

レドックスハイドロゲル修飾グルコース電極の  
合理的設計に関する研究

吉田 愛未

2021年2月

筑波大学大学院博士課程

理工情報生命学術院

数理物質科学研究群博士論文

博士（工学）

レドックスハイドロゲル修飾グルコース電極の  
合理的設計に関する研究

吉田 愛未

応用理工学学位プログラム

物性・分子工学サブプログラム

# 目次

第1章 緒言 .....	4
1-1 研究背景.....	5
1-2 バイオ燃料電池の活用例.....	7
1-2-1 体表 .....	7
1-2-2 体内 .....	8
1-2-3 生体外.....	9
1-3 酵素センサーの活用例 .....	10
1-3-1 環境センサー .....	10
1-3-2 生体センサー .....	10
1-3-3 食品センサー .....	11
1-4 酵素電極を構成する要素.....	11
1-4-1 電極 .....	11
1-4-1-1 板・繊維状素材：カーボンクロス .....	12
1-4-1-2 板・繊維状素材：カーボンペーパー .....	12
1-4-1-3 板・繊維状素材：バッキーペーパー .....	13
1-4-1-4 粉状素材：カーボンナノチューブ(CNT).....	13
1-4-1-5 粉末素材：ケッチェンブラック (KB) .....	13
1-4-1-6 粉末素材：MgO 鋳型炭素 (MgOC) .....	13
1-4-1-7 グラフェンナノシート .....	14
1-4-2 電極触媒.....	14
1-4-3 メディエータ .....	15
1-4-3-1 レドックスポリマー .....	16
1-4-3-2 キノン類.....	17
1-4-3-3 フェノチアジン類.....	17
1-4-3-4 フェロセン .....	17
1-4-4 電解液.....	18
1-4-5 酵素 .....	18
1-4-5-1 グルコース酸化酵素：GO <sub>x</sub> (Glucose oxidase) .....	19
1-4-5-2 グルコース脱水素酵素：PQQ-GDH(pyrroloquinoline quinone dependent glucose dehydrogenase).....	19
1-4-5-3 グルコース脱水素酵素：FAD-GDH (Flavin Adenine Dinucleotide dependent Glucose Dehydrogenase) .....	20
1-4-5-4 補酵素：FAD(flavin adenine dinucleotide).....	20
1-4-5-5 補酵素：PQQ(pyrroloquinoline quinone).....	21
第2章 MgOC を電極足場とし、グルコース酸化酵素 (GO <sub>x</sub> ) を使用したレドックスハイドロゲル型グルコース酸化電極の特性評価および電解質溶液の電流生成への影響の解明 .....	22

2-1	緒言 .....	23
2-2	実験方法.....	24
2-2-1	多孔質電極の作製.....	24
2-2-2	ハイドロゲル修飾.....	24
2-3	多孔質電極と平板電極の触媒電流値の比較.....	25
2-4	多孔質電極と平板電極の短期安定性の比較.....	28
2-5	多孔質電極と平板電極の長期安定性の比較.....	30
2-6	GO <sub>x</sub> ハイドロゲル電極に対するアニオンの影響 .....	31
2-7	GO <sub>x</sub> 修飾ハイドロゲル電極の触媒電流値とアニオンホフマイスター系列 .....	35
2-8	イオンの濃度とハイドロゲル電極の触媒電流値.....	40
2-9	GO <sub>x</sub> 修飾ハイドロゲル電極の触媒電流値とカチオンホフマイスター系列 .....	41
2-10	結論.....	43
第3章	FAD-GDH を使用したハイドロゲル電極への溶存電解質の影響の解明 .....	45
3-1	緒言 .....	46
3-2	実験方法.....	46
3-2-1	多孔質修飾電極の作製.....	46
3-2-2	ハイドロゲル修飾.....	46
3-3	(d)FAD-GDH ハイドロゲル電極に対するアニオンの影響.....	46
3-4	(d)FAD-GDH 修飾ハイドロゲル電極の触媒電流値とホフマイスター系列 .....	51
3-5	FAD-GDH 修飾ハイドロゲル平板電極の長期安定性評価 .....	53
3-6	FAD-GDH 修飾ハイドロゲル多孔質電極の長期安定性評価 .....	55
3-7	結論.....	56
第4章	低い酸化還元電位を有するレドックスポリマーを用いたグルコース酸化電極の作製 .....	57
4-1	緒言 .....	58
4-2	実験方法.....	59
4-2-1	多孔質修飾電極の作製.....	59
4-2-2	ハイドロゲル修飾.....	59
4-3	polymer II 修飾ハイドロゲル電極の特性評価 .....	60
4-4	3種類のレドックスポリマーを修飾した GO <sub>x</sub> ハイドロゲル修飾多孔質電極の比較 .....	64
4-5	FAD-GDH 修飾電極の特性評価 .....	66
4-6	結論.....	69
第5章	結言 .....	70
参考文献	.....	73
発表リスト	.....	77
謝辞	.....	79

# 第1章 緒言

## 第1章 緒言

### 1-1 研究背景

世界的な高齢化により健康寿命の延伸が重要な課題となり、ヘルスケア産業のビジネスが拡大している。また IoT (internet of things) 技術の進化により、ウェアラブルな健康管理・生体データの収集といった技術に対する期待も高まっている一方、IoT 化と切り離せない課題の一つとして電源の問題がある。多くの IoT 機器は一定以上の出力を安定供給できる電源を前提として開発されており、リチウムイオン電池やエネルギーハーベスティング技術が活用されている。既存のリチウムイオン電池は生体毒性のある液体が電解質として使用されており、また発火の恐れがある。そこで、固体電解質を利用した全固体型リチウムイオン電池 [1]が医療分野の IoT 製品向けに開発されている。エネルギーハーベスティングは、生活の中にある未利用の光や振動、熱といったエネルギーを活用するという概念であり、太陽電池などがその代表となる。エネルギーハーベスティング技術を使ったヘルスケア IoT の例には、振動電圧を採用した「踏んで発電する万歩計」 [2]や、フレキシブルな太陽電池を電源とした腕章型発熱アラーム [3]などが開発されている。

入手容易で安全な化合物を燃料とし、酵素を電極触媒として、化合物の化学エネルギーを電気に変換するバイオ燃料電池 (Biofuel cell, BFC) もエネルギーハーベスターの一つといえる。特に、グルコース・酸素型の BFC は、エネルギー密度、安全性、可用性の点で優位性を有しており、盛んに研究がされている。生体触媒を使用しているという特徴から、常温常圧・中性 pH という穏やかな環境で発電することができ、ウェアラブルデバイスや生体内埋込機器の IoT 電源として期待される。軽く・安価・使い捨て可能な環境にも優しい電池 [4]となる。近年では、大気中の酸素を取り込む空気極とグルコース酸化電極を組み合わせ、 $\text{mW cm}^{-2}$ レベルの高出力を達成する BCF についても報告されている [5]。さらに BFC の酵素電極は、その出力が検体の濃度に依存するために、出力からその濃度を計測することもでき、自己駆動型センサーとして将来のヘルスケア分野での幅広い活用も議論されている。血糖センサーを例にとると、国際糖尿病連合 (IDF) の発表によれば世界の糖尿病人口は爆発的に増え続けており、2019 年時点における糖尿病患者数が 4 億 6,300 万人を上回ることが明らかとなっている。血糖値を手軽に家で計測できる血糖センサーは、グルコース酸化電極によって血中のグルコースを検出する。血液が染み込んだ電極に電圧を印加すると、電極触媒が血中のグルコースを酸化し、流れる電流値から血中グルコース濃度を算出することが可能である。しかし食事毎に採血・測定をする必要であり、日々の患者の負担は大きい。今後も増加が予想される糖尿病患者の QOL (Quality Of Life) の向上を目的として、血糖センサーと BFC を組み合わせ、衣類や体表に貼り体液で発電する自己駆動型センサー [6]や、生体埋込デバイスへの応用 [7]の研究が発表されてきた。

BFC の実用化に向けては、電極触媒を電極表面に固定させることが必須となり、かつ依然として出力の小ささ・安定性の低さの 2 つの課題を解決する必要がある。BFC のアノード (負極) として利用されるグルコース酸化電極を例に挙げると、出力の向上に向けては、起電力向上のため反応電位を負側にシフトさせる、触媒能力の高い酵素を開発する、酵素-電極間の電子移動効率を向上させる、三次元的な電極構造の構築により大量の酵素を電極上に担持させ出力の向上を図る、といった研究がなされてきた。グルコースを酸化する酵素の活性部位は酵素内部に埋まっているため、酵素と電極間の電子移動をサポートするメディエータとして働く酸化還元物質を用いる MET 型 (Mediated Electron Transfer) 電子移動系がとられてきた。また、酵素の投影面積当たりの担持量を増やすため、発泡状炭素材料 [8]、ケッチェンブラック (KB) [9]等様々な炭素材料が利用されてきた。辻村らは MgO 鑄型多孔質炭素 (MgOC)

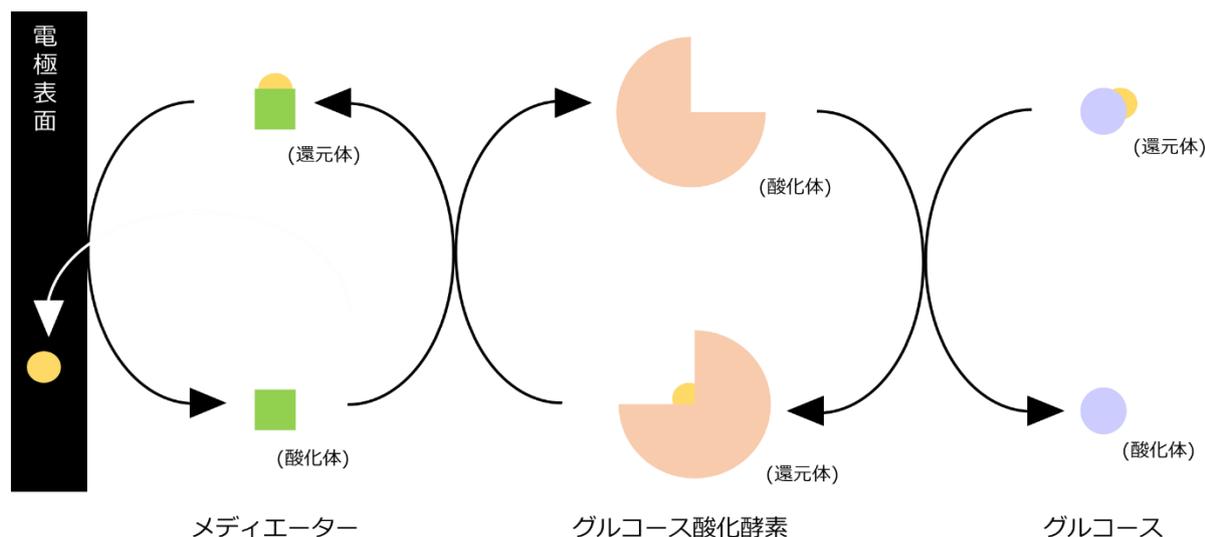


Figure 1-1 : Mediated electron transfer

を足場とした電極上に、触媒活性の高い FAD 依存性グルコースデヒドロゲナーゼ (FAD-GDH) を組み合わせた MET 型電極で  $100 \text{ mA cm}^{-2}$  の電流値を達成した [10]。

グルコース酸化アノードの安定性の低さは、酵素自身の低い安定性と、酵素やメディエータの電極からの離脱が原因であることが多い。そのために耐熱性のある酵素の開発や、酵素・メディエータの電極上への固定化による性能の改善が行われてきた。2019 年に新山らより報告された FAD-GDH とキノン系のメディエータを炭素電極上に物理吸着させた BFC は  $2 \text{ mW cm}^{-2}$  の高い出力密度を達成したが、経時的なメディエータの溶出による出力の低下が報告されている [5]。酵素およびメディエータを電極上に強固に固定化させる方法として、酵素とメディエータとして働く金属錯体が付加したポリマー (レドックスポリマー) を架橋剤により架橋し、ハイドロゲルとして電極上に固定する方法がある [11]。この手法は 1990 年代に A.Heller らにより体内埋め込み型グルコースセンサーへ応用するために開発され、現在では 2 週間の連続測定を可能にする埋め込み型血糖センサーとして市販されている [12]。ハイドロゲル修飾電極は、酵素層と外液の間を隔てる隔膜を有していないため、物質輸送の観点でも優れている。ハイドロゲル化法は酵素電極を構築する上で理想的な固定化法である一方で、測定溶液中の電解質など様々な因子の影響を受ける [11]。埋め込み型連測センサーとしての利用の際には、電解液は体液であるために、電解質、pH など外部環境によるハイドロゲル特性の変動は少ない。一方、BFC としての応用を考えた場合には、体液以外を電解液として使用する場合も想定され、その塩の種類や濃度の影響を大きく受ける可能性がある。また出力の向上に向け、密に電極上に酵素と高分子状メディエータを高密度に保持させる必要がある。このような非生理環境におけるハイドロゲル修飾電極の挙動に関する研究はこれまでほとんどなされてこなかった。また、溶液をハイドロゲルの性能を引き出すために最適化することで、電極活性を向上させることも可能になると期待される。

本論文ではハイドロゲル化グルコース酸化電極を研究テーマとして取り扱う。第 1 章では幅広く酵素電極として、BFC・バイオセンサーの活用例や、酵素電極を構築する要素について言及する。第 2 章以降は、安定性・出力やイオンの影響といった課題の観点から、グルコース酸化電極の合理的設計に関する研究成果を報告する。

## 1-2 バイオ燃料電池の活用例

BFCは入手容易で安全な化合物を燃料とし、酵素を電極触媒とすることから、生体触媒を使用しているという特徴から、常温常圧・中性pHという穏やかな環境で発電することができ、ウェアラブルデバイスや生体内埋込機器のIoT電源として期待される。ここでは、BFCの活用フィールドと、体表・体内・生体外の3つの視点で分類し、先行研究について紹介する。

Figure 1-2: Examples of using BFC



### 1-2-1 体表

体表で使う BFC は汗中の物質を測定するバイオセンサーと組み合わせた研究が報告されている。Garcia らは汗の中に含まれる乳酸を測定するセンサーとグルコースと酸素を燃料にする BFC を組み合わせることにより、自走型バイオセンサーを開発した [6]。人工の汗を使った試験にて乳酸の濃度に比例した電流を確認し、BFC としては 16mW を出力した。この BFC の出力は乳酸センサーを作動させるのに十分な出力であった。またコンタクトレンズと BFC を組み合わせた実験が東北大学の Kusama らによって行われた [13]。一般的にコンタクトレンズ装着時の目には本来あるはずの涙の上の油膜がなく、水分の流動性に優れたコンタクトレンズの表面から水分が蒸発し、乾燥を加速させ、その結果ドライアイの症状が誘発される。Kusama らはコンタクトレンズ内に「電気浸透流」を発生させることで、保湿の可能性があることを実証した。電気浸透流は通電に伴って生じる液体の流れを指し、マイクロ流路における送液などに利用されている。この自己保湿コンタクトレンズを自立型デバイスとして駆動させるため、コンタクトレンズの上下に炭素材料を修飾して電極化し、フルクトース脱水素酵素とビリルビンオキシダーゼを吸着させ BFC を構築した。自立デバイスとしてのスマートコンタクトレンズによってドライアイの緩和が期待されるだけでなく、目薬の徐放制御や眼球を満たす体液である房水の排出誘起による眼圧制御など様々な活用の可能性が考えられる。体表での使用の際には上記の2例のように電極は汗・涙などの体液に浸っている状態であることから、酵素・メディエータの電極への固定化が必須となる。

### 1-2-2 体内

洞不全症候群や完全房室ブロックなど、脈拍が遅くなる疾患の患者はペースメーカーを埋め込むことによって一定のリズムで電気刺激を送り、拍動を一定にしている。ペースメーカーの電池の寿命は5年から10年程であり、定期的な電池交換のため手術が必要となる。また本人の意思に反して手足の震えなどの症状が起こるパーキンソン病患者に対しては、原因となる脳に電気刺激を与える装置を埋め込むことでその症状を抑える脳深部刺激療法が行われている。脳卒中後疼痛や帯状疱疹後疼痛など鎮痛剤などで十分な鎮痛・除痛が得られない痛みを、脊髄に微弱な電気刺激を与えることにより軽減する脊髄刺激療法もあり、こちらも骨髄に電気刺激を与える埋め込み式刺激装置が使用されている。このように様々な医療分野で患者の QOL (Quality Of Life) を向上させるための埋め込み装置が開発されているが、機器を駆動させるための電力の供給という点では定期的な電池交換が必要なりチウムバッテリーを採用している機器がほとんどである。BFC はその穏やかな作動環境やグルコースや酸素といった生体内に含まれる物質を原料として発電できる特徴から、生体埋込機器用の次世代電源として期待がされている。本分野では、実際にカタツムリやネズミに BFC を埋め込み、体液に含まれる物質での発電を確認する実験が行われている。Halankova らのカタツムリを使った実験では、カタツムリの殻に電極を刺し、体液に含まれるグルコースと酸素を使って、数か月にわたって発電することを確認した [7]。Zebda らのネズミの腹腔に BFC を埋め込む実験においてもグルコースの酸化と酸素の還元により発電する電池を使い、 $38.7 \mu W$  を出力した。さらにこの電池を LED ライト・温度計に接続し、どちらも作動させることを確認した [14]。体内で利用するにあたっては血液などの流れのある体液にさらされているため、酵素・メディエータは電極表面に強固に固定されている必要がある。Heller は  $7 \mu m$  のカーボンファイバーを電極材料として用い、ハイドロゲル化法によって酵素・メディエータを固定することで微小 BFC を構築した。本電池は埋込センサーを動かすのに十分な  $4.3 \mu W$  の出力を達成した [15]。



Figure 1-2-2: Implanted biofuel cell operating in a living snail [7]

## 第1章 緒言

### 1-2-3 生体外

生体外での活用として、ソニーはブドウ糖溶液と空気中に含まれる酸素を自然拡散で取り込んで発電するパッシブ型の BCF を開発し、ウォークマンにつなぐことで音楽再生を実現した [16]。MacVittie らは木に実っているオレンジに電極を刺し、オレンジに含まれるグルコース・フルクトースで発電する BFC を作製した [17]。



Figure 1-2-3: MP3 powered by biofuel cell [16]

### 1-3 酵素センサーの活用例

酵素電極はその出力が検体の濃度に依存するために、酸化または還元電流からその濃度を計測することが可能である。電極触媒となる酵素は基質特異性が高い点もセンサーに適しており、また酵素を適切に選択することで様々な物質のセンサーとして用いることができる。ここでは、酵素電極のセンサーとしての応用例について、環境測定・生体測定・食品含有物の測定の3つの視点から紹介する。



#### 環境測定センサー

- BODセンサー：水の汚れを表す指標のBODをリアルタイムで検出
- ホルムアルデヒドセンサー：シックハウス症候群の原因物質の測定



#### 生体測定センサー

- 血糖センサー：糖尿病患者の血糖値の測定
- 乳酸センサー：スポーツ生態学にて、運動の負荷を乳酸量で数値化



#### 食品含有物センサー

- ビルピン酸センサー：酒造にて臭気の原因となるビルピン酸を検出

Figure 1-3: Examples of using enzyme sensor

#### 1-3-1 環境センサー

国立研究開発法人産業技術総合研究所（産総研）では、部屋にいるときにのどの痛みや頭痛を引き起こすシックハウス症候群の原因の一つとなるホルムアルデヒドを検出するセンサーに、ホルムアルデヒド脱水素酵素を電極触媒として組み合わせたバイオセンサーの研究をしている。産総研と従来からホルムアルデヒドなどの有害物質検出用センサーの開発を行ってきた船井電機研究所は、メソポーラスシリカ多孔体を用い酵素電極の課題となっていた安定性を改善し、小型で高性能なホルムアルデヒドのセンサーデバイスの実現に向けた共同研究を行ってきた [18]。

#### 1-3-2 生体センサー

酵素センサーの特徴として中性 pH・常温・常温で作動する特徴から、体表・生体内での使用に適していると考えられている。一方で糖尿病患者の血糖値を簡易的に図る血糖自己測定器としては 1970 年代の開発当初からグルコース脱水素酵素が利用されていた。血糖自己測定器は、指に針を刺し流血させ、その血を測定機に取り込むことで血糖値を測定するシステムとなっている。そのため、日常的な測定が負担に感じる患者も多い。この患者の負担を軽減させるため、汗に含まれるグルコースで血糖値を算出するウェアラブルセンサーの開発・研究が行われている [19]。また 2017 年にはアボット社より血糖値を最長 14 日間の連続測定が可能な血糖センサーが開発された。酵素固定化法にはハイドロゲル化法が採用されており、レドックスポリマーには Os 錯体が利用されている [20]。

また汗に含まれる乳酸量をモニタリングすることは、スポーツ生態学においても重要である [21]。生体内では糖と脂肪の分解によりエネルギーを得るが、乳酸はその糖の分解の過程で作られる。運動強度

## 第1章 緒言

が上がると糖の利用が高まり、中間体である乳酸が作られるようになる。血流が乳酸を排出する速度よりも、乳酸を生産する速度が上回った時の値を乳酸閾値と呼ぶ。乳酸閾値に達すると、脚が重くなったり、筋肉に痛みを感じたりする。ウェアラブルデバイスにより乳酸量を調べることは、運動の負荷や選手の限界値を知るといった観点で非常に有用である。乳酸オキシダーゼをフェロセンを用いたレドックスポリマーと共に電極上に固定化した自走式のバイオセンサーの研究が行われている [22]。

### 1-3-3 食品センサー

食品の製造過程でもバイオセンサーは活用の可能性がある。例えば、造酒工程において、ビルピン酸を測定するバイオセンサーは、その香りを調整するために重要である。ビルピン酸は木香様臭として清酒では異臭とされるアセトアルデヒドの生成原因物質である。香味調整、防腐もしくは増量の目的で日本酒のもろみにアルコールを添加するが、アルコール添加時に酵母に含まれる酵素の作用によりビルピン酸はアセトアルデヒドに変換される。そのため、アルコール添加時のビルピン酸濃度は少ないほうがよく、1.14mM とされている。一般的にビルピン酸の濃度を測るためには酵素法が使われており、その中でも分光光度法・試験紙法がある。両手法においても測定には 10 分の時間がかかり、また定量的に測定できる分光光度法では、高価な分光光度計・遠心分離機・恒温槽が必要であり、簡易的な手法となる試験紙法は定量性に欠けるといった課題があった。後藤らはビルピン酸オキシダーゼを使い、90 秒で定量的な測定ができるデスポーザブルバイオセンサーの開発に至った [23]。

### 1-4 酵素電極を構成する要素

酵素電極は電極・酵素・メディエーター・燃料から成り、作動においては燃料や電解質を運ぶ電解液が必要である。ここでは酵素電極を構築する要素について紹介する。

#### 1-4-1 電極

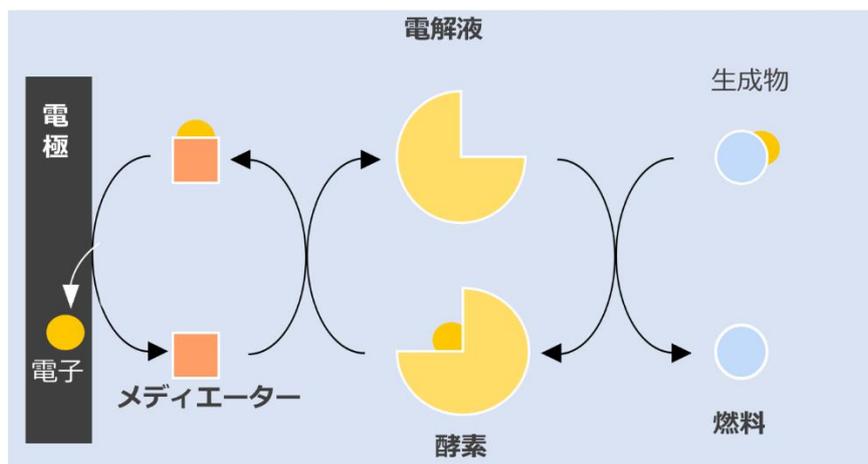


Figure 1-4: Construction of enzyme electrode

BFC やバイオセンサーの研究においては、安価で導電性・化学的安定性に優れているという特徴から炭素材料が電極材料として使用されることが多い。BFC としての出力の向上やセンサーとしての感度を向上させるためには、より多くの酵素を電極上に薄く修飾する必要がある。そのためナノスケールの細孔を有する炭素材料やカーボンナノチューブ、炭素粒子などを三次元的に炭素電極上に固定化し、投影

## 第1章 緒言

面積当たりの酵素修飾量を増やす試みが行われている。本分野で利用される電極材料について、下記で紹介する。

### 1-4-1-1 板・繊維状素材：カーボンクロス

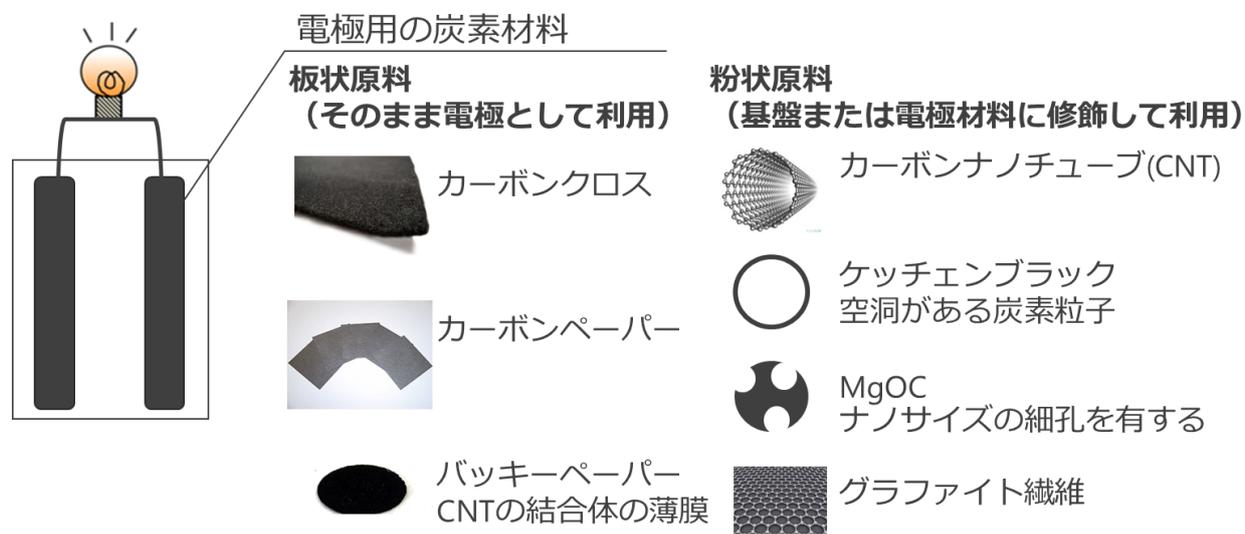


Figure 1-4-1: Carbon material for electrode

カーボンクロスは、特殊な有機繊維を熱処理し炭化した炭素繊維の紡績糸からなる黒鉛化織物である。カーボンが持つ特性を持ちつつ、繊維であるため柔軟性があり、その繊維状の構造からガス拡散性が高い点も特徴である。肌の表面などに貼るウェアラブルデバイスとしての応用を想定した際には、カーボンクロスのような曲げられる、フレキシブルな素材が適している。新山らはカーボンクロスを電極材料として用い、高いパフォーマンスを発揮する BFC を作成した [5]。さらにカーボンクロスの表面に炭素材料を修飾することで3次元的な表面積を増大させ、酵素の修飾量を増やすことができる。新山らは細孔サイズを調整できる MgO 铸型炭素をカーボンクロスに塗布し BFC を構築した。カソードの作製においては、空気中から酸素を供給できるガス拡散型電極を想定し、片面に撥水性を持たせるために PTFE (ポリテトラフルオロエチレン) を塗布した。本実験ではカソード側で最大出力  $15 \text{ mA cm}^{-2}$ 、アノード側で  $150 \text{ mA cm}^{-2}$ 、電池としては  $2 \text{ mW cm}^{-2}$  の出力を達成した。また Handa らはアノードに4種類の酵素を利用した BCF を構築する際に、炭素繊維を高密度にからみ合わせて製造するカーボンフェルトを電極材料として使用した [24]。カーボンフェルトもカーボンクロスと同様に、ガス拡散電極として使用できる点、高表面積、高い電気伝導性、耐食性、機械的強度などが特徴とされ、電極材料として採用された。BFC として、 $2.90 \text{ mA cm}^{-2}$  の出力を達成した。

### 1-4-1-2 板・繊維状素材：カーボンペーパー

カーボンペーパーは炭素でできたマイクロファイバーを平らなシートにしたものであり、燃料電池分野ではリン酸型燃料電池や固体高分子型燃料電池の電極基材として、すでに実用化されている素材である。本原料もカーボンクロスと同様の特徴（高気体透過性、高表面積、高電気伝導性、耐食性）が挙げられる。Ivnitski らは多孔質な三次元構造を有するカーボンペーパーを足場とし、その上で多層カーボンナノチューブを生長させることに成功した [25]。一方で、カーボンペーパーは素材としては厚紙のよ

## 第1章 緒言

うなものが多く、曲げると折れてしまうため、ウェアラブルデバイスとしては不向きである。

### 1-4-1-3 板・繊維状素材：バッキーペーパー

、バッキーペーパーとはカーボンナノチューブ(CNT)を集めてフィルム状にしたものを指す。CNT から構成されるため、高機械強度・軽量・高電流密度耐性・高熱伝導特性などの性質を有し、航空宇宙産業やエレクトロニクスなどへの応用が期待されている。BFC 分野では、Guven らにより血清に含まれるグルコースと酸素で発電する BCF の電極材料として利用された [26]。DET 型の電子移動を実現するため、電極材料として多層 CNT から成るバッキーペーパーを使用し、生理学的なグルコース濃度よりも低い濃度環境においてメディエータが無くとも  $16.12\mu\text{W cm}^{-2}$  の出力を確認した。

### 1-4-1-4 粉状素材：カーボンナノチューブ(CNT)

Lyらは、乳酸菌や納豆菌と並ぶ食用の発酵菌である酢酸菌を用いセルロースを生成させ、多層 CNT を組み合わせることで環境に優しく低コストな電極の作製に取り組んだ [27]。培養液中に CNT と酢酸菌を分散させ6日間混ぜ続けることにより、酢酸菌により生成されたセルロースと CNT を絡ませた。その後、その混合物から酢酸菌と培地成分を取り除き電極とした。電極構造を SEM にて確認したところ、超微細ネットワーク構造の構築・高比表面積であることが確認され、酸素の透過にも適した構造であることが分かった。また SEM よりも低解像度の TEM を使用し、本電極の微細構造はランダムな三次元ネット構造になっていることを確認した。合成された電極に架橋剤と酵素を注入し、BFC を作製した。pH5.5、グルコース 50 mM で  $55^{\circ}\text{C}$  の条件下で、最大出力  $32.98\mu\text{W cm}^{-2}$  を達成した。

### 1-4-1-5 粉末素材：ケッチェンブラック (KB)

KB は導電性カーボンブラックであり、中空シェル上の構造を有している。田中らは、カーボンペーパーに KB をペースト状にしたインクを塗布し、焼却したものを BFC のカソード電極として用いた [28]。KB は従来のカーボンブラックに比べて少量で同等の性能を発揮できる。また、粒子同士が複雑に繋がった構造となっており、KB 修飾部分は多孔質体のような微細構造をとるため、溶液との実質的接触面積が増大し電極反応の活発化が期待される。電極の比表面積と比例関係にある電気二重層を確認したところ、KB を修飾することで、比表面積が6倍になったことが分かった。

### 1-4-1-6 粉末素材：MgO 鑄型炭素 (MgOC)

MgOC は、鑄型となる酸化物にカーボンをコーティングし、このコンポジット材の酸洗浄により鑄型を溶出させることで調製される細孔構造を有する炭素材料である。鑄型の大きさの調整が可能のため、細孔を制御できる点が特徴である [29]。村田らは細孔構造の効果を調べるため、細孔を持たないカーボンパーティクルとランダムな細孔を有する KB、そして平均直径 38 nm の細孔を有する MgO を鑄型とした多孔質炭素材料(MgOC)をインク状にして電極表面に修飾することにより、各炭素材料を足場として用いた場合のハイドロゲル電極の性能を比較した [30]。3種類の炭素材料を比較したところ、MgOC を用いた場合に最も高い触媒電流密度  $13\text{ mA cm}^{-2}$  が観察された。これは KB, カーボンパーティクル修飾電極の表面上のマクロ孔が MgOC 修飾電極 (MgOC-E) よりも少なく、少量の酵素・メディエータですべての細孔が満たされてしまったからである。さらに酵素の保持と共にスムーズな物質輸送を行う

## 第1章 緒言

ためには、酵素サイズに適したメソ孔と物質輸送に適したマクロ孔の両方を有する階層構造が適している。マクロ孔を構築するため泳動電着法によって作製した MgOC 修飾電極上に GO<sub>x</sub> ハイドロゲルを修飾したところ、平板のグラッシーカーボン電極(GC-E)の約 13 倍もの触媒電流密度を達成した [31]。また FAD-GDH 修飾ハイドロゲル電極の安定性を比較した際には MgO-E では初期電流値の 80 %を 7 日間観察し続けたのに対して、GC-E ではたった 2 日間目以降で 80 %以下になってしまった [10]。このことから酵素サイズに適した細孔が、酵素の固定化に十分寄与していることが分かった。本研究では酵素保持力や酵素との接触面積の増大を期待して酵素サイズに近い 38 nm の細孔を有する MgOC を採用している。また細孔は酵素自身の活性保持の役割も果たすことが船橋らによって報告されている [32]。酵素の失活の原因の一つとして、酵素の構造的な変性がある。MgOC の細孔のサイズをより酵素に近づけた直径 20 nm の細孔を有する MgOC を足場として利用した場合、酵素が十分失活する環境においても触媒電流値を保持することができた。

### 1-4-1-7 グラフェンナノシート

ナノシートは厚さが 1~100 nm 程度の 2 次元ナノ構造体を指す・ナノシートの典型例としては、もっとも薄い (0.34 nm) 2 次元物質であるグラフェンが挙げられる。これは炭素原子が六角形格子状に配列して単層のシートを形成したものである。Koushanpour らは電極比表面積の増大と電気化学反応の促進のため、電極として使用するカーボンペーパー上にグラフェンナノシートを修飾した [33]。フェロセン溶液中で本電極を使用し酸化還元ピークを観察したところ、グラフェンナノシートを修飾した電極においては、ピーク電流値がカーボンペーパーのみの電極の 20 倍となった。これは電極の表面積の増大に起因する差と考えられる。またカーボンペーパーのみの電極については、サンプルごとで得られたフェロセンの酸化と還元のパーク電位差より算出される電気化学速度の特性にばらつきがあった。その一方、グラフェンナノシートを修飾した電極においては、どのサンプルにおいてもその特性が大きく改善していた。

### 1-4-2 電極触媒

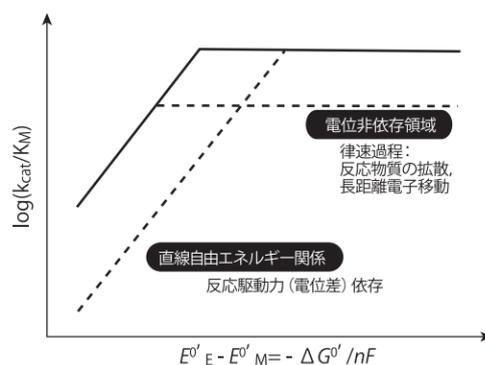
電極触媒には、単離酵素が使用される。酵素の特徴として特定の物質の酸化還元に寄与するため、特にバイオセンサーとしての使用に適している。電極構造の簡易化の観点から、酵素は直接的に電極へ電子伝達できる Direct Electron Transfer (DET) 型であることが望ましいが、現実的には DET 型の酵素は少なく、直接的に電子伝達を行えたとしても電気的な出力が非常に小さい。このような課題を克服すべく、電極と酵素間の電子移動をサポートする酸化還元物質をメディエータとして使用する研究が多くなされている。酵素→メディエータ→電極の順で電子伝達を行う仕組みを Mediated Electron Transfer (MET) 型と呼ぶ。本分野で多く研究されるグルコース酸化電極を例にとると、触媒はグルコース酸化酵素や微生物などの生体触媒と、貴金属などの非生体触媒に分けられる。非生体触媒としては、白金系の合金 [34]、金属アド原子 [35]などが検討されているが、基質特異性が低いためセンサーとしては高い精度を達成することが難しく、また穏やかな環境では反応性に乏しい。実用化を考えた場合は、原料が高価なためコスト面に問題が生じる [36]。非生体触媒と比較して、酵素は基質特異性が高いため、血糖センサーの電極触媒として用いた際に高い精度を実現することができる。また BFC の電極触媒として

## 第1章 緒言

用いた場合には、酵素の基質特異性により陽極相・陰極層の分離が必要ないため、シンプルな電池の構造設計が可能である。そしてもう一つの酵素の特徴は常温・中性 pH といった穏やかな環境で活性を示す点である。酵素型グルコース酸化電極を利用した BFC は、どのような環境でも安心して利用できる未来のユビキタス電池としても期待できる。

### 1-4-3 メディエータ

電極触媒として使用される酵素は、電極へ電子伝達を行う酸化還元反応部位が酵素の内部に埋まっているため、電極と直接的に電子の受け渡しがし難く、電極と酵素の間の電子移動を仲介するメディエータを必要とする場合が多い。メディエータを選択する際には、①メディエータの酸化還元電位、②酵素との反応性、を考慮する必要がある。血糖センサーとしての応用を考えた場合には血中に含まれるアスコルビン酸(ビタミン C、標準還元電位  $E^{\circ} = +0.39\text{ V}$ )等の酸化還元物質の検出を防ぐため、グルコース酸化電極の酸化還元電位は+0.3 V 以下であることが望ましい。しかしながら酸化還元電位が負側に寄り過ぎると血液等に含まれる酸素の還元反応が起こるため、血糖センサーとしての応用を考えた場合には、グルコース酸化電極の触媒定常電流に達する電位は+0.3 V 以下+0.07 V 以上であることが望ましい。同様に BFC としての応用を考えた際には、BFC の出力は負極と正極の反応電位の差(起電力)に比例する。この差をより広くするためには負極であるグルコース電極の反応電位は負であるほど、正極である酸素還元電極の反応電位は正であるほど良い。MET 型グルコース酸化電極の場合、酵素とメディエータの酸化還元電位の差は反応の駆動力になるため、酵素の酸化還元電位とメディエータの酸化還元電位が離れているほど高い触媒電流値を達成することができる。これは酵素・メディエータの二分子速度定数と酵素・メディエータ間の電位差の関係性を示す「直線自由エネルギー関係」にて示されている。電位差と酵素・メディエータ間の二分子反応速度定数は比例関係にあることが説明されている [37]。BFC としての応用を考えた場合には各電極における触媒電流値と、負極と正極間の電位差の二つを考慮したうえで適切な酸化還元電位を有するメディエータを選択・設計する必要がある。



**Figure 1-4-3:** Typical pattern of bimolecular rate constant ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ) between enzyme and mediator as a function of the formal potential difference ( $\Delta E^{\circ}$ ) between the two [37].

### 1-4-3-1 レドックスポリマー

レドックスポリマーとはメディエータとして働く金属錯体等の酸化還元物質が主鎖となるポリマーからペンダント上に付加したものである。ポリマー主鎖にぶら下がった酸化還元物質同士が衝突しあうことによって、電子を運ぶことができるため、酵素の配向性を無視したスムーズな電子移動を実現できる。レドックスポリマーの性能を決定する因子として①採用する酸化還元物質、②酸化還元物質とポリマーを繋ぐスペーサーの長さ、③レドックスポリマーの電荷が挙げられる。またレドックスポリマーは酵素と共に架橋剤によって電極表面に薄膜化して固定することができ、この方法はハイドロゲル化法と呼ばれている。以降にレドックスポリマーを構成する要素について説明する。



Figure 1-4-3-1: Redox polymer

#### 1-4-3-1-1 酸化還元物質

レドックスポリマーは付加する酸化還元物質を選択することで、酸化還元電位を変更することが可能である。また酸化還元物質として錯体を選択した際には、錯体の配位子を変更することで酸化還元電位を変化させることも可能である [38]。Osなどの金属錯体が利用されるケースが多いが、低コスト化・環境負荷の軽減を見据えてキノンなどの有機化合物を酸化還元物質として利用する研究も行われている [38]。

#### 1-4-3-1-2 スペーサー

スペーサーは長いほど金属錯体の可動域が広がり、ハイドロゲル膜内の電子拡散性が向上する。実用化に向けメディエータの酸化還元電位を下げると、結果的にメディエータと酵素の酸化還元電位の差が縮まり触媒電流値が小さくなる。電位差が小さい状態でも大きな触媒電流を出力するためには、酸化還元部位の可動性を上げ、膜内電子拡散性を向上させる必要がある。可動性を向上させるため、Hellerらはスペーサーを長くしたレドックスポリマーを開発した [39]。このレドックスポリマーには13炭素原子分のスペーサーを導入することにより、見かけの拡散係数を3桁程度上げることに成功した。このレドックスポリマーの膜中の電子拡散係数は架橋剤の量に依存しており、多重な架橋が施されるほど酸化還元部位の可動性が下がり拡散係数は小さくなる。Hellerらの研究においては架橋剤量を10%から25%まで増やすと拡散係数は最大値の1/20になった。その一方でスペーサーが短いレドックスポリマーの拡散係数は架橋剤割合が25%の時点で最大拡散係数値の2/3にとどまった。本研究の第4章において

## 第1章 緒言

も長いスペーサーを有するレドックスポリマーを使用した MgOC-E の電極応答について評価した。

### 1-4-3-1-3 レドックスポリマーの電荷

レドックスポリマーに正電荷を持たせ負電荷の酵素との静電引力を大きくすることで、さらなる触媒電流値の増加が期待できる。レドックスポリマーの一部に正電荷の官能基を導入することで高触媒電流密度化を試みる研究が行われている [40]。本研究でもレドックスポリマー[Os(bipyridine)<sub>2</sub>Cl] が付加した Polyvinylimidazole ( $E^{\circ} = +0.23 \text{ V vs Ag/AgCl}$ ) (Polymer I,  $6 \text{ mg ml}^{-1}$ ) についてはクオーターナイズ処理を行うことでレドックスポリマーの負電荷を強めている。

### 1-4-3-2 キノン類

サステナブル・低価格という点から、有機化合物のメディエータの活用も検討されており、キノン類はその中の一つとして期待されている。キノンとはベンゼン環から誘導され、2つのケトン構造を持つ環状有機化合物を指す。ビタミン K がキノン類であるように、キノンは生物学的にも重要な物質であり、工業的には色素としても使用され、比較的身近な物質であることが分かる。鶴岡らの実験では、FAD-GDH を触媒としたグルコース酸化電極のメディエータとしてキノン類を評価した [41]。FAD-GDH または GOx の電子移動速度数はメディエータの酸化還元電位に依存し、電位が高いほど電子移動速度係数が大きいことが分かった。数あるキノン類の中でも、特にオルトキノン類がパラキノン類よりも高い二分子反応速度係数を示した。これは、オルトキノンにおいて、立体障害が少なかったことが理由であると結論付けられている。

### 1-4-3-3 フェノチアジン類

フェノチアジンはチアジンの両端にベンゼン環が2つ縮環してできた複素環式化合物である。フェノチアジンの誘導体としてメチレンブルーやメチレングリーン、プロマジジン等があるが、これらは染料や抗精神病薬として利用されている。キノン類と同様にフェノチアジン誘導体も有機化合物メディエータとして期待されている。フェノチアジン類は電気化学的に重合させることができ、かつその重合体は NADH の酸化を触媒することが知られている。鶴岡らは、チオニン、メチレングリーン、メチレンブルーそしてトルイジンブルーを電極表面で電気化学的に重合し、FAD-GDH と組み合わせることでメディエータとしての挙動を調査した [42]。4種類のフェノチアジン誘導体の中でメチレングリーン重合体がメディエータとして効果的に作用することを確認した。

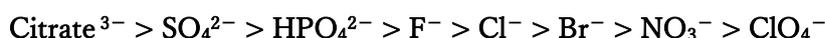
### 1-4-3-4 フェロセン

フェロセンは  $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$  で表される鉄のシクロペンタジエニル錯体である。フェロセンは燃料への添加剤として使用されており、またある種のフェロセニウム塩は抗がん剤としての利用も検討されている。フェロセンは極めて安定な酸化還元特性を示すため、メディエータとしても利用しやすい一方で、人体への刺激性は強く、生体埋込センサー・電池への応用には課題が残る。Lin らは BFC を構築する際にフェロセンを生体適合性の高いポリマーに修飾し、そのポリマーを電極上に固定化することで、フェロセン-電極間の電子移動の向上を図った [43]。

## 第1章 緒言

### 1-4-4 電解液

一般的な電池と同様に、BFC やバイオセンサーではイオンを伝導させる媒体として塩などのイオン性物質を溶解させた水溶液を電解液として使用する。バイオセンサーや埋込電池などを想定した際には、血液や汗に含まれる NaCl がその役割を担う。電極触媒である酵素はその特徴が溶存イオンによって大きく影響を受けることが確認されている。溶存イオンのタンパク質に対する影響は、ドイツの化学者フランツ・ホフマイスターによって研究され、タンパク質の溶解度に及ぼす塩効果の序列はホフマイスター系列として知られている [44] [45]。ホフマイスター系列はタンパク質の溶解度・塩析だけではなく、酵素活性といった生体機能や界面活性剤の相変化のような単純な物性に至るまで多くの溶質の物性に共通していることが分かっている。アニオンはカチオンよりも大きな影響力を有しており、一般的には以下の順列で示される。



同様の順列がカチオンに関しても報告されている。



ホフマイスター系列のうち、左側に位置するイオンはコスモトロピックイオンと呼び、水との親和性の高くタンパク質の塩析効果を有する。右側には水との親和性の低いイオンであるカオトロピックイオンが配置されており、これはタンパク質の塩溶効果を有する。コスモトロピック・カオトロピックの分類は、Jones-Dole viscosity B coefficients が正のイオンをコスモトロピックイオン、負のイオンをカオトロピックイオンとされる。イオンと水の親和性のパラメータの一つに水和エンタルピーがあるが、ホフマイスター系列はこの水和エンタルピーの大きさとも一致している。酵素電極に対しても、電解質として使用する塩の種類により、酵素の安定性・電気化学的な出力に大きな影響を及ぼすことが確認されており [46] [47]、酵素種に合わせた適切な電解質の選択が、電極としての高機能化につながる。

### 1-4-5 酵素

酵素は生体内外で起こる化学反応を促進させる有機触媒であり、生体細胞内で作られる。ビール醸造工程において、麦芽を温水抽出する際に得られる粉がでんぷん消化能力を有することが発見されたことが最初といわれている [48]。酵素には多くの種類があるが、タンパク質のみで酵素作用を持つタンパク質酵素と、タンパク質以外の因子との共存によって作用を発揮する複合タンパク質酵素に分類できる。前者には加水分解酵素が多く、後者には酸化還元反応に関連するものが多い。複合タンパク質は、本体となるタンパク質に強く結合する補欠因子族や、タンパク質との結合が緩く離れやすい補酵素を有する。酵素は有機触媒であるが、ほかの触媒と異なり基質特異性があるため、特定の反応のみを触媒するという特徴がある。

存在する酵素はすべてタンパク質から構成されており、そのタンパク質はアミノ酸の重縮合体である。一つの酵素はいくつものアミノ酸の結合により成り立つが、そのアミノ酸の結合順序は酵素ごとに異なる。アミノ酸の結合順序という視点で見た時の構造は一次構造と呼ばれている。しかしながら、本来の酵素は一次元的な構造ではなく、立体的に折りたたまれているのが一般的である。この酵素の立体構造の考え方として有名なのが $\alpha$ ヘリックス構造である。酵素を構成するペプチド鎖のアミノ酸の C=O 基の O と、その 4 残基先のアミノ酸の N-H 基の H が順次水素結合するとらせん構造をとるというものである。一般のタンパク質では全アミノ酸の約 1/4 が $\alpha$ ヘリックス構造になっている。一方で、多くのタ

## 第1章 緒言

タンパク質は実際には球状であり、 $\alpha$ ヘリックス構造から想像できるような棒状ではない。球状タンパク質は比較的短いペプチドからなる $\alpha$ ヘリックスが縦横前後に入り込み、無秩序にたたまれた二次構造、さらにこの二次構造を組み合わせた三次元構造となる。この構造は酵素の活性の維持に重要であり、活性に関わる構造を変性させることは酵素の失活を引き起こす。以降に、酵素電極に使用される酵素・補酵素を紹介する。

### 1-4-5-1 グルコース酸化酵素：GO<sub>x</sub> (Glucose oxidase)

グルコース酸化酵素の代表的な酵素としてグルコースオキシダーゼ(GO<sub>x</sub>, EC1.1.3.4)がある。分子量は18万前後で、主にカビの液体培養によって取り出される。酸化還元電位は-0.43 V vs Ag|AgClである。二量体を形成しており、補酵素にFADを有する。等電点はpH 4.2であり、酵素蛋白質として安定な蛋白質のひとつである。GO<sub>x</sub>は電子受容体として酸素に電子を渡すことが分かっており、この点がバイオセンサーとしての短所となる。GO<sub>x</sub>を血糖センサーの電極触媒として用いる場合にはこの特性のため血液中の溶存酸素と反応してしまい、センサーとしての正確さに欠ける。また電子を受け取り還元された酸素が過酸化水素になることで酵素の失活・変性を引き起こしてしまう。

### 1-4-5-2 グルコース脱水素酵素：PQQ-GDH(pyrrroloquinoline quinone dependent glucose dehydrogenase)

ピロロキノリンキノン(PQQ)を補酵素としたグルコース脱水素酵素であり、GO<sub>x</sub>の代替として開発された。1990年頃に、GO<sub>x</sub>を用いた自己血糖測定センサーが売り出されるようになったが、GO<sub>x</sub>の溶存酸素依存性が問題視され、溶存酸素とは電子授受を行わないグルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)が注目されるようになった。グルコース測定原理はGO<sub>x</sub>を用いた場合と同様で、酵素をGDHに置き換えることによってセンサーを構築できる。PQQ-GDHが当初はGO<sub>x</sub>の代替として使用されたが、PQQ-GDHはマルトースと反応することが判明し、新たな課題となった。マルトースはグルコース2分子分が結合した糖であり、浸透圧調整のために輸血の成分として含有されている。そのため、輸血を使用する患者の血糖値を測った場合に、本来よりも高い数値になってしまうというリスクがあった。現在はタンパク工学的に改良され、マルトースと反応しないPQQ-GDHが血糖センサーに使用されている。

BFCの分野では、酵素の安定性の低さから医療的な埋込電池よりも、使用期間の短い環境測定用センサーの電力源としての応用のほうが現実的だと考える研究者もいる。MacVittieらは木に実っているオレンジに直接BFCの電極を刺すことによって、オレンジに含まれるグルコース・フルクトースを燃料とした発電を行った。キャパシターと通信機器を接続することによって、ワイヤレス送信の可能性について検討した[49]。アノードにはPQQ-GDHとFAD依存性フルクトースデヒドロゲナーゼ(FAD-FDH)を使いグルコースとフルクトースの酸化反応を、カソードではラッカーゼを使い酸素の還元反応を行った。この3つの酵素はメディエータを必要とせず、補酵素としてのNAD<sup>+</sup>も不要なDET型の電子移動を行える。埋込電池としてナノ構造の電極を構築するにあたり、DET型のようにシンプルな仕組みであることは非常に重要である。実験では、オレンジに埋め込んだ電池を電源とし、予め組んでおいたプログラムからPCへワイヤレスのメッセージの発信に成功した。一方で耐久性としては6時間が限界であり、環境バイオセンシングとして利用するのであれば、数年は連続測定できるほどの寿命が必要のため、引き続き電池としての長寿命化が課題となる。

### 1-4-5-3 グルコース脱水素酵素：FAD-GDH (Flavin Adenine Dinucleotide dependent Glucose Dehydrogenase)

GO<sub>x</sub> や PQQ-GDH の抱えるグルコース以外の物質との反応性の問題を解決するため、グルコース特異性が高い酵素を求めて池田糖化工業株式会社らは研究を開始し、バイオセンサーを構築した [50]。血糖センシングには、血中含有物質の中からグルコースのみを選択・認識する必要がある。各種微生物を対象として酵素スクリーニングを行った結果、*Aspergillus* 属の糸状菌の一種が基質特異性が高くグルコースを酸化する酵素を菌体外に産生することを発見した。本酵素は FAD (フラビンアデニンジヌクレオチド) を補酵素として含むことが判った。FAD は還元されることにより 2 原子の水素を受容し FADH<sub>2</sub> となる。特筆すべきことに、本酵素はフラビン酵素であるにも拘わらず、O<sub>2</sub> を電子受容体としないことが明らかとなっている。GO<sub>x</sub> や PQQ-GDH の最大の課題とされた血中 O<sub>2</sub> やマルトースの影響も受けない高い基質特異性を併せ持つ酵素であることが明らかとなった。近年の研究において FAD-GDH は、非常に高い触媒電流値を達成した [10]。また FAD-GDH の持つ糖鎖を除去することによってさらなる基質結合部位へのアクセス性が上がり、25°C の溶液中で平板電極上においては本来の酵素を用いた場合の 1.6 倍の触媒電流値を出力することに成功している。

### 1-4-5-4 酸素還元酵素：BOD(Bilirubin oxidase)

酸素の還元反応を触媒する酸化還元酵素であり、複数の銅イオンを活性中心に持つ酵素であるマルチ銅オキシダーゼに属する。この酵素の基質はビリルビンと酸素、生成物はビリベルジンと水である。本酵素は従来から、臨床検査の場面における肝機能の検査試験（血中のビリルビンの測定試薬）として広く使用されてきた。ビリルビンは赤血球に含まれる黄色色素であり、肝臓や胆のう等で処理される。肝機能等に障害がある場合には、血中ビリルビンの量が増加することから、肝機能測定試薬として利用されている。BFC の分野では、酸素の還元反応を行うカソード側の電極触媒として用いられている。Kamitaka らは負極にフルクトースデヒドロゲナーゼを、正極に BOD を組み合わせた DET 型の電子移動を行うセパレーター不要の BFC を開発した [9]。電極材料にはカーボンペーパーを使用し、その上に KB を修飾した。電流値としては、4 mA cm<sup>2</sup> を達成し、出力としては 850 mW cm<sup>2</sup> が最大となった。

### 1-4-5-4 補酵素：FAD(flavin adenine dinucleotide)

FAD は様々な酵素の補酵素として働く [51]。FAD の場合には、酵素タンパク質と強固に結合している。イソアロキサチン環が水素原子の授受に寄与する。

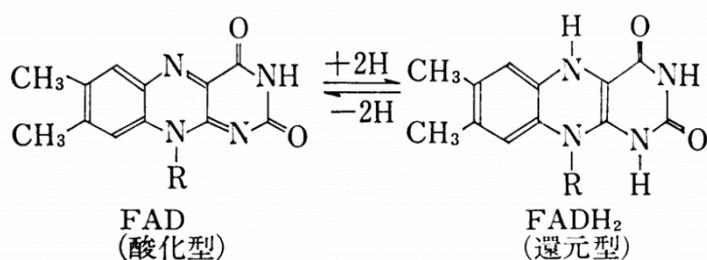


Figure 1-6-1: Oxidized type and Reduced type of FAD

1-4-5-5 補酵素：PQQ(pyrroloquinoline quinone)

細菌のグルコース脱水素酵素に含まれるニコチンアミドとフラビンに次ぐ3番目の酸化還元補酵素として見出された補酵素である [52]。PQQ は生体内において主にアルコール、グルコース、アルデヒドおよびアミンなどの酸化を司っていることがわかっている。

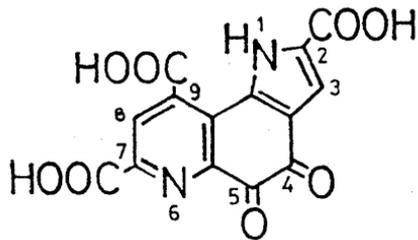


Figure 1-6-2: PQQ [52]

## 第2章

MgOC を電極足場とし、

グルコース酸化酵素 (GO<sub>x</sub>) を使用した

レドックスハイドロゲル型グルコース酸化電極の特性評価

および電解質溶液の電流生成への影響の解明

## 2-1 緒言

グルコースの酸化反応を触媒する GOx は、安定性が非常に高く BFC・バイオセンサーの電極触媒として最も広く使用される酵素である。体内での連続的なグルコースの検出や BFC のアノードとしての応用に向け、GOx を用いたレドックスハイドロゲル技術が今まで研究されてきた [53]。更なる高電流密度化を目指し、電極表面に炭素材料を修飾することで薄いハイドロゲル膜を形成し電子移動距離を短くすることで、発電効率を上げる方法がある。数 nm の細孔を有する KB が電極の足場として用いられたが、その効率は平板電極の高々3倍である [54]。一方、KB と異なり均一なメソ孔を有する MgOC は電極足場として注目を集めている。本研究においては酵素との接触面積を増大させる目的で酵素サイズに近い 38nm の細孔を有する MgOC を利用した。MgOC は泳動電着法により、GC-E 上に修飾した。泳動電着法は炭素材料が電気泳動によって電極表面に滞積する現象を用いた固定化法であり、物質輸送に適した数十  $\mu\text{m}$  サイズのマクロ孔が形成される。FAD-GDH を電極触媒として用いたハイドロゲルを修飾した際には、37°Cにおいて  $200\text{ mA cm}^{-2}$  を超える触媒電流値を達成した [10]。しかしながら FAD-GDH は熱耐性が低く、37°Cの環境では長期的な連続測定は不可能である。本研究ではこのマクロ-メソ階層構造を安定性の高い GOx と組み合わせることで、高出力密度と長期的な安定性を有するハイドロゲルグルコース酸化電極の開発を目的とした。

またこのハイドロゲル修飾電極は、イオンの影響を受けやすいということが報告されている。ハイドロゲルは架橋構造を取っているため、NaCl が添加されたイオン強度が高い条件でもその触媒機能を失うことはない [53]が、触媒電流値は減少する [11] [55] [56]。これは①酵素とメディエータの静電的な相互作用が打ち消され、酵素・メディエータの静電的アダクトの密着度が下がってしまうこと、②レドックスポリマー自身のもつプラス電荷の斥力が無効化され相分離してしまうということ、が原因であると報告されている。一方で、過塩素酸ナトリウム塩を添加した場合にはハイドロゲルは脱水状態になり、同濃度の NaCl 存在下よりも触媒電流値は減少する [57]。このことからイオン強度だけでは説明することができないイオン毎の性質を考慮した解釈が求められるが、それぞれのイオンの影響に関する研究は行われていない。そこで本研究では、ハイドロゲル電極の電流値に影響を与える電解質イオンの特性やその強さを、ホフマイスター系列にしたがって特性評価し、電極表面で高濃度に修飾されたハイドロゲルの新たな特性を知ることを目的とした。ホフマイスター系列とはアニオン、カチオンが持つタンパク質の構造や凝集特性に及ぼす影響力順にイオンを並べたものであり [58]、タンパク質の溶解性や

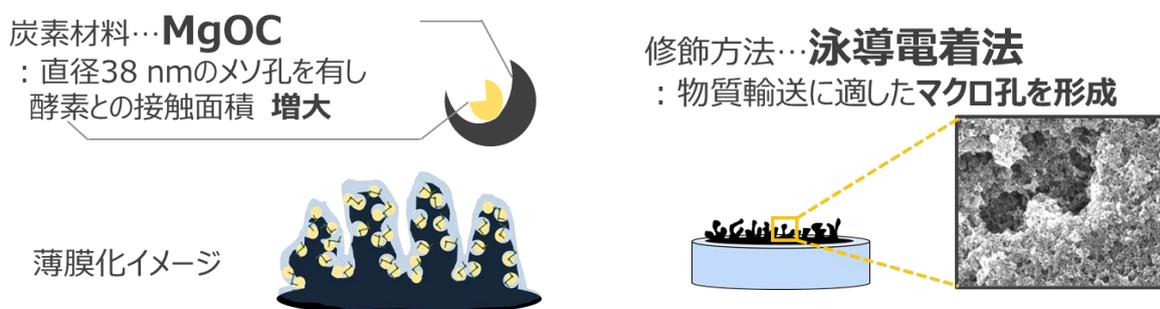


Figure 2-1: Design of MgOC-E

沈殿誘起など、高分子の関わる化学的・生物学的な幅広い現象において見受けられる [59] [60] [45] [44]。ごく最近 Carucci らによって、MET 型のグルコース酸化電極の触媒電流値がホフマイスター系列に順ずる形で電解質の種類により変化することが報告された [61]。本論文では、GOx からなるハイドロゲル電極について、様々な塩を支持電解質として用いた際の電極応答についても報告する。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 多孔質電極の作製

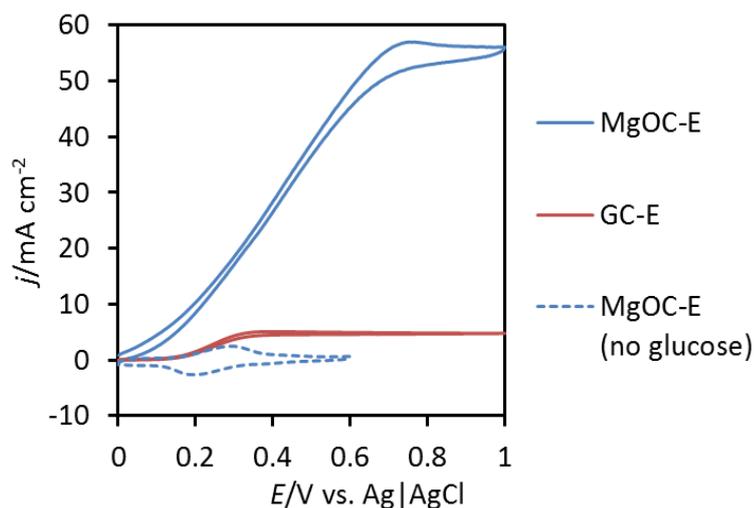
poly(vinylidene difluoride) (PVdF, #9305, 株式会社クレハ) 90 mg をアセトニトリル 15 ml の中で 15 分間ホモジナイザーを用いて分散させた。その後、平均直径 38 nm の細孔を有する MgOC (CNobel®, 東洋炭素株式会社) 15 mg を PVdF 分散液の中に加え、さらに 10 分間分散させた。グラッシーカーボン電極(GC-E, 6.0×3.0mm, ビー・エー・エス株式会社) を基盤として用い、カーボンプレートをカウンター電極として用いた。直流電圧気によって両電極間に 50 V の電圧を 60 秒間印加し、MgOC 粒子を GC 電極上に修飾した。MgOC 修飾電極 (MgOC-E) は常温で乾燥させ、アセトニトリルを気化させた。ハイドロゲル修飾前に 10 分間のプラズマ酸化処理によって親水化した。

### 2-2-2 ハイドロゲル修飾

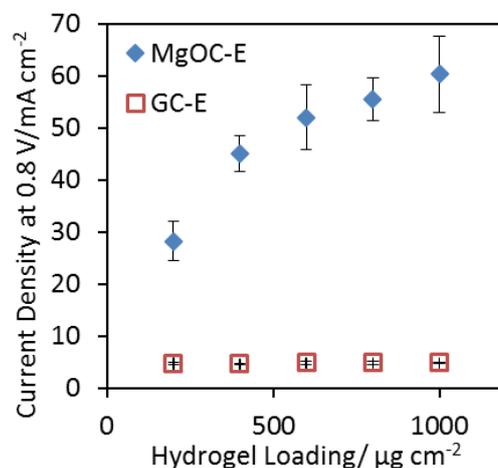
酵素・レドックスポリマー・架橋剤の重量比が 45:45:10 になるように GOx (from *Aspergillus niger*, 和光純薬株式会社) 溶液 (40 mg ml<sup>-1</sup>)、レドックスポリマー [Os(bipyridine)<sub>2</sub>Cl] が付加した Polyvinylimidazole (E°' = +0.23 V vs Ag/AgCl) (Polymer I, 6 mg ml<sup>-1</sup>) を混合した。その後架橋剤として poly(ethylene glycol) diglycidyl ether (PEGDGE, molecular weight 500, 8 mg ml<sup>-1</sup>) を GOx・レドックスポリマー混合溶液に加えた。この触媒混合溶液を MgOC-E 上に滴下し、電極を 4°C 18 時間の条件で乾燥させ、ゲル化を行った。

## 2-3 多孔質電極と平板電極の触媒電流値の比較

MgOC-E と GC-E それぞれに対して、電極の投影単位面積( $\text{cm}^2$ )当たり酵素・レドックスポリマー・架橋剤の合計総重量(水を含まない)が  $800 \mu\text{g}$  になるように修飾した。Figure 2-3-a には、各電極のサイクリックボルタモグラム(CV)を比較した。ハイドロゲルの組成比は酵素：レドックスポリマー：架橋剤の重量比を 45:45:10 とした。MgOC-E のグルコース酸化触媒電流密度は  $56 \pm 4.1 \text{ mA cm}^{-2}$  であり、この値は GC-E の値の約 12 倍である。GOx を電極触媒として用いた報告の中では、最も大きな触媒電流密度を出力した。GOx は酸素を電子授与体とするため、溶存酸素の存在下においては触媒電流値が小さくなる [53]、かつ過酸化水素を発生し酵素自体が失活する事が知られている [62]が、この実験においてはその影響が非常に小さかった。これはグルコースの濃度が非常に高く、かつ GOx の電子受容体である FAD から Os 錯体への電子移動の効率が良かったことが理由であると考えられる。Figure 2-3-b には、 $0.8 \text{ V vs Ag/AgCl}$  における触媒電流値のハイドロゲル担持量依存性を示した。電極には MgOC-E と GC-E をそれぞれ使い、 $37^\circ\text{C}$  の  $0.5 \text{ M}$  グルコース溶液中で測定を行った。MgOC-E において、 $400 \mu\text{g cm}^{-2}$  の修飾まではほぼ直線的に触媒電流値が増加した。このことから  $400 \mu\text{g cm}^{-2}$  までは修飾した酵素のすべてが電極反応に寄与していたと考えられる。その後はなだらかに電流値が増加し、 $1000 \mu\text{g cm}^{-2}$  の担持量においては、 $60 \text{ mA cm}^{-2}$  を達成した。 $400 \mu\text{g cm}^{-2}$  以上ではハイドロゲルの膜厚が厚くなり、修飾したすべての酵素が電極反応に寄与できていない状態であると考えられる。一方で平板電極においては、 $200 \mu\text{g cm}^{-2}$  の時点で電流値が頭打ちとなった。この時点でハイドロゲル膜が厚く、ほとんどのハイドロゲルが酵素反応に寄与できていない状態である。Ohara らによって Polymer I と GOx をハイドロゲル化法より GC-E 上に修飾した場合のハイドロゲル担持量依存性の実験が報告されている [63]。彼らの実験においてもハイドロゲル担持量が約  $200 \mu\text{g cm}^{-2}$  付近から触媒



**Figure 2-3-a:** Cyclic voltammograms (CV) for glucose oxidation on the MgOC-E and GC-E and CV for redox of Os complex on MgOC-E,  $0.1 \text{ M}$  phosphate buffer pH7.0,  $37^\circ\text{C}$ ,  $0.5 \text{ M}$  glucose, hydrogel loading  $800 \mu\text{g cm}^{-2}$ , scan rate  $20 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $8000 \text{ rpm}$



**Figure 2-3-b:** Dependence of the glucose oxidation current at  $0.8 \text{ V}$  on the hydrogel loading for the MgOC-E (◆) and GC-E (□)  $0.1 \text{ M}$  phosphate buffer pH7.0,  $37^\circ\text{C}$ ,  $0.5 \text{ M}$  glucose,  $8000 \text{ rpm}$

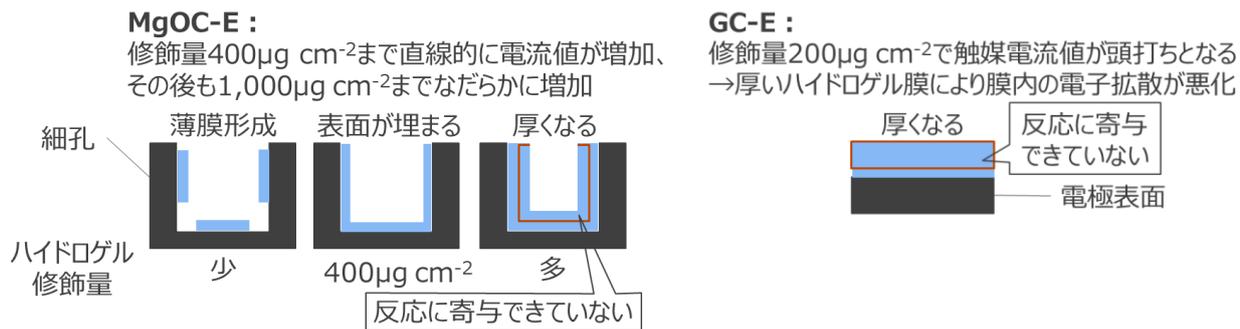


Figure 2-3-c: Hydrogel loading of MgOC-E and GC-E

電流値が一定値に近づくことが報告されている。触媒電流値は電極表面から数  $\mu\text{m}$  未満の反応層における酵素濃度によって決定される。そのため、電極表面から遠いところに位置する酵素のほとんどは、触媒として反応に寄与していないと考えられる。本研究結果から、MgOC による電極の多孔質化が、電極反応に寄与できる酵素・メディエータを増やし触媒電流値の増大に効果的であることが分かった。MgOC-E 上に電極触媒として糖鎖除去を行った FAD-GDH(d-FAD-GDH)をハイドロゲル化法により修飾したところ、 $1000 \mu\text{g cm}^{-2}$ の修飾量で  $150 \text{ mAcm}^{-2}$ を観察した [10]。この値は同条件の GOx 電極の結果の 2 倍以上である。GOx と d-FAD-GDH の 2 倍の差は酵素の活性によるものである。また過去にインク塗布法によって作成した MgOC-E に GOx をハイドロゲル化法により  $1000 \mu\text{g cm}^{-2}$ 修飾した際は、 $25^\circ\text{C}$ で  $11.3 \text{ mA cm}^{-2}$ を出力した [30]。インク塗布法では、MgOC をインク状にしスパチュラで電極表面に塗布することで多孔質電極を作製するため、泳導電着法のようなマクロ孔を有する三次元構造が形成されづらい。また酵素活性の観点から、測定温度が  $25^\circ\text{C}$ から  $37^\circ\text{C}$ へ上昇すると触媒電流密度は約 2 倍になる [10]。この点を考慮すると、 $37^\circ\text{C}$ におけるインク塗布法の電極は  $23 \text{ mA cm}^{-2}$ を出力すると想定される。泳導電着法による電極では、同条件で  $60 \text{ mA cm}^{-2}$ を達成したことから、炭

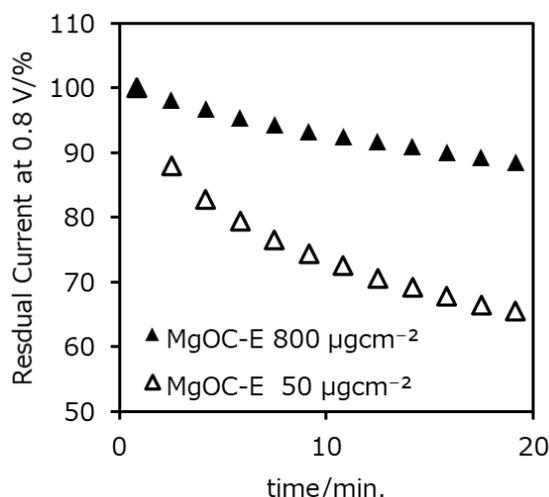
Table 2-3: Previous researches

炭素	表面写真	触媒電流値
MgOC (本研究結果) : 38nmの細孔を有する		$55 \text{ mAcm}^{-2}$ ハイドロゲル修飾： $800 \mu\text{gcm}^{-2}$
カーボンペーパー上に CNTが生長 [76]		$22 \text{ mAcm}^{-2}$ ハイドロゲル修飾： $800 \mu\text{gcm}^{-2}$
CNT フォレスト (CNTが規則的に並んだフィルム) [78]	※電極イメージ 	$26.7 \text{ mAcm}^{-2}$ ハイドロゲル修飾量： $13 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ of Os complex

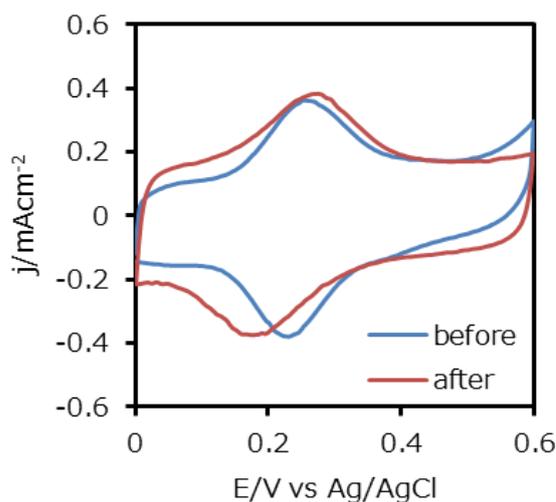
素材料の固定化手法をインク塗布法から泳動電着法に変えると、触媒電流密度は約 2.5 倍になることが分かる [30]。これは泳動電着法により形成されたマクロ孔が、物質輸送に適していたからであると考えられる。そのほか様々な炭素材料上で GO<sub>x</sub>・polymer I を使用した先行研究について、Table 2-1 にまとめた。MgOC-E のメソ-マクロの階層構造がハイドロゲルの足場として適していることから、本結果はほかの先行研究よりも高電流密度を出力したことが分かる。

### 2-4 多孔質電極と平板電極の短期安定性の比較

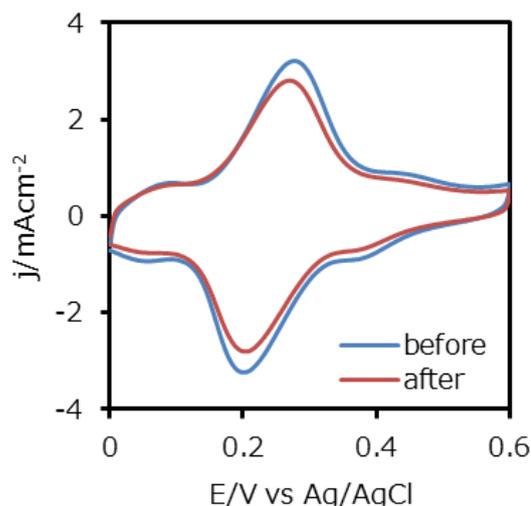
Figure 2-4-a, 2-4-d では 20 分間 8000 rpm で激しく電極を回転させた際の触媒電流値の変化を示した。MgOC-E 上のハイドロゲル修飾量が  $50 \mu\text{g cm}^{-2}$  の場合は 20 分間の測定で触媒電流値が初期電流値の 24 %まで減少した。しかしハイドロゲルの修飾量を  $800 \mu\text{g cm}^{-2}$  まで増やすと、20 分間 8000 rpm で激しく回転させた際でも 75 %の電流値を保つことができた。修飾量の増加に伴い安定性が改善することが分かった。同様の傾向が GC-E においても見られた。実際に測定前後の Os 錯体の酸化還元ピークを比較(Figure 2-4-b, c)したところ、触媒電流値の減少量と同等のピーク電流値の減少は見られなかった。レドックスポリマーは 8000 rpm という厳しい環境においても電極に強固に固定されていることがわかる。このことからハイドロゲル修飾量が  $50 \mu\text{g cm}^{-2}$  の時の急激な触媒電流値の減少



**Figure. 2-4-a:** Stabilities of the glucose oxidation currents of MgOC-E, hydrogel loading  $50 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , and  $800 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 0.1 M phosphate buffer pH7.0, 37°C, 0.5 M glucose

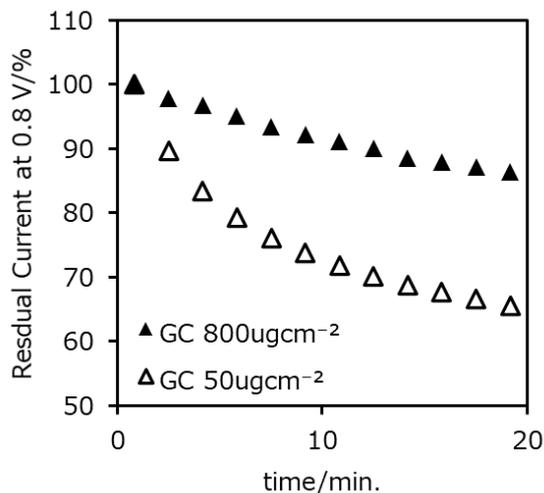


**Figure 2-4-b**

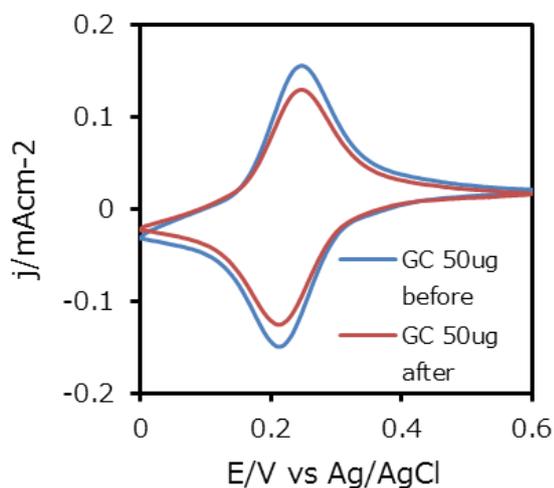


**Figure 2-4-c**

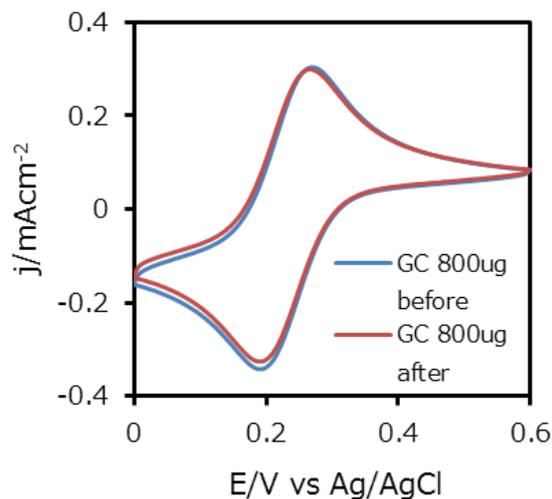
CVs of redox of Os complex on GC-E before and after Figure. 2-4-a experiment, hydrogel loading  $50 \mu\text{g cm}^{-2}$  (Figure. 2-4-b),  $800 \mu\text{g cm}^{-2}$ (Figure. 2-4-c), 0.1 M phosphate buffer pH7.0, 25°C, scan rate  $20 \text{ mV s}^{-1}$



**Figure 2-4-d:** Stabilities of the glucose oxidation currents, hydrogel loading  $50 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  hydrogel/GC-E, and  $800 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  hydrogel/GC-E, 0.1 M phosphate buffer pH7.0,  $37^\circ\text{C}$ , 0.5 M glucose



**Figure 2-4-e**



**Figure 2-4-f**

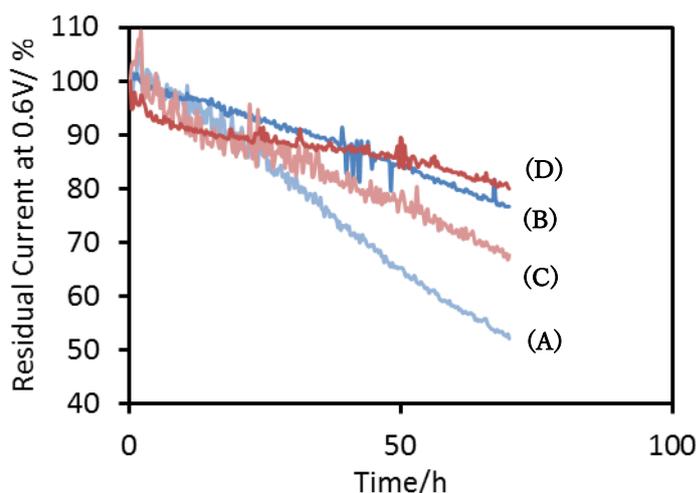
CVs of redox of Os complex on GC-E before and after Figure. 2-4-d experiment, hydrogel loading  $50 \mu\text{g cm}^{-2}$  (Figure. 2-4-e),  $800 \mu\text{g cm}^{-2}$  (Figure. 2-4-f), 0.1 M phosphate buffer pH7.0,  $25^\circ\text{C}$ , scan rate  $20 \text{ mV s}^{-1}$

は、酵素の脱離によるものと考えられる。電極近傍に存在する酵素以外は触媒として電極反応に寄与することはできないが、ハイドロゲル膜を厚くすることで、酵素の担持力を向上させる効果があることが分かった。

## 2-5 多孔質電極と平板電極の長期安定性の比較

Figure 2-5-a では 0.6 V における MgOC-E、GC-E の連続電流応答の結果を示す。Figure 2-4-a, 2-5-d の評価では修飾量が多いほど十分な安定性を示したため、本研究では  $800 \mu\text{g cm}^{-2}$  のハイドロゲルを各電極に修飾した。初期電流密度は MgOC-E (Figure 2-5-a(A)) と GC-E (Figure 2-5-a(C)) でそれぞれ  $4.9 \pm 0.4 \text{ mA cm}^{-2}$ ,  $1.6 \pm 0.1 \text{ mA cm}^{-2}$  となった。70 時間の連続測定の後、触媒電流値は MgOC-E においては初期電流値の  $57 \pm 8.3 \%$  (Figure 2-5-a(A)), GC-E では  $67 \pm 7.5 \%$  (Figure 2-5-a(C)) まで減少した。この触媒電流値の減少は GOx の持つオキシダーゼ特性によって過酸化水素が生成され、酵素自身が失活した可能性が考えられる。一方で、MgOC-E よりも GC-E の方が安定性は高い傾向にあった。これは、GC-E においてはハイドロゲル膜が非常に厚く、溶存酸素が反応層の GOx までたどり着くことが難しく反応層における過酸化水素による影響が小さかったからであると考えられる。一方で MgOC-E においては非常に薄いハイドロゲル薄膜が形成されているため、溶存酸素は容易に反応層の GOx にたどり着き、過酸化水素の影響を受けやすく安定性が低くなったと考えられる。

Heller らは過酸化水素の分解を行うカタラーゼをハイドロゲルに加えることで、連続測定における安定性を向上させることに成功した [62]。この研究結果を参考とし、本研究でも  $80 \mu\text{g cm}^{-2}$  のカタラーゼをハイドロゲルに加えた。初期電流値は MgOC-E (Figure 2-5-a(B)) と GC-E (Figure 2-5-a(D)) でそれぞれ  $4.6 \pm 0.5 \text{ mA cm}^{-2}$ ,  $2.1 \pm 0.2 \text{ mA cm}^{-2}$  となった。触媒電流値の応答は MgOC-E は Figure 2-5-a (B)、GC-E は Figure 2-5-a (D) にて示されており、70 時間後の触媒電流値は MgOC-E では初期電流値の  $76 \pm 6.0 \%$ 、GC-E では  $81 \pm 7.5 \%$  となり、カタラーゼを加えることにより安定性が向上する結果となった。一方、村田らの先行研究においては d-FAD-GDH を電極触媒として用いた実験では、 $25^\circ\text{C}$  のにおける 3 日間の測定で触媒電流値は初期電流値の 22 % まで減少した。このことから GOx を用いたハイドロゲル電極の耐久性の高さが確認できる [10]。本研究にて、MgOC-E の 70 時間の測定前後のレドックスポリマーの酸化還元ピークを、非グルコース存在下にて確認した (Figure 2-5-b, 2-5-c)。Os 錯体の酸化還元反応から約 3 割のレドックスポリマーが剥離していることが分かった。



**Figure 2-5-a:** Three days of continuous current response at 0.6 V for hydrogel/MgOC-E (A), hydrogel containing catalase/MgOC-E (B), hydrogel/GC-E (C), and hydrogel containing catalase/GC-E (D), 0.1 M phosphate buffer pH7.0,  $37^\circ\text{C}$ , 0.1 M glucose, hydrogel loading  $800 \mu\text{g cm}^{-2}$

剥離割合はカタラーゼの有無に関わらず同じであった。架橋によって酵素・メディエーターを固定し

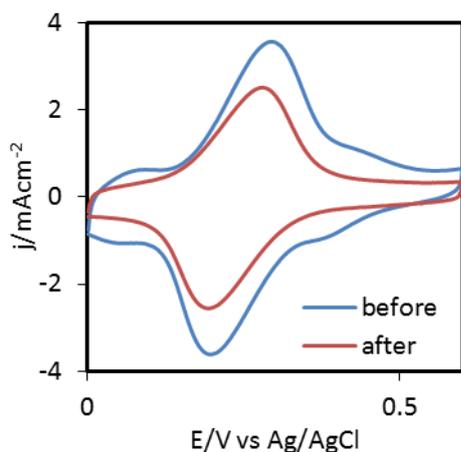


Figure 2-5-b

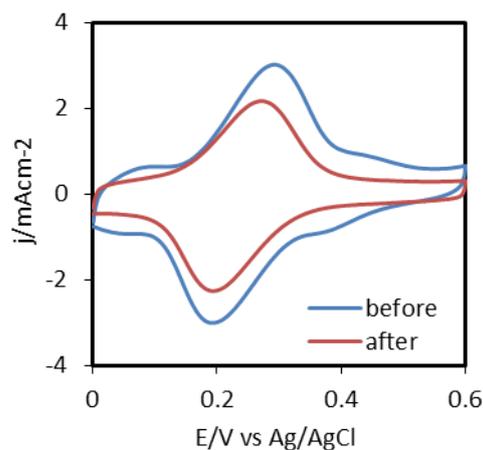


Figure 2-5-c

CVs for redox of Os complex before and after Figure. 2-5-a experiment, hydrogel loading  $800 \mu\text{g cm}^{-2}$  (Figure 2-5-b),  $800 \mu\text{g cm}^{-2}$ +catalase  $80 \mu\text{g cm}^{-2}$  (Figure 2-5-c), 0.1 M phosphate buffer pH7.0,  $25^\circ\text{C}$ , scan rate  $20 \text{ mV s}^{-1}$ , in quiescent solutions

たとしても約 3 割のレドックスポリマーが脱離しているため、さらなる安定化に向けては架橋剤の割合の検討やより強固な固定技術 [64]を検討する必要がある。

## 2-6 GOx ハイドロゲル電極に対するアニオンの影響

本研究では、GC-E にハイドロゲルを修飾して評価を行った。最初に親水的なアニオンであるクエン酸イオン存在下において評価をした。Figure 2-6-a(a)は、ハイドロゲル電極を  $25^\circ\text{C}$ の 0.1 M リン酸バッファー pH 7.0、0.2 M グルコース溶液中（基準溶液）で 2000 rpm で回転し測定したものである。  $2.5 \text{ mA cm}^{-2}$  の触媒電流が得られた。次に基準溶液中に 0.5 M クエン酸ナトリウムを加え pH を 7.0 に調整した溶液（クエン酸ナトリウム塩溶液）で、(a)と同じ電極を用いて測定した CV が Figure 2-6-a(b)である。触媒定常電流値の低下が観察された。定常電流は安定であり、経時的な電極の劣化を観察しているということではない。最後にもう一度電極を簡易的に蒸留水で洗った後、再度基準溶液中で測定(Figure 2-6-a(c))を行ったところ、触媒電流値はほぼ元通りになった。Figure 2-6-fではより疎水的なアニオンである  $\text{NO}_3^-$ の影響を調べた。基準溶液中で測定(Figure 2-6-f(a))後、0.5 M の硝酸ナトリウム塩を基準溶液中に溶解させ、pH を 7.0 で調整した溶液中（硝酸ナトリウム塩溶液）での CV を Figure 2-6-f(b)に示す。先述のクエン酸ナトリウム塩溶液中に比べて、大きく触媒電流値が減少した。この場合についても、再び基準溶液中で測定すると触媒電流値はほぼ初期の基準溶液中の値に戻った。同様の実験を硫酸ナトリウム塩(Figure 2-6-b)、リン酸ナトリウム塩(Figure 2-6-c)、塩化ナトリウム塩(Figure 2-6-e)、過塩素酸ナトリウム塩(Figure 3-6-g)が溶解した溶液中においても行った。どの塩を用いた場合においても各ナトリウム塩の存在下で電流値が減少し、2 回目の基準溶液中にて再び CV を測定すると、電流値はほぼ(a)の結果と同等まで回復することがわかった。先行研究に研究において、Cl 存在下においてハイドロゲル電極の触媒電流値が減少することは既に報告がされている [11] [55]。また別の報告においてはこの反応が可逆的であることも報告されてきたが [65]、本研究におい

て、アニオンの種類によって触媒電流値に差があることが明らかとなり、さらにどの塩を用いた場合も可逆的に触媒電流値が回復することがわかった。この結果から、電解質（ナトリウム塩）の存在下における電流値の減少は、不可逆的な酵素の変性や失活によるものではなく、ハイドロゲル内部の可逆的な構造変化によることが示唆された。Figure 2-6-h に様々なナトリウム塩溶液中で測定した CV の結果をまとめた。特に  $\text{ClO}_4^-$  存在下では触媒電流がほとんど観察されなかった。

Figure 2-6-i ではハイドロゲル化した Os 錯体の酸化還元ピークを、グルコースを含まないナトリウム塩溶液中で観察した。この結果から、 $\text{ClO}_4^-$  を除いて、酸化還元電位やピークに大きな差がないことがわかる。したがって、Figure 2-6-h における CV の変化は、レドックスポリマーの酸化還元電位の変化によるものではないことが示唆された。Carucci らは、フェロセンの酸化還元反応に対するイオンの影響を調べる研究を行った [61]。この場合においても、フェロセンの酸化還元反応に対する塩の影響は小さいが、グルコースの触媒電流値にはばらつきがあることが報告されている。 $\text{ClO}_4^-$  に注目すると、触媒電流値は非常に小さく、酸化還元ピーク電流値も他のイオン存在下や基準溶液中と比べても非常に小さかった。疎水性の非常に高い  $\text{ClO}_4^-$  [66] はハイドロゲルと強く相互作用することでハイドロゲル内部が脱水状態になり、ゲル中への電解質やグルコースの輸送が困難になり、触媒電流値のみならず Os 錯体の酸化還元ピークさえも観察されなくなったと考えられる。

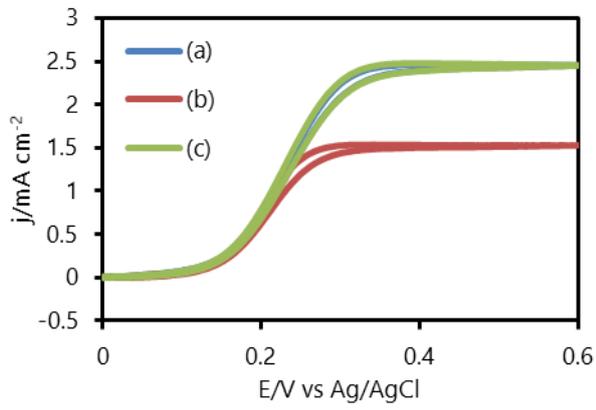


Figure 2-6-a

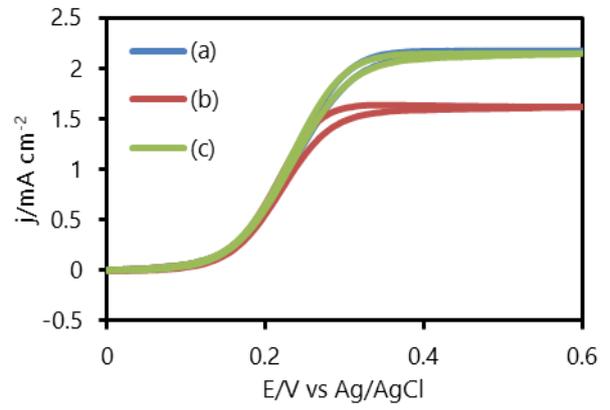


Figure 2-6-b

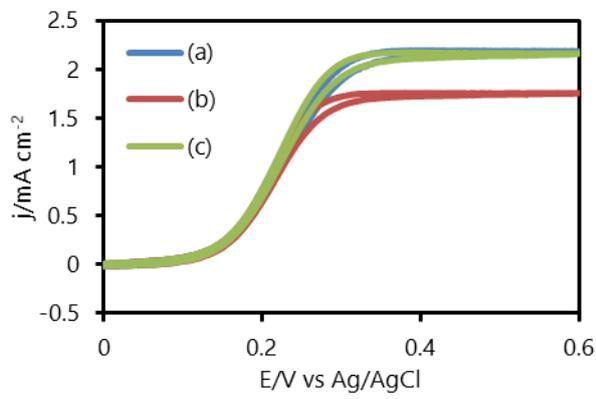


Figure 2-6-c

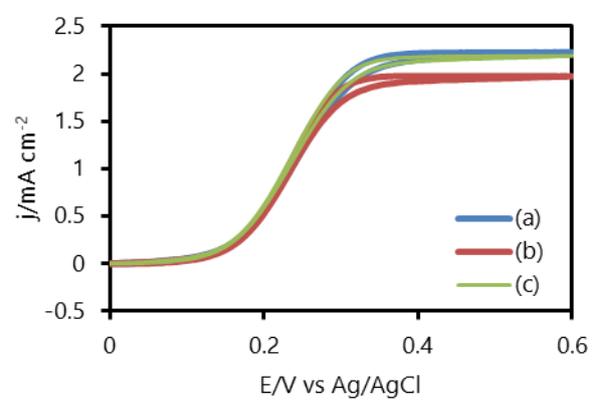


Figure 2-6-d

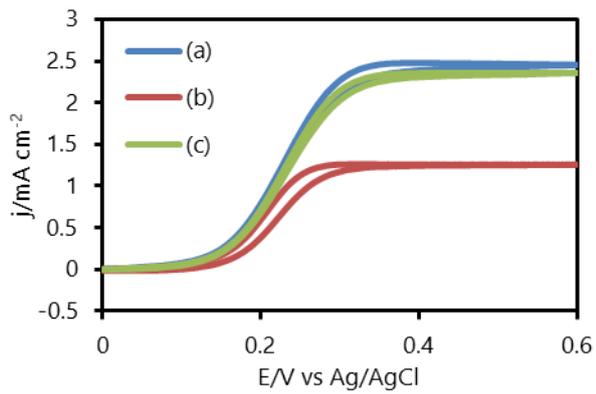


Figure 2-6-e

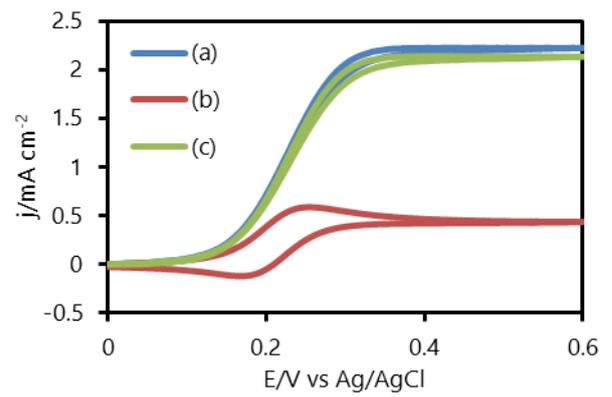


Figure 2-6-f

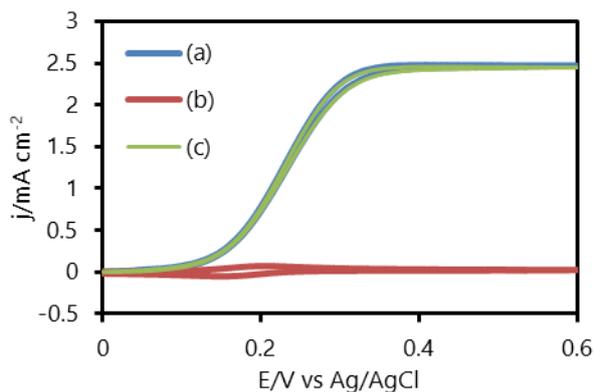


Figure 2-6-g

**added sodium salt**

Figure 2-6-a sodium citrate

Figure 2-6-b sodium sulphate

Figure 2-6-c sodium phosphate

Figure 2-6-d sodium fluoride

Figure 2-6-e sodium chloride

Figure 2-6-f sodium nitrate

Figure 2-6-g sodium perchlorate

0.1 M phosphate buffer pH7.0, 25°C, 0.2 M glucose, 0.5 M sodium salt (only (b)), scan rate 20 mV s<sup>-1</sup>, 2000 rpm

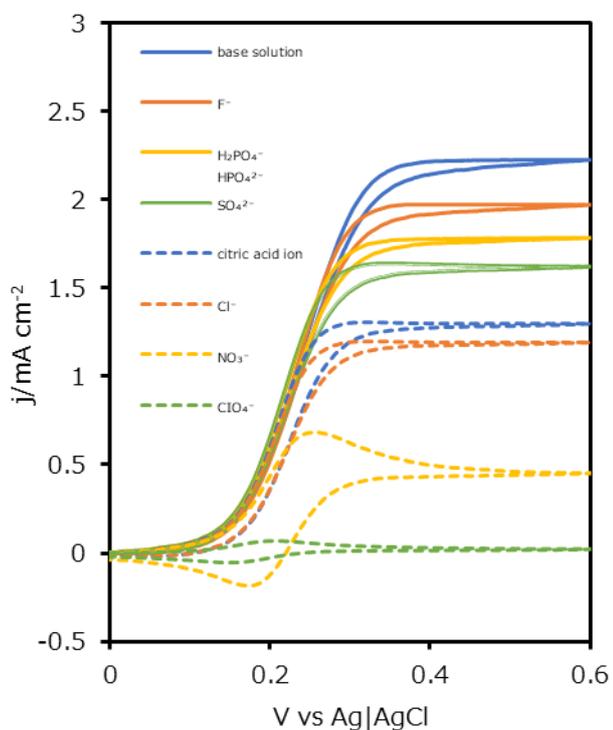


Figure 2-6-h: CV in presence of various salt and glucose, 0.1 M phosphate buffer pH7.0, 25°C, 0.2 M glucose, 0.5 M sodium salt, scan rate 20 mV s<sup>-1</sup>, 2000 rpm

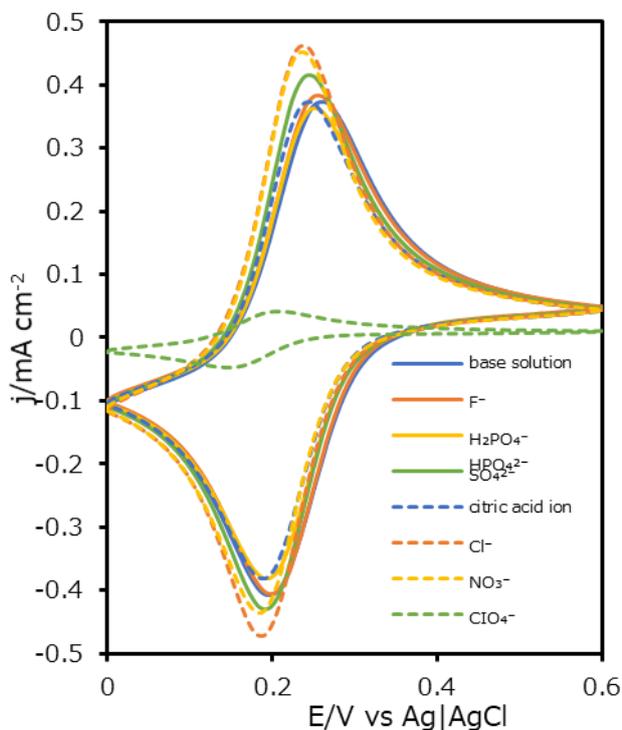
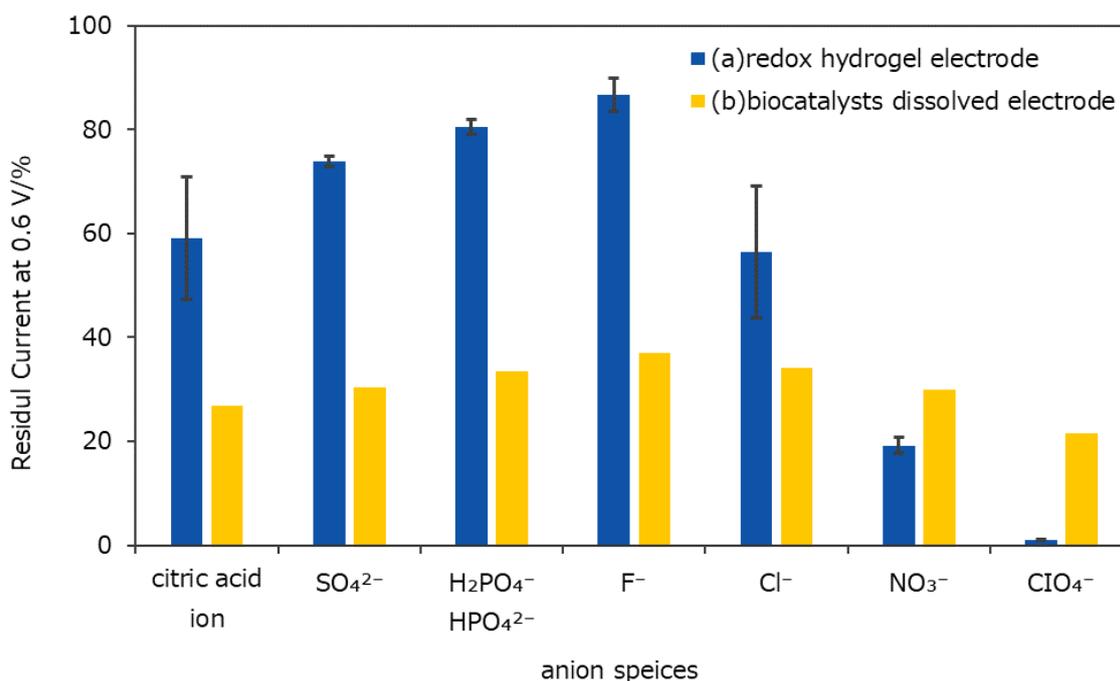


Figure 2-6-i: CV on presence of various salt, 0.1 M phosphate buffer pH7.0, 25°C, 0.5 M sodium salt, scan rate 20 mV s<sup>-1</sup>

## 2-7 GOx修飾ハイドロゲル電極の触媒電流値とアニオンホフマイスター系列

Figure 2-7-a の(a)に Figure 2-6-a-f の0.6 Vにおける触媒電流値をアニオンのホフマイスター系列順 [60] [67]に並べた。縦軸は残存電流値([(b)0.6 Vにおける各ナトリウム塩溶液中の触媒電流値]/[(a)0.6 Vにおける基準溶液中の触媒電流値]×100)とした。(b)は各ナトリウム溶液中に Os 錯体と GOx を溶存させた場合の結果を示した。Os 錯体は  $41 \mu\text{M}$ 、酵素は  $0.5 \mu\text{M}$  になるように添加し、0.6 V で触媒定常電流を観測した。溶存系においても、[(b)0.6 Vにおける各ナトリウム塩溶液中の触媒電流値]/[(a)0.6 Vにおける基準溶液中の触媒電流値]×100 で算出した。塩析力を有するコスモトロピックイオンを左に、塩溶力を有するカオトロピックイオンを右側に示した。ハイドロゲル・溶存系のどちらにおいても、フッ素をピークとしたベル型のグラフとなった。この結果について1. イオン強度、2. The law of matching water affinities(LMWA)の観点による静電的なイオンの吸着・分散力によるイオンの吸着、4. ハイドロゲルの膨潤、5. ハイドロゲルの脱水の観点から考察を行う。

最初に1. イオン強度について考察する。ハイドロゲル電極はイオン強度の増加に伴い、電流値が減少することが報告されている。これは①レドックスポリマーの持つ正電荷を無効化されコイル状になることで酸素との反応性が下がる、②酵素とレドックスポリマー間の静電的相互作用が無効化され、酵素-レドックスポリマー間の電子移動が阻害されることが原因である [11]。7種類のアニオンのうち、クエン酸イオン、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 、 $\text{HPO}_4^{2-}$ は多価アニオンであり、イオンの濃度が同じであってもイオン強度は異なる。pH 7.0の溶液のイオン強度は、クエン酸イオンは1価のアニオンの5.4倍、 $\text{SO}_4^{2-}$



**Figure 2-7-a:** Effects of various 0.5 M sodium salts on glucose oxidation currents at 0.6 V for (a) GOx-hydrogel modified electrode system and (b) biocatalyst dissolved system, **(a) redox hydrogel electrode:** hydrogel loading  $600 \mu\text{g cm}^{-2}$ , 0.1 M phosphate buffer pH 7.0,  $25^\circ\text{C}$ , 0.2 M glucose, 0.5 M sodium salt, 2000 rpm. **(b) solution system:**  $0.5 \mu\text{M}$  GOx,  $41 \mu\text{M}$  Os complex monomer ( $[\text{Os}(\text{bipyridine})_2(\text{imidazole})\text{Cl}]^{1+/2+}$ ), 0.1 M phosphate buffer pH 7.0,  $25^\circ\text{C}$ , 0.5 M glucose, 0.5 M sodium salt

は3倍、 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 、 $\text{HPO}_4^{2-}$ は1.8倍である。多価イオンであるクエン酸、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 、 $\text{HPO}_4^{2-}$ の存在下ではハイドロゲルの静電的アダクト(酵素・メディエータ)の相互作用がさらに弱まり、1価の $\text{F}^-$ 存在下よりも触媒電流値が小さくなったと考えられる。そこで、 $\text{SO}_4^{2-}$ のイオン強度を1価のイオンのイオン強度に合わせ(0.5/3 Mの濃度)実験を行ったところ、 $\text{F}^-$ が0.5 Mの場合と同等の電流密度を示した。このことから多価イオンにおける電流値の減少はイオン強度が大きく影響を与えていることが伺える。しかし本研究結果にて、 $\text{F}^-$ から $\text{ClO}_4^-$ にかけてはすべて1価のイオンであり、イオン強度が同じながらも差が表れたことから、イオン強度以外にもそれぞれのイオンが持つ特性がグルコース酸化反応に影響を与えていると考えられる。Figure 2-7-a(b)の溶存系の実験においては、(a)の結果と同様に基準溶液内でもっとも大きな触媒電流値  $12 \mu\text{A cm}^{-2}$ を観測した。各ナトリウム塩を加えイオン強度が上がると、酵素・メディエータの静電的な相互作用が弱まり、触媒電流値が基準溶液内の40%未満となった。イオン存在下では $\text{F}^-$ の存在下にて電流値が最も大きく、基準溶液37%程度となった。多価イオン存在下における溶存系の触媒電流値の減少はハイドロゲル電極の触媒電流値の減少理由と同様、イオン強度の増加による酵素・メディエータの静電相互作用の弱化によるものだと考察できる [68]。

続いて $\text{F}^-$ より右側のカオトロピックイオンによる触媒電流値の差について、2. 静電的なイオンの吸着・分散力によるイオンの吸着によって説明できる [60]。1価のアニオンに関してはコスモトロピックからカオトロピックイオンへと触媒電流値が減少する傾向にあり、これはメディエータとしてフェロセンメタノールを用いた Carucci らの報告と一致している [61]。イオンの吸着は、LMWAの視点による静電的な吸着と分散相互作用の2つの観点から考察する。LMWAはエンタルピーの観点からイオン同士の親和性の傾向をつかむ考え方である [44]。Figure. 2-7-bにLMWAの傾向を表したVolcano plotを示す。縦軸は結晶の溶解エンタルピーであり、横軸はカチオンとアニオンの水和エンタルピー(気体イオンから水溶液イオンへの変化に伴うエンタルピー変化)の差を示す。縦軸は数字が大きいほど、イオン結びつきが強いと言え、横軸は0に近いほど、アニオンとカチオンの水和エンタルピーが近い。この表からはカオトロピックイオン同士、またはコスモトロピックイオン同士など水和力の近いイオン同士において親和性が高いことが分かる。酵素を構築するアミノ酸に着目すると、

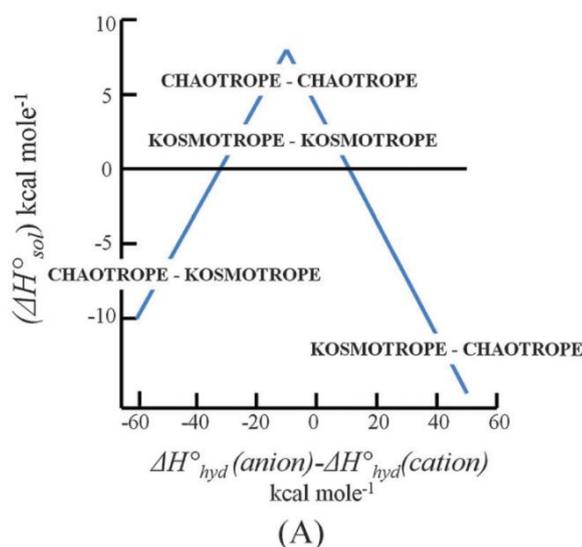
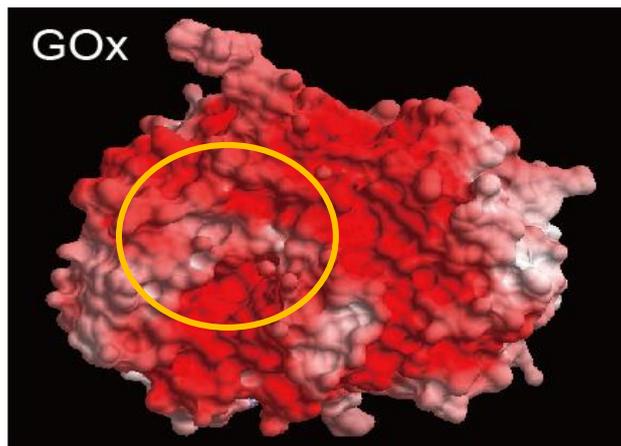


Figure 2-7-b: Volcano plot [44]



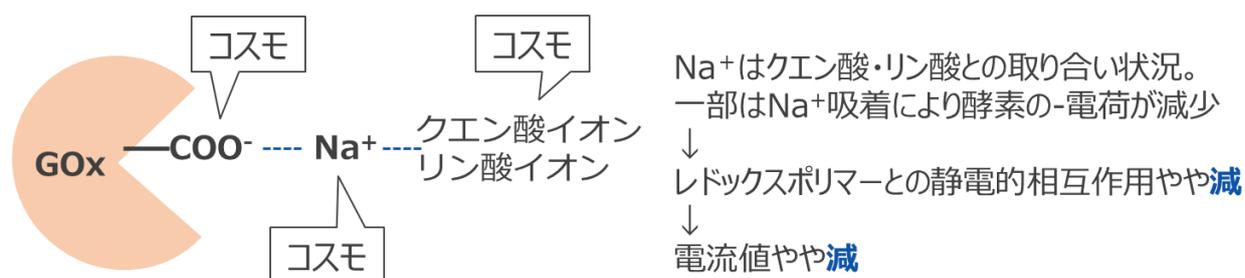
**Figure 2-7-c** Three-dimensional rendering of GOx relevant to the present study, indicating surface charge distribution. Red indicates negative charge, blue indicates positive charge, and white indicates no charge. Rendering software: CueMol 2 ver 2.2.3.443.

電荷を有するアミノ酸は、その残基の類似性からカオトロピックまたはコスモトロピックに分類される。カルボキシル基を有するアスパラギン酸やグルタミン酸はコスモトロピックに分類され、アミノ基を有するヒスチジン、リジン、アルギニンはカオトロピックに分類される。つまり、LMWA とアミノ酸の分類から、酵素表面に吸着しやすいイオンの傾向をつかむことが可能である。GOx は pI が 4.2 であり中性 pH の環境において正味電荷が負である。Figure. 2-7-c に GOx の表面電荷を示す。黄色の○で示す部分が GOx 活性部位であり、負電荷を帯びていることが分かる。つまり GOx の活性部位付近はコスモトロピックに分類されるカルボキシル基で囲まれているため、同じコスモトロピックなカチオンが吸着しやすい。本研究では Na<sup>+</sup> がそれに相当する。Na<sup>+</sup> の吸着は GOx の負電荷を減らすため、

○カオトロピックアニオン存在下



○コスモトロピックアニオン存在下



**Figure 2-7-d:** Adsorption of ion

anion species	Isotropic Static Polarizability( $\text{\AA}^3$ )
citric acid ion	16.05
$\text{SO}_4^{2-}$	6.13
$\text{HPO}_4^{2-}$	6.85
$\text{H}_2\text{PO}_4^-$	5.47
$\text{F}^-$	1.22
$\text{Cl}^-$	4.22
$\text{NO}_3^-$	4.01
$\text{ClO}_4^-$	4.79

Figure 2-7-e: Isotropic static polarizability [81]

正電荷の Os 錯体との静電的相互作用を下げ、結果的に触媒電流値を減らす。一方で  $\text{Na}^+$  は溶液中のコスモトロピックアニオンとも親和性が高いことから、クエン酸イオンや  $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 、 $\text{HPO}_4^{2-}$  の存在下では  $\text{Na}^+$  は酵素と溶存イオンの間で取り合われる状況になるため、コスモトロピックアニオンの存在下では  $\text{Na}^+$  の吸着の影響は弱まる。Figure. 2-7-d に LWMA によるイオンの吸着について示す。イオン吸着による GOx の表面電荷の変化がハイドロゲル電極・溶存系どちらの結果においても影響を及ぼしたと考えられる。

またイオンの吸着は分散相互作用についても考慮する必要がある。溶存イオンは LMWA のような静電的な吸着以外に、イオンの分極性が高いほど分散力が働き、タンパク質表面の帯電の有無に関わらず吸着する [69]。分散力の大きさは各イオンの静的分極率に依存する。本実験で利用したアニオンの静的分極率を Figure 2-7-e に示す。傾向としては、コスモトロピックまたはカオトロピックに寄るほど静的分極率が大きくなり、コスモトロピック・カオトロピックの境目となる  $\text{F}^-$  ほど小さくなる。静的分極率が大きいアニオンは酵素に吸着することで酵素の負電荷が大きくなり、Os 錯体との静電的相互作用が高まると考えられるが、静的分極率と Figure 2-7-a のパラメータには相関性がなかった。GOx は負電荷が十分大きいことから、アニオンの吸着による正電荷の強化の効果が見えなかった、また無電荷の部位の少ないことから、静電的な吸着が優位になっていたと考えられる。また本研究でカチオンとして利用した  $\text{Na}^+$  は静的分極率が  $0.13 \text{\AA}^3$  と小さいため、分散相互作用による吸着の効果は小さいと考えられる。

続いて 3. ハイドロゲルの膨潤について議論する。Figure 2-7-a の結果からハイドロゲル系と溶存系のどちらの実験においても触媒電流値の大きさは  $\text{F}^-$  存在下をピークとするベル型を示しており、イオン傾向が非常に似ている。しかしながら細かく比較すると二つの実験結果は以下の点で異なっている。  
(i) ハイドロゲルの場合、 $\text{F}^-$  存在下では、87%の電流を維持し、溶存系では  $\text{F}^-$  存在下にて 37%まで減少しており、ハイドロゲルの場合と比較してその減少幅が大きい。

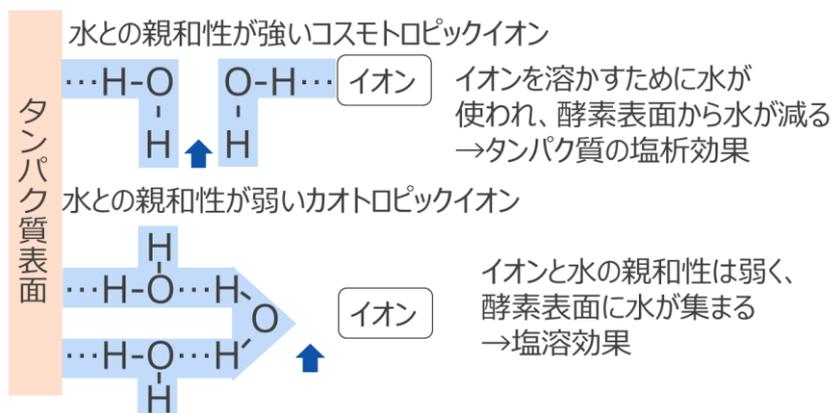


Figure 2-7-f: Mechanism of kosmotropic ion and chaotropic ion

(ii) ハイドロゲルの場合、イオンによる触媒電流値の差が大きく、溶存系ではイオン種による触媒電流値の差は比較的小さい。ハイドロゲル化により酵素・メディエータは架橋され膜を形成しているため、各種の塩が添加されイオン強度が増加した状態でも酵素・メディエータは密な膜を維持することができている。一方で溶存系においては酵素・メディエータは静電的な相互作用のみで近づく必要があるためイオン強度の影響を大きく受ける。(i)の違いは酵素・メディエータが架橋されているかどうかでイオン強度の影響が異なることが理由だと考えられる。一方で(ii)(iii)の差から溶存イオンが酵素・メディエータ間の反応以外にも、「ハイドロゲル」の構造に特異的に影響を与えていると考えられる。カオトロピックイオンは水との親和性が弱く、酵素の表面に水を集め溶解度を上げる塩溶効果がある。Figure 2-7-f にコスモトロピックイオンとカオトロピックイオンの水との相互作用について示す。このようなイオンの持つ効果によって、ホフマイスター系列に則りゲルの膨潤度が変化することが報告されている [70] [71] [72] [73] [74]。Figure 2-7-a の実験結果において、Cl<sup>-</sup>や NO<sub>3</sub><sup>-</sup>のようなカオトロピックなアニオンを添加した場合には、水を酵素に集めることでハイドロゲルの膨潤を促すと

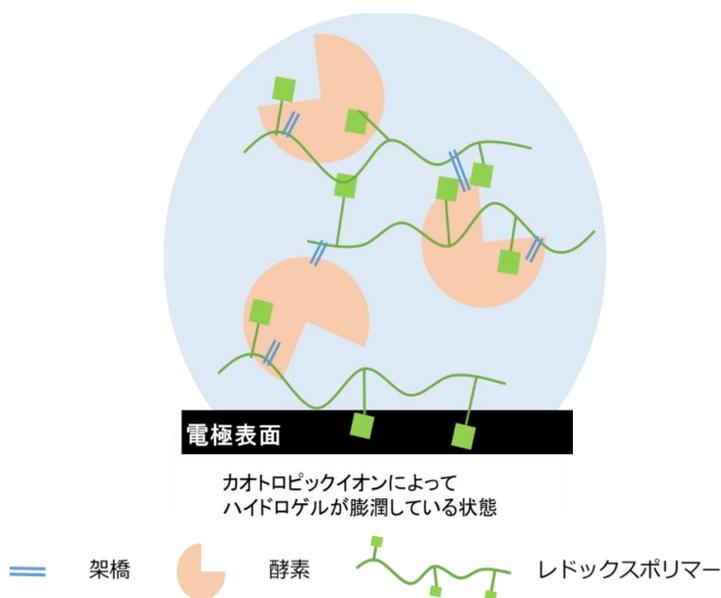
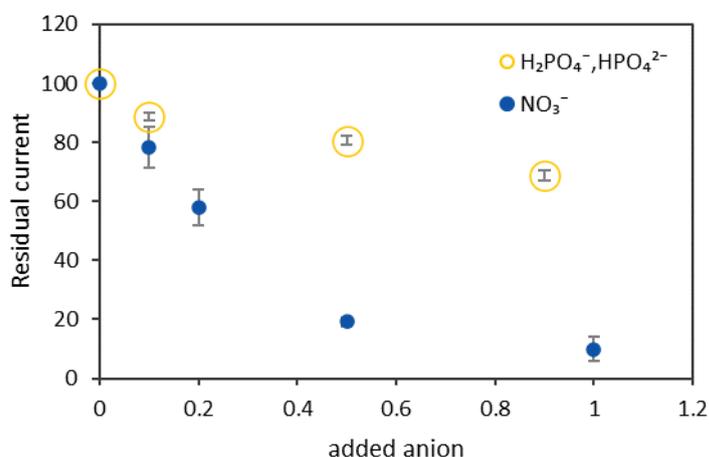


Figure 2-7-g: Shrinking and swelling effect on redox hydrogel in presence of kosmotropic ion or chaotropic ion

考えられる。Figure2-7-g にハイドロゲルの膨潤状態を示す。ハイドロゲルが膨潤すると膜厚が厚くなり、酵素・メディエータ・電極間の移動距離が長くなる。その結果として触媒電流値が小さくなったと考えられる。最後に4. ハイドロゲルの脱水について報告する。ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>の場合、ハイドロゲル系ではOs 錯体の酸化還元とともに触媒電流値はほとんど観察されなかったが、溶液系においては基準溶液中の20%の電流密度を維持している。疎水性が非常に高いClO<sub>4</sub><sup>-</sup>はハイドロゲルの疎水性を向上させ、電解質やグルコースのアクセス性を下げることで電流応答やOsの酸化還元ピークが極端に小さくなったと推察できる。

## 2-8 イオンの濃度とハイドロゲル電極の触媒電流値

次に触媒定常電流値のH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>,HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>およびNO<sub>3</sub><sup>-</sup>の濃度依存性を調べた。25°C, 0.2 M グルコースを含む0.1Mリン酸緩衝液に硝酸ナトリウム塩とリン酸ナトリウム塩を添加し、pHを7.0そろえた溶液でCV測定を行った。0.6Vにおける触媒電流値を添加した塩濃度に対してプロットした。触媒電流値はNO<sub>3</sub><sup>-</sup>の濃度上昇に伴い減少した。1Mの時の触媒電流値は初期電流値の約10%となった。このグラフから触媒電流値はイオン濃度に対して比例的ではなく、漸近的に減少することがわかる。H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>,HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>存在下において同様の実験を行ったところ0.9Mでの触媒電流値は69%にとどまり、ハイドロゲル電極の触媒電流値はイオン濃度の上昇に伴い減少し続けるわけではなく、またその減少割合はイオン種に依存することが分かった。一方でd-FAD-GDHを用いたレドックスハイドロゲル電極の実験においてはリン酸緩衝液の濃度が増加するとともに触媒電流値が増加することが報告されている[10]。触媒電流値の上昇の原因については、イオン強度の変化に伴うハイドロゲルの構造変化と酵素とOs錯体間の静電的相互作用の変化によると推察されているが、酵素の持つ特性によってイオンによる影響が異なっていることがわかった。



**Figure. 2-8-1:** Dependence of glucose oxidation current on anion concentration for redox hydrogel electrode in phosphate buffer with 0.2 M glucose, and with phosphate ion (open circle) or nitrate ion (solid circle), 0.1 M phosphate buffer pH7.0, 25°C, 0.2 M glucose, 2000 rpm

### 2-9 GOx 修飾ハイドロゲル電極の触媒電流値とカチオンホフマイスター系列

最後にカチオンの影響について検討した。2-6 と同様の実験を  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  の硫酸塩と塩化物塩を添加した溶液中にて、CV を観察した。Figure. 2-7-a と同様に 0.6 V における触媒電流値をプロットしたものが Figure. 2-9-g である。この3つのカチオンをホフマイスター系列に並べた場合、 $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+$  の順でコスモトロピック性が強い。触媒電流値は硫酸塩・塩化物塩の両方の場合において、 $\text{K}^+$  のカチオンがあるときに最も電流値が大きくなっているが、カチオン種による触媒電流値の差はアニオンのそれに比べると比較的小さい。なお塩化物塩と硫酸塩のいずれにおける実験の場合にも、再度基準溶液内での CV では触媒電流値が回復した。

イオン強度の観点からみると、0.5M の硫酸塩溶液のイオン強度は 1.5 であり、塩化物塩溶液は 0.5 でその差は 3 倍である。また  $\text{NH}_4^+$  の存在下にて電流値が最も小さくなるという傾向が硫酸塩・塩化物塩の両方に対して見られた。LMWA に則ると、GOx の活性中心はコスモトロピックなアニオンに分類されるカルボキシル基に囲まれていることから  $\text{Na}^+$  の方がより吸着しやすく、酵素の負電荷を下げることで電流値も減少すると考えられる。しかし、結果としては  $\text{NH}_4^+$  で最も電流値が小さく、 $\text{K}^+$  でピークとなるベル型の傾向にあった。この結果を考察するにあたり、分散力によるイオンの吸着についても考察する。カチオンの静的分極率はそれぞれ、 $\text{Na}^+ : 0.13 \text{ \AA}^3$ ,  $\text{K}^+ : 0.80 \text{ \AA}^3$ ,  $\text{NH}_4^+ : 1.28 \text{ \AA}^3$  である。カオトロピックイオンほど分極率が大きいことから、分散力による吸着の効果も大きくなる。つまり LMWA と分散力の2つの効果によってカチオンにおいてはベル型の結果が得られたと考えられる。同様の傾向を Carucci らも報告している [61]。彼らは、フェロセンメタノールと GOx を溶液中に溶解させ、グルコースの酸化還元電流に対するイオンの効果を調べた。カチオンについて同様のベル型の傾向が確認されている。

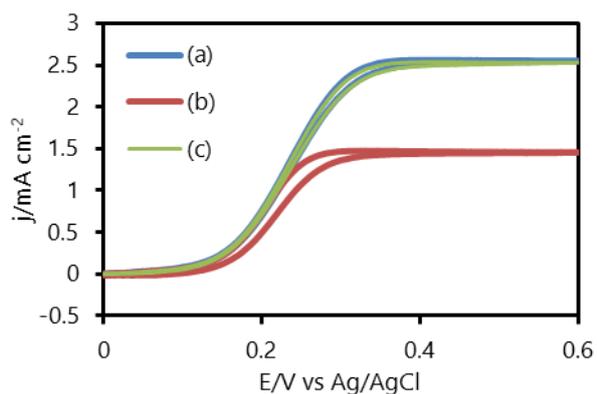


Figure 2-9-a

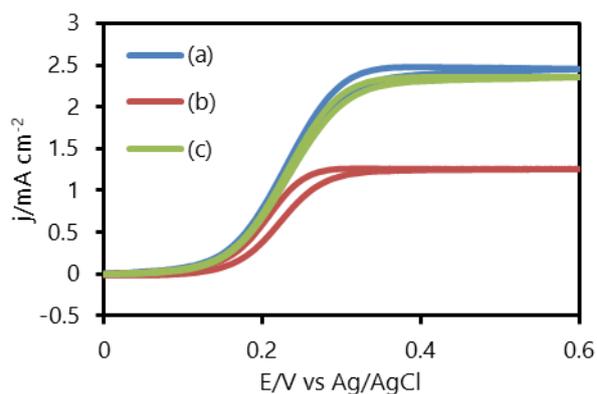


Figure 2-9-b

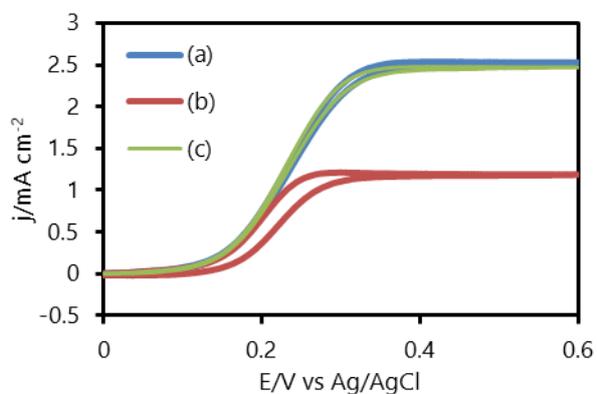


Figure 2-9-c

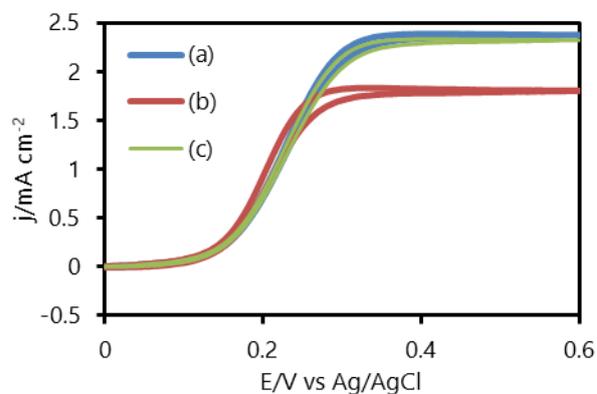


Figure 2-9-d

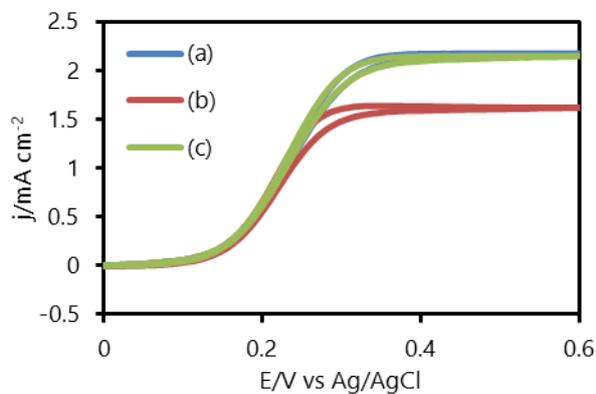


Figure 2-9-e

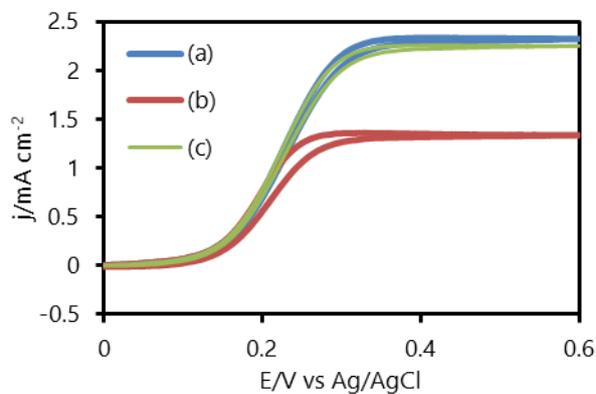


Figure 2-9-f

**added sodium salt**

Figure 2-9-a potassium chloride, Figure 2-9-b sodium chloride Figure 2-9-c ammonium chloride, Figure 2-9-d potassium sulphate, Figure 2-9-e sodium sulphate, Figure 2-9-f ammonium sulphate, (a), (c): 0.1 M phosphate buffer pH7.0, 25°C, 0.2 M glucose, scan rate 20 mV s<sup>-1</sup>, 2000 rpm, (b): 0.1 M phosphate buffer pH7.0, 25°C, 0.2 M glucose, 0.5 M sodium salt, scan rate 20 mV s<sup>-1</sup>, 2000 rpm

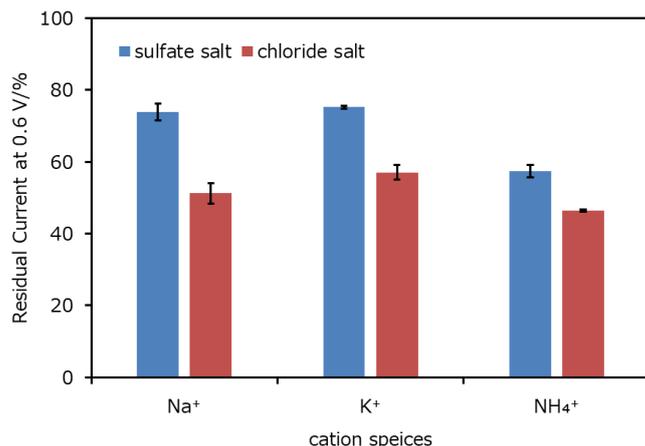


Figure 2-9-g: Dependence of glucose oxidation current on cation species in 0.5 M sulfate salts and chloride salts, 0.1 M phosphate buffer pH7.0, 25°C, 0.2 M glucose, 0.5 M sodium salt, 2000 rpm

### 2-10 結論

三次元構造のメソ孔を構築するため、泳導電着法に 38 nm のメソ孔を有する MgOC を電極表面に修飾した。作製した MgOC-E 上に GOx をハイドロゲル化法によりレドックスポリマー polymer I と共に固定化したところ、37°C の環境下で平板電極の約 13 倍である 60 mA cm<sup>-2</sup> のグルコース酸化触媒電流値が観察された。村田らの研究では、メソ孔が構築できないインク塗布法によって MgOC-E を作製した。その電極上に GOx をハイドロゲル化法により修飾した際は、25 °C の溶液中で 11.3 mA cm<sup>-2</sup> の触媒電流値を示した [30]。25 °C から 37 °C に温度を変えると酵素の触媒活性は約 2 倍になる。この温度差を考慮すると、泳導電着法による MgOC-E の触媒電流値はインク塗布法による電極の約 2.5 倍の触媒電流値を示したと考察できる。この泳導電着法による電極の触媒能力の高さは、電気泳導の際に形成されるマクロ孔による効率の良い物質輸送が効果的に働いているからである。メソ

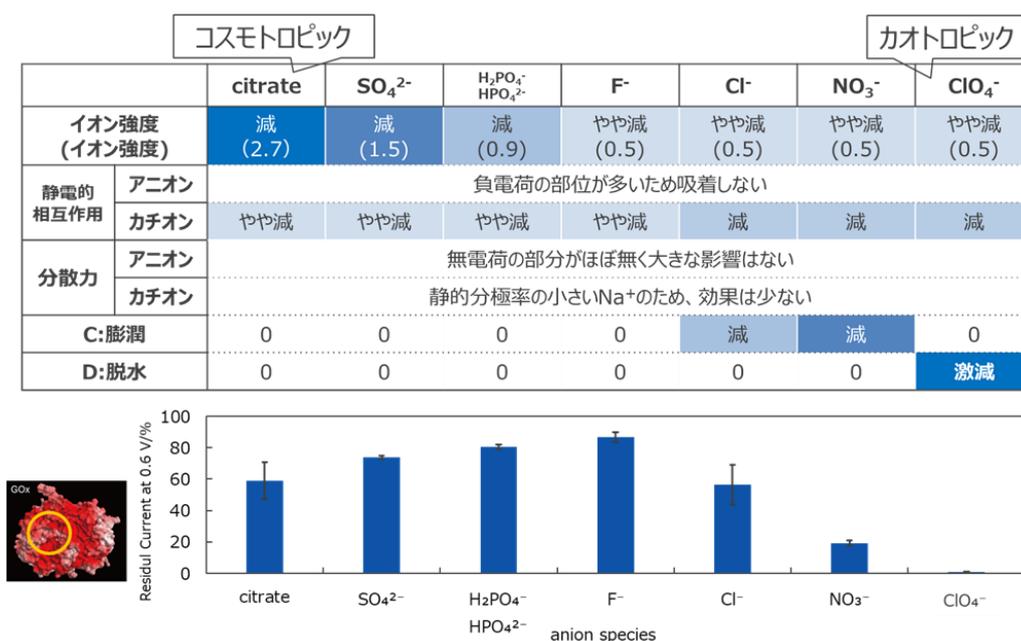


Figure 2-10 : Summary of ionic effect

孔を有する MgOC を足場とした電極の利用は、グルコース酸化電極の性能を大きく向上させた。さらに MgOC-E、GC-E に GO<sub>x</sub> とカタラーゼをハイドロゲル化法により固定化したところ、37°Cの静止溶液中においては初期電流値の約8割の電流を3日間連続で出力し続けることができた。さらなる安定性の向上には架橋剤比率の最適化や、他の固定化技術との組み合わせが必要になるだろう。

電解質として用いたアニオンはハイドロゲル電極の触媒電流値に大きく影響を与え、またその影響力の大きさはホフマイスター系列に則ることがわかった。これは

1. イオン強度による酵素・メディエータ間の静電的相互作用の減少
2. LWMA による静電的なイオンの吸着効果
3. カオトロピックアニオンがレドックスハイドロゲルの膨潤度を変化させる効果
4. ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>がハイドロゲルを脱水させる効果

の4つの相乗的な影響によることが示唆された。佐藤らの研究では適切な官能基を poly(4-vinyl phenol) のゲルに導入することによって、膨潤特性を変化させることに成功している [71]。本研究成果を元に、酵素の特性に応じ、特定の官能基の導入したレドックスポリマーの設計や、酵素・メディエータ間の相互作用を加味して電解質を選択することで、高イオン強度の環境においても影響を受けにくいグルコース酸化電極の開発や、ハイドロゲル電極の電流応答の向上が期待される。

第3章  
FAD-GDH を  
使用したハイドロゲル電極への  
溶存電解質の影響の解明

### 3-1 緒言

特定のイオンは、酵素の表面への吸着や、酵素の活性や耐熱性の向上を促す効果があることが報告されている。そのため、酵素修飾電極の電極応答にもたらずイオンの影響を調べることは非常に重要である。GOxを修飾したハイドロゲル電極に関しては、イオン強度の増加によって酵素・メディエータ間の静電引力が下がり電流値が減少した。またイオンの酵素への吸着やハイドロゲルの脱水・膨潤効果などにより、同じイオン強度であってもイオン毎の特性により触媒電流値にばらつきがあった。一方で d-FAD-GDH 修飾ハイドロゲル電極に関する報告では、リン酸緩衝液の濃度を 0.1M から 1M に増やすと触媒電流値が 2 倍になることが報告されている [10]。このように同じハイドロゲル電極でも、用いる酵素によってイオンによる影響が異なる。酵素種を変えることによって、イオンがハイドロゲル電極のどの部分に影響して触媒電流値を増減させているのかを調べることは、今後のハイドロゲル電極の高機能化に向けた構造設計の上で非常に重要な情報となる。

本研究ではホフマイスター系列に則り、溶存イオンと (d-)FAD-GDH 修飾ハイドロゲル電極の電気化学応答の関係性について調べた。

### 3-2 実験方法

#### 3-2-1 多孔質修飾電極の作製

第2章を参照

#### 3-2-2 ハイドロゲル修飾

酵素・メディエータ・架橋剤の重量比が 45:45:10 になるように FAD-GDH または d-FAD-GDH (from *Aspergillus terreus*, 池田糖化株式会社) 溶液 (25.2 mg ml<sup>-1</sup>)、レドックスポリマー [Os(bipyridine)<sub>2</sub>Cl] が付加した PVI (E°' = +0.23 V vs Ag/AgCl) (PVI-Os, 6 mg ml<sup>-1</sup>) を混合した。その後 poly(ethylene glycol) diglycidyl ether (PEGDGE, molecular weight 500, 8 mg ml<sup>-1</sup>) を酵素・レドックスポリマー混合溶液に加えた。このハイドロゲル混合溶液を GC-E または MgOC-E 上に滴下した。ハイドロゲル混合溶液修飾の後、電極を 4°C 18 時間の条件で乾燥させ、ゲル化を行った。

#### 3-3 (d)FAD-GDH ハイドロゲル電極に対するアニオンの影響

実験方法は第3章と同様である。Figure 3-3-a(a)は FAD-GDH をハイドロゲル化法により GC-E に修飾し、25°Cの基準溶液 (0.1 M リン酸バッファー pH 7.0, 0.2 M グルコース) 中にて 2000 rpm で回転させ測定したものである。1.5 mA cm<sup>-2</sup> の触媒電流が得られている。次にこの電極を基準溶液中に 0.5M クエン酸ナトリウムを加え、pH を 7.0 に調整した溶液中で測定したものが Figure 3-3-a(b) である。Figure 3-3-a(a)に比べ、触媒電流値の低下が観察された。本実験の触媒電流は安定であり、経時的な電極の劣化を観察しているということではない。最後にもう一度基準溶液中で CV 測定を行った (Figure 3-3-a(c)) ところ、触媒電流値はほぼ元通りになった。同様の実験を硫酸ナトリウム塩 (Figure 3-3-b)、リン酸ナトリウム塩 (Figure 3-3-c)、フッ素ナトリウムイオン (Figure 3-3-d)、塩化ナトリウム塩 (Figure. 3-3-e)、硝酸ナトリウム塩 (Figure 3-3-f)、過塩素酸ナトリウム塩 (Figure 3-3-g) に対しても行った。どの塩を用いた場合においても (c) のリン酸緩衝液にふたたび電極を戻して CV を測定すると、触媒電流値はほぼ (a) の測定結果と同等の触媒電流値まで回復することがわかった。

### 第3章 FAD-GDH ハイドロゲル電極

同様の実験を d-FAD-GDH 修飾電極に対して行った結果が Figure 3-3-h-n に示されている。これらの結果から、第3章の GOx 修飾ハイドロゲル電極の場合と同様、各ナトリウム塩存在下における触媒電流値の変化は不可逆的な酵素の変性や失活ではなく、ハイドロゲル内部の可逆的な構造変化によるものであることが強く示唆される。Figure. 4-3-o, p には、様々なアニオンのナトリウム塩溶液中で測定した CV をまとめた。この実験結果から GOx 修飾レドックスハイドロゲル電極の実験結果同様、測定溶液中に加える塩の種類によって触媒電流値に差が出ることが分かった。

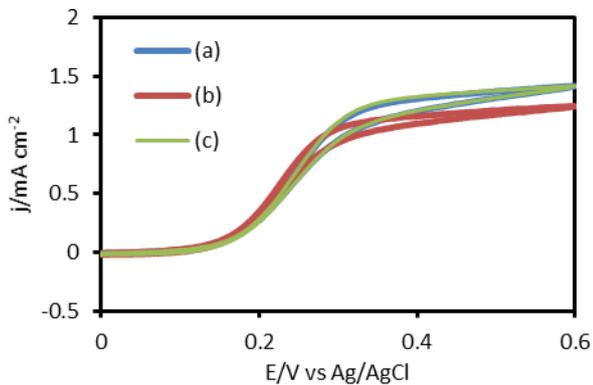


Figure 3-3-a

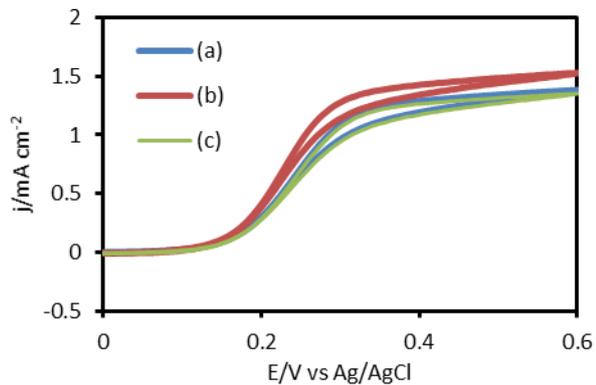


Figure 3-3-b

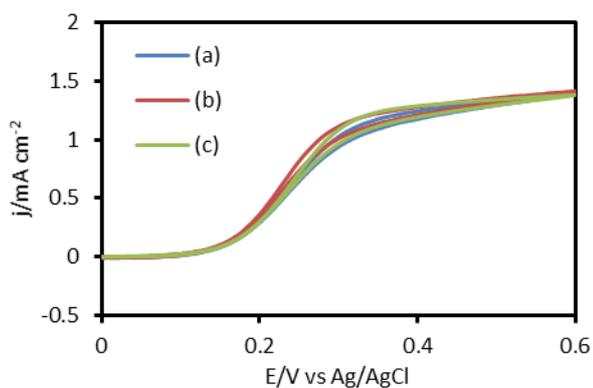


Figure 3-3-c

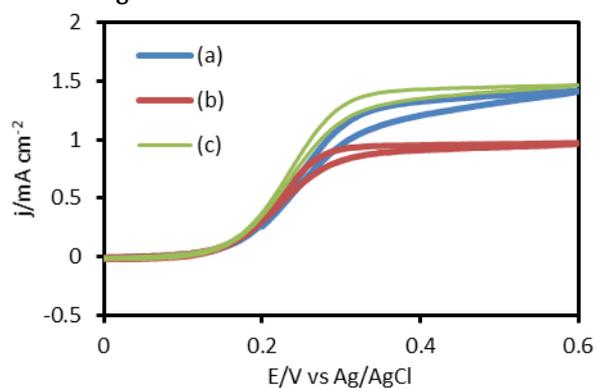


Figure 3-3-d

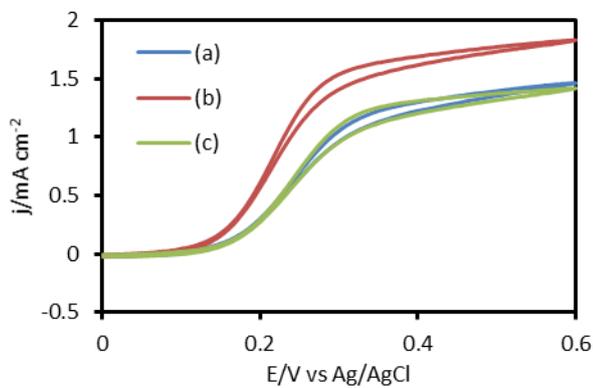


Figure 3-3-e

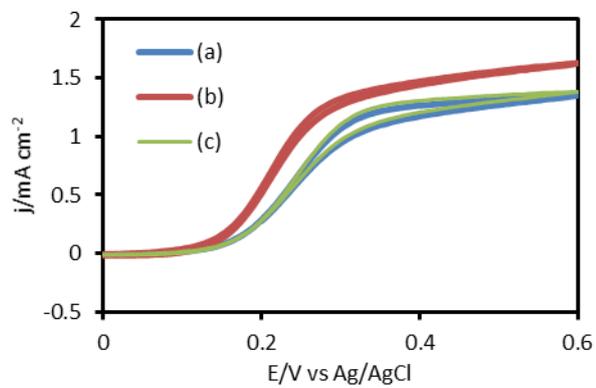


Figure 3-3-f

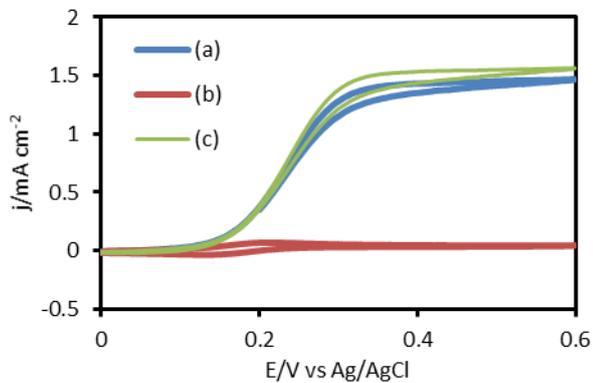


Figure 3-3-g

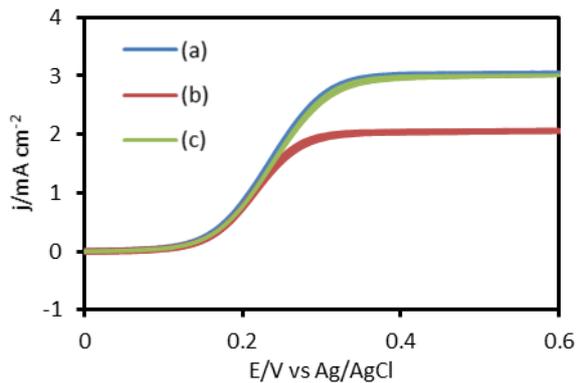


Figure 3-3-h

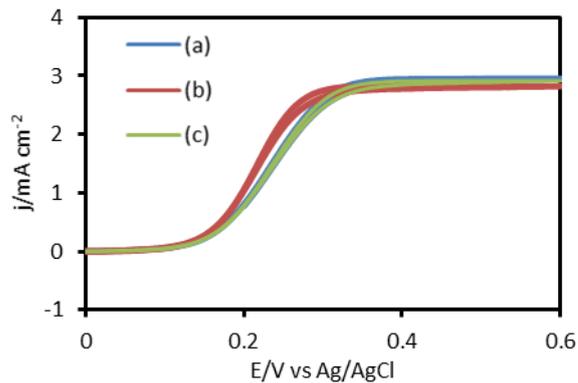


Figure 3-3-i

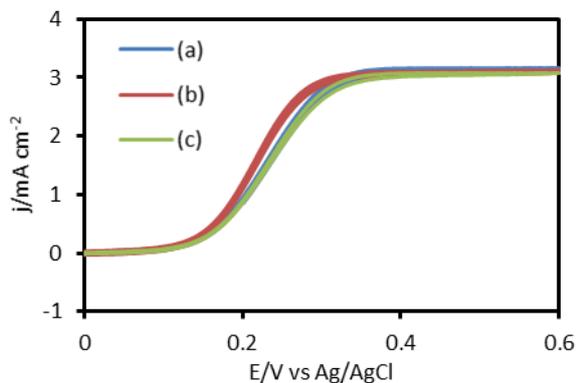


Figure 3-3-j

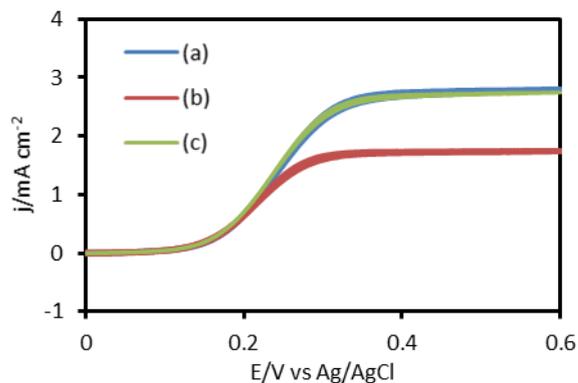


Figure 3-3-k

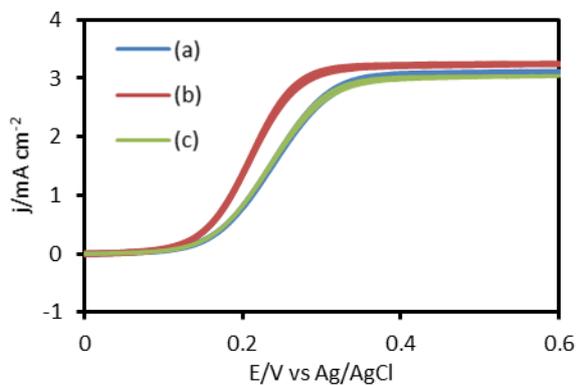


Figure 3-3-l

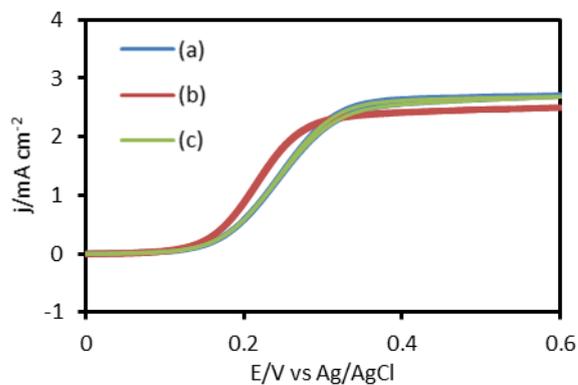


Figure 3-3-m

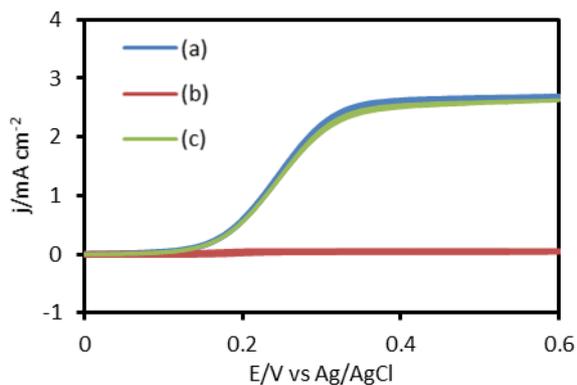


Figure 3-3-n

**added sodium salt**

Figure 3-3-a, h: sodium citrate

Figure 3-3-b, i: sodium sulphate

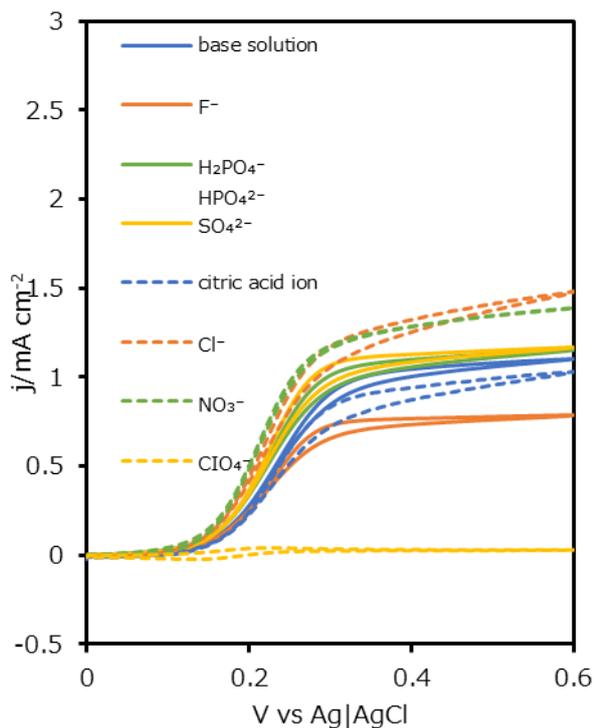
Figure 3-3-c, j: sodium phosphate

Figure 3-3-d, k: sodium fluoride

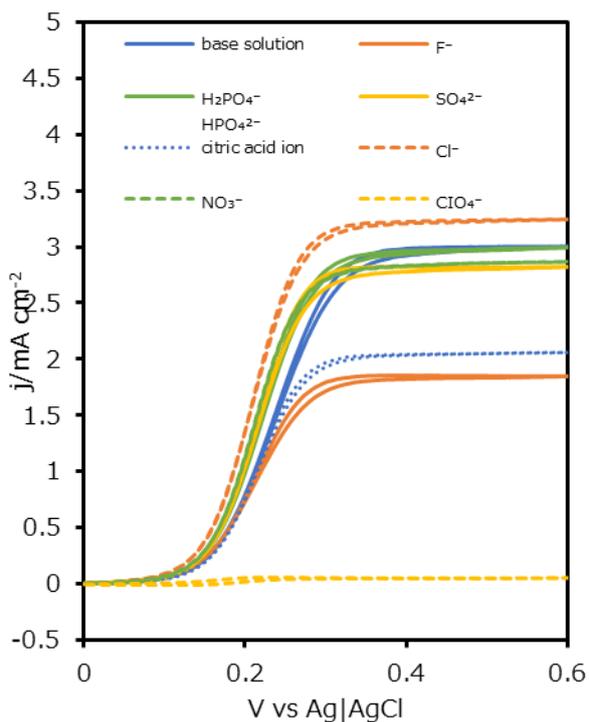
Figure 3-3-e, l: sodium chloride

Figure 3-3-f, m: sodium nitrate

Figure 3-3-g, n: sodium perchlorate



**Figure 3-3-o:** CV of (b) from Figure. 3-3-a, b, c, d, e, f, g (hydrogel electrode with FAD-GDH)



**Figure 3-3-p:** CV of (b) from Figure. 3-3-h, i, j, k, l, m, n (hydrogel electrode with d-FAD-GDH)

**Figure 3-3:** CV results for glucose oxidation performed sequentially on the same electrode: (a) without salt, (b) with 0.5 M sodium salt, and (c) without salt, d-FAD-GDH, GC-E, loading  $600 \mu\text{g cm}^{-2}$ , FAD-GDH for Figure.3-3-a-g, d-FAD-GDH for Figure. 3-3-h-n, (a)(c):0.1 M phosphate buffer pH7.0, 25°C, 0.2 M glucose, scan rate  $20 \text{ mV s}^{-1}$ , 2000 rpm, (b):0.1 M phosphate buffer pH7.0, 25°C, 0.2 M glucose, 0.5 M sodium salt, scan rate  $20 \text{ mV s}^{-1}$ , 2000 rpm

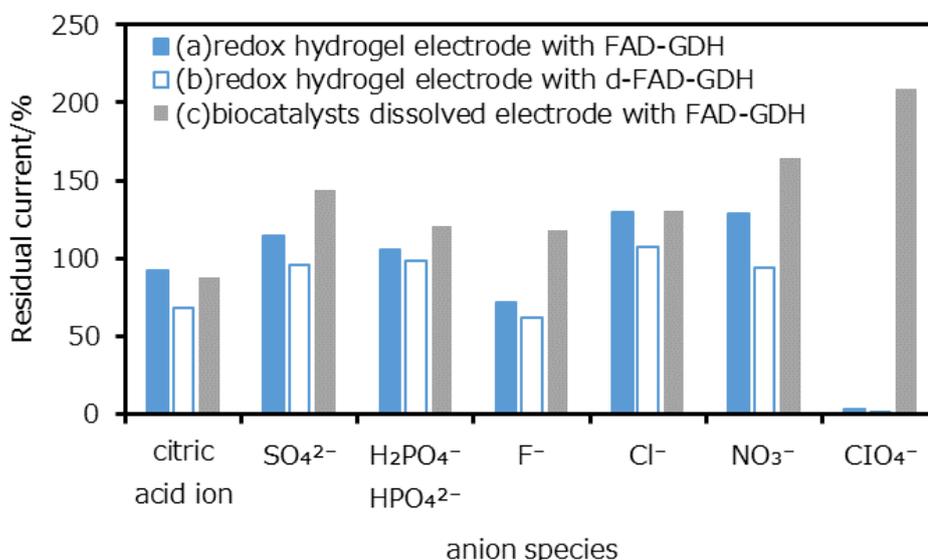
### 3-4 (d)FAD-GDH 修飾ハイドロゲル電極の触媒電流値とホフマイスター系列

Figure 3-4-a に Figure 3-3 の 0.6V における触媒電流値を、アニオンのホフマイスター系列順 [60] [45]に並べた。残余電流値は  $([(b)0.6 \text{ V}$  における各ナトリウム塩溶液中の触媒電流値]/[(a)0.6 V における基準溶液中の触媒電流値]  $\times 100)$ とした。

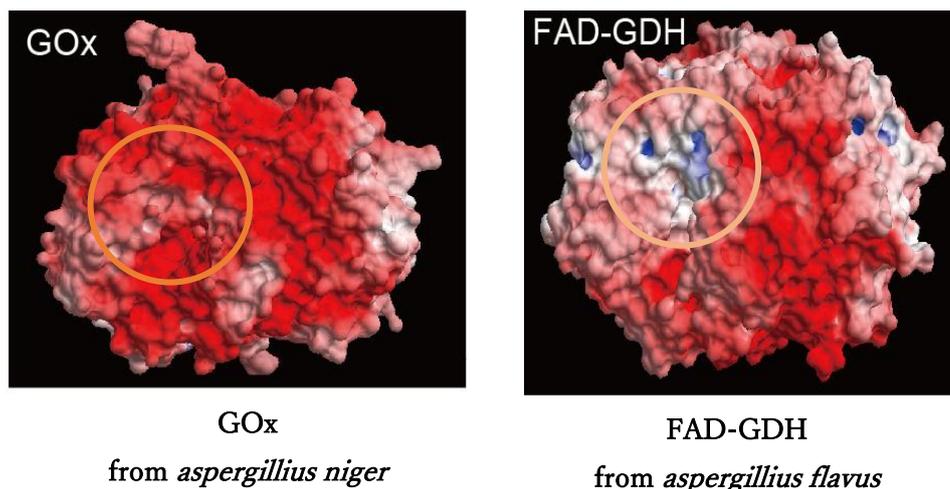
特筆すべきは FAD-GDH または d-FAD-GDH 修飾ハイドロゲル電極の場合は、触媒電流値を増加させるイオン種が存在することである。この傾向は  $\text{GO}_x$  存在下においては見られなかった。第2章において、 $\text{GO}_x$  修飾電極に対する溶存アニオンの影響は主に以下の4つの観点から考察した。

1. イオン強度が高いほど、酵素・メディエータ間の静電相互作用を弱め触媒電流値を減少させる効果
2. LWMA に則った静電的なイオンの吸着と分散力によるイオン吸着による酵素・メディエータの静電的相互作用の変化による触媒電流値の減少
3. カオトロピックイオンほど膨潤を促し触媒電流値を減少させる効果
4.  $\text{ClO}_4^-$  存在下におけるハイドロゲルの脱水による触媒電流値の減少

最初に1.について多価イオンであるクエン酸イオン,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  &  $\text{HPO}_4^{2-}$  と  $\text{F}^-$  について考察する。 $\text{GO}_x$  修飾電極ではこれらのイオンの存在下ではイオン強度が高いほど触媒電流値が小さくなったが、(d-)FAD-GDH 修飾電極では  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  &  $\text{HPO}_4^{2-}$ 、クエン酸イオン、 $\text{F}^-$  の順で触媒電流値が大きいベル型を示した。これはイオン強度と2.の分散力によるイオンの吸着の2つの効果から説明できる。 $\text{GO}_x$  の場合と同様、イオン強度はクエン酸イオン,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  &  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{F}^-$  の順で大きくなり、電流値はイオン強度が大きくなるほど小さくなる。一方分散力の観点で見ると、コスモトロピック寄りのイオンほど静的分極率が大きいため、分散力によってイオンが吸着し酵素の負電荷を強める効果がある。この [イオン強度の影響による触媒電流値の減少] と [分散力によるイオン吸着による電流値の増加] の



**Figure 3-4-a:** Effects of various 0.5 M sodium salts on glucose oxidation currents at 0.6 V, (a)(b): FAD-GDH or d-FAD-GDH-hydrogel modified electrode, 0.1 M phosphate buffer pH7.0, 25°C, 0.2 M glucose, 0.5 M sodium salt, 2000 rpm, (c): 0.5 uM FAD-GDG, 50 uM complex monomer ( $[\text{Os}(\text{bipyridine})_2(\text{imidazole})\text{Cl}]^{1+/2+}$ ), 0.2 M glucose, 0rpm, 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, 25°C, 0.5 M sodium salt



**Figure 3-4-b:** Three-dimensional rendering of redox enzymes (left: FAD-GDH, right: GOx) relevant to the present study, indicating surface charge distribution. Red indicates negative charge, blue indicates positive charge, and white indicates no charge. Rendering software: CueMol 2 ver 2.2.3.443.

2つの効果により、ベル型の傾向が見られたと考えられる。

$\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ に関してはGOx修飾電極ではコスモトロピックイオンほど残存電流値が大きかったが、(d-)FAD-GDH修飾電極ではカオトロピックイオンほど触媒電流値が大きく、逆の傾向が見えた。Figure 3-4-bに *aspergillus flavus* 由来のFAD-GDHの三次元構造における表面電荷を示す。 $-0.78\text{ mV}$ 以下の範囲は赤く、 $+0.78\text{ mV}$ 以上の範囲は青く、 $\pm 0.78\text{ mV}$ 以内の範囲は白く示した。なお本研究で使用した酵素は *aspergillus terreus* 由来であるが、構造としては *aspergillus flavus* 由来と約70%が類似していると報告されている。Figure 3-4-bにて活性中心付近を○で示しており、正に帯電または無電荷であることが分かる。タンパク質の正電荷部位はアミノ基によるものであり、ホフマイスター系列ではカオトロピックに分類される。LMWAの観点からカオトロピックカチオンにはカオトロピックアニオンが吸着しやすいため、(d-)FAD-GDHの活性部位付近にはカオトロピックアニオンほど吸着する傾向にあると考えられる。活性中心付近に  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ といったカオトロピックアニオンが吸着することで負電荷が向上し、(d-)FAD-GDHの活性部位とメディエータの反応性を向上させ、結果的に電流値が増加したと考えられる。またGOxの際と同様に、分散相互作用についても考慮する必要がある。本実験で利用したアニオンの静的分極率はコスモトロピックまたはカオトロピックに寄るほど静的分極率が大きくなり、コスモトロピック・カオトロピックの境目となるF<sup>-</sup>ほど小さくなる。この傾向は(d-)FAD-GDHのイオン存在下における電流値の傾向と似ている。FAD-GDHは活性部位周辺が中性または正電荷のため、アニオンが吸着することで酵素の負電荷が大きくなり、Os錯体との静電的な相互作用が高まったと考えられる。一方で静的分極率の大きいクエン酸イオン存在下においては、触媒電流値が大きくならなかった。これは、クエン酸イオンは他のイオンに比べても分子サイズが大きいことから、過剰な吸着によりグルコースやOs錯体が酵素の活性部位への接触を阻害したことが理由と考えられる。

3. のカオトロピックイオンによる膨潤による電流値の減少の効果は(d-)FAD-GDHについては確認されなかった。これはカオトロピックアニオンの吸着による触媒電流値の増加の影響が大きく、膨潤による電流値の減少の影響が打ち消されたためと考えられる。

最後に4.  $\text{ClO}_4^-$ 存在下におけるハイドロゲルの脱水による触媒電流値の減少について報告する。 $\text{ClO}_4^-$

### 第3章 FAD-GDH ハイドロゲル電極

4- は第2章にてホフマイスター系列に則らず、極度の脱水作用を示すことから膜内の物質輸送が制限され触媒電流値が減少したと考察されている。(d-)FAD-GDH 修飾電極に関しても、同様の電流値が極端に減少する傾向が見られた。

d-FAD-GDH に関しては、イオンによる触媒電流値の増加効果が FAD-GDH と比較して小さかった。これは糖鎖との特異的なイオンの吸着や水分子の吸着が深く関係していると考えられる。

最後に溶存系とハイドロゲル系について比較を行う。(c)に FAD-GDH と Os 錯体が溶存した溶液中で同様の評価を行ったところ、クエン酸溶液中以外では電流値が増加する傾向にあり、特に  $\text{ClO}_4^-$  については触媒電流値が基準溶液中に比べ2倍近くの数値となった。ハイドロゲル電極においては  $\text{ClO}_4^-$  存在下での触媒電流値はほぼ確認されていないことから、 $\text{ClO}_4^-$  はイオンとしては吸着することで酵素・メディエータの静電的相互作用を向上させるが、ハイドロゲル膜の脱水によりグルコース等の輸送を遮断している可能性がある。そのほかのイオンにおいては、FAD-GDH 修飾ハイドロゲル電極と同じ傾向にあるが、イオン存在下における電流値の増加の傾向は溶存系の方が大きい。これは溶存系の方がイオンの吸着による酵素・メディエータの静電的相互作用の増加効果がより顕著に表れているからだと考えられる。

#### 3-5 FAD-GDH 修飾ハイドロゲル平板電極の長期安定性評価

長期安定性におけるイオンの効果について報告する。Figure 3-5-a に d-FAD-GDH 修飾ハイドロゲル電極の 0.6 V における連続電流応答を示した。電極には GC-E を用いた。初期電流値は 0.1 M リン酸緩衝液中で  $2.3 \pm 0.4 \text{ mA cm}^{-2}$ 、1 M リン酸緩衝液中で  $2.2 \pm 0.1 \text{ mA cm}^{-2}$  を示した。連続測定 3 日後の電極応答は 0.1 M リン酸緩衝液中にて  $3.2 \pm 3\%$  まで減少したが、1 M リン酸緩衝液中では  $41 \pm 7\%$  を維持した。FAD-GDH は酵素活性が高い一方、耐熱性が低い。そのため、 $37^\circ\text{C}$  の環境における安定性は非常に低い結果となった。酵素電極の安定性の低下原因は

1. レドックスポリマーの脱離
2. 酵素の失活
3. 酵素の電極表面からの脱離

の3つが考えられる。

まずレドックスポリマーの脱離について考える。Figure 3-5-c, d に各3日間の連続測定前後のレドックスポリマーのピーク面積を比較した。1 M リン酸濃緩衝液中での測定前後と 0.1 M リン酸濃緩衝液中での測定前後ではレドックスポリマーの脱離度合いに大きな差がないことが分かる。この結果からリン酸緩衝液の濃度はレドックスポリマーの脱離度合いに対しては影響を示さないことが分かった。

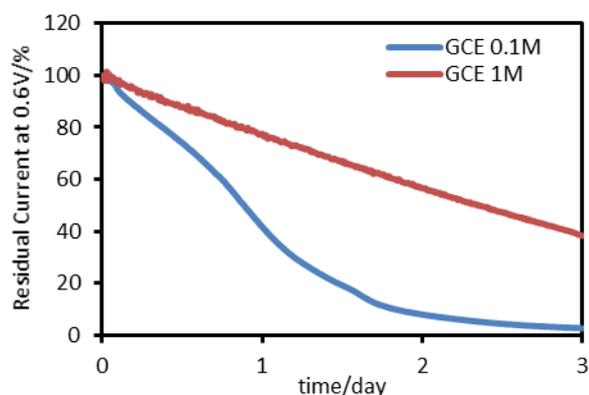
次に酵素自身の失活について考える。ホフマイスター系列に則った酵素活性の研究によると、酵素の構造を安定させるコスモトロピックイオンほど酵素の安定性を上げることが報告されている [60] [45]。これはコスモトロピックイオンが水との親和性が高くタンパク質の表面から水を取り除くことで疎水性を上げ、タンパク質と溶液が接する表面積を減らすためである。リン酸緩衝液に含まれる  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{PO}_4^{2-}$  はホフマイスター系列のコスモトロピックイオンに分類されるため、濃度が高い環境の中では酵素の安定化効果が強まり、d-FAD-GDH 電極は比較的高い安定性を示したと考えられる。

最後に酵素の表面からの脱離について考える。コスモトロピックイオンは酵素自身の安定化と同時にハイドロゲルの収縮を促すことが報告されている [70]。FAD-GDH はモノマーであるため、分子サイ

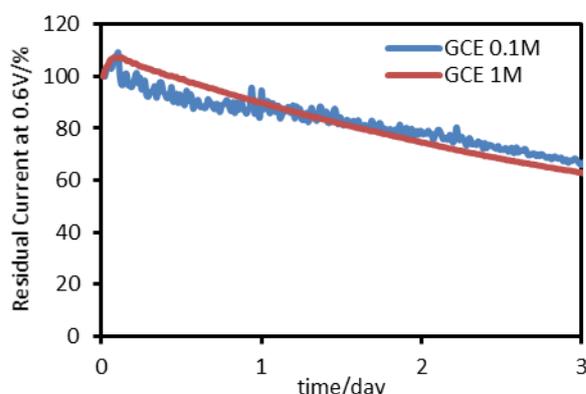
### 第3章 FAD-GDH ハイドロゲル電極

ズが小さくレドックスハイドロゲル膜の網目構造内に保持されることが難しい。しかし、コスモトロピックイオン存在下では膜が収縮し網目構造がより密になることで、酵素が脱離しにくいハイドロゲル構造に変化した可能性が考えられる。

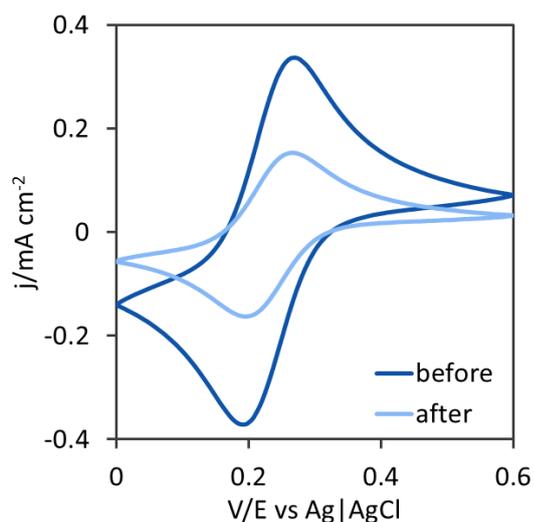
同様の長期安定性の実験を GOx に対して行った結果が Figure 3-5-b である。各電極の初期電流値は 0.1 M リン酸緩衝液中で  $1.6 \pm 0.1 \text{ mA cm}^{-2}$ 、1M リン酸緩衝液中で  $2.1 \pm 0.1 \text{ mA cm}^{-2}$  を示した。連続測定 3 日後の電極応答は 0.1 M リン酸緩衝液中において  $66 \pm 8 \%$ 、1 M リン酸緩衝液中では  $53 \pm 9 \%$  となった。GOx は比較的耐熱性が高いため、0.1 M のリン酸緩衝液中でも安定した電流応答を示した。GOx の場合は第 2 章で報告した通り、酸素の還元反応により生成した過酸化水素の影響を受けている可能性がある。第 2 章の結果と同様、過酸化水素を取り除くカタラーゼを導入することでさらなる安定性の向上が期待できる。d-FAD-GDH を用いた場合はリン酸濃度の向上により安定性が向上したが、



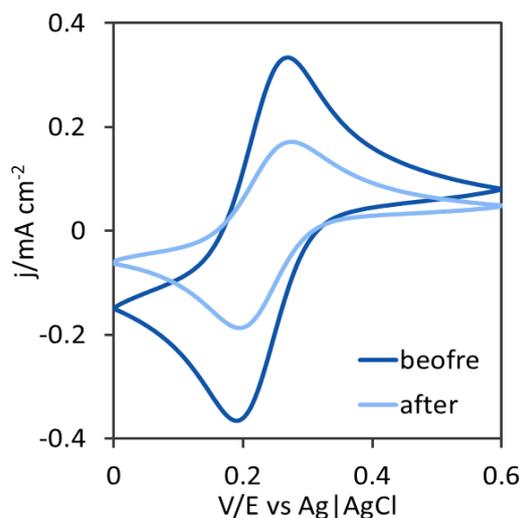
**Figure 3-5-a:** Three days of continuous current response at 0.6 V for hydrogel containing d-FAD-GDH/GC-E in 0.1 or 1 M phosphate buffer pH7.0 at 37°C, 0.1 M glucose



**Figure 3-5-b:** Three days of continuous current response at 0.6 V for hydrogel containing GOx/GC-E in 0.1 or 1 M phosphate buffer at 37°C, 0.1 M glucose



**Figure 3-5-c:** 0.1M phosphate buffer



**Figure 3-5-d:** 1 M phosphate buffer

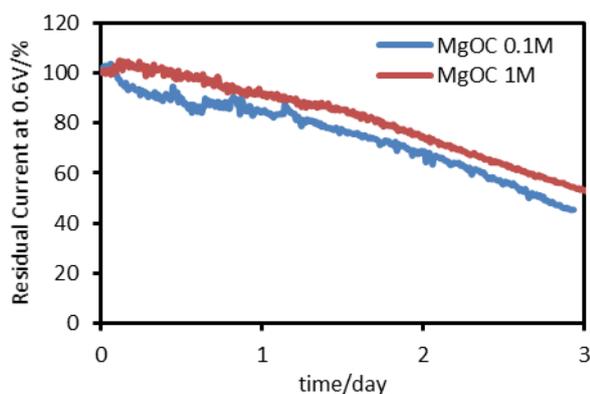
Os redox responses in 25 °C 0.1 M phosphate buffer before and after three days of continuous current response at 0.6 V for hydrogel containing d-FAD-GDH/GC-E in 0.1M (Figure 3-5-c) or 1 M phosphate buffer (Figure 3-5-d), 37°C, 0.1 M glucose

### 第3章 FAD-GDH ハイドロゲル電極

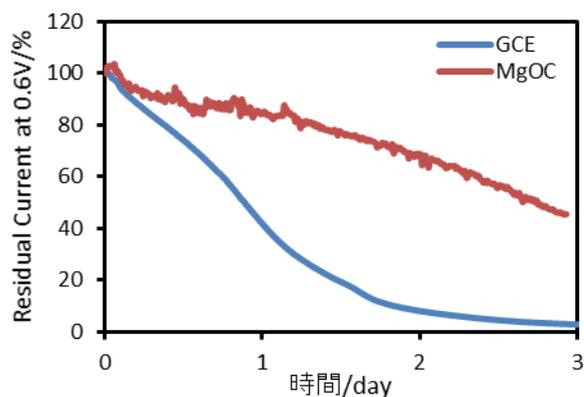
GOx の場合は安定性に大きな変化はなかった。用いる酵素の種類によってこの塩による安定性への効果は大きく異なる様である。GOx で安定性向上効果が見られなかった原因として、一つに酵素の耐熱性が挙げられる。コスモトロピックイオン存在下で、熱耐性が向上することが報告されているが、GOx は FAD-GDH に比べ高い熱耐性を有するため、イオンによる効果を十分に発揮することはできなかった可能性がある。また酵素の脱離に関しては、酵素の分子サイズの違いが考えられる。GOx はダイマーであるため、分子サイズは FAD-GDH よりも大きい。そのため、GOx はハイドロゲルの収縮の有無に関わらず、網目構造内に酵素が十分に固定されていたのではないかと考えられる。

#### 3-6 FAD-GDH 修飾ハイドロゲル多孔質電極の長期安定性評価

Figure 3-6-a に d-FAD-GDH をハイドロゲル化によって修飾した MgOC-E の連続電流応答を示す。各電極の初期電流値は 0.1 M リン酸緩衝液中で  $4.7 \pm 0.4 \text{ mA cm}^{-2}$ 、1M リン酸緩衝液中で  $5.6 \pm 0.3 \text{ mA cm}^{-2}$  を示した。連続測定 3 日後の電極応答は 0.1 M リン酸緩衝液中において  $44 \pm 10 \%$ 、1M リン酸緩衝液中では  $59 \pm 12 \%$  となった。MgOC-E 上でも、1 M リン酸緩衝液中において高い安定性を示した。また FAD-GDH を使用した場合、リン酸緩衝液濃度の増加に依存して触媒電流値が増えることは既に報告されており [10]、本研究結果とも一致している。Figure. 3-6-b に MgOC-E 上と GC-E 上のそれぞれに d-FAD-GDH を修飾した際の連続電極応答の比較を示した。電極を GC-E から MgOC-E に変えることで安定性が大幅に改善されたことが分かる。既に辻村らによって 25°C における d-FAD-GDH を修飾した MgOC-E と GC-E の長期安定性については報告されている [10]。連続測定 2 日目で GC-E は初期電流値の 80 % 以下となった一方で、MgOC-E は 7 日間初期電流値の 80 % 程度の触媒電流値を維持した。この結果より、多孔質炭素材料の導入が酵素の脱離を防いでいることがわかる [10]。同様の多孔質電極による安定化効果が 37°C の環境でも確認された。



**Figure 3-6-a:** Three days of continuous current response at 0.6 V for hydrogel containing d-FAD-GDH/MgOC-E in 0.1 or 1 M phosphate buffer, 37°C, 0.1 M glucose



**Figure 3-6-b:** Three days of continuous current response at 0.6 V for hydrogel containing d-FAD-GDH/GC-E or MgOC-E in 0.1M phosphate buffer pH7.0 at 37°C, 0.1 M glucose

3-7 結論

(d-)FAD-GDH 修飾ハイドロゲル電極においては、溶存イオンの種類によって触媒電流値の増減が確認された。コスモトロピックアニオン存在下においては、多価イオンにより触媒電流値は下がる傾向にはあるが、静的分極率の高いイオンの吸着によって密な膜が形成し、結果的に電流値が増加したと考えられる。またカオトロピックイオン存在下では、LMWA による酵素へのイオン吸着によって酵素の負電荷が増大し、酵素・メディエータ間の静電的相互作用が向上することで、電流値の増加が確認できたと考えられる。ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>については GO<sub>x</sub> 電極の際と同様、ハイドロゲル系に置いては極度の脱水作用によって触媒電流値が観測されなかったが、溶存系の実験結果から酵素表面への吸着効果は高いことが分かった。

長期測定においては FAD-GDH は H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>により安定化され、また脱水効果によって形成された密なハイドロゲル膜によって FAD-GDH の脱離が防がれたと考えられる。イオンとグルコース酸化電極の触媒電流値の関係性を調べることは、生体外で利用する BFC の適切な電解質を選択する際に非常に重要である。一方生体埋め込みデバイスを想定した際には、電解質としてのイオンの選択やイオン濃度の調整は実用的な方法ではない。しかし本研究結果を元に、酵素・メディエータ間の相互作用を調整しつつレドックスポリマーの構造や酵素表面を設計することは、生体環境下における長期測定に耐えるハイドロゲルの構造設計に役立つはずである。

		コスモトロピック				カオトロピック		
		citrate	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
イオン強度 (イオン強度)		減 (2.7)	減 (1.5)	減 (0.9)	やや減 (0.5)	やや減 (0.5)	やや減 (0.5)	やや減 (0.5)
静電的 相互作用	アニオン	0	0	0	0	増	増	増
	カチオン	活性部位周辺が正電荷・無電荷のため吸着しない						
分散力	アニオン	増 (16.05)	増 (6.13~6.85)	増 (5.47)	ほぼ0 (1.22)	増 (4.22)	増 (4.01)	増 (4.79)
	カチオン	静的分極率の小さいNa <sup>+</sup> のため、効果は少ない						
膨潤		0	0	0	0	減	減	0
脱水		0	0	0	0	0	0	激減

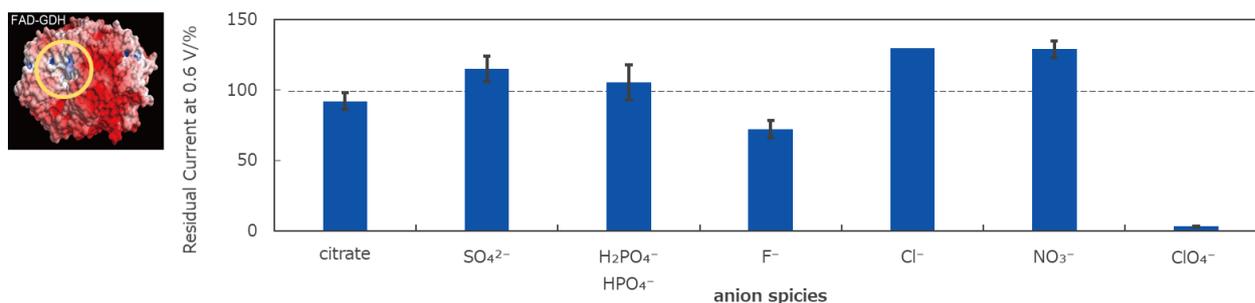


Figure 3-7: Summary of ionic effect

## 第4章

# 低い酸化還元電位を有する レドックスポリマーを用いた グルコース酸化電極の作製

### 4-1 緒言

本研究では直径 38 nm の MgOC を酵素電極の足場として用いることによって、レドックスハイドロゲル電極の高出力化・安定化を図ってきた。部分的にクォーターナイズされたレドックスポリマー、 $[\text{Os}(\text{bipyridine})_2\text{Cl}]$  が付加した PVI (polymer I,  $E^\circ = +0.23 \text{ V vs. Ag|AgCl}$ ) ・GOx ・架橋剤によって構成されたレドックスハイドロゲル電極は、泳導電着法により作製した MgOC-E 上で 37 °C の条件下で  $60 \text{ mA cm}^{-2}$  の高出力を達成した [75]。この polymer I はその他の炭素材料上でも多く研究されてきたが [76] [77] [78]、その他の多孔質炭素電極と比較すると MgOC-E の階層構造は高電流密度化という点で効果的であることが証明されている。GOx 修飾 MgOC-E は、同量の酵素を修飾した GC-E の約 12 倍の触媒電流値を出力した。polymer I は酸化還元電位が高く、酵素の活性中心である FAD からの電子移動速度は速い。そのため酵素からメディエータへの電子移動は律速段階となることはなく、MgOC を用いた電極の階層構造を評価するために用いてきた。一方で、polymer I は、酸化還元電位が高いため、BFC のアノードや血糖センサーへの実用化は現実的ではない。BFC として応用するためには出力パラメータとなる起電力を向上するためにアノードの反応電位を下げる必要があり、血糖センサーとしての応用の際にもサンプル中に共存するアスコルビン酸などの電気化学酸化が起こらない低い反応電位が必須となる。しかし印加電位が  $-0.07 \text{ V vs. Ag|AgCl}$  以下になると酸素の還元が起こり、過酸化水素が生成されてしまうため、適切な酸化還元電位を有するレドックスポリマーを選択することが重要である。

本研究では polymer II として  $-0.03 \text{ V vs. Ag|AgCl}$  に酸化還元電位を有する  $\text{Os}(1,1'\text{-dimethyl-2,2'\text{-bimidazole})_2\text{-2-[6-methylpyridid-2-yl]imidazole})^{2+/3+}$  が付加した PVP [54] [8] [79] を用いた。polymer II は Os 錯体とポリマー主鎖を結ぶ炭素鎖が長いため、酸化還元電位が低いながらも拡散係数が大きく高電流密度化が期待できる点が長所である。既報の研究において、GC-E 上に GOx と polymer II を含む  $200 \mu\text{g cm}^{-2}$  のハイドロゲルを修飾した際には 37°C の環境で  $2.5 \text{ mA cm}^{-2}$  の触媒電流値を示している [54]。さらに大きな触媒電流密度を達成するために、多孔質電極材料として KB をレドックスハイドロゲル修飾足場として用いた研究報告もある [54]。しかしながら、この KB 修飾電極の触媒電流値は GC-E のたった 3 倍程度であった。KB が酵素およびレドックスポリマーの浸透を妨げ、グルコースの拡散を遮断したことが、この非効率性の原因だと考えられる。本研究においては第 2 章でも使用した泳導電着法により作製した MgOC-E 上に polymer II と GOx を修飾し、低い反応電位でも高い触媒電流値を達成できるグルコース酸化電極の作製を試みた。

## 第4章 低電位レドックスポリマー

### 4-2 実験方法

#### 4-2-1 多孔質修飾電極の作製

第2章を参照

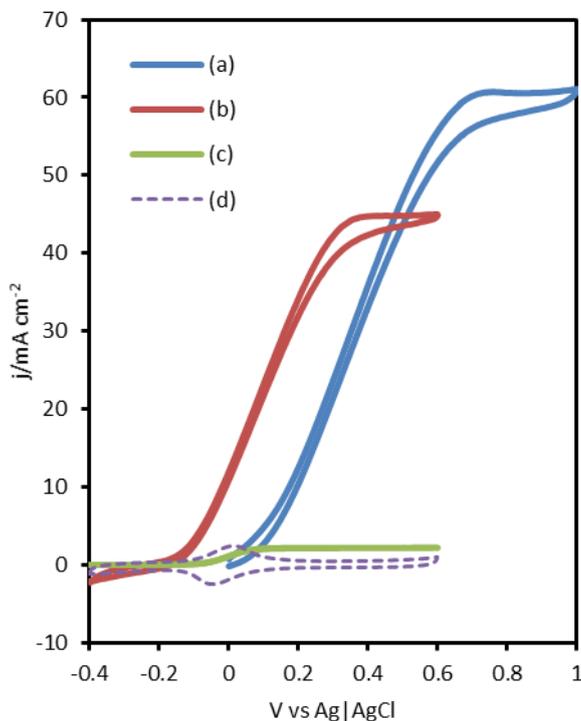
#### 4-2-2 ハイドロゲル修飾

酵素・レドックスポリマーの重量比が 1:1 になるように混ぜた。酵素には GOx (from *Aspergillus niger*, 和光純薬株式会社) 溶液(40 mg ml<sup>-1</sup>)または FAD-GDH (from *Aspergillus terreus*, 池田糖化株式会社) 溶液(25.2 mg ml<sup>-1</sup>)を用いた。レドックスポリマーには [Os(bipyridine)<sub>2</sub>Cl] が付加した PVI (E°' = +0.23 V vs Ag|AgCl) (polymer I, 6 mg ml<sup>-1</sup>)、Os(1,1'-dimethyl-2,2'-biimidazole)<sub>2</sub>-2-[6-methylpyrid-2-yl]imidazole)<sup>2+/3+</sup> が付加した PVP (E°' = -0.03 V vs. Ag|AgCl) (polymer II, 8 mg ml<sup>-1</sup>)、[Os(dmbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] が付加した PVI (E°' = 0.1 V vs. Ag|AgCl, polymer III, 3 mg ml<sup>-1</sup>) の 3 種類を用いた。その後 poly(ethylene glycol) diglycidyl ether (PEGDGE, molecular weight 500, 8 mg ml<sup>-1</sup>) を GOx・レドックスポリマー混合溶液に加えた。架橋剤の重量は各実験によって合計ハイドロゲル担持量の 10、15、20、30% とした。投影面積当たり 1000 μg cm<sup>-2</sup> となるようにハイドロゲル溶液を滴下した。ハイドロゲル混合溶液修飾の後、電極を 4°C 18 時間の条件で乾燥させ、ゲル化を行った。

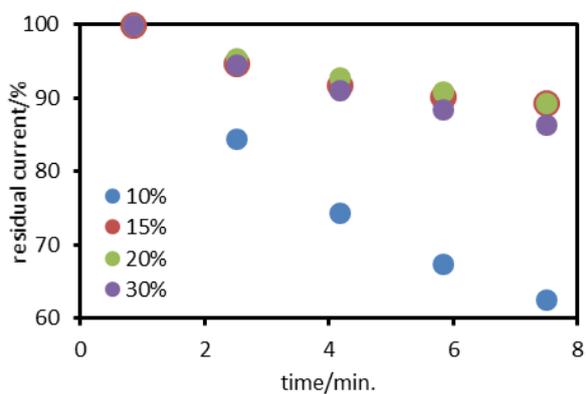
## 4-3 polymer II 修飾ハイドロゲル電極の特性評価

Figure 4-3-a (d) にグルコース非存在下における MgOC-E 上の polymer II の酸化還元ピークを示す。このグラフからこの polymer II の電位は  $-0.022\text{ V}$  であることが示唆された。またグラフ(d)の酸化還元ピーク面積から、電極に吸着しメディエータとして働いている Os 錯体の物質量を計算すると約  $2 \times 10^{-7}\text{ mol cm}^{-2}$  であることが分かった。このことからレドックスハイドロゲル電極作製の際に電極上に担持した polymer II がほぼすべて電極表面における酸化還元反応に寄与していることがわかった。Figure 4-3(b), (c) は MgOC-E、または GC-E 上に  $1000\text{ }\mu\text{g cm}^{-2}$  のハイドロゲルを修飾した際の CV である。測定は  $37^\circ\text{C}$   $0.5\text{ M}$  グルコース存在下にて測定を行った。グラフ(b)より、グルコース酸化反応の開始電位は  $-0.012\text{ V}$  であり定常電流に達する電位は  $0.35\text{ V}$  であることがわかる。MgOC-E におけるグルコース酸化定常電流値は  $45 \pm 7\text{ mA cm}^{-2}$  であり、これは GC 電極における触媒定常電流値 (Figure 4-3-a(c))、 $2.3 \pm 0.1\text{ mA cm}^{-2}$  の約 20 倍である。Figure 4-3-b に MgOC-E の触媒電流値の時間変化を示した。実験は  $8000\text{ rpm}$  という過酷な条件で 10 分間行った。Figure 4-3-c にハイドロゲルの架橋剤割合と触媒電流値・安定性の関係性を示した。Figure 4-3-b で示す通りグルコース酸化の触媒電流値は、ハイドロゲルの架橋剤の割合に依存していることがわかる。すべての電極においてハイドロゲルの合計担持量は  $1000\text{ }\mu\text{g cm}^{-2}$  であり、重量比が GOx/polymer/crosslinker = 40:40:20 と 42.5:42.5:15 の割合において最も高い触媒電流密度 ( $50 \pm 8$  and  $50 \pm 6\text{ mA cm}^{-2}$ ) が観測された。ハイドロゲルの合計担持量は固定されているため、架橋剤の重量比が 10 % から 20 % へと増加すると、酵素とメディエータの量は減少する。しかしながら架橋剤の重量比が増加すると高い触媒電流値が観察されていることから、電極応答の効率が上がっていることが示唆される。同様に架橋剤割合の増加によって、連続的な電流応答の安定性も向上している。 $8000\text{ rpm}$  の環境下における 10 分間の測定の後、架橋剤割合が 10 % の時の触媒電流値は初期電流値の 70 % 以下となっている。しかし架橋剤を 15 %~20 % まで増加させると、初期電流値のほぼ 90 % の触媒電流値を維持した。架橋剤重量 10 % の電極の 10 分間の測定の前後で、修飾されている Os 錯体の酸化還元ピーク面積を Figure 4-3-d にて比較したところ、変化はほぼ無かった。このことから触媒電流値の減少は酵素の脱離によるものであり、架橋材量を 15-20% まで増やすことで酵素の固定が強固になったことが示唆される。架橋剤の割合はハイドロゲル電極の電流生成効率と電極応答の安定性に大きく影響を与えることが分かった。Mao らは polymer II と同様にポリマー主鎖と錯体間を結ぶスペーサーの長さが 13 炭素原子長のレドックスポリマーを用いたハイドロゲル電極に関して報告をしている [39]。彼らの報告によると長いスペーサーを有するレドックスポリマーを用いた場合、架橋剤量を増やすほどレドックスポリマーの電子拡散

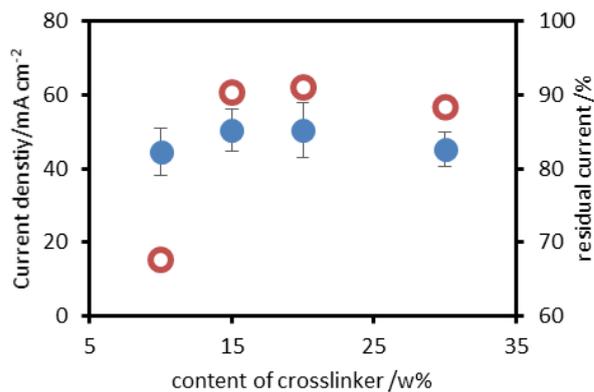
は悪くなる。架橋剤量が0%の時と25%の時の拡散係数を比較すると25%の際は、0%の時の約1/20



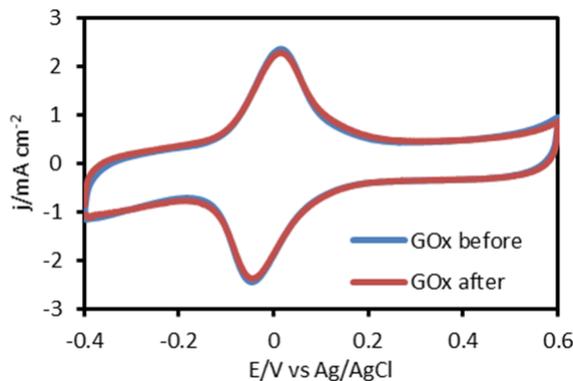
**Figure 4-3-a:** Rotating disk CV for glucose oxidation catalyzed by GOx hydrogel with polymer II modified on MgOC-E (b) and GC-E (c) electrodes. Curve (d) was observed on GOx and polymer II-modified MgO-E. The scan rate was  $20 \text{ mV s}^{-1}$ , (a), (b), (c): 0.1 M phosphate buffer pH 7.0,  $37^\circ\text{C}$ , 0.5 M glucose, 8000 rpm, (d): 0.1 M phosphate buffer pH 7.0,  $25^\circ\text{C}$ , in quiescent solution



**Figure 4-3-b:** Stabilities of the glucose oxidation currents for hydrogel electrode containing 10, 15, 20, 30 % of crosslinker, 0.1 M phosphate buffer pH7.0,  $37^\circ\text{C}$ , 0.5 M glucose, 8000 rpm



**Figure 4-3-c:** Dependence of the catalytic current density (blue closed circle for left axis) and residual current (red open circle for right axis) on crosslinker content.

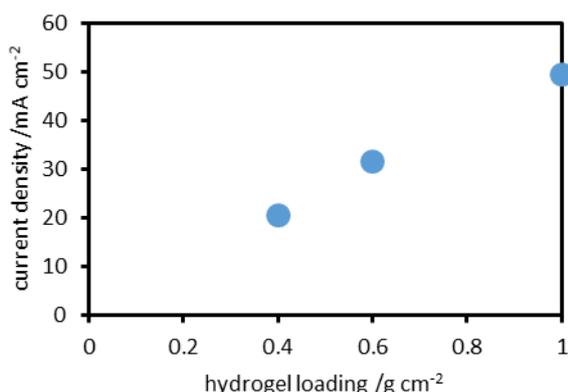


**Figure 4-3-d:** CVs of redox of Os complex on MgOC-E before and after Figure 4-3-b experiment, 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, 25°C

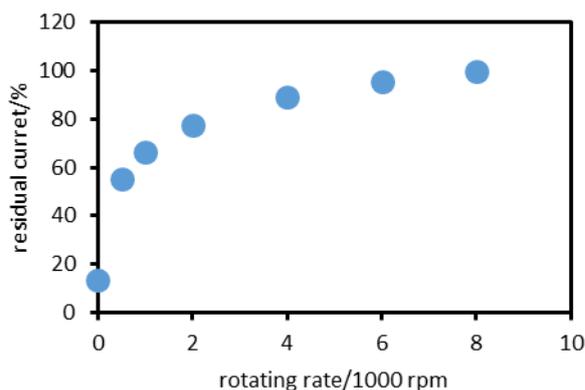
の  $0.3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  まで減少している。一方でスペーサーが 1 原子長のレドックスポリマーを用いた際には架橋剤重量比 7 % 周辺に触媒電流値の最大値が現れ、その後徐々に拡散係数が小さくなり、架橋剤量 25 % で最大値の約 2/3 の  $2.3 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  を示した。ハイドロゲル膜内の電子拡散係数は、ポリマー主鎖に付加した酸化還元中心(Os 錯体部位)の可動性に依存する。架橋が多重になる程 Os 錯体の可動性が下がり、結果的に拡散係数が小さくなったと考えられる。拡散係数と触媒電流値は比例関係にあるため、Mao らの研究結果より、polymer II のような長いスペーサーを有するレドックスポリマーを用いた場合は架橋剤量を増やすことで、触媒電流値が大きく減少するはずである。しかしながら MgOC-E を用いた本研究においては、架橋剤を増やしても顕著な触媒電流値の減少は見えず、さらに 10 % から 20 % まで増やすと触媒電流値の増加が観察された。この結果から、MgOC-E 上にハイドロゲルを修飾した場合、架橋剤を増やした際にも長いスペーサーの長所を失わずに、電極としての安定化を達成することができることが示唆された。

#### 第4章 低電位レドックスポリマー

Figure 4-3-e は触媒電流値のハイドロゲル修飾量依存性を示す。触媒電流値は少なくとも  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  まで直線的に増加していることが分かる。polymer II は Os 錯体部位とポリマー主鎖を結ぶスペーサーが長いこと、電極反応に寄与できる反応層が厚い。そのため修飾したレドックスハイドロゲルのほぼすべてが電極反応に寄与していると考えられる。第2章にてスペーサーの長さが短い polymer I を用い同様の修飾量依存性の実験を行った。この場合には比例関係は約  $400 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  で止まった [75]。長いスペーサーを有するレドックスポリマーを用いて、GC-E を使った場合のハイドロゲルの修飾量と触媒電流値の関係性が Heller らによって報告されている。彼らの実験においても両者の

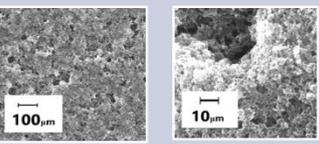
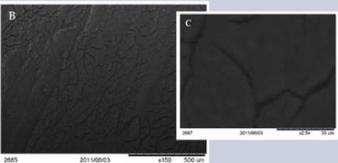
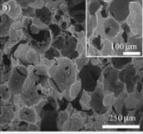


**Figure 4-3-e:** Dependence of the glucose oxidation current at 0.6 V on the hydrogel loading, 0.1 M phosphate buffer pH7.0, 37 °C, 0.5 M glucose, polymer: enzyme: crosslinker= 40: 40: 20, 8000 rpm



**Figure 4-3-f:** Dependence of the glucose oxidation current at 0.6 V on the rotating rate, 0.1 M, 0.1 M phosphate buffer pH7.0, 37°C, 0.5 M glucose, hydrogel loading  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , polymer: enzyme: crosslinker= 40: 40: 20, phosphate buffer pH7.0, 37°C, 0.5 M glucose, hydrogel loading  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , polymer: enzyme: crosslinker= 40: 40: 20

**Table 4-3-g:** Previous researches

炭素	表面写真	触媒電流値
MgOC (本研究結果) : 38nmの細孔を有する		<b>50mAcm<sup>-2</sup></b> ハイドロゲル修飾量: $1000\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$
ケッチエンブラック : 中空シェル上の構造を有する		<b>8mAcm<sup>-2</sup></b> ハイドロゲル修飾量: $200\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$
発泡性炭素材料 : 繋がった空洞を有する		<b>18mA cm<sup>-2</sup></b> ハイドロゲル修飾量: $1734\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$

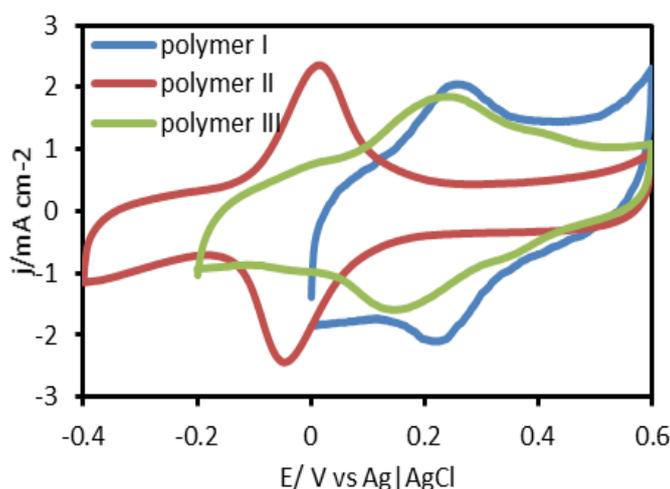
## 第4章 低電位レドックスポリマー

比例関係は  $1000 \mu\text{g cm}^{-2}$  まで保たれていた [39]。Figure 4-3-f は  $0.3 \text{ V}$  における触媒電流値の電極回転数依存性を示す。触媒電流値は  $500 \text{ rpm}$  まで直線的に増加するが、その後  $1000 \text{ rpm}$  から一定領域へ近づいていく。 $500 \text{ rpm}$  においても  $8000 \text{ rpm}$  の時の  $60\%$  の触媒電流値を出力している点から、このマクロ-メソ階層構造が物質輸送に非常に効果的であることが示唆された。GOx と polymer II を組み合わせたハイドロゲル電極の先行研究について Figure 4-3-g にまとめた。KB や発泡性炭素材料を電極足場として利用した研究が行われているが、本研究では他社の研究結果よりも高い触媒電流値を達成していることが分かる。これは第2章と同様に、メソ-マクロ孔の電極表面構造が効果的に働いた結果であると考えられる。

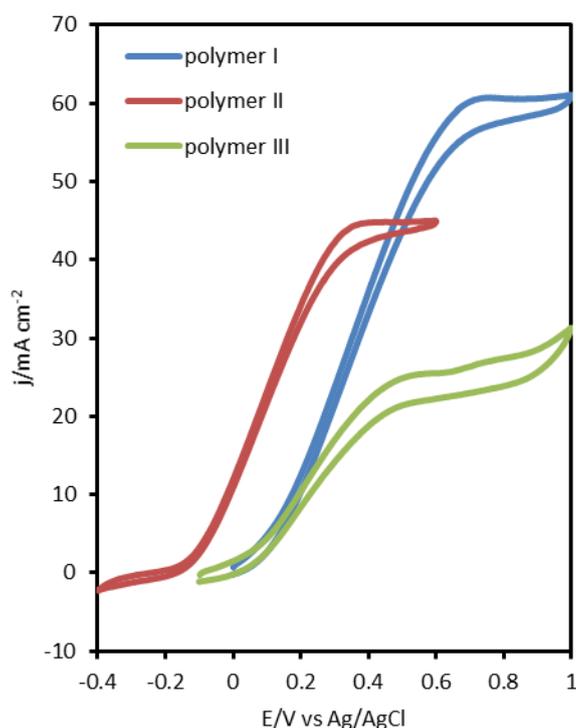
### 4-4 3種類のレドックスポリマーを修飾した GOx ハイドロゲル修飾多孔質電極の比較

polymer I, polymer II そして polymer III の3種類のレドックスポリマーと GOx または FAD-GDH をハイドロゲル化によって MgOC-E 上に固定した。Figure. 4-4-a に3種類のレドックスポリマーの酸化還元ピークを示した。本研究結果より MgOC-E 上に修飾した時の各レドックスポリマーを酸化還元電位は、polymer I:  $0.24 \text{ V}$ 、polymer II:  $-0.015 \text{ V}$ 、polymer III:  $0.19 \text{ V}$  であり、大小関係は polymer I > polymer III > polymer II であった。報告されている各メディエータの酸化還元電位は、polymer I:  $+0.23 \text{ V}$  [10]、polymer II:  $-0.03 \text{ V}$  [54]、polymer III:  $+0.1 \text{ V}$  であり Figure 4-4-a で示された酸化還元電位よりも低い。電極への修飾により酸化還元電位が正側にシフトする理由については、明らかではない。

Figure 4-4-b には3種類のレドックスポリマーを修飾した MgOC-E の、グルコース酸化 CV の比較を示した。グルコースの酸化還元電位とメディエータの酸化還元電位の差はグルコース酸化反応の駆動力となるため、この差が小さくなるほど触媒電流値は小さくなる。GOx の酸化還元電位は  $-0.43 \text{ V}$  vs Ag/AgCl のため、Os 錯体の酸化還元電位は負であるほど、触媒電流値は小さくなる。一方、polymer II 修飾電極の CV は polymer I のものに比べ酸化還元電位が  $0.25 \text{ V}$  程負側へシフトしているにも関わ



**Figure 4-4-a:** CVs of redox of Os complex,  $\cdot 0.1 \text{ M}$  phosphate buffer pH7.0,  $25^\circ\text{C}$ , MgOC-E, hydrogel loading  $1000 \mu\text{g cm}^{-2}$ , GOx modified as enzyme, polymer: enzyme: crosslinker= 45:45:10 for polymer I, polymer II, 30:30:40 for polymer III



**Figure 4-4-b:** Rotating disk CV for glucose oxidation catalyzed by GOx hydrogel with polymer I, polymer II or polymer III modified on MgOC-E. The scan rate was 20 mV s<sup>-1</sup>, 0.1 M phosphate buffer pH7.0, 37°C, 0.5 M glucose, MgOC-E, hydrogel loading 1000 μg cm<sup>-2</sup>, polymer: enzyme: crosslinker= 45:45:10 for polymer I, polymer II, 30:30:40 for polymer III

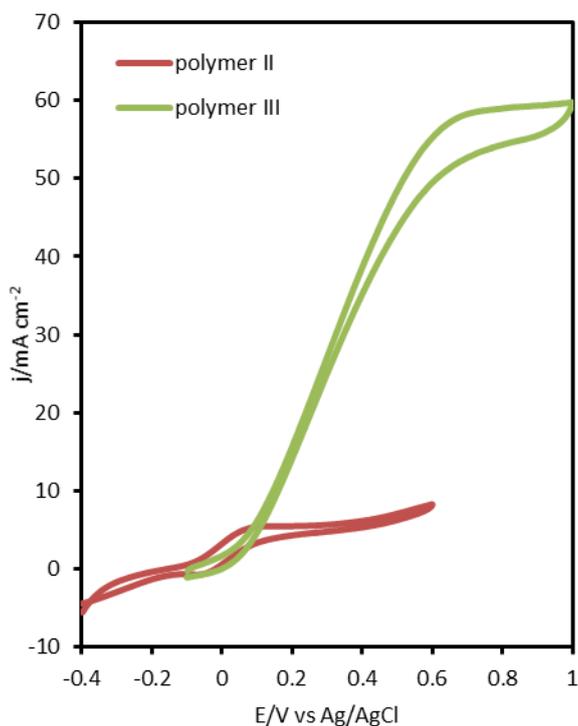
らず、触媒電流値は比較的大きい。これは Os 錯体とポリマー主鎖を結ぶ炭素鎖が長いため、酵素の活性中心からの電子輸送を効率的に行うことができるからである。さらに MgOC-E のマクロ-メソ階層構造による円滑な物質輸送が polymer I と同様、低い酸化還元電位を有する polymer II を用いたハイドロゲル電極においても非常に効果的であることが示唆される。電極触媒として GOx を用いた場合、ハイドロゲル電極の触媒電流値は 0.6V においては polymer I > polymer II > polymer III となった。polymer I はこの 3 種のポリマーの中で最も酸化還元電位が正であるため、最も高い触媒電流値を示した。一方で polymer II は polymer III よりも酸化還元電位が 0.2 V 近く電位が負でありながら高い電流密度を達成できたのは、polymer II の有する長いスペーサーによって Os 錯体の可動性が向上したからである。Figure 4-4-c に本研究のレドックスポリマーの種類と触媒電流値を表にまとめた。

redox polymer	spacer	redox potential(V)	current density(mA cm <sup>-2</sup> )	
			at 0.6V	at 0.35V
polymer I	short	0.23	53.6	28.6
polymer II	long	-0.03	45.0	42.7
polymer III	short	0.10	23.9	18.2

**Figure 4-4-c:** Parameter of redox polymer and hydrogel electrode with GOx

## 4-5 FAD-GDH 修飾電極の特性評価

d-FAD-GDH に関しては過去の報告にて, polymer I と共にハイドロゲル化した際には 25°Cの環境において 60 mA cm<sup>-2</sup> 近くの触媒電流値を示している。本研究と同様の 37°Cの環境ではその約 2 倍近くの触媒電流値を示すことが予想される。FAD-GDH を各種 polymer とハイドロゲル化したところ触媒電流値は polymer III > Polymer II となった (Figure 4-5-a)。d-FAD-GDH と polymer II を組み合わせた際には長いスペーサーの効果は得られず電流値は非常に小さかった。この結果については、1. 電極構造、2. 糖鎖除去処理の影響、3. メディエータの酸化還元電位、4. 酵素の疎水性の 4 つの観点で考察を行う。まず MgOC-E と GC-E を利用し、GOx と d-FAD-GDH の触媒電流値を比較したところ、どちらの電極を用いた場合でも d-FAD-GDH の触媒電流値は GOx の約 1/5 となった (Figure 4-5-b, f)。このことから電極構造によってメディエータのスペーサーが機能していないわけではないことが分かった。同様に 2. について糖鎖除去処理を行っていない FAD-GDH を電極触媒として代わりに使用した場合でもほぼ同様の触媒電流値が得られた (Figure 4-5-c)。続いてメディエータの酸化還元電位について考察すると、*A. terreus* 由来の FAD-GDH はナフトキノンやほかの酸化還元物質のような -0.1 V 付近の酸化還元電位を有する有機メディエータとの反応性はよい。例えば -0.14 V 付近に酸化還元電位を有する 1,2-naphthoquinone をメディエータとして用いた場合、FAD-GDH の二電子反応速度定数は GOx のものよりも 2~3 桁大きい。Ross らの研究報告によると 1,2-naphthoquinone を付加したレドックスポリマーは FAD-GDH の電子移動を促進させたが、GOx を用いた場合にはその

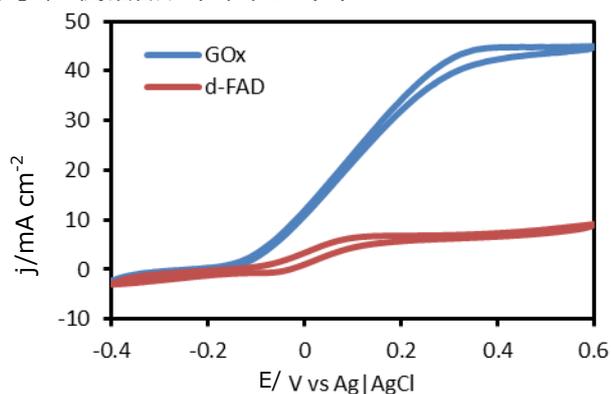


**Figure 4-5-a:** Rotating disk CV for glucose oxidation catalyzed by FAD-GDH hydrogel with polymer II or polymer III modified on MgOC-E. The scan rate was 20 mV s<sup>-1</sup>, 0.1 M phosphate buffer pH7.0, 37°C, 0.5 M glucose, MgOC-E, hydrogel loading 1000 µg cm<sup>-2</sup>, polymer: enzyme: crosslinker= 45:45:10 for polymer I and polymer II, 30:30:40 for polymer III

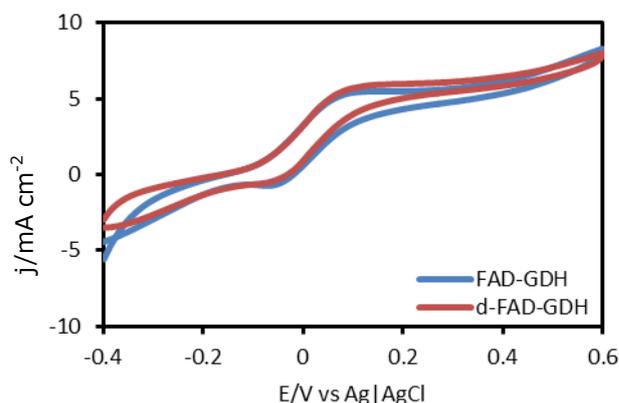
#### 第4章 低電位レドックスポリマー

ような効果が見られなかった [38]。最後に酵素の疎水性についてだが、GOx は酵素全体が負電荷を帯びており、全体として親水基で囲まれていることが分かる。その一方 FAD-GDH の表面は無電荷の疎水性の部分が多く、スペーサーも炭素鎖のため疎水部位同士の相互作用により FAD-GDH の表面へ吸着、または d-FAD-GDH と絡まってしまうことでスペーサーが適切に可動しなかった可能性がある。つまり polymer II を組み合わせた際に大きな触媒電流値が観察されなかった原因は、レドックスポリマーの酸化還元電位の低さや電極の表面構造によるものではなく、分子間の相互作用によってスペーサーや Os 錯体が効果的に働かなかったためである。このことから酵素の種類によって適切なスペー

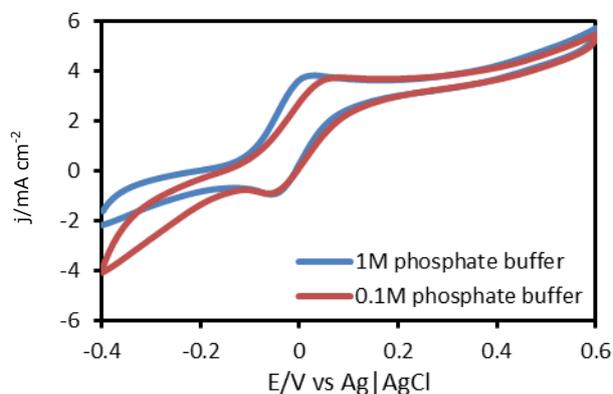
第4章 低電位レドックスポリマー



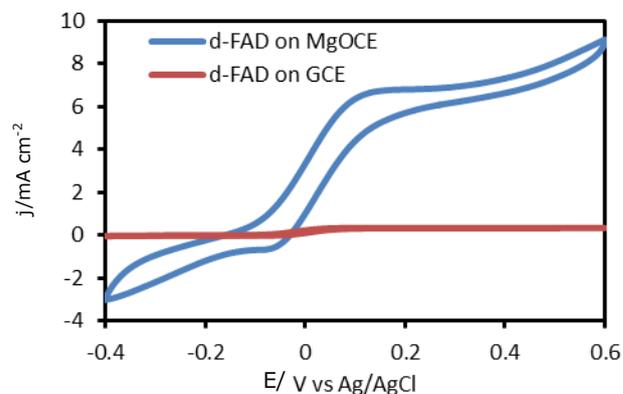
**Figure 4-5-b:** CVs of MgOC-E with GOx or d-FAD-GDH hydrogel, 0.1 M phosphate buffer pH7.0, 37°C, 0.5 M glucose, 8000 rpm



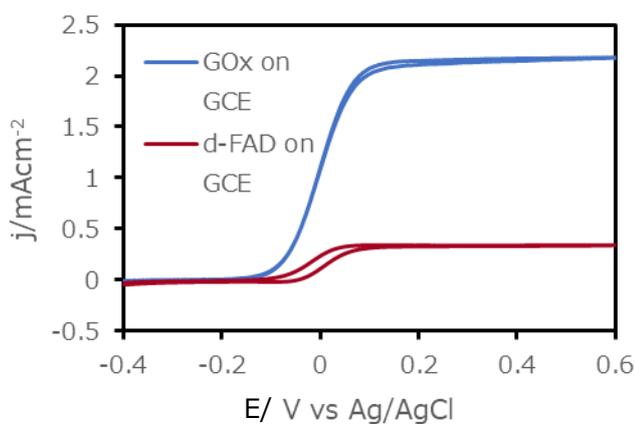
**Figure 4-5-c:** CVs of MgOC-E with FAD-GDH or d-FAD-GDH hydrogel, 0.1 M phosphate buffer pH7.0, 37°C, 0.5 M glucose, 8000 rpm



**Figure 4-5-d:** CVs of MgOC-E with d-FAD-GDH hydrogel in presence of 0.1 M or 1 M phosphate buffer pH7.0, 0.1 M phosphate buffer pH7.0 or 1 M phosphate buffer pH7.0, 37°C, 0.5 M glucose, 8000 rpm



**Figure 4-5-e:** CVs of MgOC-E or GC-E with d-FAD-GDH hydrogel, 0.1 M phosphate buffer pH7.0, 37°C, 0.5 M glucose, 8000 rpm



**Figure 4-5-f:** CVs of GC-E with GOx or d-FAD-GDH hydrogel, 0.1 M phosphate buffer pH7.0, 37°C, 0.5 M glucose, 8000 rpm

## 第4章 低電位レドックスポリマー

サーを有するレドックスポリマーの設計が必要であることが分かった。

第3章の結果にて、polymer I を用いた d-FAD-GDH 修飾ハイドロゲル電極はリン酸バッファの濃度を上げると触媒電流値が増加した [10]。しかしながら polymer II を用いた本実験系においては、リン酸緩衝液の濃度を 0.1M から 1M に変えても触媒電流値が増えることはなかった (Figure 4-5-d)。イオンの影響は酵素の種類だけではなくレドックスポリマーの種類も関係があることが分かった。

### 4-6 結論

Os(1,1'-dimethyl-2,2'-biimidazole)<sub>2</sub>-2-[6-methylpyrid-2-yl]imidazole)<sup>2+/3+</sup>が付加した PVP (polymer II) を GO<sub>x</sub> と共に、38 nm の細孔を有する MgOC-E に固定化すると、0.3 V において 50 mA cm<sup>-2</sup> のグルコース酸化電流値を観測した。グルコース酸化の開始電位は 0.12 V であり、これは過去に報告されてきたレドックスポリマー [Os(bipyridine)<sub>2</sub>Cl] が付加した PVI (polymer I) を用いた時よりも 0.25 V 低い。本研究において GO<sub>x</sub> 修飾ハイドロゲル電極は FAD-GDH または d-FAD-GDH を用いた場合よりも大きなグルコース酸化触媒電流値を示した。3 種類のポリマーを GO<sub>x</sub> と FAD-GDH の 2 種類の酵素をそれぞれ用いて比較したところ、FAD-GDH に対しては polymer II が有するスペーサーが十分に働かなかったことが示唆された。これは電極の構造やレドックスポリマーの酸化還元電位が理由ではなく、酵素・レドックスポリマーのスペーサー間の分子間相互作用が影響していると考えられる。酵素・レドックスポリマー間での分子間相互作用に関してさらなる理解が必要である。また第3章で得られたイオン濃度の増加による電流値の増加の傾向は本実験系では得られなかった。酵素だけではなく、レドックスポリマーとの組み合わせも考慮した上で、イオンの影響を調べる必要があることが分かった。

## 第5章 結言

## 第5章 結言

本研究ではバイオ燃料電池・バイオセンサーへの応用に向け、グルコース酸化電極の安定性・出力の課題解決のために電極構造の影響と電解質の影響を明らかにし、電解質の効果をグルコース酸化電極の安定化・出力化のために適用した。具体的には下記について報告をする。

- 1) MgOC を電極足場とし、グルコース酸化酵素 (GOx) を使用したレドックスハイドロゲル型グルコース酸化電極の特性評価、および、電解質溶液の電流生成への影響の解明 (第2章)
- 2) 溶存電解質の FAD-GDH を使用したハイドロゲル電極への影響の解明 (第3章)
- 3) 低い酸化還元電位を有するレドックスポリマーを用いたグルコース酸化電極の作製 (第4章)

第2章ではグルコースセンサーの電極触媒として最も広く使用されてきた酵素であるグルコース酸化酵素 (GOx) を使用したハイドロゲル電極について検討した。電流密度の向上を目指し、平均細孔径 38 nm の MgOC を電極材料として用いた。物質輸送に適した数十  $\mu\text{m}$  サイズのマクロ孔を形成するために、泳動電着法を用いて、MgOC をグラッシーカーボン電極 (GC-E) 上に修飾した。マクロ-メソ階層構造を有する MgOC 修飾電極 (MgOC-E) 上にレドックスハイドロゲルを修飾したところ GC-E の 13 倍となる  $60 \text{ mA cm}^{-2}$  の触媒電流密度を達成した。

続いてウェアラブルデバイスとしての応用に向け、 $37^\circ\text{C}$  で、3 日間の連続測定における安定性を調べた。過酸化水素分解酵素のカタラーゼを GOx と共にハイドロゲル中に修飾した。 $37^\circ\text{C}$  の静止溶液中においては初期電流値の約 8 割の電流を 3 日間連続で出力し続けることができた。

続いて、ハイドロゲル電極に対する電解質の影響について検討した。本研究では、ハイドロゲル電極に影響を与える電解質の強さを、ホフマイスター系列に則って評価した。ハイドロゲル電極の触媒電流値は共存するアニオン種に大きく影響を受け、またその影響の大きさはホフマイスター系列に則りベル型の傾向にあることがわかった。この結果はイオン強度による影響、LWMA と分散力によるイオンの吸着による酵素・メディエータ間の静電的相互作用の変化による影響、ハイドロゲルの膨潤度・脱水効果の 4 つの影響によるものだと考えられる。

第3章では、FAD-GDH を修飾したハイドロゲル電極について報告する。(d-)FAD-GDH を用いたハイドロゲル電極のイオンの影響を調べたところ、GOx の結果とは異なる逆ベル型の結果となり、特に、カオトロピックアニオンを含む溶液では電流値が増加する結果が得られた。FAD-GDH の活性付近は GOx より表面に負の電荷を有するアミノ酸が少なく、メディエータとの静電的な相互作用が弱い。FAD-GDH の活性付近は正電荷に帯電しているためカオトロピックアニオンが吸着しやすく、また静的分極率の高いアニオンが酵素表面に吸着することで、正電荷のレドックスポリマーとの相互作用が高められたと考えられる。

一方、安定性に関しては FAD-GDH ハイドロゲル電極を  $37^\circ\text{C}$  の環境で連続運転させると、3 日間の連続応答の結果 0.1 M のリン酸緩衝液中では初期電流値の 3 % にまで低下したが、1 M のリン酸緩衝液中では 3 日間の連続運転でも初期電流の 41% の安定性を維持した。さらに酵素の保持を高めるために、38nm の細孔を有する MgOC-E を組み合わせることで、3 日間の  $37^\circ\text{C}$  での連続測定においても初期電流値の 59% を維持する安定性を達成した [80]。本研究成果から、グルコース酸化電極として高出力化・安定化に向け、電解質の種類や濃度を調整するという新しいアプローチを見出した。

## 第5章 結言

第4章では低酸化還元電位を有するレドックスポリマーを採用したハイドロゲル電極について報告した。本章では $-0.03\text{ V vs. Ag|AgCl}$ に酸化還元電位を有し、Os 錯体とポリマー主鎖を結ぶスペーサーが長いレドックスポリマーと MgOC-E を用い、その特性を調べた。polymer II を用いることで、GOx 修飾グルコース酸化反応の開始電位は約  $0.2\text{ V}$  負にシフトし、定常電流に達する電位もより負側にシフトしたことが確認できる。本研究結果の  $45\text{ mA cm}^{-2}$  はこれまでの研究と比べても最も高い電流密度となっており、MgOC-E が効果的に働いたためだと考えられる。一方で FAD-GDH を組み合わせた際には高い電流密度は達成できなかった。これは、FAD-GDH の表面とスペーサーが両方とも疎水的であることでスペーサーが酵素表面と相互作用し、適切に働かなかったことが原因と考えられる。使用する酵素種に合わせて適切なスペーサーを導入する必要があることが分かった。

MgOC を足場とした多孔質炭素電極とハイドロゲルを組み合わせることによって、安定性と出力の両方を向上できることを示した。酸化還元電位の低い polymer II に対しても MgOC が効果的であることを示した。本研究結果は、すでに多孔質炭素材料の効果的な活用事例として多くの学術論文にて引用されている。またこの手法はグルコース酸化電極だけでなく、ハイドロゲル乳酸センサーの長期測定を可能にするなどの研究にも応用されており、多くの BFC・センサーの分野で応用できる技術となりうる。

電解質として溶存するイオンが酵素自身の安定性を向上、かつ酵素のハイドロゲル膜からの脱離を防ぎ、グルコース酸化電極としての安定化に貢献することが分かった。さらに電解質は酵素へ吸着することでメディエータと酵素間の静電的相互作用にも影響を与え、出力を向上させる効果も発揮した。本研究結果は電解質とハイドロゲル膜の構造の関係性を明らかにした研究例として様々なハイドロゲルに関する論文にて参照されており、また電解質の種類・濃度を変えることにより酵素・メディエータ間の反応速度を評価し、両者間の相互作用を分析するといった後続研究にもつながっている。このように、ハイドロゲルをベースにした酵素修飾電極は、酵素に負荷をかけることなく、容易に作製することができ、将来的には幅広い酵素に適用可能である。今回は単独の酵素反応に適用させたが、複合酵素系など幅広い応用が期待される。

## 参照文献

- [1] Ilika Technologies, <https://www.ilika.com/sectors-applications/medical>, (参照 : 2020/10/24).
- [2] Conference, San Francisco, USA, pp. 296-297, Feb. 2015, K. Ishida, T. C. Huang, K. Honda, Y. Shinozuka, H. Fuketa, T. Yokota, U. Zschieschang, H. Klauk, G. Tortissier, T. Sekitani, H. Toshiyoshi, M. Takamiya, T. Someya, T. Sakurai, Insole Pedometer With Piezoelectric Energy Harvester and 2 V Organic Circuits,.
- [3] H. Fuketa, M. Hamamatsu, T. Yokota, W. Yukita, T. Someya, T. Sekitani, M. Takamiya, 2015 IEEE International Solid-State Circuits Conference , San Francisco, USA, pp. 296-297, Feb. 2015.
- [4] C. Desmet, C. A. Marquette, L. J. Blum, B. Doumeche, Biosensors and Bioelectronics, 76, 2016, 145-163.
- [5] A. Niiyama, K. Murata, Y. Shigemori, A. Zevda, S. Tsujimura, Journal of Power Sources 427, 2019, 49-55.
- [6] S. O. Garcia, Y. V. Ulyanova, R. Figueroa-Teran, K. H. Bhatt, S. Singhal, P. Atanassov, ECS Journal of Solid State Science and Technology, 5, 8, 2016, M3075-M3081.
- [7] L. Halámková, J. Halánek, V. Bocharova, A. Szczupak, L. Alfonta, E. Katz, J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 5040-5043.
- [8] V. Flexer, N. Brun, M. Destribats, R. Backov, N. Mano, Phys. Chem. Chem. Phys., 2013, 15, 6434-6445.
- [9] Y. Kamitaka, S. Tsujimura, N. Setoyama, T. Kajinob, K. Kano, Phys. Chem. Chem. Phys., 2007, 9, 1793-1801.
- [10] S. Tsujimura, K. Murata, W. Akatsuka, J. Am. Chem. Soc., 2014, 136, 14432-14437.
- [11] Y. Degani, A. Heller, J. Am. Chem. Soc., 1989, 111, 2357-2358.
- [12] A. Heller, B. Feldman, Electrochemistry in Diabetes Management, Account of Chemical Research, 43, 7, 2010, 963-973 .
- [13] S. Kusama, K. Sato, S. Yoshida, M. Nishizawa, Adv. Mater. Technol. 2020, 5, 1900889.
- [14] A. Zebda, S. Cosnier, J.P. Alcaraz, M. Holzinger, A. L. Goff, C. Gondran, F. Boucher, F. Giroud, K. Gorgy, H. Lamraoui, P. Cinquin, DOI: 10.1038/srep01516.
- [15] A. Heller, Phys. Chem. Chem. Phys., 2004, 6, 209-216.
- [16] ソニー株式会社 , <https://www.sony.co.jp/SonyInfo/News/Press/200708/07-074/> ( 参照 : 2020/12/31) .
- [17] A. J. Bandodkar, J. Wang, Electroanalysis, 2016, 28, 1188-1200.

- [18] 国立研究開発法人産業技術総合研究所, [https://www.aist.go.jp/aist\\_j/press\\_release/pr2008/pr20081111/pr20081111.html](https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2008/pr20081111/pr20081111.html), (参照: 2020/12/31).
- [19] H. Y. Y. Nyein, M. Bariya, L. Kivimäki, S. Uusitalo, T. S. Liaw, E. Jansson, C. H. Ahn, J. A. Hangasky, J. Zhao, Y. Lin, T. Happonen, M. Chao, C. Liedert, Y. Zhao, L.C. Tai, J. Hiltunen, A. Javey, *Sci. Adv.* 2019; 5 : eaaw9906.
- [20] 佐藤亜位, 信州医誌, 66, 1, 2018, 17-27.
- [21] アークレイ株式会社, <https://biz.arkray.co.jp/lact/hatta/index.html> (参照: 2020/12/31) .
- [22] D. P. Hickey, R. C. Reid, R. D. Milton, S. D. Minteer, *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 15, 2016, 26-31.
- [23] 後藤正雄, 塚本泰嗣, 池田明子, 98, No12(2003), 821-829.
- [24] Y. Handa, Ki. Yamagiwa, Y. Ikeda, Y. Yanagisawa, S. Watanabe, N. Yabuuchi, S. Komaba, *ChemPhysChem* 2014, 15, 2145 – 2151.
- [25] D. Ivniński, B. Branch, P. Atanassov, C. Apblett, *Electrochemistry Communication*, 8, 2006, 1204-1210.
- [26] G. Guven, S. Sahin, A. Guven, E. H. Yu, *Frontiers in Energy Research*, 2016, 4, 1-7.
- [27] P. Lv, Q. Feng, Q. Wanf, G. Li, Dawei, Q. Wei, *Materials*, 2016, 9, 183, doi:10.3390.
- [28] 田中 裕己, 西岡 求, 杉浦 公彦, スマートプロセス学会誌, 第1巻, 第2号, 2012年3月, 86-92.
- [29] T. Morishita, T. Tsumura, M. Toyoda, J. Przepiórski, A. W. Morawski, H. Konno, M. Inagaki, *Carbon*, 48, 2010, 2690-2707.
- [30] K. Murata, W. Akatsuka, S. Tsujimura, *Chem. Lett.* 2014, 43, 928-930.
- [31] A. Suzuki, K. Murata, N. Mano, S. Tsujimura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 89, 2016, 24-26.
- [32] H. Funabashi, K. Murata, S. Tsujimura, *Electrochemistry*, 2015, 85, 5, 372-375..
- [33] A. Koushanpour, M. Gamella, E. Katz, *Electroanalysis* 2017, 29, 1602-1611.
- [34] S. B. Aoun, Gyeong S. Bang, T. Koga, Y. Nonaka, *Electrochem. Comm.*, 2003, 5, 317-320.
- [35] S. Kerzenmacher, J. Ducre, R. Zengerle, F. von Stetten F., *J. of Power Sources* 2008, 182, 1-17.
- [36] 田巻 孝敬, 山口 猛央, グルコースを用いた酵素型バイオ燃料電池, 2011, 水素エネルギーシステム Vo1.36, No.2 特集.
- [37] 辻村 清也, 加納 健司, *Electrochemistry*, 76, 12, 2008, 900-909.
- [38] R. D. Milton, D. P. Hickey, S. Abdellaoui, K. Lim, F. Wu, B. Tana, S. D. Minteer, *Chem. Sci.*, 6, 4867-4875, 2015..
- [39] F. Mano, N. Mano, A. Heller, *J. am. Chem. Soc.*, 2003, 12, 4951-4957.
- [40] H. H. Kim, N. Mano, Y. Zhang, A. Heller, *J. Electrochem. Soc.*, 2003, 150, 2, A209-A213..

- [41] N. Tsuruoka, T. Sadakane, R. Hayashi, S. Tsujimura, *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 604.
- [42] N. Tsuruoka, S. S. Soto, A. B. Tahar, A. Zebda, S. Tsujimura, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 192, 2020, 111065.
- [43] X. Lin, T. Konno, M. Takai, K. Ishihara, *Transaction of the materials research society of Japan*, 36, 3, 531-534, 2001.
- [44] A. Salis, B. W. Ninham, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, 43, 7358-7377.
- [45] Y. Zhang, P. S Cremer, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2006, 10, 658-663.
- [46] A. Suzuki, S. Tsujimura, *Electrochimica Acta* 201, 2016, 228-232 231.
- [47] M. Nemoto, K. Sugihara, T. Adachi, K. Murata, K. Shiraki, S. Tsujimura, *ChemElectroChem*, 2019, 6, 1028-1031.
- [48] 今堀 和友, *日本結晶学会誌*, VII, 3, 1965, 144-152.
- [49] K. MacVittie, T. Conlon, E. Katz, *Bioelectrochemistry*, 2015, 106, 28-33.
- [50] S. Tsujimura, S. Kojima, K. Kano, T. Ikeda, M. Sato, H. Sanada, H. Omura, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 30, 2006, 654-659.
- [51] 富田 研一, *日本結晶学会誌*, 20, 17, 1978, 17-30.
- [52] 大城 芳樹, 伊東 忍, *有機合成化学*, 第 47 卷, 第 9 号, 1989, 855-867.
- [53] B. A. Gregg, A. Heller, *Anal. Chem.*, 1990, 62, 258-263.
- [54] E. Suraniti, S. Viés, S. Tsujimura, N. Mano, *J. of the electrochem. Soci.* 2013, 160, 6, G79-G82.
- [55] N. Mano, F. Mao, A. Heller, *J. Electroanal. Chem*, 2005, 574, 347-357.
- [56] S. Tsujimura, A. Ishii, T. Abo, K., Kano, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2008, 614, 67-72.
- [57] A. Aoki, A. Heller, *J. Phys. Chem.*, 1993, 97, 11014-11019.
- [58] T. Maeda, M. Takenouchi, K. Yamamoto, T. Aoyagi, *Biomacromolecules*, 2006, 7, 2230-2236.
- [59] P. L. Nostro, B. W. Ninham, *Chem. Rev.*, 2012, 112, 2286-2322.
- [60] Z. Yang, *J. Biotech.*, 2009, 144, 12-22.
- [61] C. Carucci, P. Haltenort, M. Salazar, A. Salis, E. Magner, *ChemElectroChem* 2015, 2, 659 - 663.
- [62] G. Binyami, A. Heller, *J. of Electrochem. Soc.*, 1999, 146, 8, 2965-2967.
- [63] T. J. Ohara, R. Rajagopalan, A. Heller, *Anal. Chem.*, 1993, 65, 3512-3517.
- [64] D. M. Aodha, M. L. Ferrer, P. Ó. Coghlaile, P. Kavanagh, D. Leech, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, 14, 14667-14672.
- [65] A. Heller, *J. Phys. Chem.* 1992, 96, 3579-3587.
- [66] S. M. Oh, L. R. Faulkner, *J. Electroanal. Chem.*, 1989, 269, 77-97.
- [67] H. Zao, *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 37, 2005, 16.

- [68] D. M. Fraser et al., *J. Electroanal. Chem.*, 1993, 359, 125-139.
- [69] L. Medda, M. Monduzzi, Salis, *Chem. Commun.*, 2015, 51, 663.
- [70] M. Takano, K. Ogata, S. Kawauchi, M. Satoh, J. Komiyama, *Polymer Gels and Networks*, 1998, 6, 217-232.
- [71] L. Xu, H. Watando, M. Satoh, *Colloid Polym. Sci.*, 284, 2006, 862-870.
- [72] L. Xu, K. Iwata, S. Kobayashi, T. Ishizone, M. Satoh.
- [73] H. Muta, M. Miwa, M. Satoh, *polymer*, 2001, 42, 6313-6316.
- [74] Y. Okazaki, K. Ishizuki, S. Kawauchi, M., Satoh, J. Komiyama, *Macromolecules*, 1996, 29, 8391-8397.
- [75] A. Suzuki, S. Tsujimura, N. Mano, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2016, 89, 24-26.
- [76] S. C. Barton, Y. Sun, B. Chandra, S. White, J. Hone, *Electrochemical and Solid-State Letters*, 2007, 10(5)B96-B100.
- [77] H. Wen, V. Nallathambi, D. Chakraborty, S. Calabrese Barton, *Microchim. Acta*, 175, 283, 2011.
- [78] S. Yoshino, T. Miyake, T. Yamada, K. Hata, M. Nishizawa, *Adv. Energy Mater.*, 3, 60, 2013.
- [79] A. PrévotEAU, N. Mano, *Electrochim. Acta*, 2012, 68, 128..
- [80] A. Suzuki, S. Tsujimura, *Chem. Lett.*, 45, 4, 2016, 484-486.
- [81] D. F. Parsons, B. W. Ninham, *J. Phys. Chem. A* 2009, 113, 1141–1150.

## 発表リスト

本論文の成果は、下記の論文にて報告した。

### ・学会誌への掲載

1. Suzuki, A., Murata, K., Mano, N., Tsujimura, S.  
Redox hydrogel of glucose oxidase on MgO-templated carbon electrode  
Bull. Chem. Soc. Jpn., 89, 24-26 (2016).
2. Suzuki, A., Tsujimura, S.  
Long-term continuous operation of FAD-dependent glucose dehydrogenase hydrogel-modified electrode at 37° C, Chem. Lett., 45(4) 484-486 (2016).
3. Suzuki, A., Tsujimura, S.  
Hofmeister effects on the glucose oxidase hydrogel-modified electrode  
Electrochim. Acta, 201, 228-232 (2016).
4. Suzuki, A., Mano, N., Tsujimura, S.  
Lowering the potential of electroenzymatic glucose oxidation on redox hydrogel-modified porous carbon electrode  
Electrochim. Acta, 232, 581-585 (2017), 10.1016/j.electacta.2017.03.007
5. Yoshida, A., Tsujimura, S.  
Improved glucose oxidation catalytic current generation by an FAD-dependent glucose dehydrogenase-modified hydrogel electrode, in accordance with the Hofmeister effect  
Journal of Physics: Energy, 10.1088/2515-7655/abd877

### ・国際学会における発表

1. Suzuki, A., Tsujimura S.  
Characterization of Glucose Oxidase-Redox Hydrogel on MgO-templated Carbon Electrode,  
66th Annual International Society of Electrochemistry Meeting, September, 2015

・国内学会・シンポジウムにおける発表

1. ○Suzuki, A., Tsujimura S.

Designing Efficient Glucose Anodes Based on MgO-Templated Carbon Electrode  
International Workshop on Science and Patents, 2013, ポスター発表

2. 鈴木 愛未, 村田 一樹, 辻村 清也

レドックスポリマー修飾多孔質電極において出力・安定性に影響する因子の検討  
電気化学会春季大会, 2014 年, 口頭発表

3. 鈴木 愛未, 村田一樹, 辻村 清也,

レドックスハイドロゲルを修飾したグルコース酸化多孔質アノードの特性評価  
第 4 回 Chemical Society of Japan 化学フェスタ, 2014 年, ポスター発表

4. 鈴木 愛未, 村田 一樹, 辻村 清也

レドックスハイドロゲル修飾電極応答に対する電解質の影響  
電気化学会秋季大会, 2014 年, 口頭発表

5. ○Suzuki, A., Tsujimura S.

Characterization of Glucose Oxidase-Redox Hydrogel on MgO-templated Carbon Electrode  
International Workshop on Science and Patents, 2015, ポスター発表

6. 鈴木 愛未, 辻村 清也

レドックスハイドロゲル修飾多孔質グルコース酸化電極の高出力化・安定化  
電気化学会秋季大会, 2015 年, 口頭発表

7. Suzuki, A., Tsujimura., S.

Influence of ion in Accordance with Hofmeister Series to Redox Hydrogel Electrode  
第 25 回 日本 Material Research Society 年次大会, 2015 年, ポスター発表

8. ○Yoshida. A, Tsujimura S.

Characterization of Glucose Oxidation Electrode modified Redox Hydrogel on MgO-templated Carbon  
Electrode  
第 30 回日本 MRS 年次大会, 口頭発表

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始懇切丁寧なるご指導、ご鞭撻を賜りました筑波大学 数理物質系 辻村清也 准教授に心より感謝の意を表します。

本論文の執筆にあたり、ご指導、ご助言を賜りました筑波大学数理物質系 木島 正志 教授、白木 賢太郎 教授、桑原 純平 准教授に深く感謝いたします。

研究活動を支えて下さった辻村研究室の皆様に深く感謝いたします。

研究活動について前向きにサポート下さった出光興産(株)Next 事業室の皆様に深く感謝いたします。

最後に大学院生活を支援くださいました夫、圭佑に心より感謝いたします。