解 説

食品成分とその機能評価のためのバイオセンシング

松本 清*・受田浩之**

Biosensing for Determination of Food Components and Estimation
of Their Functions

Kiyoshi MATSUMOTO* and Hiroyuki UKEDA**

**Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School
of Kyushu University, Fukuoka 812-8581****Department of Bioresources Science, Faculty of Agriculture, Kochi University,
Nankoku 783-8502*

1. はじめに

新栄養成分表示基準の導入や HACCP (危害分析重要管理点) 方式の推進により食品工業は大きな変革を迫られ、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の重要性が益々高まっている。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ので、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互に変化しながら、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飛躍的に増加しつつある¹⁾。これら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。

このような背景のもとに著者らは、前処理を必要としない高選択的分析法の設定とそれらの分析法の簡易・迅速化、更には食品成分の機能性評価法の確立を目指し

て、固定化生体触媒を利用した計測システムの開発に取り組んできた^{2)~7)}。本解説では、固定化生体触媒とフローインジェクション分析 (FIA) 法の結合による食品成分分析の手法について述べた後、これからの最重要課題として開発が待たれる機能性評価法の迅速・簡便化の方向性について幾つかの先駆的方法を例に解説する。

2. バイオセンサーと FIA

酵素、微生物、抗体といった生体分子が有する高い分子識別能を、測定対象物質に対する選択的識別素子として利用したのがバイオセンサーである⁸⁾。その基本構成は、測定対象物質を特異的に認識する分子識別部位 (レセプター) と、そこで生じた変化を電気信号に変換する信号変換部位 (トランスデューサー) からなる。食品の分析を目的として開発されたバイオセンサーは、レセプター部位に酵素あるいは微生物を用いたものが大部分である。その場合、レセプター部位で、測定対象物質の化学変化が生じることから、その変化を直接または間接に固体電極で電気化学的に検出する電極バイオセンサータイプが最も広く用いられている。

一方、FIA は 1975 年に開発された連続流れ分析法である⁹⁾。この方法は細管内に適当な試薬溶液を流してお

* 九州大学大学院農学研究院 (〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1)

** 高知大学農学部 (〒783-8502 南国市物部乙 200)

き、これに途中から試料を注入し、ミキシング部で混合もしくは反応させ、下流に設置したフローセルにより検出するものである。この流れ分析法をバイオセンサーと組み合わせる場合、その基本的システムとしてはレセプター部分を固定化生体触媒が充填されたミニリアクターに求め、化学変化量を下流に設置したトランスデューサーで検出する方式が取られる (図 1 (a))。もちろん、図の波線内のように、単に試料をミキシングコイルで攪拌しながら送りレセプターとトランスデューサーを一体化させた電極装着型検出器で検出するタイプも用いられている。FIA では、典型的な応答曲線として図 1 (b) のような形状をしたピークが得られる。このようなシステムでは、バイオセンサーの有する高い特異性に、FIA の簡易・迅速性が付与されているため、前処理をほとんど必要とせず、リアルタイムで分析結果を得ることが可能であり、自動化や多数試料の連続分析にも適している。まさに食品分析技術に課せられている多くの条件が満足された理想的な方法であると言え、その進歩が益々期待されている¹⁰⁾。

3. 食品成分分析

1. 酵素センサー/FIA

オキシダーゼの基質は、反応で消費される酸素をクラーク型酸素電極で測定するか、または生成する過酸化水素をグラッシカーボン電極や白金電極等の固体電極で定電位電解することで定量される。例として、スルファイトオキシダーゼ固定化リアクターと透析膜被覆白金フローセルを用いた亜硫酸測定用酵素センサー/FIA システムを紹介する²⁾。酵素は臭化シアン活性化セファロースに固定化し、酵素反応によって生成する過酸化水素を $+0.5\text{V vs. Ag/AgCl}$ で検出した。本センサーはリン酸塩緩衝液 (pH 8.0) をキャリアー溶液として 1.3 ml/min で送液するとき、亜硫酸濃度 $0.5\sim 10\text{ ppm}$ の範囲で応答電流との間に直線関係を与えた。実際のワイン試料中の亜硫酸測定ではタンニンと思われる若干の妨害物質の影響が認められたが、2.5% のゼラチン液で前処理することにより解決された。

天然には NAD (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) あるいは NADP (NAD のリン酸化物) を受容体とするデヒドロゲナーゼが多数存在する。デヒドロゲナーゼ反応は、一般にその平衡が大きく NAD の生成系に傾いている。そこで、酵素分析法では平衡を NADH 生成系 (正反応方向) に移動させるために、反応で生成する還元型 NADH を第二の酵素を用いて NAD に再生

図 1 (a) 基本的なバイオセンサー/FIA システムの構成と (b) 典型的な応答ピーク

する方法が用いられる。この再生反応を適当なトランスデューサーでモニターできれば原理的にはすべてのデヒドロゲナーゼの基質定量系を構築することが可能となる。第一の NADH 酸化再生系は、ジアフォルゼとビタミン K_3 (メナジオン) を用いた以下の反応系である。

還元型ビタミン K_3 は溶存酸素で速やかに酸化されるため、本再生系では、結果的に NADH の酸化を溶存酸素の消費として捉えることができる。本再生反応はワイン中のエタノールとリンゴ酸の定量に利用され良好な結果が得られた¹¹⁾¹²⁾。

第二の溶存酸素による再生系は、NADH オキシダーゼ (NOD) を用いる方式である。著者らは *Bacillus*

licheniformis 由来の NOD を用い、デヒドロゲナーゼ系酵素と NOD を組み合わせ、溶存酸素による NADH から NAD への直接酸化系を構築した。このシステムにより、希釈操作のみで市販アルコール飲料中のエタノールまたはグリセロールの定量が可能であることを実証した²⁾。このシステムでは酸素消費量をモニターしているが、同様のデヒドロゲナーゼ系で NADH の再生に NOD を用いて最終的に生成する過酸化水素をモニターすることでリンゴ酸¹³⁾ 及びイノシン酸¹⁴⁾ の定量も可能であった。

一方、酵素反応によって生成した NADH や NADPH そのものを蛍光検出 (励起波長 340 nm, 蛍光波長 455~460 nm) する方法も高感度で好ましい手段である。例えば、著者らは従来酵素センサーでは不向きであった酒石酸やコハク酸をこの方法で測定した。酒石酸については、D-リンゴ酸デヒドロゲナーゼの L-酒石酸に対する二次的活性 (主基質は D-リンゴ酸) を利用し、NADH を蛍光検出することにより L-酒石酸を選択的に定量することが可能であった¹⁵⁾。また、コハク酸はグリオキシレートとの共役によるイソクエン酸リアーゼの作用、並びに、それに続くイソクエン酸と NADP を基質とするイソクエン酸デヒドロゲナーゼの作用により生成した NADPH を蛍光検出することによって定量した¹⁶⁾。

2. 微生物センサー/FIA

微生物菌体内には反応系に必要な酵素、補酵素を含めすべてが取り揃えられていることから、極めて経済的な測定法であり、さら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。その一例とし、牛乳の脂肪分解臭の原因となる低級脂肪酸を定量する微生物センサー/FIA システムを紹介する²⁾。

本微生物電極の構造を図 2 に示す。n-酪酸を含む液体培地で培養した *Arthrobacter nicotiana* 菌体をポリビニルアルコール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着した。図 1 (a) 破線内の FIA システムで本微生物電極を検出端として用いることで牛乳試料中の低級脂肪酸を定量できる。本電極は酪酸からラウリン酸までの脂肪酸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などの長鎖脂肪酸にはほとんど応答を示さない。従って、得られる電極応答はガスクロマトグラフィーで得られる炭素数 4~12 の脂肪酸濃度の合計値と高い相関を示す。

生乳試料の品質評価に対する本システムの適用性を特

図 2 生乳の体細胞数とセンサー応答 (n-酪酸濃度に換算して表示) との関係
挿入図は微生物電極の構造

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、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する。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体細胞数との比較を行った (図 2)。両者の間に直線的相関関係が成立するとは言いにくいものの、一定の体細胞数、例えば 10^6 /ml 以上の体細胞を含む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。この結果から、本システムは異常乳の検出に利用できることが明らかとなった。

微生物の持つもう一つの特徴は、培養条件を変化させることで同じ菌体を異なる物質に対する分子識別素子として利用できることである。この特性を巧みに利用して、ワイン中の有機酸を定量するための微生物電極/FIA システムが開発された⁴⁾。

3. 多機能センサー/FIA

上述の酵素センサーあるいは微生物センサーは食品中の単一成分、または同じ系統の化合物群の定量に対して開発されたものである。しかしながら、食品分析では場合によっては、各成分の組成、量比及び相互作用によって醸し出される食品全体としての品質を捉えることも重要である。このような観点から、複数かつ系統の異なる食品成分の同時定量が可能なバイオセンサーシステムの開発を行った。

図 3 にその FIA システムの概略を示す。(a) は複数流路-複数検出器、(b) は複数流路-単一検出器から構成されたシステムである。各流路には測定対象物質に対応して独立の酵素リアクターを設置し、そこには各リアク

図 3 多機能酵素センサー/FIA システム

(a) 乳酸、グルコース、エタノールの同時定量システム（複数流路—複数検出器タイプ）、(b) リンゴ酸、乳酸の同時定量システム（複数流路—単一検出器タイプ）、(c) 乳酸、グルコース、スクロースの同時定量システム（多チャンネルCFA）

POT, ポテンシostat; REC, レコーダー; AsA カラム, アスコルビン酸除去カラム; OE, 酸素電極; A, リン酸塩緩衝液 (pH 8.0); B・C, リン酸塩緩衝液 (pH 7.0); D, ビタミン K₃ 飽和ピロリン酸塩緩衝液; E, リン酸塩緩衝液 (pH 6.8)

ター内の固定化酵素の最適条件に合わせたキャリアー溶液を流している。試料は 16 方バルブを用いて同時に複数流路に注入するが、(a) のシステムでは、同時に各リアクター内で反応が進行し、下流にその変化を捉えることができるマルチチャンネル式の検出器をフローセルに集積しておく。(b) のシステムでは、リアクターの後方で流路を合流させ、検出器へ導いているが、試料の移送速度を調節することで、検出器への到達時間を制御して、各リアクターでの反応を一連のピークとして検出することができる。(a) の例として、マルチチャンネル型白金フローセルを用いた乳酸、グルコース、エタノールの同時定量システムを¹⁷⁾、また、単独のクラーク型酸素電極を検出端とした (b) のシステムを用いて、ワイン中のリンゴ酸と乳酸の同時定量システムを開発した¹⁸⁾。

図 3 (c) は多チャンネル CFA (Continuous Flow Analysis) 法と呼ばれるもので、多成分測定を可能にすると同時に、流路の切り替えによる逐次注入システム以上の再現性を達成し得るシステムである。このフローシステムは、2 つの多流路バルブ (サンプル、ブランク、標準液の導入制御用 V1 及びチャンネル切り替え用 V2)、1 台のポンプ及び検出システムにより構成されている。流路の切り替えは、バルブ V1 と V2 専用コントローラにより自動的に制御されている。このシステムでは、インジェクション操作の無い CFA を基本にしているので、通常の FIA 法とは異なったプラトー値を持った階段状のシグナルが得られ、定常状態を示すプラトー値を測定することにより優れた再現性が得られる。このシステムで、乳酸飲料中の乳酸、グルコース、スクロースの

逐次定量を行った¹⁹⁾。

4. 食品機能評価

食品の有する生体調節機能は単一成分の濃度ではなく、複合的な生物活性として捉えられることが多い。当然、その活性の評価法としても成分分析と同様に特異性、迅速性、簡便性、並びに自動化に適したフォーマットが要求される。ここではSOD（スーパーオキシドジスムターゼ）様活性と二糖類分解酵素（ α -glucohydrolase；AGH）、アンジオテンシンI変換酵素（ACE）の阻害活性評価法について述べる。

1. SOD 様活性の迅速計測

酵素SODは2つのスーパーオキシドアニオン（ O_2^- ）を過酸化水素と酸素に不均化する酵素である。本酵素は酸化ストレスに対する防御の上で重要な役割を果たしている。生物の有するSOD活性と寿命との間の有意な相関、生活習慣病や種々の疾病との関わりも示され、その活性がライフサイエンスの様々な分野において重要な知見を与えることが明らかにされている。また、SODと同様に O_2^- を不均化する活性（SOD様活性）や O_2^- の消去活性を有する成分を食品から摂取することで、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。従って、食品試料の有するSOD様活性を簡易・迅速に測定する技術が食品工業においても強く必要とされている。

SODの活性測定法としては酵素キサンチンオキシダーゼ（XO）によるヒポキサンチンの酸化反応で生成させた O_2^- の捕捉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（図4）。し

図4 SOD活性測定法の原理図

かしながら汎用されているニトロブルー-テトラゾリウム（NBT）は O_2^- により還元されると水不溶性となり非常に取り扱いにくいこと、さらに過剰量のSODをアッセイ系に添加しても100%阻害が認められないことなどの欠点を有している（図5）。これに対して最近開発された水溶性のテトラゾリウム塩（XTT, WST-1, WST-8）では過剰量のSOD添加により100%阻害が認められることから、SOD活性測定に適した捕捉剤であることが明らかにされた（図5）²⁰⁾。このうちXTTを捕捉剤とするアッセイ法は、すでに赤ワイン、緑茶、コーヒー、ココアの O_2^- 消去活性の測定に適用可能であることが示されている。

水溶性テトラゾリウムに基づくSOD活性測定は容易にFIAへ展開できる。この場合、 O_2^- の生成に必要なXOを担体に固定化し、リアクターとして用いることで、迅速性の向上と共に、経済性の賦与も図れる。試料

図5 XTT法並びにNBT法で得られたSOD標品の阻害曲線

を予め XTT (または WST-1) 及びヒポキサンチン溶液と混合した上で XO 固定化リアクターに注入すると、SOD 活性がない場合に最大のピーク高が見られ、活性の強さに依存してピーク高が減少する。この原理に基づき 1 時間あたり 30 検体以上の分析が可能となり、従来のバッチ法の分析時間を 10 倍以上短縮できる²⁰⁾。さらに最近、 O_2^- の捕捉剤として化学発光プローブを用いた高感度な SOD 活性測定法を FIA に基づき完全自動化したシステムも開発されており、各種食品試料への適用が試みられている (未発表データ)。

2. AGH 及び ACE 阻害活性評価

糖尿病は予備軍も合わせると日本人の約 1 割 (1370 万人) が罹患していると言われているが、血糖値を適切に維持することによりその治療及び合併症の予防が可能である。一般に、食品成分である糖質 (多糖類) は、アミラーゼの作用によってマルトース単位まで消化された後 (スクロースの場合はそのままの状態) 小腸上皮に到達する。その後、上皮膜細胞に存在する AGH の作用によってグルコースまで分解され、門脈を介して肝臓に蓄積される。このため、糖尿病予防として、食後の血糖値上昇を遅延し得る、すなわち二糖類からグルコースの生成を触媒する AGH に対して阻害活性を有する成分を食品に求める研究が行われつつある。AGH 阻害測定法として *in vitro* で行われている簡便法は、合成基質として *p*-ニトロフェニル- α -D-グルコシドを用いて、酵母由来 AGH の作用によって生じる *p*-ニトロフェノールの吸光度 (405 nm) から AGH 阻害活性を求める方法である。OKI ら²¹⁾²²⁾ は直接マルトース及びスクロースを基質とし、ラット由来 AGH をセファロースに固定化し、小腸上皮細胞の環境を模した *pseudo-in vivo* 測定系を設定している。現在のところ流れ系での測定は生成したグルコースを HPLC で測定しているが、固定化 AGH とグルコースオキシダーゼ固定化リアクターとの連結による測定系も検討されている。

高血圧予防食品の開発分野では、レニン-アンジオテンシン昇圧系をブロックするため ACE 阻害活性を有する食品成分の検索が活発に行われている。ACE 阻害活性評価 (*in vitro*) では、疑似基質としてヒプリル-ヒスチジル-ロイシンが一般に用いられおり、ACE の作用によって生じる馬尿酸を吸光度で検出している。著者らは馬尿酸をアミノアシラーゼ固定化リアクターで分解し、生じた安息香酸を D-アミノ酸オキシダーゼ固定化リアクターで検出するシステムを開発している (未発表)。近い将来 ACE をも固定化した測定システムの確立を目指す

し現在鋭意検討中である。

5. おわりに

食品の栄養機能、感覚機能、及び生体調節機能に関わる成分のバイオセンシング法について、特に実用的に利用可能な技術を中心に解説した。現在、急速な進展を遂げている生体調節機能因子の評価にも、固定化生体触媒を利用するバイオセンシング法とその FIA 法との融合技術が、迅速性や経済性の面から有効な方法であることをおわかりいただけたものと信じる。現状の機能性研究において、活性評価に要する手間と時間、そしてコストは莫大なものであり、実質上、研究の発展にブレーキを掛ける隘路となっている。従って、本研究分野をさらに発展させるためにも、種々の食品機能に対する簡易・迅速かつ経済的な評価法の確立が急務の課題である。その評価法は新規素材のスクリーニング法として、動物実験やヒト試験への橋渡し役を務めるだけでなく、機能性食品の製造レベルにおける工程管理法や製品の品質評価法としても利用価値は高い。

文 献

- 1) 松井利郎・松本 清: 分析化学, **49**, 477 (2000).
- 2) 受田浩之: 日本食品科学工学会誌, **42**, 849 (1995).
- 3) 受田浩之: 食品工業, **42**, 45 (1999).
- 4) 受田浩之: 分析化学, **48**, 183 (1999).
- 5) 陳 力騏・松本 清: *J. Flow Injection Anal.*, **12**, 167 (1995).
- 6) 松本 清: 食品工業, **34**, 43 (1991).
- 7) 受田浩之: *J. Flow Injection Anal.*, **11**, 142 (1994).
- 8) 相澤益男: バイオセンサー, 鈴木周一編 (講談社サイエンティフィック), p. 4 (1984).
- 9) 高島良正, 与座範政編: 図説フローインジェクション分析法 (廣川書店) (1989).
- 10) 松本 清・受田浩之: ぶんせき, **2000**, 211.
- 11) 受田浩之・松原美保・松本 清・箴島 豊: 分析化学, **38**, T165 (1989).
- 12) 受田浩之・中田勇二・松本 清・箴島 豊: 分析化学, **39**, 723 (1990).
- 13) MATSUMOTO, K., HIGUCHI, S. and TSUKATAN, T.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 847 (1996).
- 14) MATSUMOTO, K., ASADA, W. and MURAI, R.: *Anal. Chim. Acta*, **358**, 127 (1998).
- 15) TSUKATANI, T. and MATSUMOTO, K.: *Anal. Sci.*, **16**, 265 (2000).
- 16) TSUKATANI, T. and MATSUMOTO, K.: *Anal. Chim. Acta*, **416**, 197 (2000).

-
17) MATSUMOTO, K., MATSUBARA, H., HAMADA, M.,
UKEDA, H. and OSAJIMA, Y.: <i>J. Biotechnol.</i> , 14 ,
115 (1990).	20) 受田浩之, Dojin News, No. 96, 1 (2000).
18) YOSHIOKA, S., UKEDA, H., MATSUMOTO, K. and
OSAJIMA, Y.: <i>Electroanal.</i> , 4 , 545 (1992).	21) OKI, T. MATSUI, T. and MATSUMOTO, K.: <i>Biol.</i>
<i>Pharm. Bull.</i> , 23 (9), in press.
19) CHEN, R.L.C. and MATSUMOTO, K.: <i>Biosci.</i>
<i>Biotech. Biochem.</i> , 59 , 813 (1995).	22) 沖 智之: 学位論文 (九州大学), 1999.
(平成 12 年 8 月 21 日受理)
-