

総合論文*

固定化生体触媒を利用した食品分析システムの開発

受田 浩之**

Development of food analytical systems based on the use of
immobilized biocatalysts

Hiroyuki UKEDA**

**Faculty of Agriculture, Kochi University, Monobe B-200, Nankoku-shi, Kochi 783-8502)

(Received 21 September 1998, Accepted 10 November 1998)

A convenient and rapid analytical system for food components responsible for food quality was developed based on the use of immobilized enzymes and microorganisms. First, an analytical system for superoxide dismutase (SOD) activity was constructed using the combination of an immobilized enzyme with flow-injection analysis (FIA). In this system, the immobilized xanthine oxidase played the role of a generator of superoxide anion; the sampling frequency was about 30 samples/h. Next, a novel analytical format was proposed involving a combination of immobilized enzymes with a 96-well microtiter plate. An alternate and repeated deposition of avidin and biotinylated enzyme was useful for enzyme immobilization with high activity and stability. Immobilized glucose oxidase under the optimized conditions was applicable to glucose determination, and the activity was retained during storage for 6 months and 50 successive determinations. The ability of microorganisms to recognize a given group of substances is useful for exploiting novel analytes. An example was indicated by the development of a rapid and convenient analytical system for short-chain fatty acids using immobilized *Arthrobacter nictiana*-FIA. A sample throughput of 20 samples/h was achieved, and the obtained response showed a linear correlation with the total concentration of $C_{4:0}$ to $C_{12:0}$. The response was also partly related to the somatic cell count in raw-milk samples ($n = 150$), suggesting that the system should be applicable to detecting mastitis milk. The application of immobilized *Pseudomonas putida* to the determination of organic acids in wine is also described, in which the relationship between the specificity and the carbon sources used in the growth medium was investigated.

Keywords : immobilized enzyme; immobilized microorganism; flow injection analysis; microtiter plate assay; food analysis; review.

1 緒 言

新栄養成分表示基準の導入や HACCP (危害分析重要

管理点) 方式の推進により大きな変革を迫られている食品工業において、原料、製品の品質、規格を判断するための検定分析、並びに製造工程を管理するための管理分析、いわゆる食品工業分析の果たすべき役割が急速にその重要性を増している。食品工業分析において対象とな

* 中国四国支部創立 40 周年記念

** 高知大学農学部: 783-8502 高知県南国市物部乙 200

る食品はその大部分が生物そのものか、あるいは生物生産物である。従って、その組成は極めて複雑で、更に各成分は様々な外因的条件や生化学的な内因的条件によってお互いに変化し合いながら、一種の動的な平衡状態を形成している。このような性質を有する食品試料の分析には、正常な状態にある食品中の目的成分を変化させることなく特異的に、かつ迅速に分析する技術が強く必要とされる。更に近年、栄養機能、感覚機能のほかに、食品の有する生体調節機能の重要性が認識されるようになり、食品機能に関連する成分の数は、今後飛躍的に増加していくことが予想される。これに対応するためには、できる限り多くの成分に適用できるように、高いフレキシビリティを備えた分析手法を開発することが必要である。

このような背景の下に著者らは、前処理を必要としない高選択的分析法の設定と、更にはそれら分析法の簡易・迅速化を目指して、固定化生体触媒を利用した様々な食品成分の分析法の開発に取り組んできた^{1)~3)}。本論文では、新しい分析項目に対応した固定化酵素-フローインジェクション分析 (FIA) システムの開発と、固定化酵素の新しい利用法として著者らが開発しているマイクロプレートアッセイ法について述べる。更に微生物が有するユニークな群特異性を利用した固定化微生物-FIA システムの開発とその食品試料への応用について詳述し、固定化生体触媒が有する食品分析分野への高い有用性を示していく。

2 固定化酵素を利用した分析システム

2.1 SOD 活性の迅速計測システム

酸素呼吸に必須の三重項酸素が1電子還元を受けるとスーパーオキシド陰イオン (O_2^-) に変わる。この O_2^- はキサンチン酸化酵素 (XO) などの酵素反応や還元性物質の自動酸化で生成し、動脈硬化症、肺気腫 (腫) などの発症にかかわっている⁴⁾。一方、生体は O_2^- の無毒化機構としてスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を備えている。この酵素は2分子の O_2^- を不均化して酸素と過酸化水素に変換する反応を触媒し、 O_2^- の反応性を低下させる。これまでの研究から SOD は酸素呼吸をする生物の寿命を決定する因子の一つであることや⁵⁾、SOD の翻訳後修飾反応が糖尿病合併症の誘発に深く関与していることが示唆されている⁶⁾。そこで、生合成される SOD に加えて、SOD と同様に O_2^- を不均化する活性を有する成分、すなわち SOD 様活性を有する成分を食品から積極的に取り入れ、老化や生活習慣病を抑えようとする考えがにわかに高まりをみせている。

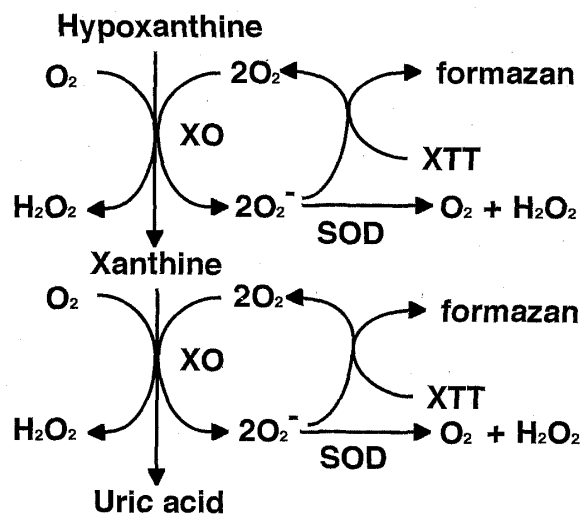


Fig. 1 Principle of the SOD assay based on the use of XTT¹⁰⁾

これに伴い、食品工業では、SOD 活性を有する食品成分の簡便なスクリーニング法の開発や食品工業分析に利用できる簡易・迅速なアッセイ法の開発が必要とされている。

SOD の活性測定法としては、酵素反応で発生させた O_2^- の捕そく能力をテトラゾリウム塩と競合させて測定する間接法が一般的に利用されている⁷⁾。しかしこの方法は測定に長時間を要すること、はん用されているニトロブルー-テトラゾリウム (NBT) が還元を受けると水に不溶性のホルマザンになり、分光光度計のセルをはじめ様々な器具に吸着してしまい、非常に取り扱いにくいこと、又 O_2^- 発生系の XO の還元型は O_2^- の関与なしに NBT を直接還元することから、活性測定の解釈が非常に複雑になるという欠点を抱えていた。

そこで著者らは、従来のテトラゾリウム塩が有していた SOD 活性測定における問題点を克服する目的で、還元型ホルマザンが水可溶性の新規テトラゾリウム塩 XTT (3'-[1-[phenylamino]-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonic acid hydrate) を利用する簡易・迅速な SOD 活性測定用 FIA システムの開発に着手した。

FIA の開発に先立ち、バッチ系での測定条件の設定を行った⁸⁾。測定法の原理を Fig. 1 に示す。バッチ系では基質としてキサンチンを用いて測定を行い、XO の作用で生じる O_2^- を、SOD の不均化反応と XTT のホルマザンへの還元反応との間で競合させた。検出は XTT ホルマザンの特異的吸収である 470 nm の吸光度を測定することで行った。最適条件として、0.1 mM キサンチン、

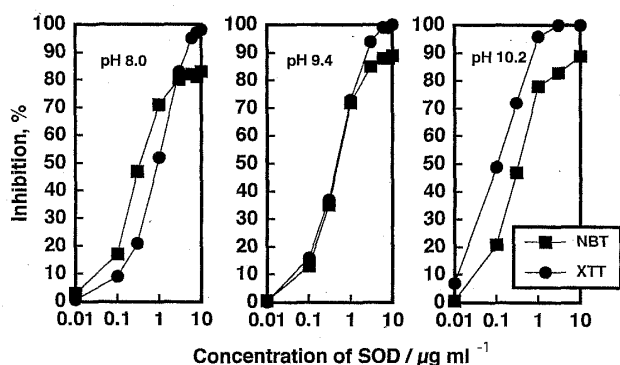


Fig. 2 SOD inhibition curves using XO/NBT (■) and the XO/XTT system (●)⁸⁾

The reaction mixture contained 2.5 ml of 50 mM carbonate buffer (pH 9.4 and 10.2) or 50 mM phosphate buffer (pH 8.0) and 0.1 ml each of 3 mM EDTA, 3 mM xanthine, 56.1 mU/ml XO, 0.75 mM XTT, and sample solution containing SOD concentration shown at abscissa.

0.1 mM EDTA, 0.025 mM XTT 溶液を含む緩衝液に SOD, 又は SOD 活性を有する試料を添加して, 20 分後の吸光度を測定した. 従って, SOD 活性を含まない試料では最大の吸光度変化が観察され, 活性の増大とともに吸光度は減少する. この条件で O_2^- による XTT の還元を 50% 阻害する SOD の活性を 1 単位と定めた. SOD 標品を用いて SOD の検量線に相当する阻害曲線を作成した (Fig. 2). ここには併せて従来の NBT 法で得られた阻害曲線も示した. NBT 法ではこれまでの報告と同様に SOD の過剰量を添加しても 100% の阻害は認められず, NBT と XO の直接的な相互作用が生じていることが明らかとなった. これに対して XTT 法では, 検討したすべての pH で 100% の阻害が認められ, O_2^- を介さない XO との直接的な相互作用は生じていないことが示唆され, 本法は NBT 法の大きな問題点を克服する方法であることが明示された. 実試料としてウサギ赤血球から抽出した SOD を用いて, NBT 法で得られる測定値との相関を調べたところ, 両者の測定値の間には相関係数 0.954 ($n=12$) の良好な直線関係が成立し, 本法が実際の生体試料に対して適用性を有していることが明らかとなった. そこで次に, 本法の食品試料への適用性を調べた. 食品としてはこれまでに SOD 様活性のあることが報告されている緑茶, コーヒー, ココア, ワインを用いた⁹⁾. これらのし(嗜)好飲料中には XTT を直接還元する物質が含まれていたが, 飲用に供する試料を 100 倍程度に希釈することで, その還元の影響を無視することが明らかとなった. 本 XTT 法で得られ

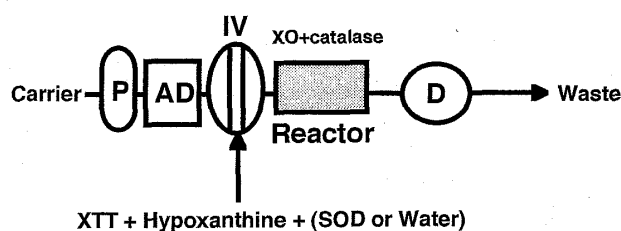


Fig. 3 FIA manifold for SOD assay¹⁰⁾

P: pump; AD: air damper; IV: injection valve; D: detector

た各嗜好飲料の SOD 様活性は, 従来法の一つである ESR 法で得られる値と同様の傾向を示し, 本法が食品試料への適用性を有していることが示唆された.

バッチ系で得られた以上の結果に基づき, 本測定原理を FIA へ展開した¹⁰⁾. 用いた FIA システムを Fig. 3 に示す. FIA システムでは, 測定に必要とされる O_2^- 発生のための XO をセファローズに固定化し, 迅速性の向上とともに, 経済性の賦与も図った. 試料溶液をヒポキサンチンと XTT を含む反応液と 1:9 の体積比で混合した後, その混合液 20 μ l を六方バルブでキャリア溶液中に注入した. ヒポキサンチンを基質として用いたのは, キサンチンよりも溶解度が高いことと, 化学量論的に 2 倍の O_2^- を発生するという理由である. 注入された試料と反応液は, XO リアクター内で Fig. 1 に示したスキームに従い反応する. そこで各試料の阻害率を次のように定義した.

$$\text{阻害率 (\%)} = 100 \times (H_0 - H_1) / H_0$$

ここで H_0 と H_1 はそれぞれ, 水を試料とした際のピーク高さと実際の試料で観察されるピーク高さである. はじめに H_0 を比較することで各種条件の最適化を行った. その結果, 反応液の XTT, 及びヒポキサンチンの濃度としてそれぞれ 2.3 と 2 mM を, 又キャリア溶液の流量を 0.4 ml/min に設定した. これらの最適条件で SOD 標品の測定を行った (Fig. 4). SOD 濃度が高くなるにつれ, ピーク高さは低くなり, 50% の阻害を与える SOD 濃度, すなわち IC_{50} は 70 μ g/ml であった. 本条件では 1 時間当たり 30 検体以上の分析が可能であり, 1 試料を平均 2 分以内で分析できることから, 従来のバッチ法の分析時間を 10 倍以上短縮することができた. 又, 1 か月にわたり分析を繰り返しても, XTT ホルマザンの流路への付着は全く認められず, 水可溶性 XTT は FIA に十分適用できることが明らかとなった.

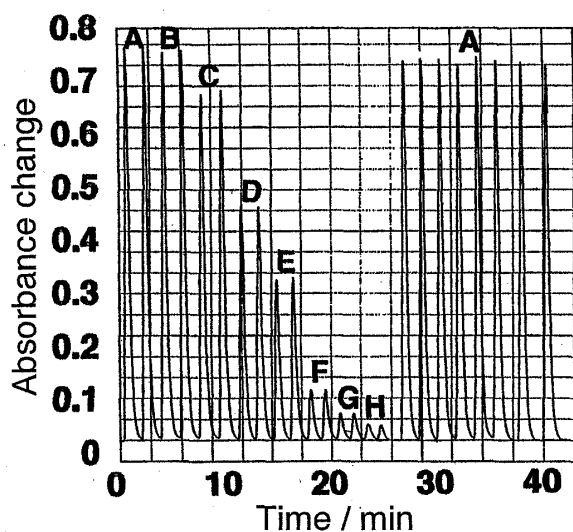


Fig. 4 A typical response curve of SOD preparation¹⁰⁾

The experimental conditions were as follows: carrier solution, 50 mM carbonate buffer (pH 10.2); hypoxanthine concentration, 2.0 mM; XTT concentration, 2.3 mM; flow rate, 0.4 ml/min. A, 0; B, 1; C, 10; D, 50; E, 100; F, 500; G, 1000; H, 2000 µg/ml

本条件では、XO リアクターは 140 回の繰り返し測定によってもほぼ一定のピーク高さを示し、高い操作安定性を有していることが示された。以上の結果から、XTT 法に基づく SOD アッセイ用の FIA システムは、バッチ系での特徴に加えて、分析時間とコストの面で従来法よりも優れていた。現在、本システムを使い、実際の食品試料への適用を試みているが、FIA システムの構築は SOD 様活性の測定に対して自動分析の道を開くものであり、食品工業における利用価値も高いと考える。

以上のように XTT 法に基づく SOD 活性測定は従来法が抱えていた問題点を克服し、食品工業をはじめ医学、生化学の分野で幅広く利用されていくと期待されるが、この方法にも全く問題がないわけではない。その一つは XTT の溶解性が十分ではなく、最適条件で用いる 2.3 mM の調製には加熱が必要とされることである。又、SOD に対する感度が pH に大きく依存することも実用上の問題点になると考えられた。

最近、石山らは XTT よりもはるかに溶解性の高いテトラゾリウム塩を開発した¹¹⁾。著者らは早速、そのうちの 2 種類のテトラゾリウム塩、すなわち 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate sodium salt (WST-1) と 4-[3-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-ben-

zene disulfonate sodium salt (WST-8) を SOD の活性測定に適用してみた¹²⁾。その結果、WST-1 を用いた場合、pH 8~10.2 の範囲で、ほとんど pH に依存しない一定した SOD の検出感度が得られ、XTT の有する欠点 WST-1 を用いることで完全に克服できることが明らかになった。現在、このテトラゾリウム塩に基づく SOD アッセイ法を XTT 法と同様に更に FIA に展開して、食品試料への適用性を詳細に検討している¹³⁾。

2.2 酵素固定化マイクロプレートによる食品分析

酵素免疫測定法に常用されているマイクロプレートは、反応場の集積化という観点から食品の分析分野に対しても極めて有用である。マイクロプレートのリキッドハンドリングを簡易にする周辺機器の充実も魅力的である。このマイクロプレートのウェル表面に分析用酵素を固定化すれば繰り返し利用が可能となり、分析コストを大幅に低減できる。そこで著者らは、酸化酵素とペルオキシダーゼ (POD) を、マイクロプレート表面に安定にかつ高い活性を維持したまま固定化する技術の開発に取り組み、それを用いた酸化酵素の基質定量システムの構築を行った。

指示反応に用いた POD はそのタンパク質分子表面が糖鎖で覆われているため、固定化に先立ち、過ヨウ素酸酸化した後、1,6-ジアミノヘキサンを修飾し、還元処理することでアミノ化した。このアミノ化 POD をグルタルアルデヒド (GA) で活性化したマイクロプレート上に固定化した。固定化 POD の活性、並びに安定性は GA による活性化条件に大きく依存しており、GA 濃度を 10%、活性化 pH を 10.0、活性化時間を 8 時間にしたときに最適であった。POD を固定化したウェルに 2 mM ABTS {2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (pH 6.5)} を 180 µl 添加しておき、これに過酸化水素を含む 20 µl の試料を加えた。室温で 10 分間反応させたときに生じる酸化型の ABTS を、415 nm での吸光度変化としてマイクロプレートリーダーで測定した。本条件で試料溶液中の濃度として 0.1~1.0 mM の範囲の過酸化水素の定量が可能であり、固定化 POD は 30 回の連続測定と 5℃ での 1 年間の保存に対して活性の低下を示さなかった。

次にこの POD 固定化ウェルを指示反応の反応場としたグルコースの定量システムを設定した。主反応としてグルコース酸化酵素 (GOD) を固定化した別のウェルを作製し、試料をこのウェル内で 30 分間反応させた後、その反応液の 20 µl を POD 固定化ウェルに移すことで試料中のグルコースを定量した (Fig. 5)。GOD の固定

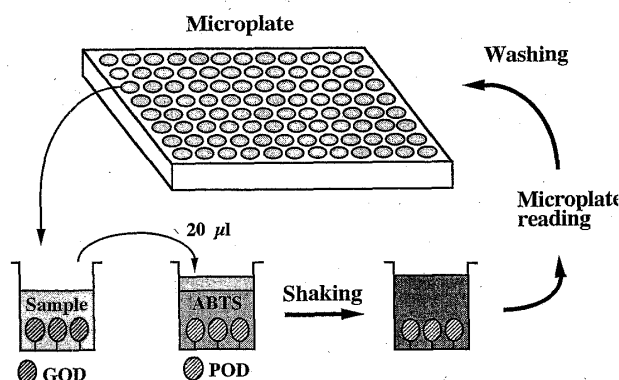


Fig. 5 Principle of the immobilized enzyme-based microtiter plate assay for glucose³⁾

化には POD のようにアミノ化は必要なかったが、十分な活性と安定性を得るためには、POD よりも更に過酷な GA による活性化条件が必要とされ、ウェルの底面部にアルドール縮合で生じたと考えられる GA 重合物が付着していた¹⁵⁾。この GOD 固定化ウェルを主反応としてグルコースの濃度依存性を調べたところ、20～1000 μM の範囲で直線性が認められた。各種果汁飲料やかんきつ搾汁液の本法による分析結果は F-kit 法と良好に一致し、本法が実際の食品試料に対して十分な適用性を有していることが明らかとなった。この GOD 固定化ウェルは 30 回以上の繰り返し利用が可能であった。

グルコースの定量と同じ原理で更にアルコール酸化酵素、及びアスコルビン酸酸化酵素 (ASOD) を固定化したウェルを作製し、それぞれエタノールとアスコルビン酸の定量を行った¹⁶⁾。ASOD は過酸化水素を生成する微生物由来の新規酵素を用いた。両者の酸化酵素共にその活性と安定性は、GOD と同様に GA による活性化条件に大きく依存したが、最適条件で調製したウェルはエタノール、アスコルビン酸共に 1 mM までの定量に利用

可能であり、30 回の繰り返し利用も可能であった。実試料への適用性も認められ、本測定原理は様々な酸化酵素の基質定量に適用が可能であることが示された。

一方、GA による酸化酵素の固定化には過酷な活性化条件が必要とされ、プレートの光透過性が著しく低下した。基質定量システムとしては光透過性が低い主反応の場合と吸光度測定を行う指示反応の場合を分けて設計したため支障はなかったが、本原理を例えば脱水素酵素などに適用する場合には、主反応と指示反応の場合が同じであることが望ましい。そこで GA 法に代わる光透過性を損わないマイクロプレートへの酵素固定化法の開発を行った。その方法として著者らは、これまでに酵素センサーの開発¹⁷⁾で利用されているアビジン-ビオチン架橋法の適用を試みた (Fig. 6)¹⁸⁾。モデル酵素としては上述の GOD を用いた。固定化手順としては、まずプレートを活性化ビオチン誘導体で共有結合にてビオチニル化した後、アビジンを添加してアビジン-ビオチン複合体をプレート上に形成させた。この結合は共有結合ではないが、極めて安定であることが知られている。次にあらかじめビオチニル化した GOD を添加してアビジン上に GOD を結合させた。その後、アビジンとビオチニル化 GOD を交互にインキュベートし、プレート表面に GOD 累積膜を形成させた。予想どおり、この累積回数に依存して GOD の活性は上昇した。16 回でその上昇傾向は頭打ちになったため、16 回の累積回数を最適固定化条件として採用した。この段階でも、プレート表面の光透過性は完全に維持されていた。この GOD 固定化ウェルも、上述の GOD 固定化ウェルと同じ濃度範囲でグルコースに対する定量性を示し、実試料への適用性も認められた。安定性は GA 法よりも更に高く、50 回の繰り返し測定が可能で、室温に半年間放置しても活性の低下は認められなかった。今後この固定化法を他の酵素に適用して、様々な分析法を開発したいと考えている。

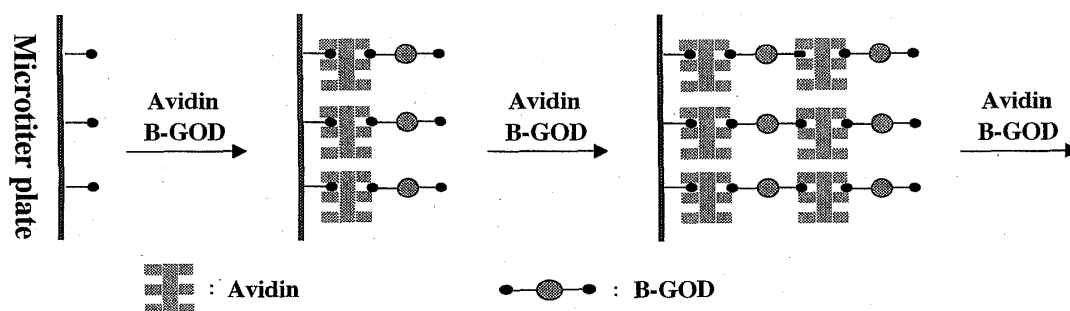


Fig. 6 Stepwise deposition of avidin and biotinylated glucose oxidase (B-GOD) on a microtiter plate surface¹⁸⁾

本酵素固定化マイクロプレート法は、1枚のプレートで96試料の分析も可能であり、多検体の一斉分析に適している。又、プレート上に異なる酵素を固定化すれば、1枚のプレートで複数の成分を同時に定量することも可能であると考えられる。従って、食品分析分野での様々な応用が期待される。

3 固定化微生物を利用した食品分析システム

微生物は通常、膜上に固定化した後、更に透析膜で被覆して電極上に設置する、いわゆる微生物電極の形状で用いるのが簡便である。食品の分析に対する微生物電極の利用は固定化酵素を用いたシステムの開発に比べて進んでいない。その理由としては微生物は酵素と比べて分子識別部位としての特異性に欠けるという点が挙げられる。又、これまでに開発された微生物電極は概して応答が遅く、迅速な分析には不向きであると考えられていたこともその理由の一つである。しかし、微生物菌体中ではその反応系に必要な補酵素を含めすべてが菌体内に取りそろえられていることなどから、極めて経済的な測定法であり、更に酵素と比較して、微生物が一群の化合物に対して高い資化性を示すことから、酵素による分析が困難な群特異的定量法としての利用価値を有している。著者らは微生物の有するその特性を利用して、酵素による分析が困難な食品成分に対する微生物電極の開発を行った。更に、培養条件を制御すれば、同じ菌株を異なる物質に対する分子識別部位としても利用できることを、実際の食品成分の分析システムを作製することで明らかにした。以下に牛乳中の低級脂肪酸の定量システム、並びにワイン中の有機酸の定量システムについて述べる。

3・1 生乳中の低級脂肪酸の FIA

生乳中、あるいは牛乳中の乳脂肪が、乳由来又は微生物由来のリパーゼにより分解を受けると、脂肪酸が遊離して脂肪分解臭（ランシッド臭）を生じる。このランシッド臭は主に炭素数が4から12の低級脂肪酸によることが知られている¹⁹⁾。従来、牛乳中の低級脂肪酸は煩雑な前処理と分析に長時間を要するガスクロマトグラフィー（GC）により分析されている²⁰⁾。そこで著者らは、牛乳中の低級脂肪酸を定量する方法として、前処理操作を必要とせず、かつ短時間での分析が可能な迅速定量法の設定を目的として、*Arthrobacter nicotiana*を用いた固定化微生物-FIAシステムの開発を行った²¹⁾。本微生物電極の構造をFig. 7に示した。*n*-酪酸を含む液体培地で培養した菌体をポリビニルアルコール（PVA）膜内に包括固定化し、クラーク型酸素電極のテフロン膜上に装

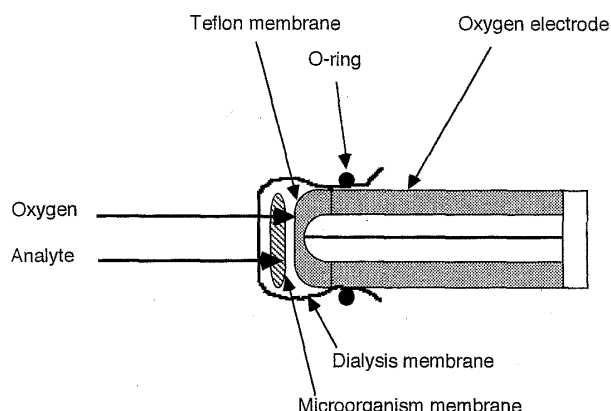


Fig. 7 Schematic diagram of the microbial electrode²¹⁾

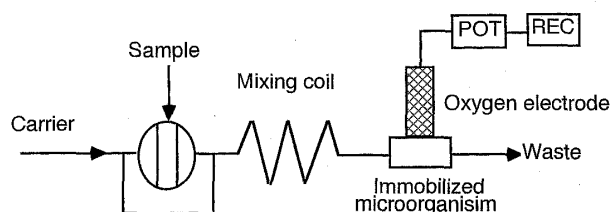


Fig. 8 FIA system for determining short-chain fatty acids or organic acids

POT: potentiostat; REC: recorder

着した。この微生物膜を保護し、更に高分子物質が微生物膜に接触することを避けるために、透析膜で外側を被覆した。本微生物電極を検出端として、低級脂肪酸のFIAシステムを試作した（Fig. 8）。本システムでは、低級脂肪酸標準液又は生乳、牛乳試料はキャリアー溶液中に直接注入され、ミキシング後、微生物電極を設置したフローセルへと移送される。本システムにより、種々の脂肪酸に対する応答を比較したところ、本電極はカプリル酸（ $C_{8:0}$ ）を最大として酪酸（ $C_{4:0}$ ）からラウリン酸（ $C_{12:0}$ ）に対して高い応答を示し、生乳、牛乳中に高い含量存在するパルミチン酸等の長鎖脂肪酸にはほとんど応答を示さないことが明らかとなった。そこで10検体の生乳試料を用いて、従来法であるGC法との比較を行った²²⁾。本システムでの応答とGC法で分析された全脂肪酸含量との間の相関係数は0.559であったのに対して、 $C_{4:0} \sim C_{12:0}$ の低級脂肪酸の合計値との間の相関係数は0.916であり、本微生物電極が生乳中の低級脂肪酸に対して高い特異性を有していることが明らかとなった。本システムでは酪酸換算で0.11～1.7 mMの範囲で

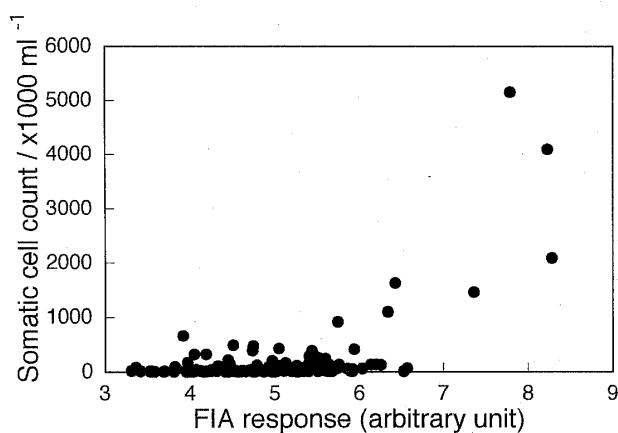


Fig. 9 Relationship between the FIA response and the somatic cell count of raw milks ($n = 150$)¹⁾

直線的応答を得ることができ、1時間当たり20検体程度の分析が可能であった。

次に生乳試料の品質評価への適用性を特に乳房炎との関連から追求した。一般に乳房炎乳は正常乳と比較して高い脂肪分解速度を示し²³⁾、又その分解により生じる脂肪酸の中でも、低級脂肪酸濃度が顕著に増加している²⁴⁾。そこで、本システムによる生乳試料(150検体の分房乳)の低級脂肪酸濃度と、その体細胞数との比較を行った(Fig. 9)²⁵⁾。両者の間に、直線的相関関係が成立するとは言にくいものの、一定の体細胞数、例えば 10^6 /ml以上の体細胞数を有する乳房炎の疑いのある試料に対しては、本システムの応答は急激に増加する傾向を示した。従って、本システムは 10^6 /ml以上の体細胞数を有する異常乳の検出に適用可能であり、FIA法に基づいた体細胞数の間接的計測が可能であることが示唆された。同様に生乳の生菌数とFIAシステムの応答との関連を調べたところ、両者の間には一定の正の相関が認められ、本FIAシステムは生乳の品質評価に対して高い適用性を有していることが明らかとなった²⁶⁾。

3.2 ワイン中の有機酸のFIA

微生物を分子識別部位に用いるもう一つの利点は、培養条件を制御することで様々な代謝経路を誘導できる点にある。このことは同じ菌株であっても、培養に用いる炭素源などを変更するだけで、異なる物質に対する分子識別部位として利用できることを意味する。

この特性を積極的に食品の分析手法に取り入れる試みとして、*Pseudomonas putida* (ATCC 17642)を用いた有機酸の分析システムの開発を行った²⁷⁾。微生物電極は上述の低級脂肪酸の分析と同じように微生物膜を調製し

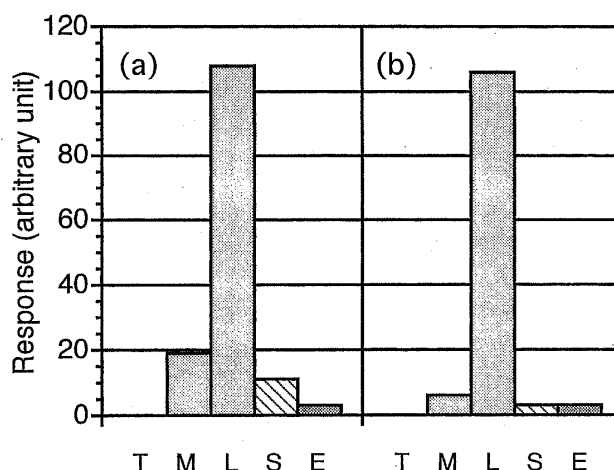


Fig. 10 Selectivity of the microbial electrode-FIA system using a microorganism cultivated in a medium containing L-lactic acid²⁷⁾

T: 10 mM L-tartaric acid; M: 10 mM L-malic acid; L: 10 mM L-lactic acid; S: 10 mM succinic acid; E: 10% ethanol. Each response was determined at (a) 130 min and (b) 400 min after the fixation of the microbial electrode into FIA system.

て、酸素電極上に装着し、テフロン膜で被覆することで作製した。この微生物電極をFig. 8のFIAシステムに組み込み、有機酸定量用のFIAシステムとした。

初めにL-乳酸を炭素源として培養した菌体を、FIAシステムに設置して種々の物質に対する応答を調べたところ、10 mMの有機酸ではL-乳酸、L-リンゴ酸、及びコハク酸に対して呼吸活性の変化が認められた{Fig. 10(a)}。ワインに含まれる5 mMグルコース、フルクトース、及び2%グリセロールは応答を示さなかった。一方、本微生物膜をFIAシステムに設置したまま400分間連続的に緩衝液を送液したところ、L-乳酸に対する応答は変化しなかったのに対して、L-リンゴ酸及びコハク酸の応答は顕著に減少した{Fig. 10(b)}。従って、本固定化微生物膜を一定時間緩衝液でコンディショニングすれば、L-乳酸に選択的なFIAシステムを構築できることが示唆された。そこで10 mM L-乳酸に対する応答を指標として固定化条件、並びに測定条件を以下のように最適化した：菌体固定化量 10 mg (湿潤重量)/cm² (膜表面積)；流量 0.5 ml/min；キャリアー溶液 pH 8。これらの条件では0.5～5.0 mMの範囲でL-乳酸濃度とピーク電流値との間に相関係数 0.998の直線関係が認められ、1時間に15検体の分析が可能であった(Fig. 11)。市販ワインの分析では、10 mM以上のL-乳酸を含む試料に対して、市販の酵素分析キットであるF-kit法との

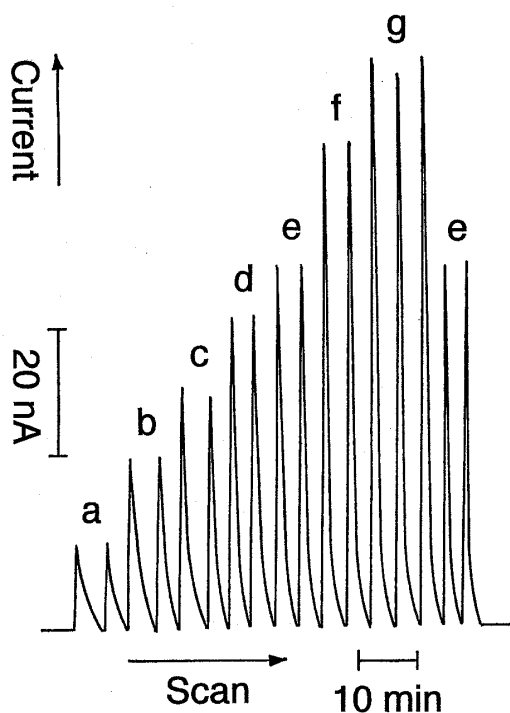


Fig. 11 Typical response curve for L-lactate²⁷⁾
a; 1; b, 2; c, 3; d, 4; e, 5; f, 7.5; g, 10 mM

良好な一致が認められ、本システムを用いてワイン中のL-乳酸を定量できることが示された。

一方、メソ酒石酸で培養した *P. putida* は L-リンゴ酸とコハク酸に高い応答を示したが、ワイン中に含まれる10% エタノール、及びL-乳酸にも比較的大きな呼吸活性の変化を示した [Fig. 12(a)]。種々の検討の結果、キャリアー溶液に低濃度のエタノール (0.01%) とL-乳酸 (0.05 mM) を共存させることで、エタノールとL-乳酸の応答をほぼ消去できることが明らかとなった [Fig. 12(b), (c)]。最適条件ではL-リンゴ酸とコハク酸の両者共に、5 mM まで各濃度と応答との間に直線関係が認められた。6検体のワイン試料を用いてL-リンゴ酸とコハク酸の合計濃度と応答電流値との間の相関を調べたところ、共存するL-酒石酸とL-乳酸の影響は認められず、両者の間に相関係数 0.969 の直線関係が成立した。従って、本微生物電極の示す応答はワイン中のL-リンゴ酸とコハク酸の合計濃度を反映することが明らかとなった。

以上の結果は、培養条件の制御により、*P. putida* は異なった有機酸に対する固定化微生物-FIA システムの分子識別部位として利用できることを示すものである。

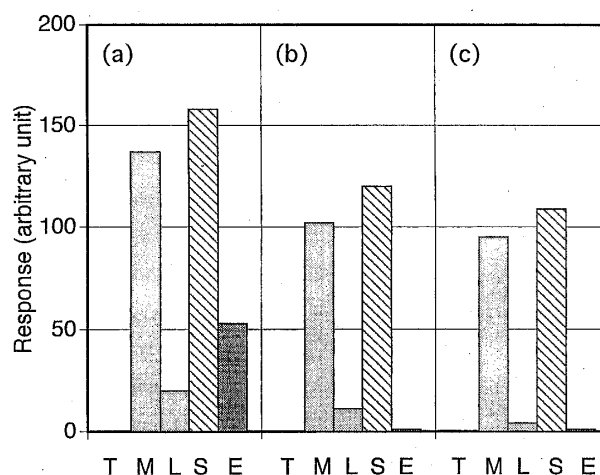


Fig. 12 Selectivity of the microbial electrode-FIA system using a microorganism cultivated in a medium containing *meso*-tartaric acid²⁷⁾

T: 10 mM L-tartaric acid; M: 10 mM L-malic acid; L: 10 mM L-lactic acid; S: 10 mM succinic acid; E: 10% ethanol. The used carrier solutions were (a) 0.2 M phosphate buffer (pH 8.0), (b) the buffer containing 0.01% ethanol and (c) the buffer containing 0.01% ethanol and 0.05 mM L-lactic acid.

4 結 語

本論文では食品の生体調節機能因子の一つであるSODの活性測定システムの開発、並びに風味にかかわる感覚機能因子である低級脂肪酸の分析システムの開発を中心に紹介した。SOD活性測定システムでは固定化酵素を分子認識部位としてではなく、生体内反応を *in vitro* で再現する反応器として利用していることから、従来の酵素センサーシステムとは異なったタイプの分析システムであると言える。今後、他の生体調節機能因子の分析システムを同様の原理に基づいて開発していく予定である。

一方、微生物の有する特異性も食品分析に対して極めて魅力的であることを、二つの固定化微生物-FIA システムの開発を通じて紹介した。この個性的な特異性を積極的に利用していけば、これまでに分析が困難であった複雑な物質群に対しても簡便でかつ迅速な分析法を設定できることが強く示唆された。これらの研究が端緒となり、この分野が更に発展していくことを期待する。

本来、それぞれの食品試料には無限とも言える種類の成分が存在している。しかし、これまでに固定化酵素、固定化微生物を利用して分析が行われた食品成分はわずか40成分程度に過ぎないことを最後に付記する²⁸⁾。著

者は固定化生体触媒の有する無限の可能性のほとんどが、まだ机上に置かれたままであると考えている。

本稿を執筆する機会を与えてくださいました中国四国支部支部長・岡山大学理学部の本水昌二教授に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 受田浩之：日本食品科学工学会誌，**42**，849 (1995)。
- 2) 受田浩之：J. Flow Injection Anal., **11**，142 (1994)。
- 3) H. Ukeda: *Recent Res. Devel. in Agricultural & Food Chem.*, **1**, 273 (1997)。
- 4) 大柳善彦：“活性酸素と病気”，(1989)，(化学同人)。
- 5) 井上正康：“活性酸素と医食同源”，(1996)，(共立出版)。
- 6) H. Ukeda, Y. Hasegawa, T. Ishii, M. Sawamura: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 2039 (1997)。
- 7) C. Beauchamp, I. Fridovich: *Anal. Biochem.*, **44**, 276 (1971)。
- 8) H. Ukeda, S. Maeda, T. Ishii, M. Sawamura: *Anal. Biochem.*, **251**, 206 (1997)。
- 9) 島村智子，前田 進，受田浩之，沢村正義：日本農芸化学会誌，**72**，1181 (1998)。
- 10) H. Ukeda, S. Maeda, M. Sawamura: *J. Flow Injection Anal.*, **15**, 39 (1998)。
- 11) 石山宗孝：臨床検査，**41**，995 (1997)。
- 12) H. Ukeda, D. Kawana, S. Maeda, M. Sawamura: accepted to *Biosci. Biotech. Biochem.*
- 13) 受田浩之，川名大介，A. K. Sarker，沢村正義：第33回フローインジェクション分析講演会講演要旨集，p. 37 (1998)。
- 14) H. Ukeda, Y. Fujita, M. Ohira, M. Sawamura: *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3858 (1996)。
- 15) 受田浩之：化学と生物，**35**，496 (1997)。
- 16) H. Ukeda, M. Ohira, M. Sawamura: Abstract of 8th European Congress on Biotechnology, p. 416 (1997)。
- 17) T. Hoshi, J. Anzai, T. Osa: *Anal. Chem.*, **67**, 770 (1995)。
- 18) H. Ukeda, M. Ohira, A. K. Sarker, M. Sawamura: accepted to *Food Research International*。
- 19) S. Kuzdzal-Sovoie: *Int. Dairy Fed.-Bull. Doc.*, **118**, 53 (1980)。
- 20) C. de Jong, H. T. Bading: *J. High Resolut. Chromatogr.*, **13**, 94 (1990)。
- 21) H. Ukeda, G. Wagner, U. Bilitewski, R. D. Schmid: *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 2324 (1992)。
- 22) H. Ukeda, G. Wagner, G. Weis, M. Miller, H. Klostermeyer, R. D. Schmid: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **195**, 1 (1992)。
- 23) C. H. Fitz-Gerald, H. C. Deeth, B. J. Kitchen: *J. Dairy Res.*, **48**, 253 (1981)。
- 24) F. Atroshi, A. Rizzo, T. Osterman, J. Parantainen: *J. Vet. Med.*, **A36**, 321 (1989)。
- 25) 受田浩之，R. D. Schmid：日本農芸化学会関西支部大会第376回講演会講演要旨集，p. 52 (1992)。
- 26) H. Ukeda, Y. Fujita, M. Sawamura, H. Kusunose: *Anal. Sci.*, **10**, 683 (1994)。
- 27) H. Ukeda, N. Yamamoto, M. Sawamura, H. Kusunose: *Anal. Sci.*, **11**, 941 (1995)。
- 28) G. Wagner: “Food Biosensor Analysis”, Edited by G. Wagner, G. G. Guilbault, p. 219 (1994), (Decker, New York)。

要 旨

固定化酵素，固定化微生物を利用した，食品成分の簡易・迅速分析システムの開発を行った。はじめに固定化酵素とフローインジェクション分析（FIA）システムとの組み合わせで，食品の生体調節機能因子の一つであるスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）活性の計測システムを試作した。本システムはスーパーオキシド陰イオンの発生に固定化キサンチン酸化酵素を利用した経済的な分析法であり，1検体の分析時間は2分以内であった。次に，酵素を固定化したマイクロプレートを利用する新しい分析システムの開発を試みた。アビジン-ビオチン架橋法によりプレート上に固定化したグルコース酸化酵素は高い活性を示し，食品中のグルコース分析にも適用可能であった。操作安定性，並びに貯蔵安定性も優れており，50回の繰り返し測定と半年間の室温保存でも活性の低下は認められなかった。微生物が有するユニークな群特異性は新規分析項目の開拓に役立つ。その例として，固定化 *Arthrobacter nictiana*-FIA システムによる低級脂肪酸の簡易・迅速分析システムの開発を行った。本システムで得られる応答は，牛乳の酸敗臭の原因とされる炭素数4から12の低級脂肪酸の濃度の合計値と高い相関を示し，1検体の分析時間は約3分であった。本システムの応答は生乳中の体細胞数と一定の相関を示し，乳房炎乳の検出にも適用可能であることが示唆された。更に固定化 *Pseudomonas putida* をワイン中の有機酸の分析に利用したシステムについても述べる。