラファイトペースト電極を作製した。これらの電極は GOD や Uc による酵素反応で生成した過酸化水素を、POD を介して直接、電極でセンシングする原理に基づいている。

3・2・1 グルコース電極 この電極のグルコースに対する応答電流と pH との関係を図 4b に示す。pH 5.0 でグルコースに対して最大応答が得られた。この pH 条件で得られたグルコースに対する検量線は、($2 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-3}$) M のグルコース濃度と応答電流との間に良好な直線関係があった。直線の傾きは $2.32 \mu\text{A mM}^{-1}$ であり、 y 切片は 2.8 nA、直線の相関係数は 0.999 であった。

3・2・2 尿酸電極 この電極の尿酸に対する応答電流と pH との関係を図 4c に示す。pH が 7.5 以上になると尿酸に対する応答が急激に減少した。これは

POD による過酸化水素の感度が中性以上の pH で急激に低下することによる。そこで、pH 7.0 の 0.1 M リン酸緩衝液を測定基礎液として用いることにした。得られた尿酸に対する検量線は $1 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-3}$ M の尿酸濃度に対して良好な直線関係があった。直線の傾きは $0.998 \mu\text{A mM}^{-1}$ 、 y 切片が 3.1 nA、直線の相関係数は 0.998 であった。

このように、グルコース電極と尿酸電極は対応する基質の濃度に比例した応答を与えた。これは POD だけを含むグラファイトペースト電極が、過酸化水素濃度の対数と応答電流の対数との間に直線関係（傾き 0.84）を与えたことと比較して、異なる点である。この理由としては、POD が GOD あるいは Uc と同時固定化されることで、グラファイトペースト中で比較的高い比活性を維持したまま固定化されることが考えられる。又、GOD や Uc の触媒作用によって生成した過酸化水素が、POD による連続的な酵素反応によって検出されるので、過剰の GA による分解を受け難いことが考えられるが、詳細は明らかでない。

3・2・3 血清中のグルコースと尿酸の定量 作製したグルコース電極と尿酸電極を、4 種の管理血清中のグルコースと尿酸の定量に適用した。

これらの電極は 0 V で対応する基質のそれぞれを検出できるので、血清中のアスコルビン酸などの被酸化性物質は妨害とならない。実際に、血清試料に 1 mM アスコルビン酸を加えても、応答電流に全く影響を与えなかった。Table 1 に定量結果と測定の再現性を示す。定量値は表示値とよく一致しており、測定の再現性もグルコースの場合 2.1% 以下、尿酸の場合で 2.5～3.9% であった。又、それぞれの電極の基質に対する応答時間は 20～30 秒であった。

以上、グラファイト粉末に POD を加えたペースト電極で、POD の活性中心と電極間で直接的な電子移動が

Table 1 Reproducibility and accuracy of measurements of glucose and uric acid

	Glucose				Uric acid			
	Indicated value/ mg dl ⁻¹	<i>n</i>	Analytical value [†] / mg dl ⁻¹	RSD ^{††} , %	Indicated value/ mg dl ⁻¹	<i>n</i>	Analytical value [†] / mg dl ⁻¹	RSD ^{††} , %
Wako I	79 ± 10	7	73 ± 1.53	2.1	5.0 ± 0.4	7	4.8 ± 0.19	3.9
Wako II	255 ± 14	7	262 ± 4.19	1.6	7.7 ± 0.8	7	8.2 ± 0.23	2.8
Ortho								
Normal serum	93 ± 7	7	92 ± 1.75	1.9	5.1 ± 0.4	7	5.5 ± 0.20	3.6
Abnormal serum	296 ± 23	7	312 ± 5.62	1.8	10.5 ± 0.8	7	11.1 ± 0.28	2.5

† Mean ± S.D.; †† Relative standard deviation

起こることによって過酸化水素濃度に比例した応答が得られることを明らかにした。更に、この原理をグルコース電極と尿酸電極に応用した結果について述べた。しかし、これらの酵素電極は5~8日間しか使用できないので、長期の安定性に問題が残されているが、メディエーターを必要としない酵素電極の簡単な作製方法として、又、過酸化水素を生成する酸化酵素のすべてにこの応答原理を適用できるので、使い捨て酵素センサーへの応用が期待できる。

文 献

- 1) 鈴木周一編: “バイオセンサー”, p. 91 (1984), (講談社サイエンティフィック).
- 2) 軽部征夫, 横山憲二: 化学, **46**, 358 (1991).
- 3) P. D. Sanchez, P. T. Blanco, J. M. F. Alvarez, M. R. Smyth, R. O'Kennedy: *Electroanalysis*, **2**, 303 (1990).
- 4) J. Wang, L.-H. Wu, L. Angnes: *Anal. Chem.*, **63**, 2993 (1991).
- 5) P. N. Bartlett, P. Tebbutt, R. G. Whitaker: *Prog. React. Kinet.*, **16**, 55 (1991).
- 6) T. Yao, M. Matsumoto, T. Wasa: *Anal. Chim. Acta*, **261**, 161 (1992).
- 7) A. I. Yaropolov, V. Malovik, S. D. Varfolomeev, I. V. Berezin: *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **249**, 1399 (1979).
- 8) G. Jonsson, L. Gorton: *Electroanalysis*, **1**, 465 (1989).
- 9) J. Kulys, R. D. Schmid: *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **24**, 305 (1990).
- 10) U. Wollenberger, V. Bogdanovskaya, S. Bobrin, F. Scheller, M. Tarasevich: *Anal. Lett.*, **23**, 1795 (1990).
- 11) U. Wollenberger, J. Wang, M. Ozsoz, E. Gonzalez-Romero, F. Scheller: *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **26**, 287 (1991).
- 12) 八尾俊男, 和田瑞穂, 和佐 保: 分析化学, **42**, 397 (1993).
- 13) T. Yao, S. Musha: *Anal. Chim. Acta*, **110**, 203 (1979).
- 14) T. Yao, M. Sato, Y. Kobayashi, T. Wasa: *Anal. Chim. Acta*, **165**, 291 (1984).
- 15) 八尾俊男, 佐藤 実, 和佐 保: 日化, **1985**, 189.



A graphite paste electrode containing peroxidase and its application. Toshio YAO, Kenichi HAGA and Tamotsu WASA (Department of Applied Chemistry, College of Engineering, University of Osaka Prefecture, 1-1, Gakuen-cho, Sakai-shi, Osaka 593)

A mediator-less enzyme electrode for the detection of hydrogen peroxide was made up by packing {one end of a glass tube (5 mm diam.)} with a graphite paste composed of 0.3 g of graphite powder, 0.18 ml of liquid paraffin, 6 mg of horse radish peroxidase (HRP) and 45 μ l of glutaraldehyde (20% solution). This electrode responded to hydrogen peroxide at 0 V (*vs.* Ag/AgCl) in the absence of a mediator such as hexacyanoferrate(II). The current response was found to be based on a direct electron transfer between the bound cofactor (ferriprotoporphyrin IX) in the immobilized HRP molecule and graphite particle. A logarithmic plot of the current response *vs.* the hydrogen peroxide concentration gave a straight line with a slope of 0.84 over the range of $2 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-4}$ M. Similarly, enzyme electrodes for glucose and uric acid were prepared by co-immobilizing HRP in the paste along with glucose oxidase and uricase, respectively, both of which were hydrogen peroxide-producing oxidases. Each of these electrodes responded to glucose or uric acid at 0 V. The current response was linearly related to the glucose or uric acid concentration, in the range of $2 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-3}$ M or $1 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-3}$ M.

(Received February 4, 1993)

Keyword phrases

electron transfer between electrode and peroxidase; enzyme electrodes; cross-linked peroxidase; amperometry; immobilized enzyme.