

ケラチン/グルコースオキシダーゼ修飾 カーボンペースト電極を用いた グルコースセンサの開発

菅原 一 晴・加瀬 健・功 刀 ちはる

下 平 明 徳・神 谷 直 人・平 林 讓 司

群馬大学教育学部化学教室

(平成19年9月12日受理)

Development of glucose sensor at a carbon paste electrode containing keratin modified with glucose oxidase

Kazuharu SUGAWARA, Takeshi KASE, Chiharu KUNUGI,

Akinori SHIMODAIRA, Naoto KAMIYA and George HIRABAYASHI

Department of Chemistry, Faculty of Education, Gunma University

(Accepted September 12, 2007)

Abstract

Development of a glucose sensor was attempted at a carbon paste electrode containing platinum powder and keratin modified with glucose oxidase. Immobilization of the enzyme is achieved due to on an electrostatic interaction between the protonated amino group of the keratin and functional groups having a negative charge on the enzyme. Glucose was detected at the electrode in 0.1 M acetate buffer (pH 6.0). An oxidation peak of H_2O_2 produced from the enzyme reaction appeared at 0.85 V (vs. Ag/AgCl) in 0.1 M acetate buffer (pH 6.0). The calibration curve was linear in the range from 5×10^{-6} to 4×10^{-4} M. The relative standard deviation of 4×10^{-5} M glucose was 5% ($n=5$).

1. 緒 言

今日、酵素や微生物、抗原-抗体などの生体内で起こる反応に基づいたバイオセンサが数多く開発されてきている。これらのバイオセンサは、生体物質の分子識別機能を利用したものであり、農学、理学、工学、医学などの幅広い分野で利用される。これまでに、様々なバイオセンサが提案されてきているが、酵素固定化電極を利用したセンサは、コストパフォーマンス、簡便性などの面で

優れている。その中でも、グルコースを選択的に検出するセンサはすでに臨床化学検査や食品検査にあたって実用化されている。このセンサは、糖尿病患者の血糖値の自己管理や果物中の糖度測定、アルコール発酵のモニタリングに有用である[1, 2]。加えて、架橋剤を用いグルコースオキシダーゼを電極表面に固定化し、グルコースの酵素反応にともなう酸素や過酸化水素の濃度変化を測定するものがある[3]。一方、生体適合性高分子メディエーターを用いたグルコースセンサや集積型グルコースセンサの開発なども進められている[4, 5]。

ケラチンは硬タンパク質に分類され、その構造上、システイン残基を多く持っており、ジスルフィド結合(S-S結合)という架橋構造を分子内に存在する。そのため、丈夫で弾性に富み、物理的、化学的にも非常に安定している。このケラチンは、皮膚の角質層や毛髪、爪そして角などを形成する主成分であり生体を維持し、細長い繊維状であるため構造タンパク質あるいは繊維状タンパク質とも呼ばれている。また、ケラチンはアミノ基やチオール基を持っているため、架橋剤を介した機能性分子の導入が可能となる。さらに、水溶液や通常の有機溶媒に溶解しないことから、酵素の支持体としての可能性を持つ[6]。

修飾カーボンペースト電極は、修飾剤と炭素粉末にバインダーを添加して混ぜることで、特定の機能を持った電極の作成が容易である。そして、修飾剤を混ぜるだけで静電的相互作用や錯形成によって、目的物を電極上に選択的に濃縮し、検出することができる。また、電極表面の塗り直しが容易であり、電極応答の安定性に優れ、再現性が高い。これまでにこのカーボンペースト電極を用いた研究として、金属合金を分散させたグルコースのバイオセンシングにおけるカーボンペースト酵素電極[7]やグルコースバイオセンサとしてのカーボンペースト電極[8]に関する研究が報告されている。酵素を固定しキチンと白金粉末を修飾剤したカーボンペースト電極によりグルコースのセンシングも行われている[9]。このグルコースオキシダーゼを固定化する手法は、プロトン化したアセチルアミド基と負電荷をもつ酵素との静電的相互作用を利用するものである。また、ケラチン修飾カーボンペースト電極における銀(I)の濃縮ボルタンメトリーも試みられている。これは、ケラチンのチオール基と相互作用により銀イオンを電極表面に濃縮し、銀イオンを還元した後に検出する方法である[10]。

本研究では、グルコースオキシダーゼをケラチンに固定化する方法を検討し、酵素反応によって生成した過酸化水素を検出するための白金粉末を修飾したカーボンペースト電極によるグルコースセンサの開発を行った。ケラチンは、アミノ基、チオール等の官能基しており弱酸性溶液中ではそれら一部がプロトン化している。一方、グルコースオキシダーゼが負電荷を有しているならば、酵素修飾ケラチンを調製することができる。この手法は、酵素の構造を大きく変化させることなくケラチン表面上にグルコースオキシダーゼの固定化を可能とする特色をもつ。

2. 実験

2.1 装置

サイクリックボルタモグラムとアンペロメトリーの測定には Bioanalytical System Inc. (BAS) CV-50W ボルタンメトリックアナライザーを用いた。また、作用電極としてカーボンペースト電極 (BAS 2210) を、参照電極として RE-1B 水系参照電極 (Ag/AgCl) (BAS 2020) を、対極として白金線を用いた。pH 測定には堀場 D-21 型 pH メーターを使用した。可視スペクトルは UV 1240 mini (Shimadzu Tokyo, Japan) により測定された。

2.2 試薬

ケラチンは(株)東京化成工業より購入した。D(+)-グルコース、グルコースオキシダーゼ、グルタルアルデヒド溶液は和光純薬工業(株)製のものを用いた。白金粉末は、キシダ化学から購入した。炭素粉末は東海カーボンから得た。ヌジヨールはメルク・ジャパン製である。本研究で用いたすべての試薬は、分析試薬グレードである。0.1 M 酢酸と 0.1 M 酢酸ナトリウムから 0.1 M 酢酸緩衝溶液 (pH 6.2) を調製し、インキュベーション溶液および支持電解質として使用した。除酸素には高純度の窒素ガスを用いた。

2.3 グルコースオキシダーゼ/ケラチン修飾電極の作製法

ケラチン粉末 50 mg とグルコースオキシダーゼ 195.8 units を 0.85 ml の酢酸緩衝溶液 (pH 6.2) に溶解し、4°C の下で一昼夜攪拌する。この溶液を吸引濾過し、10 分間乾燥させる。乾燥終了後、この酵素固定化ケラチンと炭素粉末、白金粉末を全体で 0.1 g になるように乳鉢に量り取り、乳棒でよく混ぜた後、適量のヌジヨールを加えペースト状にする。そして、このペーストの一部をカーボンペースト電極の先端部に詰めて電極表面をスパチュラで滑らかに整え、修飾電極として用いた。

2.4 測定操作

酢酸緩衝液 (pH 6.0) 中において、酵素固定化ケラチン修飾電極によるブランクとグルコースの応答を、サイクリックボルタンメトリー (Initial Electric Potential = 0.2 V, High Electric Potential = 1.0 V, Scan rate = 0.05 V sec⁻¹, Sample Interval = 0.001 V, QuietTime = 15 sec) により測定を行った。また、酵素反応や電極反応の応答時間について、アンペロメトリー (Initial Electric Potential = 0.85 V) により測定を行った。

3. 結果と討論

3.1 ケラチン表面における酵素の固定化

Figure 1 は、391.6 units の酵素を 1.7 ml の酢酸緩衝溶液に溶解したものと、同量の酵素と 100 mg のケラチンを溶液に溶解したものを一昼夜攪拌した後、それぞれの吸光度を示したものである。こ

の吸光度の差から、本法においてケラチンに固定化されたグルコースオキシダーゼの量を求めたところ、ケラチン 100 mg あたり 99.6 units となっており、使用した酵素量の約 4 分の 1 の量が固定されていることが分かった。このことから、ケラチン表面にグルコースオキシダーゼを固定化できることが明らかとなった。

3.2 過酸化水素とグルコースの応答

グルコースオキシダーゼの酵素反応により過酸化水素が生成することを確かめるために、ケラチン/グルコースオキシダーゼ修飾電極による過酸化水素とグルコースの応答をサイクリックボルタンメトリーにより測定したものを Fig. 2 に示す。グルコースの検出原理は、酵素の触媒作用によってグルコースがグルコノラクトンに変換される。このとき同時に生成された過酸化水素はカーボンペースト中に白金粉末が修飾されているため検出される。測定溶液に 4.0×10^{-4} M の過酸化水素を加えると、測定した幅広い電位で電流値の増加が見られたため、酸化反応が起きていることが示唆される。一方、 4.0×10^{-4} M のグルコースを加えた場合にも、酵素反応により生成した過酸化水素の生成に基づく電流値の増加がみられた。従って、酵素が固定化され過酸化水素が生成されている。

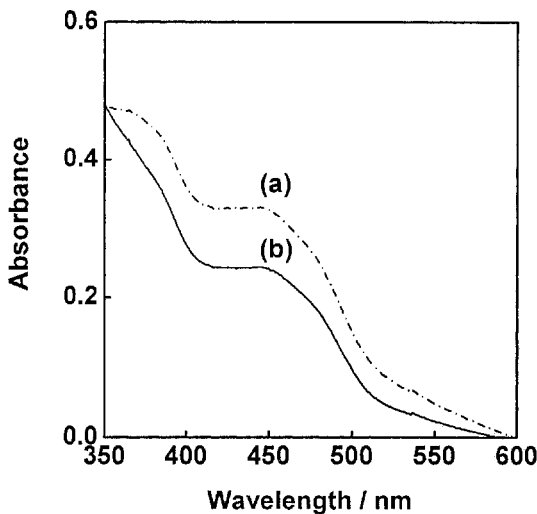


Fig. 1 Amount of glucose oxidase immobilized to chitin.

Immobilization of glucose oxidase was carried out in 0.1 M acetate buffer (pH 6.0) containing 230 units/ml glucose oxidase for 4 h with stirring. Absorbance at 450 nm was measured with spectrometry.

(a) 0 mg Keratin, (b) 60 mg Keratin.

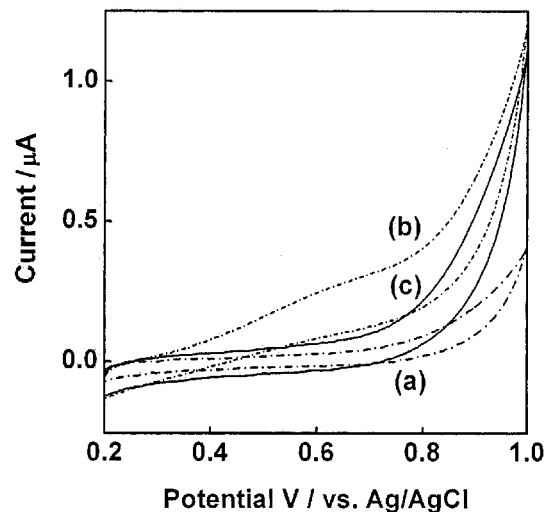


Fig. 2 Cyclic voltammograms of H_2O_2 and glucose obtained by a modified CPE.

Immobilization of glucose oxidase was carried out in 0.1 M acetate buffer (pH 6.0) containing 230 units/ml glucose oxidase and 60 mg chitin for 4 h with stirring. Measurement at the electrode containing 30 % keratin with glucose oxidase, 25 % platinum powder and 45 % graphite powder in 0.1 M acetate buffer (pH 6.0).

(a) Blank, (b) 4×10^{-4} M H_2O_2 , (c) 4×10^{-4} M Glucose.

3.3 グルコースの濃度の影響

測定溶液にグルコースを添加した際には、+0.85 Vにおける電流値が 5×10^{-6} Mから 4×10^{-4} Mの範囲でよい直線関係 ($I_p(A) = 0.00133 \times C(M) + 0.000000135$) を示した。また、 4.0×10^{-5} Mにおいて、ペーストを塗り直して5回同じ測定を繰り返したところ、相対標準偏差が5%程度となり、再現性のよい電極の再生が可能である。グルコースオキシダーゼ/ケラチン修飾電極を用いて、 4.0×10^{-5} Mのグルコースを加え+0.85 V(vs. Ag/AgCl)において、アンペロメトリーにより測定を行ったときの典型的応答曲線がFig. 3である。 4.0×10^{-5} Mのグルコースを添加したときの電流値は急激に変化し、60秒程度で一定となった。グルコースの濃度に依存し電流値は変化するため、この測定方法を用いてグルコースの検出が可能となる。

3.4 ヌジョールの添加量

バインダーであるヌジョールの添加量を変化させ電流値におよぼす影響をFig. 4に示した。ヌジョールの添加量の増加に伴い電流値は減少しており、 $40 \mu\text{l}$ において、電流値はもっとも大きい。ヌジョールが不十分であり均一なペーストの作製が困難となる。それに対して、ヌジョールの添加量を増加させると電流値が徐々に減少する。これは、ヌジョールによる酵素反応の阻害に起因して

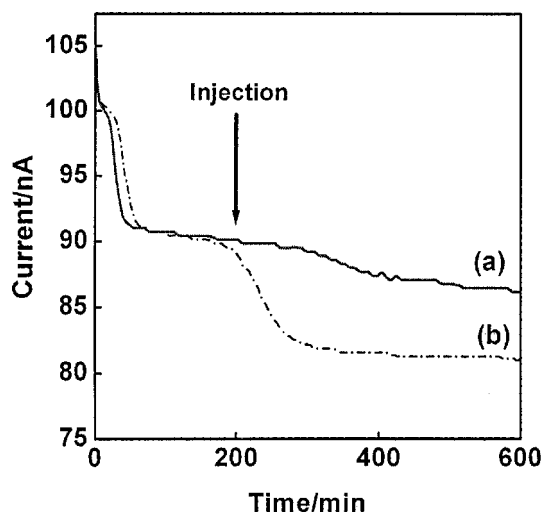


Fig. 3 Typical response curves of time base.

Immobilization of glucose oxidase was carried out in 0.1 M acetate buffer (pH 6.0) containing 230 units/ml glucose oxidase and 60 mg chitin for 4 h with stirring. Measurement at 0.85 V by the electrode containing 30 % keratin with glucose oxidase, 25 % platinum powder and 45 % graphite powder in 0.1 M acetate buffer (pH 6.0).

(a) Blank, (b) 4×10^{-5} M Glucose.

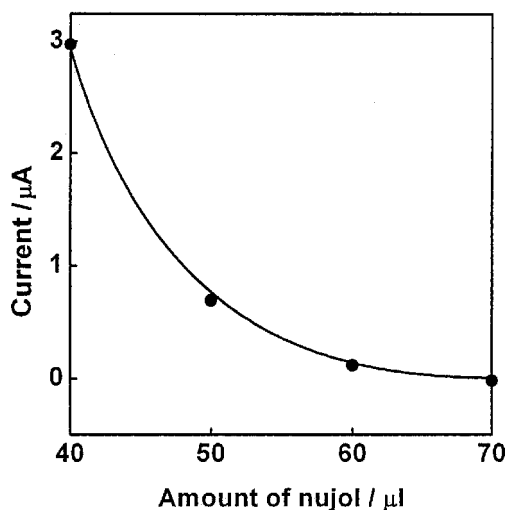


Fig. 4 Effect of amount of nujol.

Immobilization of glucose oxidase was carried out in 0.1 M acetate buffer (pH 6.0) containing 230 units/ml glucose oxidase and 60 mg chitin for 4 h with stirring.

Measurement at 0.85 V by the electrode containing 30 % keratin with glucose oxidase, 25 % platinum powder and 45 % graphite powder in 0.1 M acetate buffer (pH 6.0) with 4×10^{-4} M glucose.

いるものと考えられる。

3.5 グルタルアルデヒドの影響

酵素を固定化するためにグルタルアルデヒド効果を検討した。グルタルアルデヒドはタンパク質間の架橋剤として用いられている。本研究においても、ケラチンとグルタルアルデヒドとの架橋効果を期待した。架橋の手法は、ケラチン粉末、グルコースオキシダーゼそしてグルタルアルデヒドを緩衝溶液中で混合した後、修飾ケラチンを乾燥させた。次に、同様の手順でペーストを作製し電極に詰め測定を行った。その結果、グルタルアルデヒドを用いない場合に比べ、グルタルアルデヒドを用いた場合の電流値は若干電極応答が小さくなった (Fig. 5)。それゆえ、ケラチンに酵素を固定化するには架橋剤を使わずに、グルコースオキシダーゼを固定化できる。すなわち、ケラチン表面のプロトン化したアミノ基と負電荷を持ったグルコースオキシダーゼとの静電的相互作用によって酵素修飾ケラチンが生成したことがわかる。

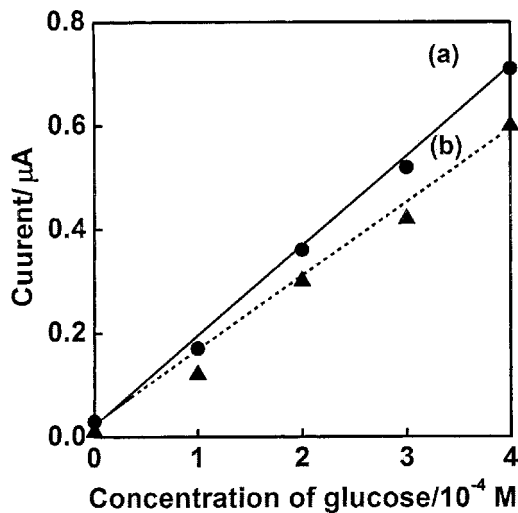


Fig. 5 Effect of glutaraldehyde. Immobilization of glucose oxidase was carried out in 0.1 M acetate buffer (pH 6.0) containing 230 units/ml glucose oxidase and 60 mg chitin for 4 h with stirring. Measurement at 0.85 V by the electrode containing 30 % keratin with glucose oxidase, 25 % platinum powder and 45 % graphite powder in 0.1 M acetate buffer (pH 6.0) with 4×10^{-4} M glucose. (a) Without glutaraldehyde, (b) With glutaraldehyde (6 %).

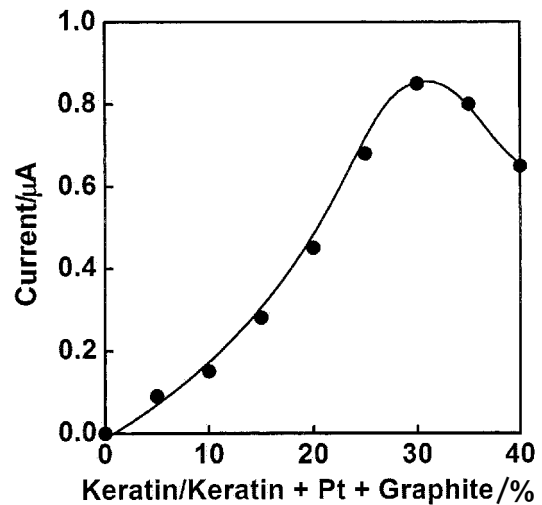


Fig. 6 Effect of keratin powder. Immobilization of glucose oxidase was carried out in 0.1 M acetate buffer (pH 6.0) containing 230 units/ml glucose oxidase and 60 mg chitin for 4 h with stirring. Measurement at 0.85 V by the electrode containing keratin with glucose oxidase, 25 % platinum powder and graphite powder in 0.1 M acetate buffer (pH 6.0) with 4×10^{-4} M glucose.

3.6 炭素粉末とケラチンとの混合比

Figure 6 は、炭素粉末とケラチンとの混合比による電流値の変化を示したものである。本実験では、白金粉末を 25 % に固定し、混合物全体で 0.1 g になるようにペーストを調製した。ケラチンの修飾率を増加させ測定したところ、電流値も増加していった。このことから、ケラチンによってグルコースオキシダーゼが固定化されていることが確認された。しかし、ケラチンの修飾率を 40 % の場合には、電流値の減少が観察された。すなわち、電極内の導電性が減少したためと考えられる。一方、30 % の比率では安定な電流値が得られたため、測定にはこの比率を用いることとした。

4. 結論

本研究では、酵素を固定化するための支持体としてケラチンの有用性を検討するため、グルコースオキシダーゼを固定化したケラチン修飾カーボンペースト電極によるグルコースのセンシングについての検討を行った。本法において、溶液中で酵素とケラチンを攪拌することにより、負電荷を有するグルコースオキシダーゼとケラチンのアミノ基との静電的相互作用によってケラチン表面に容易に固定化することができた。また、酵素固定ケラチンと炭素粉末、白金粉末を混合することにより、修飾剤が容易に調製された。グルコースオキシダーゼの固定にはグルタルアルデヒドのような架橋剤を必要とすると考えられたが、グルタルアルデヒドを用いない場合において感度は高い結果となった。その感度は 10^{-5} M レベルであり、グルコースの検出が達成された。このように、酵素をケラチンに固定化することで生体機能性材料としての可能性を広げることができた。さらに、ヌジールの添加量や、炭素とケラチンの混合比などの最適な測定条件を検討することによって、実用的なグルコースセンサが開発できることが期待される。今後、グルコースオキシダーゼに代わる他の酵素の固定化に対するケラチンの支持体としての可能性や、グルコース以外の糖質の検出法へと展開する予定である。

参考文献

- [1] 長谷部靖, 内山俊一, ぶんせき, 2002, 544-549.
- [2] J. Liu, F. Lu, J. Wang, *Electrochem. Commu.*, **1** (1999) 341-344.
- [3] Z. Zhang, H. Liu, J. Deng, *J. Anal. Chem.*, **68** (1996) 1632-1638.
- [4] C. Malitesta, F. Palmisano, L. Torsi, P. G. Zambonin, *Anal. Chem.*, **62** (1990) 2735-2740.
- [5] J. Kulys, *Biosensors Bioelectronics*, **14** (1999) 473-479.
- [6] 宮本武明, 赤池敏宏, 西成勝好, 21 世紀の天然・生体高分子材料, 1998.
- [7] D. Savitri, C. K. Mitra, *Bioelectrochem. Bioenergetics*, **47** (1998) 67-73.
- [8] C. Saby, F. Mizutani, S. Yabuki, *Anal. Chim. Acta*, **304** (1995) 33-39.
- [9] K. Sugawara, T. Takano, S. Hoshi, K. Akatsuka, H. Kuramitz, S. Tanaka, *J. Electroanal. Chem.*, **482** (2000) 81-86.
- [10] K. Sugawara, H. Matsui, S. Hoshi, K. Akatsuka, *Analyst*, **123** (1998) 2013-2016.