

酵素センサーを用いて複数成分をはかる FIA

松本 清

九州大学大学院農学研究院：〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

1. はじめに

酵素を用いる分析法は生化学、医薬品、食品、環境分析等で早くから用いられてきたが、1970年代から酵素を固定化して再利用できる形にしたセンサー化が活発に行われ^{1,3)}、さらにこれらを流れ分析に応用する研究が精力的に展開されている。酵素は選択性（基質特異性）が極めて高いので、複雑な混合系から選択的に目的成分を認識し触媒作用を示す。したがって、酵素センサーを用いる分析は前処理をほとんど必要としない点で簡便・迅速である。酵素センサーに関する最適設計については既に本解説のシリーズで取り上げられている。酵素センサーは選択性が良い反面、対象とする目的物質に対してそれぞれ酵素センサーを作製する必要がある。これまで、単独成分分析用酵素センサーが多数作製され報告されており、装置も市販されている。しかしながら、分析の目的からすると複数の成分を同時に分析したい場合は少なくない。この点で酵素センサーがクロマトグラフィーや電気泳動法と比較して弱点とされてきた。しかしながら、数種の複数成分に限定すると酵素センサーを集合化（集積化）することで対応可能と考えられる。この場合、クロマトグラフィーや電気泳動法とは違って、糖類、有機酸類、ヌクレオチド類の組み合わせといった異なる種類、系統の目的物質に対応可能なメリットが生じる。この解説では、酵素センサーを用いて複数成分をはかる流れ分析法について、酵素反応を中心に記述する。

2. 酵素反応と検出対象物質

現在まで、約 3000 種類程度の酵素が単離されその性質が調べられているが、酵素センサーに用いられる酵素はその 1/20 程度であろう。酵素センサーでは、主に酸化酵素（オキシダーゼ）および脱水素酵素（デヒドロゲナーゼ）が用いられる。センサー化するためには、酵素触媒反応でもたらされる何らかの変化を捉える必要がある。一般的には、酸素の消費、過酸化水素の生成、アンモニア・二酸化炭素の生成、補酵素ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD/NADH 酸化還元対）および酸化還元メデイエーターの変化を捉えている。特殊な場合として、酵素触媒反応に伴う温度（反応熱）変化や発光量なども検出対象となる。表 1 に酵素センサーで用いられる主な酵素反応をまとめた。

3. 検出法

検出対象物質は上記のように比較的少ないが、検出手段としては種々のバイリエーションが考えられる。酸素消費の検出系では溶存酸素計（酸素電極）が一般的であり、各種の酸素電極がフローセルと共に市販されている。過酸化水素検出系では、過酸化水素電極が最も広く使用されているが、蛍光検出なども行われている。アンモニア・二酸化炭素の検出系では、ガス感応性イオン選択性

電極が多用されている。NADH の消長を検出する系では、+0.75 V 程度の定電位印加によるアンペロメトリー検出、340 nm における吸光度検出、 $E_x=340$ nm, $E_m=450$ nm 程度での蛍光検出など様々な検出系が用いられる。酸化還元メデイエーターの検出系では、それぞれのメデイエーターに対応したアンペロメトリーや吸光度検出、蛍光検出が採用されている。複数成分の定量では、吸光度検出や蛍光検出などは装置的に大掛かりとなり一般的ではなく、主に電気化学的検出（アンペロメトリー、イオン選択性電極）が用いられている。

4. フローシステム

複数成分を同時に定量する流れ分析法のタイプは、半導体などのマイクロ化技術を用いるものを別にすると、ほぼ 4 つに大別される。最初のタイプは、固定化酵素膜を装着した複数の酵素電極を同一セルに差し込み、1 回の試料注入で複数の化学物質を同時に定量するものである（単一流路-複数検出器）。第 2 のタイプは、主流路である緩衝液の流れを途中でいくつかの流れに分岐させ、各分岐流路に異なった固定化酵素リアクターを設置すると同時に、各カラムの前方に遅延コイルを導入し、試料滞留時間を制御するものである（分岐流路-単一検出器）。すなわち、遅延コイル長が各分岐で異なるため、試料の固定化酵素リアクターへの到達時間は異なり、応答値も重複することなく現れる。このタイプは、検出器が 1 つであり、きわめてスマートなシステムであるが、反面では、1 台の検出器であるがゆえに、モニターできる酵素反応生成物が限られ、したがって、使用可能な酵素も制限される。第 3 のタイプは、複数の固定化酵素リアクターを並列に配置した複数流路系による多項目同時定量系である（並列配置型）。このような並列配置では各固定化酵素の最適条件で酵素反応を行わせることができる利点がある。第 4 のタイプは高速液クロ（HPLC）の分子認識型反応器として固定化酵素を用いる系である。すなわち、固定化酵素/FIA システムを HPLC の分離カラムの出口に接続することで、HPLC の特異的なポストカラム反応検出器として利用するものである（HPLC 分離/分子認識反応器型）。

一方、発酵過程での種々の成分の消長をモニターする場合には、一定時間間隔で複数成分を逐次的に定量することで十分である。このような場合、複数の固定化酵素リアクターを並列に並べ、流路切替バルブを用いて順次流路を切替えることにより逐次的に複数成分を定量することができる（流路切替-逐次注入型）。また、複数の流路切替バルブと複数の固定化酵素リアクターを配置することで多チャンネル連続流れ分析（Multi-channel Continuous Flow Analysis, 多チャンネル CFA）が可能である。このシステムでは緩衝液で希釈した試料そのものを流路に流す逐次定量系が構築され、得られる信号は普通の FIA によって得られるピーク状の信号ではなく、階段状の信号となる。以下、実際の例を示しながらマニホールド、酵素反応系、検出系を解説する。

表1 酵素反応

①	$2 \text{ L-グルタミン酸} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$	$\xrightarrow[\text{オキシダーゼ}]{\text{グルタミン酸}}$	$2 \text{ 2-オキソグルタル酸} + 2 \text{ NH}_4^+ + \text{H}_2\text{O}_2$
②	$5\text{-リボヌクレオチド} + \text{H}_2\text{O}$	$\xrightarrow{\text{5-リボヌクレオチダーゼ}}$	ヌクレオシド + リン酸
③	ヌクレオシド + リン酸	$\xrightarrow[\text{ホスホリラーゼ}]{\text{ヌクレオシド}}$	グアニン(ヒポキサンチン) + リボース-1-リン酸
④	グアニン + H_2O	$\xrightarrow{\text{グアナナーゼ}}$	キサンチン + NH_4^+
⑤	キサンチン + $1/2 \text{ O}_2 + \text{H}_2\text{O}$	$\xrightarrow[\text{オキシダーゼ}]{\text{キサンチン}}$	尿酸 + H_2O_2 (+ $1/2 \text{ O}_2^- \cdot$)
⑥	ヒポキサンチン + $1/2 \text{ O}_2 + \text{H}_2\text{O}$	$\xrightarrow[\text{オキシダーゼ}]{\text{キサンチン}}$	キサンチン + H_2O_2 (+ $1/2 \text{ O}_2^- \cdot$)
⑦	L-乳酸 + NAD^+	$\xrightarrow{\text{乳酸デヒドロゲナーゼ}}$	ピルビン酸 + $\text{NADH} + \text{H}^+$
⑧	グリセロール + NAD^+	$\xrightarrow[\text{デヒドロゲナーゼ}]{\text{グリセロール}}$	ヒドロキシピルビン酸 + $\text{NADH} + \text{H}^+$
⑨	$\beta\text{-D-グルコース} + \text{NAD}^+$	$\xrightarrow[\text{デヒドロゲナーゼ}]{\text{グルコース}}$	D-グルコノ- δ -ラクトン + $\text{NADH} + \text{H}^+$
⑩	L-リンゴ酸 + NAD^+	$\xrightarrow{\text{デヒドロゲナーゼ}}$	リンゴ酸
⑪	$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{O}_2$	$\xrightarrow{\text{NADH オキシダーゼ}}$	$\text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$
⑫	$\beta\text{-D-グルコース} + \text{O}_2$	$\xrightarrow{\text{グルコースオキシダーゼ}}$	D-グルコノ- δ -ラクトン + H_2O_2
⑬	D-フルクトース + p-ベンゾキノン	$\xrightarrow[\text{デヒドロゲナーゼ}]{\text{フルクトース}}$	5-ケト-D-フルクトース + p-ヒドロキノン
⑭	スクロース + H_2O	$\xrightarrow{\text{インベルターゼ}}$	$\alpha\text{-D-グルコース} + \beta\text{-D-フルクトース}$
⑮	$\alpha\text{-D-グルコース}$	$\xrightarrow{\text{ムタローターゼ}}$	$\beta\text{-D-グルコース}$
⑯	$2 \text{ H}_2\text{O}_2$	$\xrightarrow{\text{カタラーゼ}}$	$\text{O}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$
⑰	L-アスコルビン酸 + $1/2 \text{ O}_2$	$\xrightarrow[\text{オキシダーゼ}]{\text{アスコルビン酸}}$	デヒドロアスコルビン酸 + H_2O_2
⑱	L-リンゴ酸	$\xrightarrow[\text{デヒドロゲナーゼ}]{\text{リンゴ酸}}$	オキサロ酢酸 + NAD^+
	オキサロ酢酸	$\xrightarrow{\text{ジスホラーゼ}}$	ピルビン酸 + $\text{NADH} + \text{H}^+$
	ピルビン酸	$\xrightarrow{\text{ピルビン酸デヒドロゲナーゼ}}$	アセトアルデヒド + $\text{CO}_2 + \text{NAD}^+$
⑲	エタノール + O_2	$\xrightarrow[\text{オキシダーゼ}]{\text{アルコール}}$	アセトアルデヒド + H_2O_2
⑳	アセチルコリン + H_2O	$\xrightarrow[\text{オキシダーゼ}]{\text{アセチルコリン}}$	コリン + 酢酸
㉑	コリン + $\text{H}_2\text{O} + 2 \text{ O}_2$	$\xrightarrow{\text{コリンオキシダーゼ}}$	ベタイン + $2 \text{ H}_2\text{O}_2$

5. 実用例

(1) 単一流路-複数検出器の系

単一流路-複数検出器の代表例として、軽部らの“うま味センサー”へのアプローチがある⁴⁾。彼らはグルタミン酸センサー、イノシン酸センサー、グアニル酸センサーを作り、図1のように1個のフローセル中に挿入したシステムを組んでいる。すなわち、グルタミン酸センサーには固定化グルタミン酸オキシダーゼ(表1, 反応式①, 以下同様)膜, グアニル酸センサーには固定化5'-ヌクレオチダーゼ(②), ヌクレオシドホスホリラーゼ(③), グアナナーゼ(④), キサンチンオキシダーゼ(⑤)膜, イ

ノシン酸センサーには固定化5'-ヌクレオチダーゼ(②), ヌクレオシドホスホリラーゼ(③), キサンチンオキシダーゼ(⑥と⑤)膜を装着した酵素電極を作成し, 酵素反応によって消費される酸素量をモニターしている。これら3成分の化学物質濃度から, うま味強度式によってうま味強度を求めると, ほとんどの食品が0.5~1.0の範囲に入るとしている。

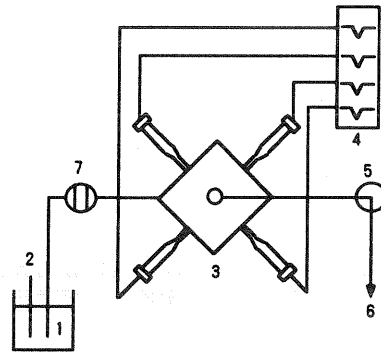


図1 多極型酵素センサーシステム
1: 緩衝液, 2: 空気, 3: 多極型センサー, 4: 記録計, 5: ペリスタポンプ, 6: 廃液, 7: 注入口

(2) 分岐流路-単一検出器の系

先にも述べたように, この系ではモニターする物質は1種類に限定される。NADHをモニターする複数成分定量系として, Morishitaら⁵⁾の乳酸, グルコース, グリセロールの3成分同時定量システムを紹介する。図2にこのFIAシステムの概略を示す。システム内の各部分は図中の説明に示す通りであるが, e1~e3にはガラスキャピラリー内壁をアミノシラン処理した後, 乳酸デヒドロゲナーゼ(⑦), グリセロールデヒドロゲナーゼ(⑧), グルコースデヒドロゲナーゼ(⑨)が別々に固定化されている。この方法では, 分岐点からのリアクターの管径と長さを変えることによって, 酵素固定化リアクター内での基質の滞留時間を巧みに制御している。このため, 上記3成分が重なりなしに1台の蛍光検出器で感度良く検出されている。このシステムのように中空のキャピラリーに酵素を固定化した場合には分岐流路の流量制御も比較的容易かも知れないが, 担体を充填した酵素固定化リアクターの場合, 流量制御のため各分岐直後にニードルバルブなど流量調節用のバルブが必須である。

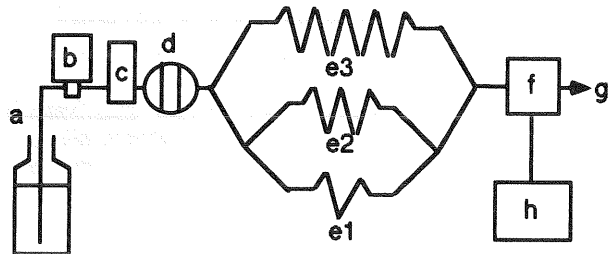


図2 分岐型乳酸, グリセロール, グルコース定量用FIAシステム
a: キャリアー溶液, b: ポンプ, c: ダンパー, d: インジェクター, e1~e3: 固定化酵素リアクター, f: 蛍光検出器, g: 廃液, h: 記録計

(3) 並列配置複数流路の系

固定化酵素リアクターを並列に配置し, マルチチャンネルフローセルとマルチチャンネル型ポテンショスタットを用いる複数成分同時定量システムが報告されている。

並列配置型の特徴は酵素反応による最終モニター対象物がそれぞれ異なっても対応できることである。すなわち、酵素反応によって生じる過酸化水素はもとより、還元型メディエーターの酸化や NADH の酸化もそれぞれ相互に影響されずに行える。実用例として、5成分同時定量用システムを取り上げる(図3)⁹⁾。このシステムは、チャンネル A (リンゴ酸用), B (グルコース用), C (フルクトース用), D (スクロース用) および E (アスコルビン酸用) の5チャンネルを持ち、それぞれ独立したキャリア緩衝液、インジェクター、固定化酵素リアクター、反応系および検出器を備えている。リンゴ酸はリンゴ酸デヒドロゲナーゼの作用で、NAD と共役し、オキサロ酢酸と NADH を生成する(⑩, リアクターII)。生成した NADH を NADH オキシダーゼの作用により NAD⁺ と過酸化水素に導き(⑪), 過酸化水素を電気化学的に検出する。β-D-グルコースはグルコースオキシダーゼ (GOD) の作用により酸素を消費してグルコノラクトンと過酸化水素を生成する(⑫, リアクターIII)。したがって、最終生成物である過酸化水素を電極で検出することによってグルコースを定量する。フルクトースはフルクトースデヒドロゲナーゼの作用で反応式⑬のように反応する(リアクターIV)。そこで、反応の電子伝達系として、*p*-ベンゾキノンを用いて生成する *p*-ヒドロキノン を定電位電解することによりフルクトースを定量する。スクロース測定では、インペルターゼ(⑭), ムタローターゼ(⑮), グルコースオキシダーゼ(⑯)の酵素リレー反応(リアクターVI)により産生された過酸化水素を電気化学的に検出することに基づいている。この際、試料中に共存しているグルコースへの寄与を取り除くため、グルコースオキシダーゼ(⑯)とカタラーゼ(⑯)が固定化されているグルコース除去リアクター(V)を前置している。電気化学検出を妨害する共存アスコルビン酸を除去するためリアクターII~Vの前にアスコルビン酸除去リアクターI(⑰)を設置している。チャンネルEのアスコルビン酸測定では、直接的な電気化学反応によるが、選択性を高めるために、アスコルビン酸除去リアクターIとブランクカラムVIIを逐次通してシグナルペア間の差引きによりアスコルビン酸を算出する。

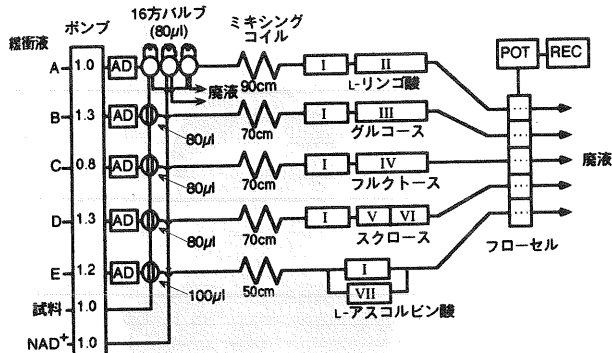


図3 5成分同時定量用センサーシステム
AD: エアードランパー, POT: ボテンショスタット, REC: 記録計, I: アスコルビン酸除去リアクター, II: リンゴ酸リアクター, III: グルコースリアクター, IV: フルクトースリアクター, V: グルコース除去リアクター, VI: スクロースリアクター, VII: ブランクカラム, A~E: 緩衝液

類似した酵素反応を利用した場合、検出器の上流に遅延コイルと合流点とを導入することにより単一検出器でも多チャンネルのシグナルを逐次的に記録することができる(並列合流型)。図4は単独の酸素電極を検出端としたワイン中のリンゴ酸とエタノールの同時定量を試みたものである⁷⁾。リンゴ酸の定量にはリンゴ酸デヒドロゲナーゼとジアホラーゼを用いてビタミン K₃ をメディエータ

ーとする溶存酸素消費反応で検出している(⑱)。また、エタノールの定量にはアルコールオキシダーゼ(⑲)を用いている。リンゴ酸およびエタノール測定用流路の流量を適切に制御することによって、2つのピークが重なりなしに得られ、分析速度も比較的迅速である。

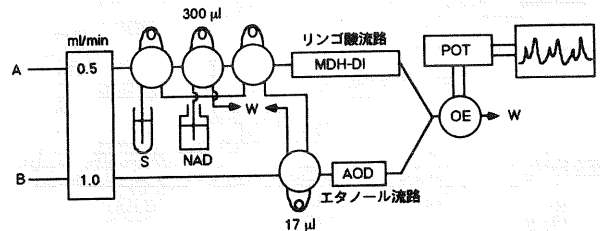


図4 並列合流型FIAによるリンゴ酸とエタノールの同時定量システム
A: ビタミンK₃飽和ピロリン酸緩衝液(pH 9), B: リンゴ酸緩衝液(pH 8), OE: 酸素電極, POT: ボテンショスタット, S: 試料, W: 廃液

(4) HPLC 分離/分子認識反応器の系

3~4成分までの測定には固定化酵素膜あるいは固定化酵素リアクターを用いて、FIA のみのシステムを組み合わせることが可能であるが、それ以上になると、何らかの分離過程との組み合わせによる定量システムとなる。このような場合、固定化酵素/FIA システムを HPLC の特異的なポストカラム反応検出器として利用することになる。このような系として、八尾らのアセチルコリンとコリンの測定システムを取り上げる(図5)⁹⁾。逆相系の OSD カラムから分離溶出したアセチルコリンとコリンは、アセチルコリンエステラーゼ(⑳)とコリンオキシダーゼ(㉑)を固定化したリアクターにより過酸化水素に変換され、下流に設置された白金電極フローセルによってピコモルレベルで検出されている。

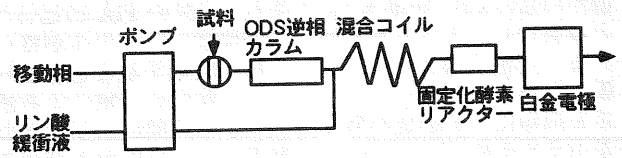


図5 アセチルコリンのHPLC/FIA検出システム
固定化酵素リアクター: アセチルコリンエステラーゼ + コリンオキシダーゼ

(5) 流路切替-逐次注入の系

逐次注入システムは分析速度の点では同時注入システムほど早くはないが、各チャンネルのコストを軽減することには効果的であり、より長時間の分析に適する。図6に魚醤風味改善用発酵槽のオンラインモニタリングシステムを示す⁹⁾。グルコース(チャンネル GOD, ⑫), グルタミン酸(チャンネル GluOD, ①)およびエタノール(チャンネル ALOD, ⑲)分析用3チャンネルには、それぞれの分析目的に応じた過酸化水素産生系の固定化酵素リアクターを設置している。多流路切替バルブの導入により、各チャンネルは、共通のキャリア緩衝液、インジェクターおよび検出器(過酸化水素電極)を使用することができ、部品などのハード面の要求やキャリア緩衝液の使用量などのランニングコストを軽減する特徴がある。念のためブランクシグナル検出用のチャンネル BLANK を設置しているが、このシステムでは強陰イオン

交換樹脂を充填したカラムの使用により、魚醤発酵液に含まれる高濃度の塩化物イオン由来の妨害信号は除去されたので、実際の測定には必要ない。このイオン交換樹脂カラムは再生せずに長時間の測定に耐える。

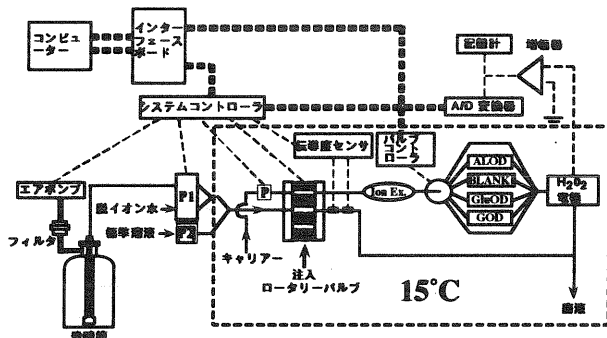


図6 魚醤風味改善用培養槽のオンラインモニタリングシステム。
P1, P2:ポンプ; Ion Ex:強陰イオン交換カラム; GOD:グルコースリアクター;
ALOD:エタノールリアクター; GluOD:グルタミン酸リアクター

(6) 多チャンネル Continuous Flow Analysis (CFA) 法

CFA 法による複数成分測定はあまり行われていないが、ここで紹介する多チャンネル CFA 法は、複数成分測定を可能にすると同時に、流路の切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。図7はその典型的フローシステムである¹⁰⁾。このフローシステムは、2つの多流路切替バルブ(試料、ブランク、標準液の導入制御用 V1 およびチャンネル切替用 V2)、1台のペリスタポンプおよび検出システムにより構成された簡単なものである。流路の切替えは、バルブ V1 と V2 専用の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、緩衝液で希釈した試料を順次流すのでインジェクション操作のない CFA を基本としており、通常の FIA のピークとは異なりプラトー値を持った階段状のシグナルが得られる。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。さらに、試料の分散による誤差を問題にする必要が無く、チャンネル間のシグナルの差引きを正確に行えるので、酵素リレー反応およびブランクシグナルのシグナル差引きによる算出と除去を簡単に行うことができる。

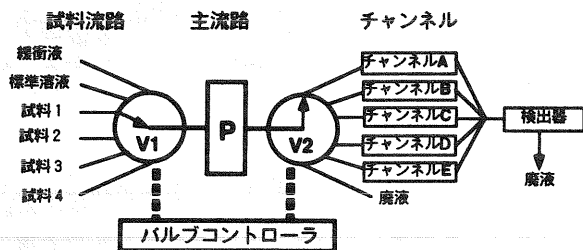


図7 自動多チャンネルCFAシステム
V1, V2: 6方流路切替バルブ; P:ペリスタポンプ
図においては、試料1がチャンネルAに吸引されている。

6. おわりに

酵素センサーを用いる複数成分定量システムについて、酵素反応とシステム構成を中心に解説してきた。固定化酵素と流れ分析系との組み合わせはそのバリエーションにまだまだ発展性が有ると考えられる。すでに複数成分を測定する市販装置も発売されているが、今のところ十分に普及しているとは言い難い。酵素センサー/FIA をより一層普及させるためには、十分な情報提供と環境整備が必須であり、ハード面とソフト面でのきめ細かい対応と規格化が必要であろう。使い捨ての酵素測定キットがもてはやされている昨今、カートリッジ式の酵素固定化リアクターの常時供給体制と使い安さ、正確性を売りにした装置の確立でキットを凌ぐ普及を期待するものである。

参考文献

- 1) 軽部征夫, “バイオセンシング”, 啓学出版 (1988).
- 2) G.G.Guilbault, “Handbook of enzymatic methods of analysis”, Marcel Dekker, New York and Basel (1976).
- 3) 高島良正, 与座範政, “図説フローインジェクション分析法”, 廣川書店 (1989).
- 4) 軽部征夫, “バイオセンサ”, p.104, 共立出版 (1986).
- 5) F. Morishita, Y. Nishikawa, T. Kojima, *Anal. Sci.*, **2**, 411(1986).
- 6) K. Matsumoto, T. Tsukatani, S. Higuchi, *Sens. & Mater.*, **7**, 167(1995).
- 7) 受田浩之, 中田勇二, 松本 清, 箴島 豊, *分析化学(Bunseki Kagaku)*, **39**, 8723(1990).
- 8) T. Yao, M. Sato, *Anal. Chim. Acta*, **172**, 371(1995).
- 9) R. L. C. Chen, K. Matsumoto, *Anal. Chim. Acta*, **308** (1995).
- 10) M-H. Lee, R. L. C. Chen, K. Matsumoto, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 99(1996).

(Received April 23, 2003)

