報 文

交流インピーダンス法による酵素機能電極の解析

寒川 恒俊¹, 辻村 清也¹, 加納 健司^{®1}

酵素機能電極の反応速度パラメーターを得ることは、その電極を組み込んだデバイスを評価する上で非常に重要である。本研究では、酵素としてピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ、メディエータとしてフェロセンカルボン酸を用いたグルコースのバイオエレクトロカタリシス反応を例に挙げ、その反応解析に交流インピーダンス法を適用した。メディエータの酸化還元反応に関する複素平面プロットは、酵素触媒反応が共役することにより半弧になり、その直径はメディエータ濃度に反比例した。酵素とメディエータが一次反応となる条件において、測定結果を理論式で解析し、反応速度パラメーターを算出した。この値をサイクリックボルタンメトリーにより算出した値と比較したところ妥当であることを確認し、交流インピーダンス法が酵素機能電極の反応解析にも有用であることを示した。

1 緒 言

酵素機能電極は、電極反応と酵素触媒反応の共役系であり、一般的に常温、常圧、中性条件で進行し、反応選択性が極めて高い。この特性を生かし、酵素機能電極はバイオセンサーやバイオ燃料電池への利用が試みられている¹⁾²⁾。酵素機能電極をこれらのデバイスに組み入れる場合、その反応性、耐久性、安全性など様々な項目で特性評価する必要がある。反応性に関しては、通常、サイクリックボルタンメトリーや定電位アンペロメトリーなどの直流法が用いられることが多い。サイクリックボルタンメトリーは反応の概略について簡便に知ることができ、様々な解析法が提案されているという利点がある。しかし、電池デバイスのようなアノードとカソード系を同時測定する場合には、サイクリックボルタンメトリーは適さず、たとえ測定してもその解析は非常に困難となる。このような場合には、交流インピーダンス法を用いることが多い。交流インピーダンス法は、様々なタイムスケールの反応を分離測定することに適しており、装置の改良も進み測定は比較的容易であるが、等価回路を定義して解析法を確立することが大前提である。

現在まで酵素機能電極に交流インピーダンス法を用いた例として、酵素とメディエータが結合したポリマーを固定した電極界面の電荷移動の解析³⁾、電極に固定化した酵素の触媒活性の確認⁴⁾、酵素電極触媒反応のシミュレーション⁵⁾、バイオセンサーへの応用⁶⁾⁷⁾などが報告されている。しかし、交流インピーダンス法による測定結果を解析の理論式に基づいて詳細に解析した例は報告されていない。

そこで、本研究では交流インピーダンス法を用いて酵素反応速度パラメーターを求めることを目的とした。酵素、基質、メディエータにはそれぞれピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ (PQQ-GDH)、D-グルコース、フェロセンカルボン酸 (Fc-COOH) を用いた。交流インピーダンスの測定結果に対し、理論式をフィッティングし、反応速度パラメーターを算出した。また、その値をサイクリックボルタンメトリーにより算出した結果と比較し、妥当性を検討した。

2 実験方法

2.1 試 薬

PQQ-GDH (“Amano”5, 4200 unit mg⁻¹) は天野エンザイムより購入した。Fc-COOH, dimethylsulfoxide (DMSO), D-グルコースは和光純薬製を、3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) はナカライテスク製のものを精製せずにそのまま使用した。PQQ-GDH は MOPS 緩衝液に 5 mg mL⁻¹ となるように溶解させ、酵素溶液として使用した。D-グルコースは 1.0 M (M = mol dm⁻³) となるように MOPS 緩衝液に溶存させ、1 晩放置して平衡化させた保存液を使用した。

2.2 電気化学測定

電気化学測定には、ポテンシostat (CHI704C, ALS 製) を用い、作用電極にはグラッシーカーボン電極 (直径 3 mm, ALS 製)、対極には白金線 (直径 1 mm, 長さ 5 cm)、参照電極には Ag|AgCl|KCl (sat.) 電極を用いた。電位はすべて本参照電極を基準として表記した。グラッシーカーボン電極はアルミナ (1 μm, 0.5 μm) で研磨した後、蒸留水中で約 10 秒間超音波洗浄し、実験に用いた。

¹ 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻: 606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町

Fig. 1 The common equivalent circuit

C_d : double layer capacitance; R_{ct} : electron transfer resistance; Z_W : Warburg impedance; R_Ω : solution resistance

電気化学測定はすべてウォータージャケット付きのガラスセル（測定液量 1 mL）を用い、測定温度 25℃ で行った。また、PQQ-GDH の活性を保つために 3 mM の塩化カルシウムを含んだ pH 7 の MOPS 緩衝液（30 mM）を用いた。この条件では Fc-COOH は解離している。

グルコース濃度を基質に対するミカエリス定数 ($K_s = 1.9 \text{ mM}^{(8)}$) より十分高くなる条件下で PQQ-GDH と Fc-COOH の反応速度定数 ($k_{cat}C_E/K_M$) をサイクリックボルタンメトリーにより算出した⁹⁾。交流インピーダンス測定の印加直流電位は Fc-COOH の酸化還元電位 (320 mV) とし、振幅は 5 mV とした。測定周波数は 0.01 ~ 10000 Hz とし、繰り返しの回数は 0.01 ~ 0.1 Hz は 2 回、0.1 ~ 1 Hz は 4 回、1 ~ 10, 10 ~ 100, 100 ~ 1000, 1000 ~ 10000 Hz は 8 回とした。

3 理論的背景

3.1 酸化還元物質のみを含む単純な系と酵素機能電極の系の比較

酸化還元物質としてのメディエータ (M) のみが溶液中に存在する場合の等価回路を Fig. 1 に示す。ここで、 C_d , R_{ct} , Z_W , R_Ω はそれぞれ電気二重層キャパシタ、電荷移動抵抗、ワールブルグインピーダンス、溶液抵抗を示している。ワールブルグインピーダンスは酸化還元物質の拡散の影響を考慮に入れた要素である。等価回路全体のインピーダンスは以下のように表される。

$$Z = R_\Omega + \frac{1}{\frac{1}{Z_F} + j\omega C_d} \quad (1)$$

ここで、 R_Ω , C_d , ω は、それぞれ溶液抵抗、電気二重層容量、角速度である。また、 $j = \sqrt{-1}$ である。 Z_F はファラデーインピーダンスであり、酸化還元物質のみが電極反応に関与する場合、以下のように表現される。

$$Z_F = R_{ct} + \frac{\sqrt{2}\sigma}{\sqrt{j\omega}} \quad (2)$$

ここで、 R_{ct} と σ は、それぞれ電荷移動抵抗、ワールブルグ定数である。 R_{ct} と σ は以下のように与えられる¹⁰⁾。

$$R_{ct} = \frac{RT}{n_M F A i_0} = \frac{RT}{n_M^2 F^2 A k^\circ (C_O^*)^{1-\alpha} (C_R^*)^\alpha} \quad (3)$$

$$\sigma = \frac{RT}{n_M^2 F^2 A \sqrt{2}} \left(\frac{1}{D_O^{1/2} C_O^*} + \frac{1}{D_R^{1/2} C_R^*} \right) \quad (4)$$

ここで、 R , T , n_M , F , A , i_0 , k° , α , C_O^* , C_R^* , D_O , D_R はそれぞれ気体定数、絶対温度、反応電子数 (Fc-COOH の場合、 $n_M = 1$)、ファラデー定数、電極表面積、交換電流密度、電極反応速度定数、移動係数、酸化体の電極表面濃度、還元体の電極表面濃度、酸化体の拡散係数、還元体の拡散係数である。酵素電極触媒反応では電極で酸化されたメディエータの一部は酵素触媒反応により再び還元される。したがって、 Z_F の拡散の項 ($\sqrt{2}\sigma / \sqrt{j\omega}$) に変化が起これと考えられる。

3.2 酵素反応

次のような基質 (S) の生成物 (P) への酸化反応を触媒する酸化還元酵素 (E) の反応を考える。

ここで、下付き O, R は、それぞれ酸化体、還元体を示す。また、 n_S は基質の電子数 (グルコースの場合、 $n_S = 2$) を示す。基質濃度がそのミカエリス定数に比べて十分高い場合には、その反応速度 (v) は以下のように記述される。

$$v = -\frac{dC_O}{dt} = \frac{\frac{n_S}{n_M} k_{cat} C_E}{\frac{K_M}{C_O} + 1} \quad (7)$$

ここで、 C_O , C_E , k_{cat} , K_M は、それぞれ酸化体メディエータ濃度、酵素濃度、酵素のターンオーバー定数、メディエータに対するミカエリス定数である。

4 結果及び考察

4.1 サイクリックボルタンメトリーによる K_M の算出

MOPS 緩衝液に D-グルコース及び PQQ-GDH の最終濃度がそれぞれ 100 mM, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ となるように添加した条件において、サイクリックボルタンメトリーで観測さ

Fig. 2 The mediator concentration (C_M) dependence of the limiting steady-state catalytic current (I_s) obtained by cyclic voltammetry at a glassy carbon electrode in MOPS buffer solution (pH 7) containing 3 mM CaCl_2 , $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ PQQ-GDH and 100 mM D-glucose

Potential was scanned from -0.1 to 0.7 V *vs.* Ag|AgCl and at a scan rate of 20 mV s^{-1} . The solid line represents the regression line obtained based on Eq. 8.

れた触媒定常限界電流値 (I_s) のメディエータ濃度 (C_M) 依存性を Fig. 2 に示す. I_s が C_M に比例していることから, この C_M 範囲では $C_O \ll K_M$ であると見なせる. また, この結果を以下の理論式 (8)⁹⁾ に基づいて解析したところ, 酵素-メディエータ間の反応速度定数を $k_{\text{cat}}C_E/K_M = 73 \text{ s}^{-1}$ と得た.

$$I_s = n_M F A \sqrt{\frac{n_S}{n_M} D_M \frac{k_{\text{cat}} C_E}{K_M}} \cdot C_O \quad (8)$$

ここで, D_M , F , A は, それぞれメディエータの拡散係数, ファラデー定数, 電極表面積である. D_M は交流インピーダンス法により求めた値 ($6.2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) を用いた.

4.2 酵素触媒反応の交流インピーダンスへの影響

MOPS 緩衝液に D-グルコースと Fc-COOH をそれぞれ最終濃度が 100, 0.050 mM となるように溶存させ, 酵素 (PQQ-GDH) 非存在下と酵素存在下 ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) の交流インピーダンスの測定結果を Fig. 3 に示す. 酵素非存在下では傾き 45 度の直線のみが現れた. この直線は Fc-COOH の物質輸送過程が電極反応の律速段階であることを示している. 一方, 酵素存在下では半弧^{りょう}が現れ, 酵素反応触媒の影響が明瞭に現れた.

電極反応に酵素反応が共役した場合の交流インピーダンスについては, Calvo ら³⁾ が酵素固定化膜を用いた場合のインピーダンスについて報告している. Calvo らは酵素反応を一次反応に近似させ, 酵素電極触媒反応の交流インピーダンスの解析を試みた. この場合のファラデーインピーダンス (Z_F) は以下の式で記述できる¹¹⁾¹²⁾.

Fig. 3 Nyquist plots obtained at a glassy carbon electrode in MOPS buffer solution (pH 7) containing 3 mM CaCl_2 , 0.005 mM Fc-COOH , and 100 mM D-glucose

Open circle : in the absence of PQQ-GDH solution ; open triangle : in the presence of $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ PQQ-GDH. DC bias potential, AC amplitude and frequency range of applied signals were set to 0.32 V *vs.* Ag|AgCl , 10 mV (peak to peak) and $10 \text{ kHz} \sim 10 \text{ mHz}$, respectively.

$$Z_F = R_{\text{ct}} + \frac{\sqrt{2}\sigma}{\sqrt{k + j\omega}} \quad (9)$$

ここで, k は一次反応速度定数である. 式 (9) は後続一次反応速度が電位変化速度より著しく遅い場合, 反応の影響がインピーダンスに現れないことを示している.

本研究では, 基質濃度がミカエリス定数より十分高く, メディエータ濃度がミカエリス定数より十分低い ($C_O \ll K_M$) 条件なので, Calvo らと同様に酵素反応を一次反応に近似して考える. $k_{\text{cat}}C_E/K_M$ (=一定) となるので, 式 (7) は次式のように一次反応に近似できる.

$$v = \frac{\frac{n_S}{n_M} k_{\text{cat}} C_E}{K_M} C_O \quad (10)$$

この場合の電極反応及び後続反応は以下のように近似できる.

$$k = \frac{\frac{n_S}{n_M} k_{\text{cat}} C_E}{K_M} \quad (13)$$

基質濃度が十分高い条件 (D-グルコース 100 mM) かつ

Fig. 4 Nyquist plot obtained at a glassy carbon electrode in MOPS buffer solution (pH 7) containing 3 mM CaCl_2 , $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ PQQ-GDH, 0.001 mM Fc-COOH , and 100 mM D-glucose (open circle)

DC bias potential, AC amplitude and frequency range of applied signals were set to 0.32 V *vs.* $\text{Ag}|\text{AgCl}$, 10 mV (peak to peak) and 1 kHz $\sim$ 10 mHz, respectively. Broken line represents the regression curve generated based on Eqs (1), (3), (4), (9), and (13) with the parameters given in the text.

メディエータ濃度が $C_0 \ll K_M$ となる条件 (Fc-COOH 500 μM) で酵素電極触媒反応を測定した結果を Fig. 4 に示す。式(1), (3), (4), (9), (13) で表される理論式を測定結果にフィッティングした結果も Fig. 4 に示した。フィッティングにより $k_{\text{cat}}C_E/K_M = 3.1 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ と求められた。フィッティングに用いた各パラメーターは酵素非存在下におけるメディエータの複素平面プロット (Fig. 3) に対し、式(1)～(4) を用いた理論式を適用して求めたもの ($\{R_\Omega = 50 \Omega \text{ cm}^2, k^\circ = 20 \text{ cm s}^{-1}, C_d = 50 \mu\text{F cm}^{-2}, D_O (= D_R) = 6.2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}\}$) を用いた。 k の値は触媒電流の限界電流値のメディエータ濃度依存性から算出した値に近い値となり、交流インピーダンス法により k を評価すること可能であることが分かった。更に、酵素存在下でメディエータ濃度 (C_M) を変化させた結果を Fig. 5 に示す。 C_M を変化させたと、半弧の直径 (R_{EC}) の大きさの逆数はメディエータ濃度に比例した (Fig. 5)。半弧の直径は虚数成分最大時のインピーダンスの実数成分と最高測定周波数 (1 kHz) のインピーダンスの実数成分の差を 2 倍するという方法で算出した。

今回得られた半弧の直径の大きさの逆数とメディエータ濃度の間の比例関係の妥当性を確かめるため、電極触媒反応の交流インピーダンスの実数成分 (Z_{re}) を考える。式(9)を式(1)に代入すると、等価回路全体のインピーダンスの実数部分と虚数部分は以下の式で表される。

$$Z_{\text{re}} = R_\Omega + \frac{\frac{p}{p^2 + q^2}}{\left(\frac{p}{p^2 + q^2}\right)^2 + \left(C_d \omega - \frac{q}{p^2 + q^2}\right)^2} \quad (14)$$

Fig. 5 Nyquist plots obtained at a glassy carbon electrode in MOPS buffer solution (pH 7) containing $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ PQQ-GDH, 100 mM D-glucose at various mediator concentrations (C_M), $\square$: 1.0 μM ; $\triangle$: 0.75 μM ; $\circ$: 0.50 μM ; $\diamond$: 0.25 μM

$$Z_{\text{im}} = -j \frac{C_d \omega - \frac{q}{p^2 + q^2}}{\left(\frac{p}{p^2 + q^2}\right)^2 + \left(C_d \omega - \frac{q}{p^2 + q^2}\right)^2} \quad (15)$$

ここで、

$$p = R_{\text{ct}} + \sigma \left(\frac{(\omega^2 + k^2)^{\frac{1}{2}} + k}{(\omega^2 + k^2)} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (16)$$

$$q = -\sigma \left(\frac{(\omega^2 + k^2)^{\frac{1}{2}} - k}{(\omega^2 + k^2)} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (17)$$

である。式(14) は $\omega \rightarrow 0$ の場合及び $\omega \rightarrow \infty$ の場合、それぞれ以下のように近似できる。

$$Z_{\text{re}(\omega \rightarrow 0)} = R_\Omega + R_{\text{ct}} + \sigma \sqrt{\frac{2}{k}} \quad (18)$$

$$Z_{\text{re}(\omega \rightarrow \infty)} = R_\Omega \quad (19)$$

したがって、直径 R_{EC} は以下の式(20) で近似される。

$$R_{\text{EC}} = R_{\text{ct}} + \sigma \sqrt{\frac{2}{k}} \quad (20)$$

式(20) に式(3), (4) を代入し、

$$\frac{1}{R_{\text{EC}}} = \frac{n^2 F^2 A}{4RT \left(\frac{1}{2k^\circ} + \frac{1}{\sqrt{Dk}} \right)} C_T \quad (21)$$

となる。ここで、 $C_T = C_O^* + C_R^*$, $D = D_O + D_R$ である。半弧の直径の逆数がメディエータ濃度に比例するという結

Fig. 6 Correlation between $1/R_{EC}$ and the mediator concentration (C_M)

The R_{EC} values were evaluated from the data in Fig. 5.

果は式(21) からも妥当である. 更に, Fig. 6 の直線の傾きは $55 \Omega^{-1} \text{cm}^{-2} \text{M}^{-1}$ となり, 先に求めた値を式(21) に代入して求めた値 $58 \Omega^{-1} \text{cm}^{-2} \text{M}^{-1}$ ともよく一致した.

5 結 言

メディエータに対して一次に近似できる酵素反応条件での酵素触媒電極反応を例に挙げ, 交流インピーダンス法を適用した. 厳密な理論式に従って解析した結果, 基本的には, サイクリックボルタンメトリーから得られるものと同等の情報が得られることを実験的に示した. 得られる情報が類似しているとしても, 手法が異なることは意義があると考えられる. 特に, 緒言で述べたように, 交流インピーダンス法の利点のひとつとして電池系にも適用できることから, 今後, ここで示した交流インピーダンス解析法はバ

イオ電池系やバイオセンサー系の特性評価に非常に有用であると考えている.

酵素反応が非線形の場合には, サイクリックボルタンメトリーと同様, 交流インピーダンス法による解析も非常に難しくなる. 非線形系に関する今後のひとつの打開策として, 近似を含めた等価回路による半定量的解析法を考案することが重要であると考えている.

文 献

- 1) T. Ikeda, K. Kano : *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 9 (2001).
- 2) S. Tsujimura, K. Kano, T. Ikeda : *Electrochemistry*, **70**, 940 (2002).
- 3) E. J. Calvo, R. Etchenique : *Anal. Chem.*, **68**, 4186 (1996).
- 4) E. E. Ferapontova, J. Castillo, D. Hushpulian, V. Tishkov, T. Chubar, I. Gazaryan, L. Gorton : *Electrochim. Commun.*, **7**, 1291 (2005).
- 5) D. Oyamatsu, S. Kuwabata : *Rev. Polarogr.*, **50**, 305 (2004).
- 6) S. Kuwabata, H. Hasegawa, K. Kano : *Chem. Lett.*, **2003**, 52.
- 7) T. Kohma, H. Hasegawa, D. Oyamatsu, S. Kuwabata : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80**, 158 (2007).
- 8) 天野 エンザ イム (株) (<http://www.amano-enzyme.co.jp/>), 製品情報.
- 9) Y. Ogino, K. Takagi, K. Kano, T. Ikeda : *J. Electroanal. Chem.*, **396**, 517 (1995).
- 10) A. J. Bard, L. R. Faulkner : *“Electrochemical Methods : fundamentals and applications, 2nd Ed.”*, p. 368 (2001), (J. Wiley & Sons, New York).
- 11) M. Sluyters-Rebach, J. H. Sluyters : *J. Electroanal. Chem.*, **26**, 237 (1970).
- 12) B. A. Boukamp : *Solid State Ionics*, **11**, 339 (1984).

AC Impedance Analysis of Enzyme-Functional Electrodes

Tsunetoshi SAMUKAWA¹, Seiya TSUJIMURA¹ and Kenji KANO¹

¹ Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502

(Received 17 March 2008, Accepted 26 April 2008)

AC impedance spectra were measured for mediated bioelectrocatalytic systems containing PQQ-dependant glucose dehydrogenase, ferrocenecarboxylic acid and D-glucose. The catalytic system showed a circular arc in Nyquist plots, and its radius was inversely proportional to the mediator concentration. The kinetic parameters were evaluated with theoretical equations for the case in which the substrate concentration was sufficiently higher than the Michaelis constant, and the mediator concentration was sufficiently lower. The evaluated value of the kinetic parameter was comparable to that obtained by cyclic voltammetry, indicating the usefulness of AC impedance methods for bioelectrocatalysis systems.

Keywords : bioelectrocatalysis ; impedance ; enzyme kinetic parameter ; biofuel cell ; biosensor.