

固定化酵素リアクターを用いたフローインジェクション分析法による食品中の有機酸類の定量

塚谷 忠之^{1,*}, 松本 清²

¹福岡県工業技術センター生物食品研究所：839-0861 福岡県久留米市合川町 1465-5

²崇城大学生物生命学部応用微生物工学科：860-0082 熊本県熊本市池田 4-22-1

Quantification of Organic Acids in Foods by Flow Injection Analysis Using Immobilized Enzyme Reactor

Tadayuki Tsukatani^{1,*} and Kiyoshi Matsumoto²

¹ Biotechnology and Food Research Institute, Fukuoka Industrial Technology Center, 1465-5 Aikawamachi, Kurume 839-0861, Japan

² Department of Applied Microbial Technology, Faculty of Biotechnology and Life Science, Sojo University, 4-22-1 Ikeda, Kumamoto 860-0082, Japan

Organic acids affect the taste and flavor of foods, influencing our perception of sourness and freshness in harmony with sweetness and bitterness. Thus, a method for the quantification of organic acids in foods by flow injection analysis (FIA) using an immobilized enzyme reactor was developed. FIA systems for L-malate, D-malate, L-tartrate, citrate, isocitrate, succinate, D-gluconate, pyruvate, L-lactate, acetate, γ -aminobutyrate, and L-glutamate were established and applied to the quantification of component in the foods. The results obtained by the proposed FIA systems were in good agreement with those obtained by conventional methods (HPLC or F-kit method). The proposed FIA systems are useful flow methods for the quantification of organic acids in foods and are useful in judging the quality of food and quality control of the fermentation process.

Keywords organic acid, food analysis, immobilized enzyme reactor, flow injection analysis

1. はじめに

有機酸は様々な食品、飲料、醸造物に含有され、その酸味や鮮度に大きく寄与する呈味成分である。食品に含まれる代表的な有機酸としては、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸、グルコン酸、ピルビン酸、乳酸、酢酸などが知られているが、酵素センサーによる測定からみると、オキシダーゼと電極を組み合わせたシンプルな系が利用できるのは乳酸とピルビン酸のみである^{1,2)}。他の有機酸の測定には、天然に200種類以上存在すると言われているデヒドロゲナーゼをはじめ、デカルボキシラーゼ、リアーゼ、キナーゼなどを利用する必要がある。

本稿では、有機酸類の測定を目的として、デヒドロゲナーゼを中心に様々な酵素系を利用した固定化酵素リアクターを考案し、これをフローインジェクション分析(FIA)に導入した測定システムについて紹介する。さらに、食品等の実試料への適用例を含めて述べる。

2. FIA システム

有機酸のFIAにはデヒドロゲナーゼなどの酵素反応を利用するため、試料と共にNAD(P)などの補酵素や分析対象成分以外の酵素基質を混合注入する必要がある。その

ため、Fig.1に示すような3種類のインジェクションモードを備えたFIAシステムを利用した。インジェクターには6、10、16方バルブをそれぞれ用いることで、(A)プレミキシング法、(B)オープンサンドイッチ法、(C)サンドイッチ法による試料と試薬類の混合注入を行った。プレミキシング法は事前に試料と試薬類を混合して注入するため、混合効率は100%であるが、試料調製に手間がかかる欠点がある。一方、オープンサンドイッチ法やサンドイッチ法は事前に試料と試薬類の混合操作が必要でないため、簡便性において優れている。混合効率はそれぞれ91%、99%を達成することが可能であった³⁾。Fig.2はオープンサンドイッチ法及びサンドイッチ法におけるインジェクターバルブの配置図である。混合注入された試料及び試薬類は下流に配置した固定化酵素リアクターにより反応を受け、生じた過酸化水素あるいはNAD(P)Hはさらに下流に配置された検出器によりモニターした。検出器にはフロースルー型の白金電極あるいは蛍光検出器を用いた。なお、固定化酵素はグルタルアルデヒドを用いた担体架橋法により調製した。担体にはアミノプロピル化多孔質ガラスを用い、得られた固定化酵素担体をガラス管(2 mm i.d.)に充填して固定化酵素リアクターとして使用した。

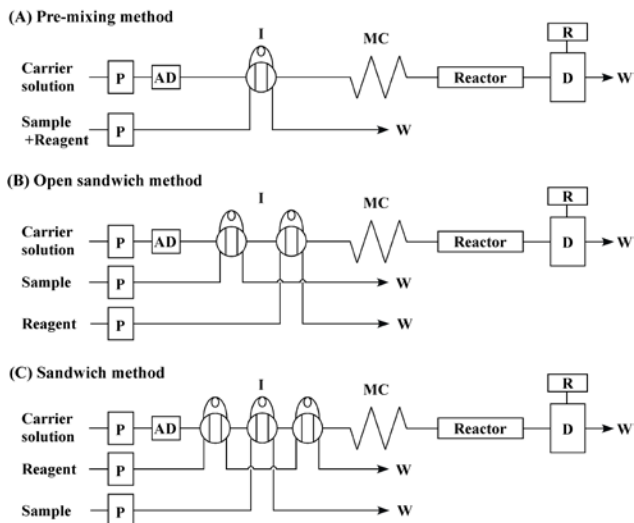
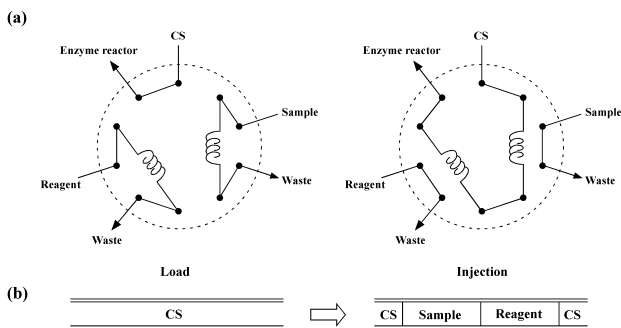


Fig.1 Schematic diagram of FIA system.

P: micro-tube pump; AD: air damper; I: injector (multi-way switching valve); MC: mixing coil; Reactor; immobilized enzyme reactor; D: detector; R: recorder; W: waste.

Open sandwich method (10-way switching valve)



Sandwich method (16-way switching valve)

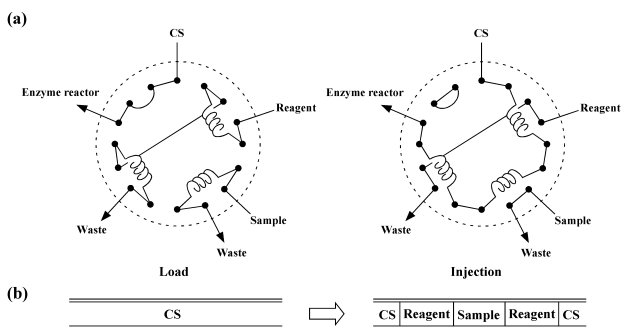


Fig.2 Arrangement of 10-way and 16-way switching valve at load and injection position (a), and the arrangement of each solution in the tube before and after injection (b).

通常、Fig.1 に示す FIA システムは単一成分の測定に用いられるが、後述するように単一流路に複数の固定化酵素リアクターを直列に配置し、注入試薬を切り替えることで複数成分の逐次定量が可能になる。また、独立した流路に複数の固定化酵素リアクターと検出器を並列に配

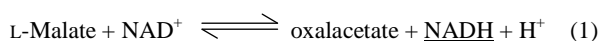
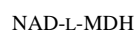
置した FIA システムを組み合わせることにより最適条件下で複数成分の同時定量が可能になる。

3. 有機酸類の定量

3-1. L-リンゴ酸、D-リンゴ酸

L-リンゴ酸はワインや吟醸酒、果実類などに多く含まれる有機酸であり、他の呈味成分と調和して爽快感ある酸味を呈する。また、リンゴ酸はラセミ体 (L-リンゴ酸と D-リンゴ酸の混合体) の形で酸味料として飲料や食品に使用されている。ここでは、L-リンゴ酸及び D-リンゴ酸の定量用 FIA の開発について紹介する。

L-リンゴ酸の酵素的測定には通常、NAD 依存性 L-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (NAD-L-MDH) が用いられるが、その平衡は大きく NAD の生成方向 (逆方向) へ傾いている (Scheme1)。



このため、NAD-L-MDH 固定化リアクター単独では FIA への適用は困難であると考えられた。そこで、NAD-L-MDH とグルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT) あるいは NADH オキシダーゼ (NOD) を同時固定化したリアクターを用いることにより、反応生成物を除去して L-リンゴ酸の酸化反応を促進する試みがなされている^{4,7)}。筆者らはこれらに加えて NADP 依存性 L-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (NADP-L-MDH) 固定化リアクターの適用を試みた (Scheme2)⁸⁾。

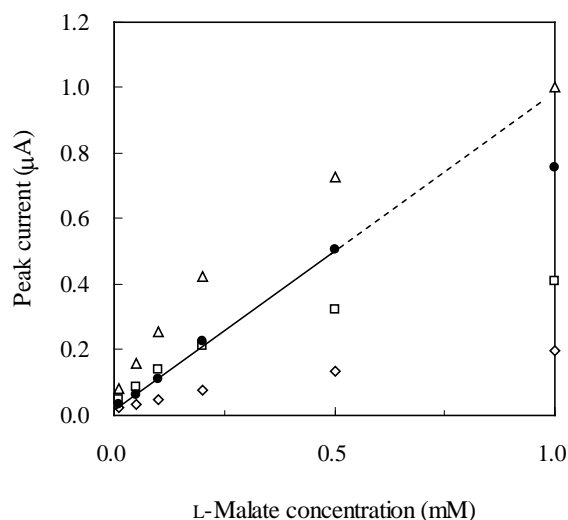
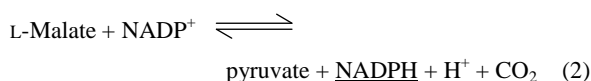
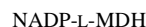
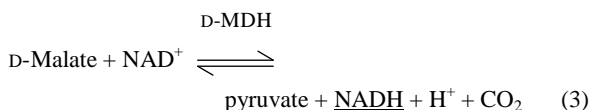


Fig.3 Calibration curves for the quantification of L-malate using various immobilized enzyme reactors.

Enzyme reactor: NAD-L-MDH (◇), NAD-L-MDH·GOT (□), NAD-L-MDH·NOD (△), NADP-L-MDH (●).

Fig.3 は4種類の固定化酵素リアクターの応答性を比較したものである。FIA システムには Fig.1(C)を用い、試料と補酵素は16方バルブを用いたサンドイッチ法で混合注入した。酵素反応生成物である NAD(P)H あるいは過酸化水素の検出には白金電極を用いた。その結果、NADP-L-MDH 固定化リアクターにおいて比較的広い L-リンゴ酸の濃度範囲 (0.01~0.5mM) で応答値との間に良好な直線関係が得られた。したがって、NADP-L-MDH 固定化リアクターが L-リンゴ酸の FIA に最適であることが明らかとなった。

一方、D-リンゴ酸は化学的に合成される D-/L-リンゴ酸 (酸味料) の構成成分であり、天然原料由来の製品には含まれていない。このため、D-リンゴ酸の検出は酸味料添加の有無の判定に有効な手段となる。D-リンゴ酸は D-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(D-MDH)固定化リアクターを用いて生成する NADH を蛍光検出器でモニターすることで定量を試みた (Scheme3)。NADP-L-MDH の反応と同様に、D-MDH の反応は単独で中性付近の pH において D-リンゴ酸の酸化方向へ進むため、FIA に最適であった。



次に、NADP-L-MDH 固定化リアクターと D-MDH 固定化リアクターを同一流路に直列に導入し、NADPH あるいは NADH を蛍光測定する FIA システムを構築した (Fig.4)。インジェクションモードにはオープンサンドイッチ法を採用した。本 FIA システムでは、それぞれの補酵素である NADP と NAD の注入を切り替えることにより単一流路で L-リンゴ酸と D-リンゴ酸を逐次定量することが可能になった (Fig.5)。また、リンゴ果汁や清涼飲料水に対して本 FIA システムを適用したところ、その結果は酵素的分析法 (F-kit 法) による結果と良好に一致した⁹⁾。

本 FIA システムはリンゴ酸光学異性体の迅速かつ簡便な定量を可能としたものであり、リンゴ果汁や清涼飲料水などの品質評価に適用できると考えられる。

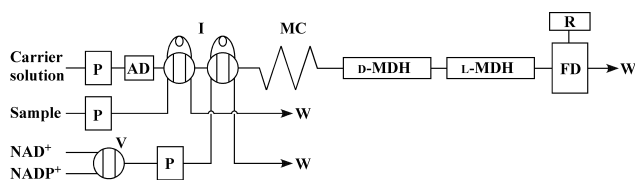


Fig.4 Schematic diagram of the FIA system for sequential quantification of L-malate and D-malate.

P: micro-tube pump; AD: air damper; I: injector (10-way switching valve); MC: mixing coil; D-MDH: immobilized D-MDH reactor; L-MDH: immobilized NADP-L-MDH reactor; V: switching valve (6-way switching valve); FD: fluorescence detector; R: recorder; W: waste.

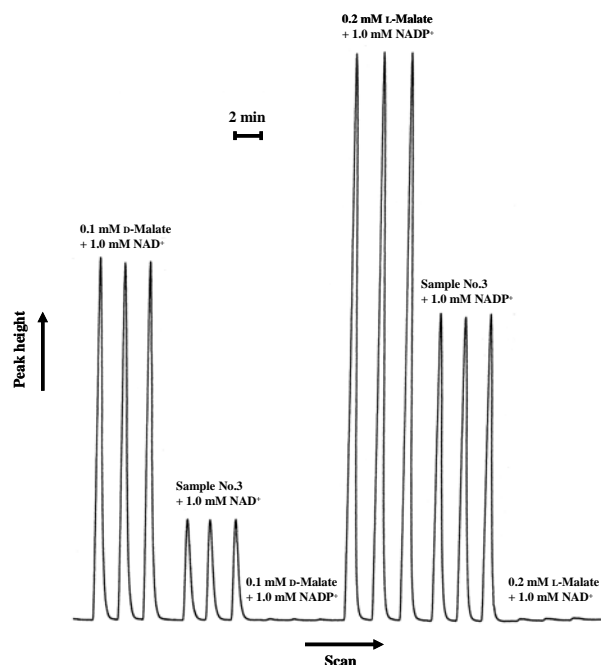
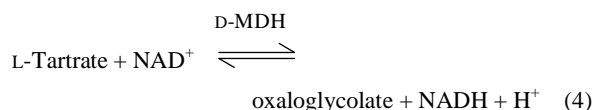


Fig.5 Typical FIA peaks for sequential quantification of L-malate and D-malate.

3-2. L-酒石酸

L-酒石酸は葡萄やそれを原料に醸造されるワイン中に最も多く含まれる有機酸であり、わずかな渋味と収斂味のある酸味を呈する。したがって、L-酒石酸量の把握は特にワイン醸造において不可欠な項目となっている。しかし、L-酒石酸に関してはこれまで酵素的測定法が開発されていなかった。筆者らは D-MDH の副反応の利用を考案し、まずバッチ系における酵素的測定法を開発した (Scheme4)¹⁰⁾。天然には D-リンゴ酸はほとんど存在しないため、人為的に D-リンゴ酸が添加されない限り、D-MDH は L-酒石酸に特異的に反応し、葡萄やワインに含有される L-酒石酸の定量に利用可能であることがわかった。そこで、D-MDH 固定化リアクターを Fig.1(A)の FIA システムに導入して L-酒石酸の迅速定量を試みた¹¹⁾。



D-MDH の副反応は主反応 (D-リンゴ酸の酸化反応) と比較して速度が遅いため、通常のフロー系では十分な測定感度が得られなかった。そこで、Stopped-FIA を採用してリアクターにおける反応時間の延長を図った。Fig.6 に L-酒石酸定量の直線領域に及ぼすストップ時間の影響を示す。ストップ時間が長くなるにつれて、直線の傾きは大きくなり、その範囲も広くなる傾向を示した。180秒では L-酒石酸 0.01~1.20mM の濃度範囲において応答値 (蛍光強度) との間に良好な直線関係が得られた。

さらに、実試料の測定における有効性を検討するため、

本法と HPLC の測定結果を比較したところ、赤ワイン No.1を除いて両者には良好な一致が認められた (Table1)。赤ワイン No.1 は FIA による値が HPLC による値より大幅に高かったことから酸味料 (D-リンゴ酸) の添加が予想された。そこで、水酸化カルシウム/エタノール処理により L-酒石酸を除去した試料と未処理試料の応答値の差から L-酒石酸濃度を算出したところ、FIA による値は 2.21 となり、HPLC による測定値と良好に一致した。

D-MDH の副次反応を利用した本手法はバッチ系及びフロー系における L-酒石酸の迅速定量をはじめ可能としたものであり、ワインの醸造工程や品質管理の有効な手段となると考えられる。

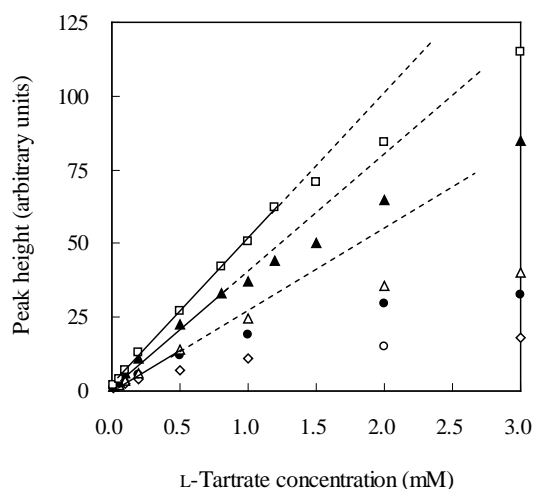


Fig.6 Calibration curves for the quantification of L-tartrate under various stopped-time conditions.

Stopped-time: 0 (○), 30 (●), 60 (△), 120 (▲), 180 (□) s.

Table1 Comparison of the results (L-tartrate) obtained by the proposed FIA with those obtained by HPLC.

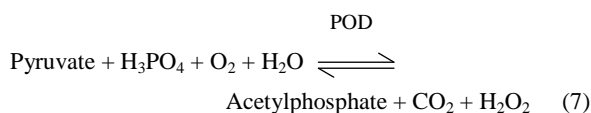
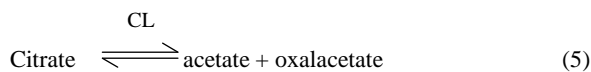
Sample	L-Tartrate (g/l)		
	FIA (A)	HPLC (B)	Bias (A-B)
White wine 1	1.94	1.97	-0.03
White wine 2	3.81	3.88	-0.07
White wine 3	3.23	3.10	+0.13
White wine 4	2.89	2.93	-0.04
White wine 5	1.95	1.95	0.00
Red wine 1	3.98	2.03	+1.95
	2.21	2.03	+0.18
Red wine 2	2.07	1.99	+0.08
Red wine 3	2.05	2.11	-0.06
Red wine 4	1.91	1.89	+0.02
Red wine 5	2.21	2.26	-0.05

3-3. クエン酸、イソクエン酸

クエン酸は柑橘類に多く含まれる有機酸であり、穏やかで爽快な酸味を呈する。したがって、クエン酸含量の把握は柑橘類の品質管理に重要な項目である。また、果

汁中の成分組成に着目した研究動向をみると、果汁中のクエン酸とイソクエン酸の組成比がほぼ一定であることを利用して偽和物添加を検出する可能性があるとの報告がなされている^{12,13)}。ここでは、クエン酸及びイソクエン酸の定量用 FIA の開発について紹介する。

クエン酸の酵素的測定には通常、クエン酸リアーゼ (CL) が用いられるが、CL はその酵素反応に伴い失活する性質を有している。また、CL は反応生成物阻害を受けるとの報告もある。そこで、まず、オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ (ODC) 及びピルビン酸オキシダーゼ (POD) 同時固定化リアクターを用い、CL を遊離酵素の状態を試料と共に混合注入する FIA システムを考案した¹⁴⁾。FIA システムには Fig.1(B) を用い、オープンサンドイッチ法により CL 溶液と試料を混合注入した。遊離 CL と ODC・POD 同時固定化リアクターによる一連の酵素反応 (Scheme5-7) で生じた過酸化水素を白金電極により検出することでクエン酸の迅速定量が可能になった。



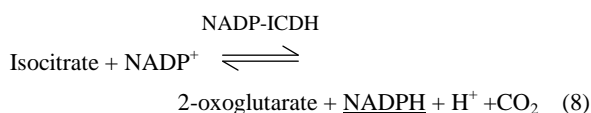
しかし、この FIA システムでは測定可能範囲が 0.1~1.0mM であり、低濃度領域での測定が困難であった。そこで、CL を固定化したリアクターを調製し、FIA システムへの導入を試みた¹⁵⁾。FIA システムには Fig.1(A) を用い、CL 及び ODC 同時固定化リアクターと POD 固定化リアクターを直結することで反応生成物を迅速に除去すると共に過酸化水素の生成へ導き、白金電極による検出を行った。その結果、測定可能範囲は 0.001~0.1mM となり、低濃度領域での測定が可能になった。次に、低濃度領域での測定が可能になったことから、注入するクエン酸の濃度を低減化することで CL・ODC 固定化リアクターの長寿命化を試みた。Table2 は試料注入量 50μl とした際のクエン酸濃度と絶対量に対する測定可能回数である。クエン酸濃度を 0.1mM すなわち絶対量を 5nmol 以下にすることで 100 回以上の繰り返し分析が可能であることがわかった。

Table2 Effects of concentration of citrate on the stability of the CL・ODC reactor.

Citrate concentration		Potent number of injection ^a
(mM)	(nmol/50μl)	
0.05	2.5	194
0.10	5.0	116
1.00	50.0	11

^a Before activity decreases.

一方、イソクエン酸は NADP 依存性イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (NADP-ICDH) 固定化リアクターを用いて生成する NADPH をモニターすることで定量を試みた (Scheme8)。NAD 依存性 ICDH も検討に加えたが、この酵素はクエン酸によりその活性が調節を受けるため、クエン酸が高濃度で含有される柑橘果汁中ではイソクエン酸の正確な定量が不可能であることが判明した。このため、NADP-ICDH を利用することとした。



次に、上記 2 種類の固定化酵素リアクターを独立した流路に並列に配置した FIA システムを構築し、クエン酸及びイソクエン酸の同時定量を試みた (Fig.7)¹⁵⁾。各固定化酵素リアクターの直前にアスコルビン酸除去リアクターを配置することで試料中のアスコルビン酸の影響を低減化した。柑橘果汁中のクエン酸濃度はイソクエン酸濃度の約 100 倍であるため、両リアクターの定量可能領域から考えて FIA に供するクエン酸量を低減化する必要があった。そこで、クエン酸定量用流路のサンプルループを 50 μl から 1 μl へ縮小することにより、反応に供するクエン酸量の低減化を図った。Fig.8 は本 FIA システムを用いて得られた FIA ピークである。本 FIA システムにより測定濃度範囲が 100 倍程度異なるクエン酸とイソクエン酸の同時定量が可能となった。

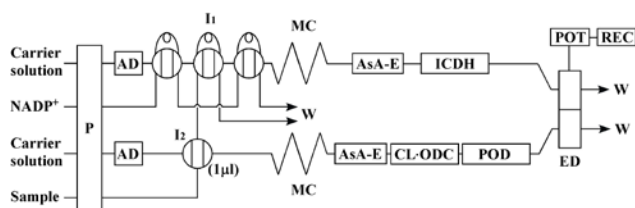


Fig.7 Schematic diagram of the FIA system for simultaneous quantification of citrate and isocitrate.

P: micro-tube pump; AD: air damper; I₁: injector (16-way switching valve, 80 μl); I₂: injector (sample injection valve, 1 μl); MC: mixing coil; AsA-E: ascorbate-eliminating reactor; ICDH: immobilized NADP-ICDH reactor; CL•ODC: immobilized CL•ODC reactor; POD: immobilized POD reactor; ED: multichannel electrode detector; POT: multichannel potentiostat; REC: multichannel recorder.

さらに、柑橘果汁に対して本 FIA システムを適用したところ、酵素的分析法 (F-kit 法) による結果と良好に一致した (Table3)。また、本 FIA システムで測定したイソクエン酸に対するクエン酸の比率はこれまで報告されている値の範囲に入るものであった。

以上の結果から、本 FIA システムによるクエン酸とイソクエン酸の同時定量法は柑橘果汁の偽和物添加検出に適用できることが示唆された。また、複数流路-複数検出系 FIA システムは化学種及び系統の異なる多成分を同時定量できるところから幅広い用途があると考えられる。

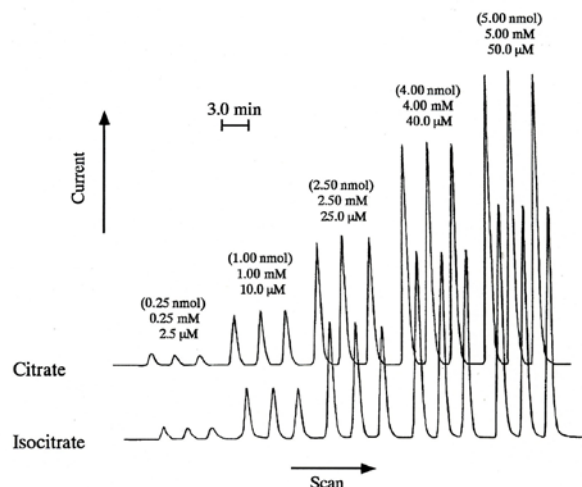


Fig.8 Typical FIA peaks for simultaneous quantification of citrate and isocitrate.

Table3 Comparison of the results (citrate, isocitrate) obtained by the proposed FIA with those obtained by the F-kit method.

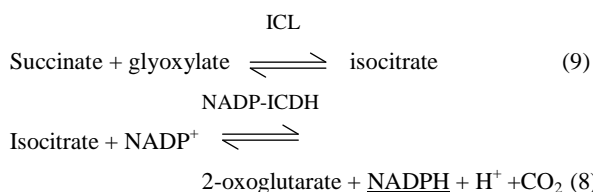
Citrus fruit	Citrate (mg%)		Isocitrate (mg%)	
	FIA	F-kit	FIA	F-kit
Valencia orange	950	942	9.8	9.7
Navel orange	1051	1081	10.4	10.1
Grapefruit	1223	1200	12.8	13.5
Satsuma mandarin	817	890	7.5	7.7

Citrus fruit	Citrate/Isocitrate	
	FIA	Reference
Valencia orange	97	— ^{12,13)}
Navel orange	101	80-120 ¹³⁾
Grapefruit	96	67-110 ¹³⁾
Satsuma mandarin	109	—

3-4. コハク酸

コハク酸は貝類や日本酒に多く含まれている有機酸であり、強い酸味と弱い渋みを伴った独特のうま味を呈することが知られている。

コハク酸の酵素的測定には通常、スクシニルコエンザイムAシンターゼ (SCS) を出発とする複雑な酵素リレー系が用いられる¹⁶⁾。また、高価な補酵素や化学物質を共存させる必要があるため、固定化酵素リアクターを用いた FIA への適用は実用的ではないと考えられる。そこで、筆者らはイソクエン酸リアーゼ (ICL) 及び NADP-ICDH 同時固定化リアクターを新たに考案し、最終生産物である NADPH を検出する FIA システムを構築した (Scheme8&9)¹⁷⁾。FIA システムには Fig.1(A)を用いた。



本 FIA システムはキャリアー溶液にグリオキシル酸を添加しておき、試料と共に NADP を注入するだけのシンプルな測定系であり、従来の SCS を出発とする複雑な酵素リレー系では実現できなかったコハク酸の FIA をはじめて可能としたシステムである。本 FIA システムを貝類や日本酒中のコハク酸定量へ適用したところ、酵素的分析法 (F-kit 法) による結果と良好に一致した (Table4)。

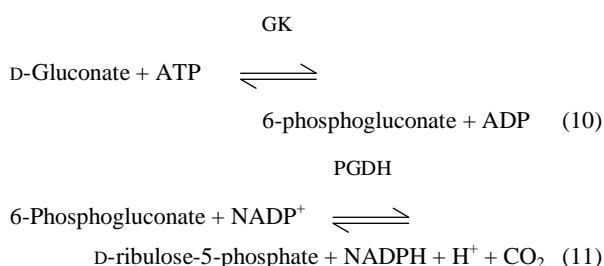
ICL と NADP-ICDH の酵素リレー系を用いた本手法は FIA のみならず、バッチ系におけるコハク酸の酵素的測定へも適用可能であるため、醸造工程や食品の品質管理への利用が期待できる。

Table4 Comparison of the results (succinate) obtained by the proposed FIA with those obtained by the F-kit method.

Sample	Succinate		
	FIA (A)	F-kit (B)	Bias (A-B)
Shellfish (mg/100g)			
Arkshell	127.1	127.9	-0.8
Clam	162.3	159.2	+3.1
Corb shell	389.7	370.3	+19.4
Short-neck clam	283.0	276.7	+6.3
Japanese sake (mg/100ml)			
Sake 1	379.1	391.7	-12.6
Sake 2	400.2	418.6	-18.4
Sake 3	290.1	294.8	-4.7
Sake 4	281.1	277.2	+3.9

3-5. D-グルコン酸

D-グルコン酸は丸みのある爽快な酸味を呈する有機酸であり、蜂蜜、食酢、貴腐ワインなどに多く含まれている。また、D-グルコン酸の分子内環状エステルである D-グルコノラクトンは添加物として様々な食品へ使用されている。そこで、D-グルコン酸の定量を目的として、固定化酵素リアクターを用いた FIA システムを構築した。



D-グルコン酸は D-グルコン酸キナーゼ (GK) 及び 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (PGDH) 同時固定化リアクターを用いて生成する NADPH をモニターするこ

とで定量を試みた (Scheme10&11)¹⁸。FIA システムには Fig.1(B)を用い、試料と試薬 (ATP 及び NADP) はオープンサンドイッチ法で混合注入した。

D-グルコン酸と D-グルコノラクトンは平衡関係にあり、特に液体試料中では D-グルコノラクトンは加水分解を受けて徐々に D-グルコン酸へ変換される。そこで、試料の pH をアルカリ側 (pH10)にすることですべての D-グルコノラクトンを D-グルコン酸へ変換して総 D-グルコン酸量として測定した。本 FIA システムを用いて実試料に対する添加回収試験を行ったところ、いずれも 100%前後の回収率が得られた (Table5)。さらに、実試料の測定における本法の有効性を検討するため、本法と F-kit 法の測定結果を比較したところ、両者には良好な一致が認められた。

以上の結果より、本 FIA システムにより食品中の総 D-グルコン酸量の迅速定量が可能であることが示唆された。

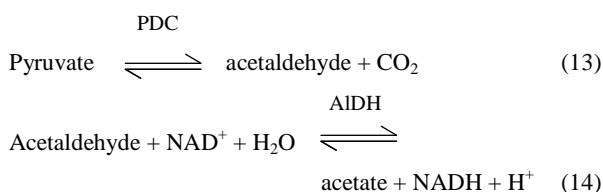
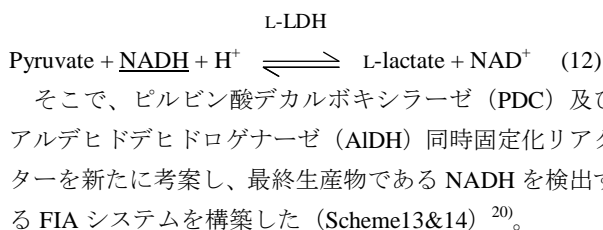
Table5 Recovery of D-gluconate in sample spiked with standard solutions.

Sample	Present	Added	Found	Recovery (%)
Honey (g/kg)	3.42	1.00	4.48	106.0
		2.00	5.49	103.5
Vinegar (g/l)	4.43	2.00	6.38	97.5
		4.00	8.50	101.8
Noble rot wine (g/l)	1.96	1.00	3.00	104.0
		2.00	4.14	109.0
Mean				103.6
CV (%) ^a				3.4

^a Coefficient of variation.

3-6. ピルビン酸、酢酸、L-乳酸

一般的にピルビン酸の酵素的測定には L-乳酸デヒドロゲナーゼ (L-LDH) が用いられている (Scheme12)¹⁹。この酵素系では NADH の消費量 (減少量) をモニターすることになるが、FIA への適用を想定した場合、高濃度の NADH を使用するためバックグラウンドの上昇につながり、結果として高感度化が困難になると考えられる。



FIA システムには Fig.1(B)を用い、試料と補酵素はオ

オープンサンドイッチ法で混合注入した。Fig.9 は本 FIA システムを用いたピルビン酸の FIA ピークであり、従来の L-LDH 固定化リアクターを用いた FIA システムと比較して約 6 倍の高感度化が可能になった。

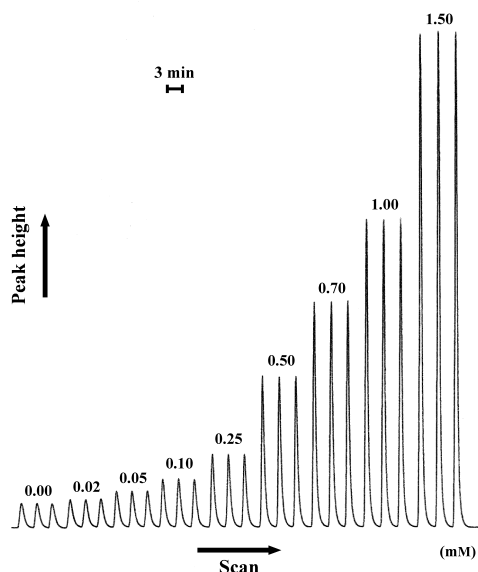


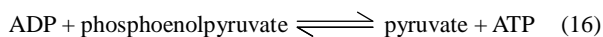
Fig.9 Typical FIA peaks for quantification of pyruvate.

さらに、PDC・AIDH 同時固定化リアクターの上流に他の固定化酵素リアクターを配置することで他の有機酸の測定を試みた。酢酸の定量には PDC・AIDH 同時固定化リアクターの直前に酢酸キナーゼ (AK) 及びピルビン酸キナーゼ (PK) 同時固定化リアクターを導入した FIA システムを用いた (Scheme13&14&15&16)。

AK

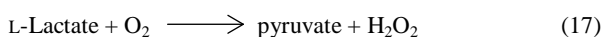


PK



また、PDC・AIDH 同時固定化リアクターの直前に L-乳酸オキシダーゼ (L-LOD) 固定化リアクターを導入することで L-乳酸の測定が可能になった (Scheme 13&14&17)。

L-LOD

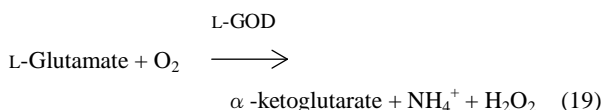
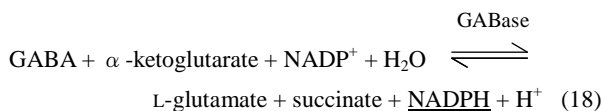


3-7. その他の酸

γ -アミノ酪酸 (GABA) は様々な生理機能を持つことで知られており、機能性食品素材として注目されている。 γ -アミノ酪酸は微生物より L-グルタミン酸から脱炭酸されて生産されることから、 γ -アミノ酪酸及び L-グルタミン酸量の測定は発酵過程をモニタリングする上で重要である。 γ -アミノ酪酸及び L-グルタミン酸は一般的には有機酸の範疇には入らないが、ここでは γ -アミノ酪酸及び L-グルタミン酸の逐次定量用 FIA についても紹介したい²¹⁾。

γ -アミノ酪酸の定量には γ -アミノ酪酸-グルタミン酸

アミノトランスフェラーゼとコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼの混合酵素である GABase を固定化したリアクターを用い、生成した NADPH を蛍光検出器でモニターした (Scheme18)。一方、L-グルタミン酸は L-グルタミン酸オキシダーゼ (L-GOD) 及びカタラーゼ (CAT) 同時固定化リアクターを GABase 固定化リアクターの直前に導入して定量した (Scheme18&19)。L-GOD の反応で生じた過酸化水素は GABase の活性を若干低下させることから、CAT により除去した (Scheme20)。



次に、L-GOD・CAT 同時固定化リアクターと GABase 固定化リアクターを同一流路に直列に導入し、NADPH を蛍光測定する FIA システムを構築した (Fig.10)。

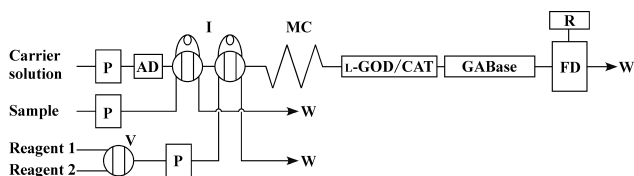


Fig.10 Schematic diagram of the FIA system for sequential quantification of GABA and L-glutamate.

P: micro-tube pump; AD: air damper; I: injector (10-way switching valve); V: switching valve (6-way switching valve); MC: mixing coil; L-GOD/CAT: co-immobilized L-GOD and CAT reactor; GABase: immobilized GABase reactor; FD: fluorescence detector; R: recorder; W: waste.

本 FIA システムでは、試薬の注入を切り替えることにより単一流路で γ -アミノ酪酸と L-グルタミン酸を逐次定量することが可能になった (Fig.11)。 γ -アミノ酪酸の定量時には過剰量の α -ケトグルタル酸を NADP 及び試料と混合注入することにより、Scheme19 の反応で試料中の L-グルタミン酸から α -ケトグルタル酸が生産されても、その影響を最小限に抑えることかできる。これにより Scheme18 の反応が γ -アミノ酪酸濃度依存的となり、 γ -アミノ酪酸を選択的に測定することができる。一方、L-グルタミン酸の定量時には過剰量の γ -アミノ酪酸を NADP 及び試料と混合注入することにより、試料中の γ -アミノ酪酸の影響を抑制することかできる。これにより Scheme19 から 18 への反応が L-グルタミン酸濃度依存的となり、L-

グルタミン酸を選択的に測定することができる。

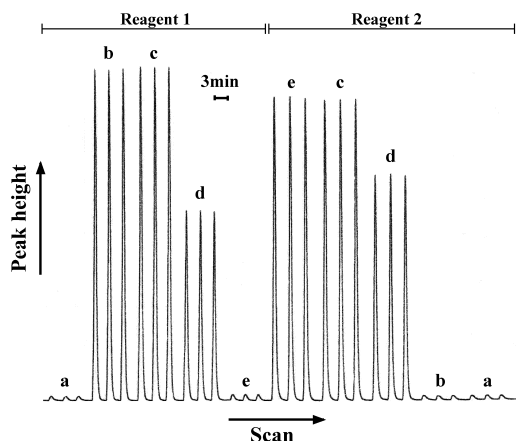


Fig.11 Typical FIA peaks for sequential quantification of GABA and L-glutamate.

Sample: a, none; b, 0.5 mM L-glutamate; c, 0.5 mM L-glutamate and 0.5 mM GABA; d, MRS medium incubated with lactic acid bacteria; e, 0.5 mM GABA.

Reagent 1: 10.0 mM GABA and 1.0 mM NADP⁺.

Reagent 2: 15.0 mM α -ketoglutarate and 1.0 mM NADP⁺.

本 FIA システムは乳酸菌による γ -アミノ酪酸の発酵工程のモニタリングに適用された。 γ -アミノ酪酸及び L-グルタミン酸の経時的な増減値は HPLC による値と良好に一致し、本 FIA システムの有効性が示された (Fig.12)。

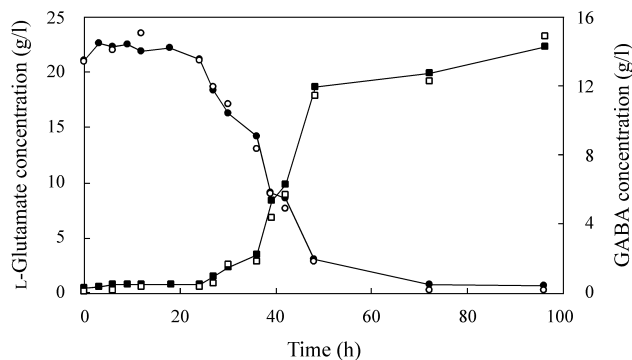


Fig.12 Comparison of the results obtained by the proposed method with those obtained by HPLC in the course of the fermentation with lactic acid bacteria.

L-Glutamate: ●, FIA; ○, HPLC. GABA: ■, FIA; □, HPLC.

4. おわりに

本稿では、筆者らが開発してきた固定化酵素リアクターを用いた FIA システムについて紹介した。バイオセンサー (酵素センサー) の市場動向をみると医療分野での利用が圧倒的であり、食品分析分野がそれに続いている。現在、動物細胞培養用に特化した酵素センサーやファーマンターのオンラインモニタリングが可能な酵素センサー

システムも市販されるようになっており、その利用は広がりつつある。今回、測定対象とした有機酸類のフロー型酵素センサーについて限ってみると、微生物による発酵工程における有機酸のモニタリングが主な用途のようである。今後、発酵工程以外の様々な分野においてフロー型酵素センサーが利用されることを期待したい。

5. 参考文献

- 1) K. Matsumoto, H. Matsubara, M. Hamada, Y. Osajima, *J. Biotechnol.*, **14**, 115 (1990).
- 2) J. Kulys, L. Wang, N. Daugvilaite, *Anal. Chim. Acta*, **265**, 15 (1992).
- 3) K. Matsumoto, H. Matsubara, M. Hamada, T. Doi, Y. Osajima, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1055(1991).
- 4) G. C. Chemnitz, R. D. Schmid, *Anal. Lett.*, **22**, 2897 (1989).
- 5) A. Almuiabed, A. Townshend, *Anal. Chim. Acta*, **221**, 337 (1989).
- 6) F. Mizutani, S. Yabuki, M. Asai, *Anal. Chim. Acta*, **245**, 145 (1991).
- 7) K. Matsumoto, T. Tsukatani, S. Higuchi, *Sensors Mater.*, **7**, 167 (1995).
- 8) K. Matsumoto, S. Higuchi, T. Tsukatani, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 847 (1996).
- 9) T. Tsukatani, K. Matsumoto, *Talanta*, **65**, 396 (2005).
- 10) T. Tsukatani, K. Matsumoto, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 1730 (1999).
- 11) T. Tsukatani, K. Matsumoto, *Anal. Sci.*, **16**, 265 (2000).
- 12) G. L. Park, J. L. Byers, C. M. Pritz, D. B. Nelson, J. L. Navarro, D. C. Smolensky, C. E. Vandercook, *J. Food Sci.*, **48**, 627 (1983).
- 13) E. Cohen, R. Sharon, L. Volman, R. Hoenig, I. Saguy, *J. Food Sci.*, **49**, 987 (1984).
- 14) K. Matsumoto, T. Tsukatani, Y. Okajima, *Electroanalysis*, **7**, 527 (1995).
- 15) K. Matsumoto, T. Tsukatani, *Anal. Chim. Acta*, **321**, 157 (1996).
- 16) G. Michal, H.O. Beutler, G. Lang, U. Guentner, *Z. Anal. Chem.*, **279**, 137 (1976).
- 17) T. Tsukatani, K. Matsumoto, *Anal. Chim. Acta*, **416**, 197 (2000).
- 18) T. Tsukatani, K. Matsumoto, *Anal. Chim. Acta*, **530**, 221 (2005).
- 19) J.R. Marsh, N.D. Danielson, *Microchem. J.*, **44**, 4 (1991).
- 20) T. Tsukatani, K. Matsumoto, *Talanta*, **69**, 637 (2006).
- 21) T. Tsukatani, K. Matsumoto, *Anal. Chim. Acta*, **546**, 154 (2005).

(Received August 8, 2011)