

電子伝達メディエータを用いた電気化学的グルコン酸センサ

近藤徹弥・榊原信彦*

グルコン酸は、醸造酢、ワイン、漬物、ヨーグルトのような発酵食品のほか米、ロイヤルゼリー、蜂蜜などに含まれている。グルコン酸は、酸味をまろやかにし（例：醸造酢）、味を良くし（例：漬物）、芳醇な独特の味を創り出す（例：貴腐ワイン）といわれている。また、グルコン酸及びその塩は、遅効性 pH 調整剤、豆腐用凝固剤、カルシウム強化剤として広く食品製造に利用されている。さらに、グルコン酸にはピフィズス菌増殖効果も見出されている。このようにグルコン酸は食品に様々な機能を付加することが分かってきた。

近年、食品分析には酵素反応を利用した分析法が盛んに用いられている。グルコン酸の定量の場合、グルコン酸キナーゼと 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素の作用により生成する NADPH (F-キット)¹⁾ や、グルコン酸脱水素酵素の作用により生成するフェロシアンイド²⁾ の量を分光法によって測定する方法がある。しかし、これらの方法はサンプルの濁りに影響されやすいため分析結果の信頼性に欠ける場合がある。また、酵素を使い捨てるために高価である。

一方、これらの問題を解決した酵素電極も食品分析に用いられている。代表的なものに、固定化したグルコース酸化酵素を酸素電極（または過酸化水素電極）と組み合わせたグルコースセンサがある。さらに酵素反応をメディエータと呼ばれる酸化還元物質を介して電極へ伝達するメディエータ型酵素電極も開発されている。池田らは、ベンゾキノンに練り込んだカーボンペースト電極にグルコン酸脱水素酵素を固定した酵素電極を作成し、電流応答の理論的解析を行い、この電極がグルコン酸センサとして実用に耐えうることを報告した³⁾。

本研究ではグルコン酸脱水素酵素とフェリシアン化カリウムを用いた電流測定型のグルコン酸センサを作成し、その応答特性について検討した。

実験方法

1. 試薬

NAD(P)を補酵素としないグルコン酸脱水素酵素

(GADH; EC 1.1.99.3, *Pseudomonas* 属由来) はシグマから購入し、精製せずに希釈して使用した。ベンゾキノン(BQ)は和光純薬製のものを昇華法により精製して使用した。フェリシアン化カリウムはキシダ化学製の特級品を、1-メトキシフェナジメトサルフェート(1-メトキシ PMS) は和光純薬製の特級品を、2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP)は半井化学製の特級品をそのまま使用した。グルコン酸測定用の F-キットは、ペーリンガー・マンハイムから購入した。その他の試薬は市販の特級品をそのまま使用した。食品サンプルとして酢酸菌培養液、蜂蜜水溶液、ワインビネガー、オレンジジュースを使用した。

2. 蛋白質濃度及び酵素活性の測定

蛋白質は、牛血清アルブミンを標準蛋白質として Lowry 法の変法⁴⁾により定量した。酵素活性は、Ameyama の報告²⁾に従って測定した。GADH の比活性は 75 units / mg であった。

3. カーボンペースト電極および酵素電極の作成

カーボングラファイトと流動パラフィンを混合し、すり鉢でよく練ったものをカーボンペーストとし、内径 3 mm のカーボンペースト電極ホルダー (CPE カーボンペースト電極 ビー・エー・エス製) に詰め、電極表面を薬包紙で滑らかに磨きカーボンペースト電極を作成した。電極表面に既知量の GADH 溶液を滴下し、風乾し、透析膜 (乾燥時の膜厚 30.5 μm ビスキング・カンパニー製) を被せ、GADH 固定化電極 (GADH - CPE) とした。

4. 電気化学測定

測定装置の構成を図 1 に示す。電気化学測定には 3 電極方式を採用した。パソコン (日本電気製 PC-9801FA 型) 内蔵の D/A 変換器 (インターフェース製 98DA12(4)-H 型) から電圧を発生させ、3 電極式ポテンショスタット (扶桑製作所製 MODEL 1100L 型) を介して、GADH - CPE の電位を規制した。この状態で、支持電解液中にフェリシアン化カリウムやグルコン酸を含む溶液を添加した。

ポテンショスタット付属の電流電圧回路により電極に

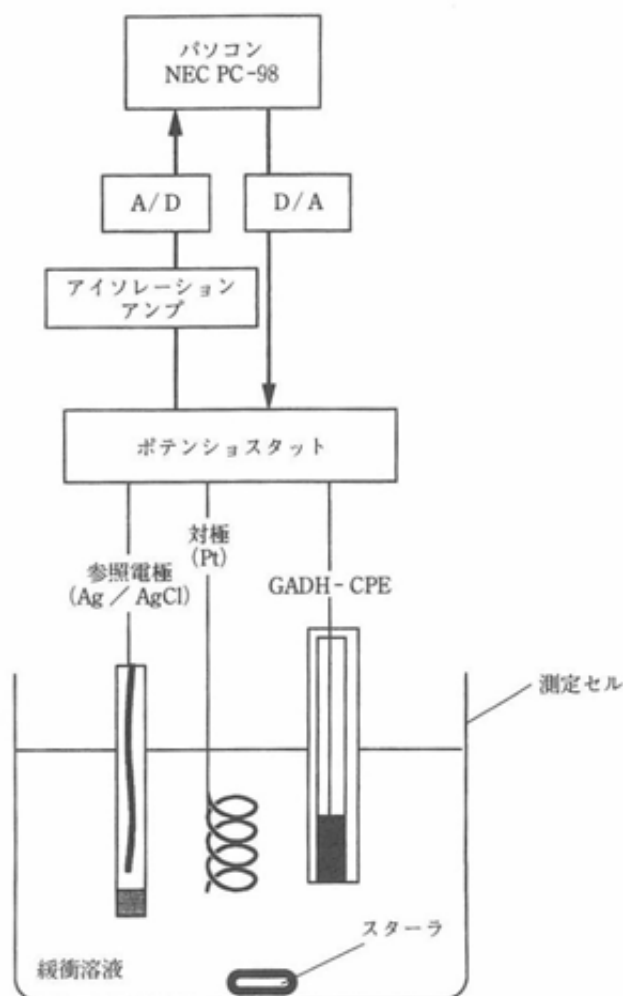


図1 測定装置の構成

流れる電流を電圧に変換した後、アイソレーションアンプ（ティアック製 SA-44型）及びA/D変換器（インターフェース製 98AD12(16/8)-H型）を介して1秒ごとに経時的にパソコンに取り込んだ。

C言語及びアセンブラを用いて測定プログラムを作成した。参照電極には銀/塩化銀電極（飽和塩化カリウム溶液）を、対極には白金線を用いた。測定セルとして30ml容ビーカーを用い、支持電解液として25mlのマッケルベン緩衝液（pH6.0）を用いた。測定中は電流値に影響しないよう十分速い攪拌速度で測定液をマグネチックスターラで攪拌した。全ての測定は25℃で行った。

実験結果及び考察

1. 酵素触媒電流の経時変化

図2に緩衝溶液中でGADH-CPEに電極電位500mV

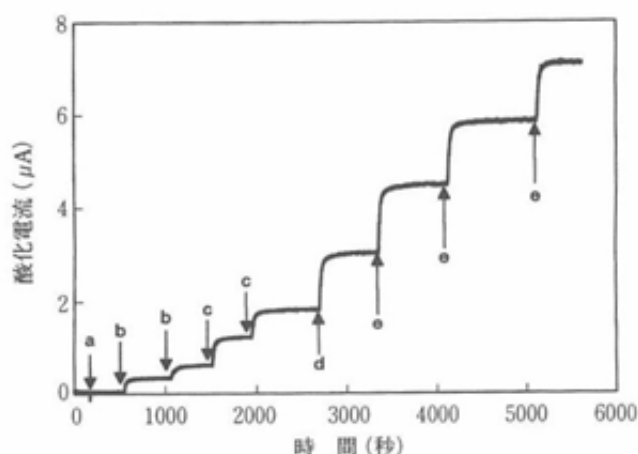


図2 0.5VにおけるGADH (0.9 μg) - CPEの電流応答の経時変化

- a : 0.5M フェリシアン化カリウムを625 μl 添加
- b : 1M グルコン酸を10 μl 添加
- c : 1M グルコン酸を20 μl 添加
- d : 1M グルコン酸を40 μl 添加
- e : 1M グルコン酸を50 μl 添加

（銀/塩化銀電極基準）を印加した状態で、フェリシアン化カリウムやグルコン酸を添加した場合の電流応答の経時変化を示す。測定セルへフェリシアン化カリウムを12.5mMとなるように添加しても電流はほとんど流れなかった（図2矢印a）。さらに、グルコン酸溶液を添加すると迅速に酸化電流が流れ、約5分で定常値(I_s)に達した（図2矢印b, c, d, e）。この定常値はグルコン酸の繰り返し添加に対して良好な応答性を示し、基質添加量の増加とともに増大した。また、グルコン酸のみの添加では電流は上昇せず、酵素、グルコン酸、フェリシアン化カリウムが全て揃わないと、電流上昇は観察されなかった。

これらの結果は、フェリシアン化カリウムがGADHと電極との電子伝達メディエータとして機能していることを示している。

2. 定常電流の電位依存性

フェロシアン化カリウム添加溶液中におけるGADH-CPEの電極電位とグルコン酸酸化電流の定常値との関係を図3に示す。フェロシアン化カリウムを含む溶液中では、電位の上昇とともに酸化電流の定常値が増大し、400mVより正の電位では限界値となった（曲線a）。これはフェロシアンイオンの電気化学的酸化によるものである。さらにグルコン酸を加えた場合、フェロシアン化カリウムのみの時よりも定常電流値は大きくなり、300mVより正の電位で限界値となった（曲線b）。グルコン酸添加による定常電流値の増大は、フェロシアンイオンから電気化学的に生成したフェリシアンイオン

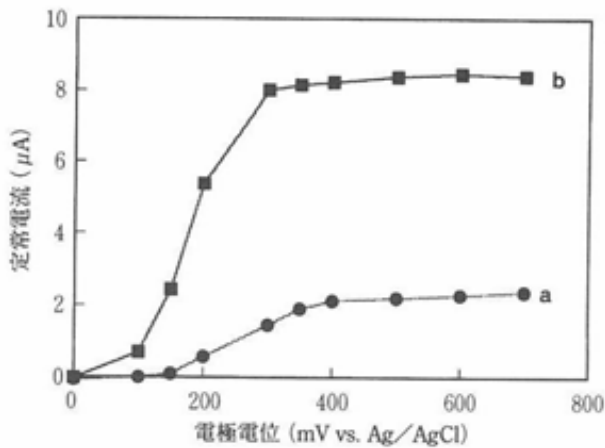


図3 定常電流の電位依存性

GADH 固定量: 0.12 μg
 曲線 a: 12.5mM フェロシアン化カリウム
 曲線 b: 12.5mM フェロシアン化カリウム
 +20mM グルコン酸

がグルコン酸の酵素的酸化反応に伴いフェロシアンイオンに還元され、電極近傍のフェロシアンイオンの濃度が増大したためと考えられる。

3. 各種酸化還元色素のメディエータ能

メディエータ型バイオセンサの特性はメディエータとして用いる酸化還元化合物の様々な性質、例えば、酵素との電子移動反応、電極との電子移動反応、酸化還元電位、溶解度などに依存する。

これまでフェリシアン化カリウム、BQ、DCIP、フェナジンメトサルフェート等の酸化還元色素が GADH の電子受容体として機能することが知られている²⁾。そこで各種酸化還元色素を電子伝達メディエータとして用いた場合の GADH-CPE の電流応答を調べた (図4)。

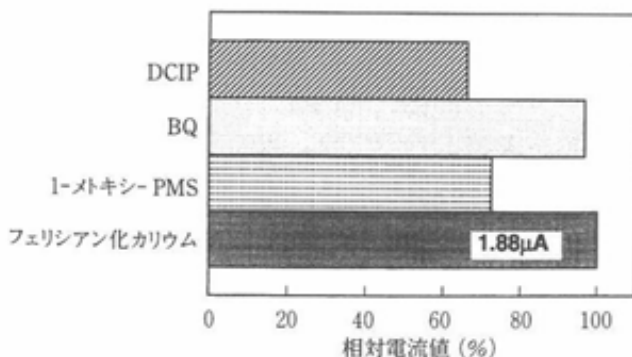


図4 各種酸化還元色素のメディエータ能

GADH 固定量: 0.12 μg
 色素濃度: 0.5mM
 グルコン酸濃度: 20mM
 電極電位: 0.5V

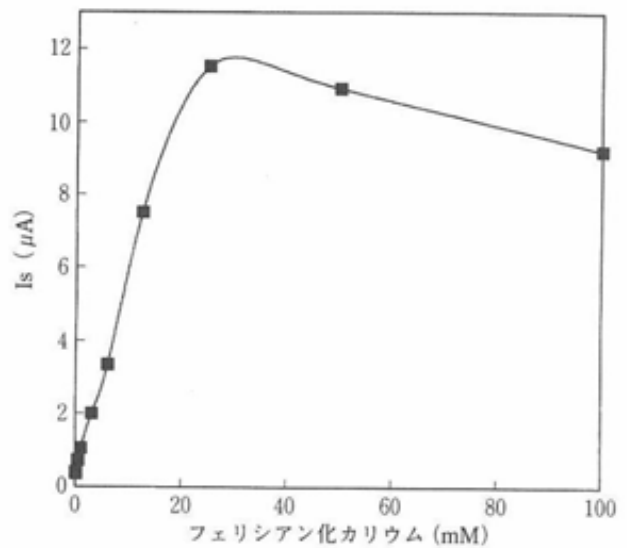


図5 メディエータ濃度の影響

GADH 固定量: 0.12 μg
 グルコン酸濃度: 20mM
 電極電位: 0.5V

フェリシアン化カリウムを用いた時が最も応答が高く、以下 BQ、1-メトキシ PMS、DCIP の順であった。このことから、GADH-CPE ではフェリシアン化カリウムをメディエータとして用いるのが最適であることが分かった。

4. メディエータ濃度依存性

図5に示したように、GADH-CPE の20mM グルコン酸に対する Is 値はフェリシアン化カリウム濃度の増加とともに増大した。フェリシアン化カリウムが25mM 以上になると定常電流はやや低下した。

5. グルコン酸濃度依存性

GADH-CPE の電流応答の基質濃度依存性を図6に示す。Is 値は20 μM から0.3mM までの範囲のグルコン酸濃度に対し直線的な応答を示した。相関係数は0.991であった。グルコン酸の高濃度領域では、Is 値は飽和傾向を示し、多くのメディエータ型酵素電極でみられるように、ミハエリスーメンテン型の挙動を示した。

6. センサの安定性

GADH-CPE を1日1回測定に供し、使用しないときは冷蔵保存して、電流応答の経時安定性を調べた。

図7に示したように、電極作製後3日間で急激に応答は低下したが、その後緩やかに減少し、30日後の応答電流は電極作成直後の約1/4であった。

7. 食品への応用

以上の結果を踏まえ、GADH-CPE による食品中のグルコン酸の定量を試みた。フェリシアン化カリウムを含

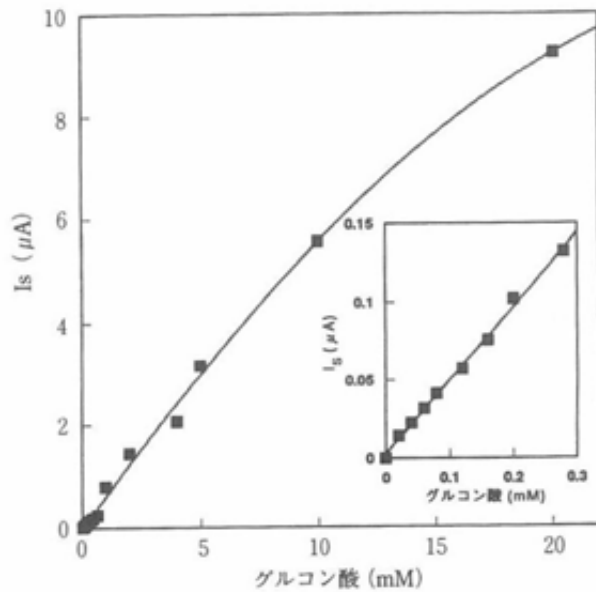


図6 定常電流のグルコン酸濃度依存性

GADH 固定量: 0.12 μg
 フェリシアン化カリウム濃度: 100mM
 電極電位: 0.5V

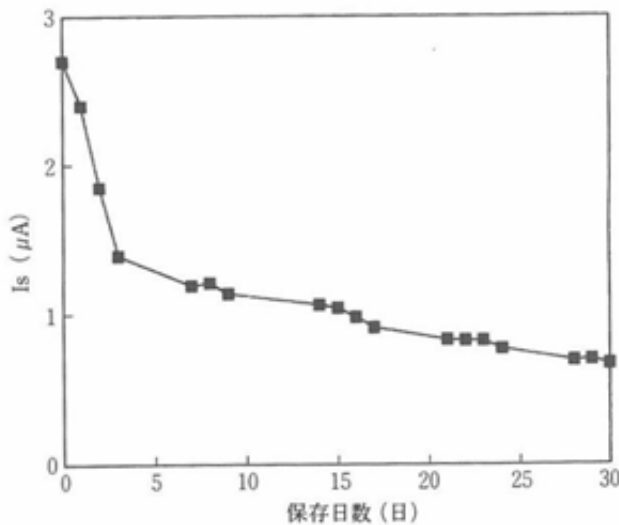


図7 GADH-CPEの安定性

GADH 固定量: 0.12 μg
 フェリシアン化カリウム濃度: 12.5mM
 グルコン酸濃度: 4.7mM
 電極電位: 0.5V

表1 食品サンプルの分析

	グルコン酸濃度 (g/ℓ)	
	本方法	F-kit
酢酸菌培養液	16.5	17.1
蜂蜜水溶液	0.33	0.62
ワインビネガー	0.41	0.31
オレンジジュース	0.39	N. D.

む緩衝液中で、食品サンプルの希釈液の適当量を添加したときの I_s 値を測定し、グルコン酸標準液に対する I_s 値からサンプル中のグルコン酸の濃度を求めた。この方法により得られたグルコン酸濃度とF-キットによる値を表1に示す。酢酸菌培養液やワインビネガーでは、両分析法の結果は比較的良く一致したが、オレンジジュースや蜂蜜水溶液では両者に差がみられた。

本センサではビタミンCが正の誤差を与えるので、オレンジジュースの場合の両者の差は、サンプルに含まれているビタミンCのような還元性物質の影響が考えられた。あらかじめ還元性物質を酸化する、より低い電位で測定するなど、還元性物質の影響を受けないような工夫をする必要がある。また、蜂蜜水溶液において、本センサの結果はF-キットの結果の約半分の値であった。このことは、蜂蜜水溶液の成分が本センサの応答に阻害的に作用しているのかもしれない。

要 約

グルコン酸脱水素酵素を電極に固定化したグルコン酸センサを作製し、その応答特性について検討した。様々な酸化還元色素のメディエータ能を検討した結果、フェリシアン化カリウムが最適であることが分かった。本センサは20 μM から0.3M のグルコン酸濃度領域で良好な直線応答性を示し、相関係数は0.991であった。本センサの応答は30日後で約1/4に低下した。食品中のグルコン酸を定量したところ、一部のサンプルを除いてF-キットによる結果と比較的良く一致した。食品に含まれる還元性物質に影響されない工夫が、今後の課題として残された。

文 献

- 1) 研究用試薬カタログ, No.428191, ベーリンガー・マンハイム株式会社
- 2) M. Ameyama: *Methods in Enzymology*, **89**, 20 (1982)
- 3) T. Ikeda, K. Miki, F. Fushimi, and M. Senda: *Agri. Biol. Chem.*, **52**, 1557 (1988)
- 4) J. R. Dullely and P. A. Grieve: *Anal. Biochem.*, **64**, 136 (1975)