

Alcaligenes xylosoxidans の菌体破砕液を固定した電極による ヒスタミンのアンペロメトリック測定

近藤徹弥・矢野未右紀・安藤俊之

ヒスタミンは、遊離ヒスチジン含有量の高いサバやマグロなどの赤身魚において、細菌のヒスチジン脱炭酸酵素活性の作用により生成する不揮発性腐敗アミンの一つであり、アレルギー様食中毒の原因物質である。この中毒は、ヒスタミン含量が 100-400 mg% (0.9-3.6 mM) の食品を摂取した時に発生するといわれている¹⁾。症状としては、全身性アナフィラキシー反応や、じんましん、気管支喘息等がある。

現在のところ我が国におけるヒスタミンの法的な規制値はないが、欧米諸国では法的規制値が定められている。アメリカでは、FDA(米国食品医薬局)がアレルギー様食中毒が懸念される魚について、ヒスタミン濃度が 5 mg/100 g を基準値とし、20 mg/100 g 以上の場合、事実上腐敗とし、50 mg/100 g 以上の場合健康上有害であるとしている²⁾。また、水産加工品に対し HACCP(Hazard Analysis Critical Control Point, 食品の危害分析・重要管理点方式)による衛生管理システムが義務づけられ、アメリカ国内はもちろんのことアメリカに輸入される水産加工品についても対象となり、我が国でも対アメリカ向け輸出水産物はこの管理システムに従う必要性がでてきた。

このような背景から、食品の鮮度管理法としてヒスタミン測定が重要になりつつあり、ヒスタミンを簡便かつ迅速に検出定量することが望まれている。しかし、従来の HPLC 法¹⁾や AOAC 法³⁾による定量法では、酸やアルコールで抽出後、イオン交換カラムで処理する等、前処理が煩雑であり、測定に 6 時間以上を要する。

近年、アミン酸化酵素を酸素電極若しくは過酸化水素電極と組み合わせたバイオセンサが研究開発されている⁴⁾。この方法によれば、HPLC 法に比べて簡便で短時間に測定できる。しかし、この種のバイオセンサはヒスタミンを酸化する際の過酸化水素の生成、もしくは酸素の消費を測定する方式であるため、生体試料をそのまま測定試料とした場合、生体試料中に存在するカタラーゼによる妨害や溶存酸素濃度の変動による誤差が指摘されて

いる。

本研究では、溶存酸素の影響を受けないアミン脱水素酵素を用いたバイオセンサを作製し、その応答特性について検討した。

1. 実験方法

(1) 微生物と培養条件

微生物として *Alcaligenes xylosoxidans* IFO13495 を使用した。培地としてリン酸水素二カリウム 5 g, リン酸一カリウム 2 g, 塩化ナトリウム 5 g, 硫酸マグネシウム・七水和物 0.1 g, 酵母エキス 0.5 g, β -フェニルエチルアミン 2 g を水 1 l に溶かし、pH 7.0 に調整したものを用いた。*Al. xylosoxidans* の保存スラントより 1 白金耳を 160 ml の培地の入った 300 ml 容三角フラスコに植菌し、30°C, 200 rpm で 72 時間振とう培養したものを前培養液とした。この前培養液を 7.84 l の培地の入った 10 l 容ジャーファーマーターに加え、30°C, 攪拌速度 150 rpm, 通気量 0.8 l/分で 72 時間培養した。

(2) 酵素液の調製

培養液を遠心分離(12 000 rpm, 20 分)により集菌した。菌体を 10 mM リン酸緩衝液(pH 7.5)で 2 回洗浄した。10 mM リン酸緩衝液(pH 7.5)150 ml に懸濁した菌体を強力超音波発生装置(INSONATOR201M, KUBOTA 製)を用いて、超音波破砕した。破砕液を遠心分離し、得られた上清を酵素液とした。タンパク質量は 5.02 mg/ml であった。酵素液を小分けにして -60°C で凍結保存し、必要に応じて解凍して使用した。解凍した酵素液の酵素活性は、4°C で少なくとも 1 か月以上安定であった。

(3) ヒスタミン脱水素酵素活性の測定

Eady らの方法⁵⁾に若干の変更を加えて分光学的に測定した。200 μ mol のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5), 0.149 μ mol の 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール (DCIP), 1 μ mol のフェナジンメトサルフェート(PMS),

20 μmol のヒスタミンを含む反応液に酵素液を入れ、全量 3.0 ml として、30°C で 600 nm における吸光度の減少を追跡した。1 分間に 1 μmol のヒスタミンを酸化する酵素の量を 1U の酵素活性と定義した。調製した酵素液のヒスタミン脱水素酵素活性は 1.06 U/ml であった。

(4) タンパク質の定量

Lowry の変法⁷⁾によりタンパク質を定量した。標準タンパク質として牛血清アルブミンを用いた。調製した酵素液のタンパク質量は 5.02 mg/ml であった。

(5) 酵素固定化電極の作成

所定量のベンゾキノン(BQ)を混ぜたカーボンペーストをCPEカーボンペースト電極(内径 3 mm, 電極表面 7.1 mm², ビーエーエス製)に詰め、電極表面を滑らかに磨いた。電極表面に酵素液を滴下し、ドライヤーで乾燥後、透析膜を被せた。

(6) 電気化学測定の装置及び測定法

電気化学測定には 3 電極式を用いた。図 1 に測定装置の模式図を示す。パソコン(PC9801FA, NEC 製)内蔵の D/A 変換器(DA12(4)-H, インターフェース製)から電圧を発生させ、3 電極式ポテンシostat(MODEL1100L, 扶桑製作所製)を介して酵素固定化電極の電位を規制した⁸⁾。参照電極には銀/塩化銀電極(飽和 KCl 溶液)を、対極には白金線を用いた。電極に流れる電流はポテンシostatに付属した電流電圧回路により電圧に変換された後、アイソレーションアンプ(SA-44, TEAC 製)及び A/D 変換器(DA12(4)-H, インターフェース製)を介して、デジタル信号としてパソコンに取り込まれた。測定セルに 10 ml の 0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)を入れ、電極電位 0.5 V(銀/塩化銀電極基準)において、ヒスタミン添加に伴う電流変化を経時的に測定した。測定セルは恒温槽内で 30°C に保ち、強制通気は行わなかった。測定中、測定液は 800 rpm で攪拌した。

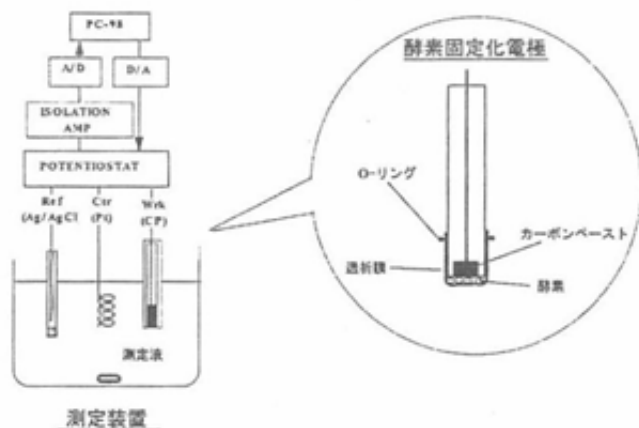


図 1 測定装置の模式図

2. 実験結果及び考察

(1) 酵素触媒電流の経時変化

図 2 に酵素固定化電極に対して得られた電流の経時変化を示す。測定は 0.5 V の電極電位で測定した。図 2 に示したように、緩衝液にヒスタミン溶液を添加すると、急激に電流が上昇し、数百秒で定常値に達した。ヒスタミン添加に伴う正味の電流増加(I)は、添加したヒスタミン量とともに増大した。また、この電流増加は BQ 及び酵素が共存した場合にのみ観察された。このことは、BQ が酵素反応と電極反応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⁹⁾。

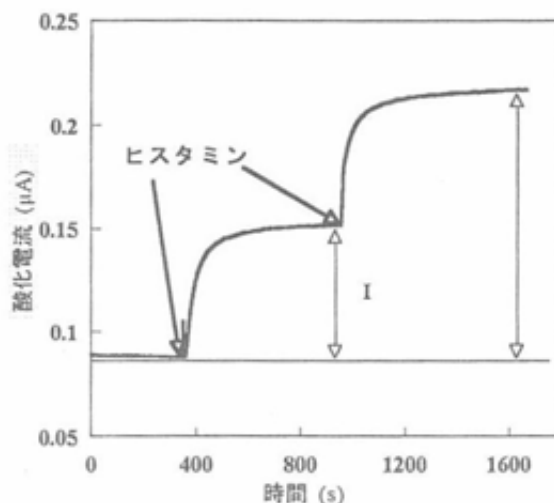


図 2 電流応答の経時変化

(2) 様々な化合物のメディエータ能

メディエータ型バイオセンサの特性は電極反応と酵素反応の電子伝達メディエータとして用いる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、溶解度等に依存する。そこで、BQ を含まないカーボンペーストで作製した酵素固定化電極を用いて、幾つかの酸化還元色素(フェリシアニド, DCIP, BQ, PMS)のメディエータ能を検討した。

1 mM のヒスタミンを含むリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)に、酸化還元色素を 10 mM 又は 50 mM となるように添加した時の電流応答をみた。図 3 に示したように、いずれの化合物でも酸化電流の増大が観察された。特に PMS は本酵素-電極間の良好な電子伝達メディエータとして機能することが示された。BQ も高濃度では比較的良好に機能した。PMS が光に不安定であること、BQ がアルカリ溶液中では不安定であるがカーボンペースト中に練り込むと安定であること、BQ が水に溶けにくいことを考慮した結果、以降の実験では BQ をメディエータとして用いることにした。

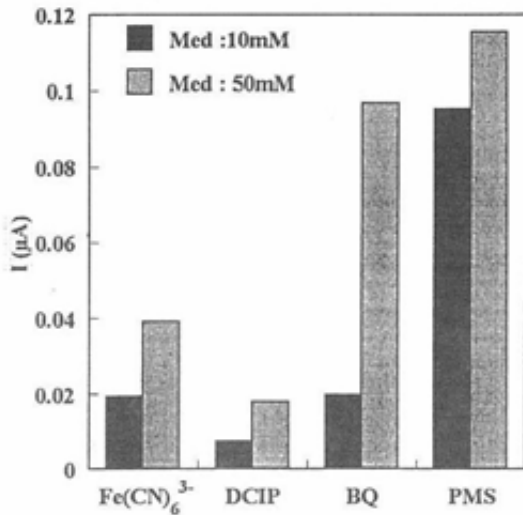


図3 電流応答に及ぼすメディエータの影響

(3) 酵素量依存性

BQのカーボンペーストへの練り込み量を5%, ヒスタミン濃度60 μMの条件で酵素固定化量の応答電流に及ぼす影響を調べたところ, 固定化した酵素量に応じて, Iは高くなったが, 0.01 U以上の酵素固定化量では電流値は飽和した。

(4) メディエータ濃度依存性

基質濃度60 μM, 酵素固定化量0.01 Uにおいて, カーボンペースト電極中のBQ量の影響を調べた結果を図4に示した。BQのカーボンペーストへの練り込み量とともに電流応答は高くなり, 5%以上で飽和した。

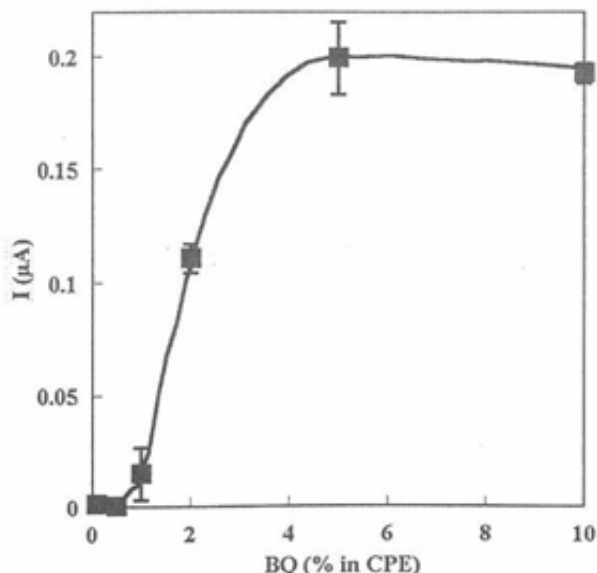


図4 ベンゾキノンの練り込み量の電流応答への影響

(5) 基質濃度依存性

電流応答の基質濃度依存性を調べた。図5に示したように, ヒスタミン濃度の増加とともに電流値は増加した。更に, ヒスタミン濃度0-20 μMの低濃度域ではヒスタミン濃度と定常電流値との間に良好な直線関係が得られ, 相関係数は0.998であった。

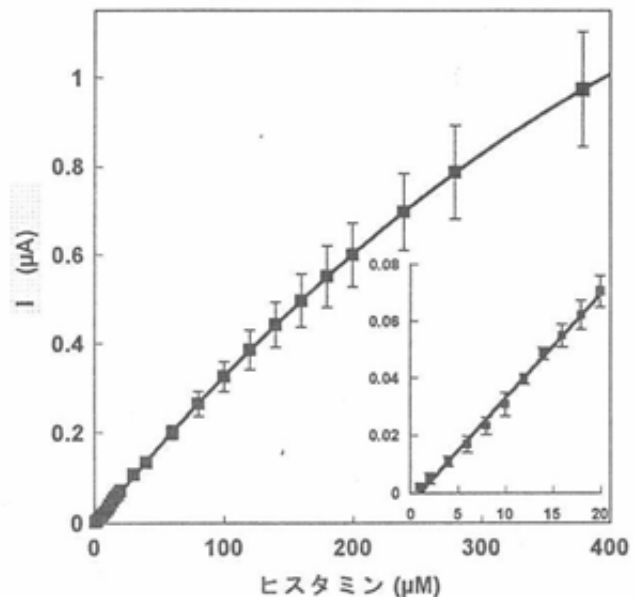


図5 電流のヒスタミン濃度依存性

(6) 通気の影響

アミン酸化酵素を用いたバイオセンサの場合, 溶存酸素が電子受容体として働くため, センサ出力は温度変化等に起因する溶存酸素の濃度変化の影響を大きく受ける。また, カタラーゼが混入した場合, ヒスタミン酸化によって生じた過酸化水素がカタラーゼにより酸素と水に分解されるため, ヒスタミンの量を低く見積もる可能性がある。一方, 脱水素酵素では酸素は電子受容体とならないので, 溶存酸素の影響はないと考えられる。実際, 今回用いた酵素固定化電極では, 空気通気, 窒素通気, 酸素通気のいずれの条件下でも応答電流値はほぼ一定であり, 溶存酸素の影響が無いことが確認された。

3. 要約

Alcaligenes xylosoxidans の菌体破砕液がヒスタミンに対し特異性の高い脱水素酵素活性を示すことを新たに見出したので, 本菌体破砕液をベンゾキノン練り込みカーボンペースト電極上に修飾した酵素固定化電極を作製し, 本電極のヒスタミンに対する応答特性について検討した。本電極のヒスタミンに対する応答は, 酵素固定化量0.01 U以上, BQ練り込み量5%以上で最大であった。また, ヒスタミン濃度が0-20 μMの範囲で定常電流との間に良

好な直線関係が得られた。本電極は溶存酸素の影響を受けなかった。

文 献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解. 288 (1990).
- 2) FDA : CPG7108. 24 (1995年8月3日改訂).
- 3) AOAC Official Methods of Analysis, Histamine in Seafood, Fluorometric Method: Section 977. 13, 876 (1990).
- 4) Ohashi, M., Nomura, F., Suzuki, M., Otsuka, M., Adachi, O., and Arakawa, N. : *J. Food Sci.* 59, 519 (1994).
- 5) Hibi, T. and Senda, M. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1963 (2000).
- 6) Eady, R. R. and Large, P. J. : *Biochem. J.* 106, 245 (1968).
- 7) Dulley, J. R. and Grieve, D. A. : *Anal. Biochem.* 64, 136 (1995).
- 8) Kondo, T. and Ikeda, T. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 664 (1999).
- 9) Ikeda, T., Miki, K., Fushimi, F., and Senda, M. : *Agric. Biol. Chem.* 51, 747 (1987).