

福岡工業大学 学術機関リポジトリ

フェニルボロン酸誘導体を含む脂質高分子膜を用いた電位型糖類用甘味センサに関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2021-12-13 キーワード (Ja): キーワード (En): potentiometric sweetness sensor, lipid polymer membrane, phenylboronic acid derivative, diol group 作成者: 巫, 霄 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/11478/00001697

フェニルボロン酸誘導体を含む脂質高分子膜を用いた 電位型糖類用甘味センサに関する研究

巫 霄 (電子情報工学科)

Research on a Potentiometric Sweetness Sensor for Sugars using a Lipid Polymer Membrane Containing a Phenylboronic Acid Derivative

WU Xiao (Department of Information Electronics)

Abstract

The boronic acids are significant functional groups for design of chemical sensors for sugar recognition, because they are known to form ester with diols. In this study, we report a research on responses to uncharged sweet substances using a lipid polymer membrane consisting of tetradecylammonium bromide (TDAB) as a lipid, dioctyl phenylphosphonate (DOPP) as a plasticizer and 3-nitrophenylboronic acid (3-NPBA) as a sugar recognition site. This sensor showed positive changes in membrane potentials to uncharged sugars such as monosaccharides and sugar alcohols, while no response to disaccharides such as sucrose or sucralose. Moreover, the sensor response has a positive correlation with the concentration of boric acid (0-5%). The results revealed that the phenylboronic acid derivative could be a useful functional substance in a lipid polymer membrane of a potentiometric sweetness sensor for detecting electrically neutral sugars.

Keywords : potentiometric sweetness sensor, lipid polymer membrane, phenylboronic acid derivative, diol group

1. はじめに

人が感じる味は、広義の意味と狭義の意味に分けられる。広義の意味では、味は味覚だけではなく、嗅覚、触覚、視覚、聴覚を合わせた五感、更には心身の状態、食習慣や食環境などの日常的条件も関与している。一方、狭義の意味での味は、舌の味細胞で感じる味(化学的な味)のことを言う。味細胞で受容される味は、基本五味と呼ばれる塩味、酸味、うま味、苦味、甘味から構成されている¹。基本五味は、我々の体にとって重要な意味や特徴を持っている。例えば、塩味は電解質の有無を示し、生体内の電解質のバランスを調整するのに必要なミネラル源となる。酸味は、腐敗のシグナルであり、酢酸やクエン酸などが挙げられる。うま味は生物に不可欠なアミノ酸の存在を示し、グルタミン酸ナトリウムやイノシン酸ナトリウムなどがある。苦味は毒性の警告を表すもので、カフェインやキナの樹皮に含まれるキニーネなどがある。甘味は生体内でエネルギー源となる糖の存在を示しており、数多くの種類が存在する。主要な分類だけでも、糖類(スクロース、グルコース等)や糖アルコール(キシリトール等)、スルホニルアミド(サッカリンナトリウム)等、ペプチド類(アスパルテーム等)やD-アミノ酸(D-トリプトファン等)、甘味タンパク質(タウマチン等)と、化学構造も分子サイズも様々なものが存在する。甘味受容体

は G 蛋白共役型受容体である T1R2 及び T1R3 が組み合わさったヘテロ複合受容体である。この単一の甘味受容体上に複数の部位(サイト)があるからこそ、種々の甘味物質を広く受容する事が出来る。甘味受容体の解明に伴い、甘味物質に共通する構造的特徴の究明も行われてきた^{2,3}。なかでも R. S. Shallenberger が提唱した AH-B 説が現在最も広く受け入れられているが、甘味物質特有の共通点を説明するには至っていない⁴。

食品・飲料メーカーにおける食品の味の評価は、官能パネラーが実際に味わい評価する官能試験が行われているが、パネラー各人の個人差や体調等の影響によるバラツキが生

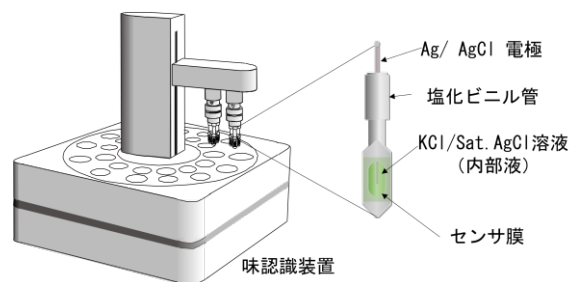


図 1 味認識装置とセンサ電極

Fig. 1. Taste sensing system and a working electrode.

じやすく、客観性や再現性に乏しいという問題がある。また、長時間にわたってパネラーにとって負担が重いといった問題もある。そこで、都甲らは、脂質高分子膜を受容部とする「広域選択性」(global selectivity)を持つ味覚センサを実現させた⁵。広域選択性とは、化学構造によらず類似した応答をするグローバルな選択性である⁶⁻⁸。現在(株)インテリジェントセンサーテクノロジーより味覚センサ(図1)は市販化されており、各センサがそれぞれ一つの味(基本五味と渋味)のみ応答するように設計されている。その基本原理は、各味を呈する物質の持つ共通の物理化学特性を利用しており、味物質と脂質高分子膜との静電的相互作用や疎水性相互作用による膜電位変化の大きさによってサンプルの味を認識する事が出来る⁶⁻¹⁰。例えば、苦味物質は疎水性が強い、塩味物質は金属カチオンや塩化物イオンを含む、酸味物質は溶液中で水素イオンが遊離する等の特徴を利用して測定する^{9,11-13}。一方、甘味物質には、非電解質である糖類や正電荷・負電荷を持つ人工甘味料など様々な種類があるので、一本のセンサにおいて異なる電荷を持つ味物質を同時に測定することは困難である。そこで先行研究において、甘味物質を食品環境下での電荷状態により3種(無荷電、正荷電、負荷電)に分類し、それぞれに対応するセンサが開発された¹⁴⁻¹⁷。現在市販されている脂質高分子膜を用いた甘味センサは糖類を測定対象としている。各種糖類に対する現行の甘味センサ(GL1)には、センサ膜の構成物質の1つとしてトリメリット酸が用いられた¹⁸。トリメリット酸は、3つのカルボキシル基を持つ。溶液中で酸性を示すカルボキシル基は、甘味センサと糖類との相互作用において重要な役割を果たすと報告された。しかし、現行の甘味センサ(GL1)はうま味と苦味には応答しないが、糖類系の甘味以外にも、塩味と酸味に反応する。これは膜の性質(疎水性・荷電状態)が塩味・酸味センサに近い領域にあり、かつそれらの味物質が電荷を持つため無電荷の糖類に比べ容易に膜電位変化を引き起こしうるためである。この選択性の低さを改善する必要がある。

一方、ボロン酸は共有結合によって糖などのジオール基

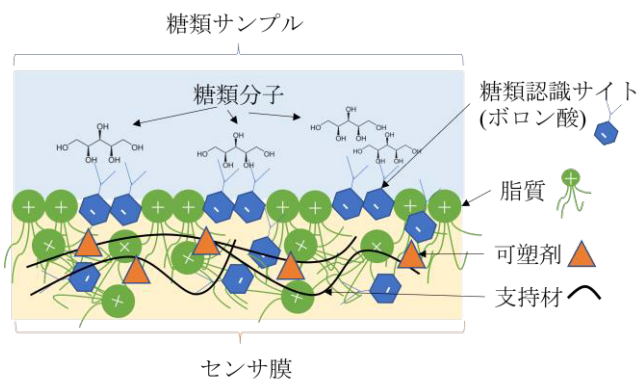


図2 センサ膜の構造概略図

Fig. 2. Schematic diagram of the structure of the sensor membrane.

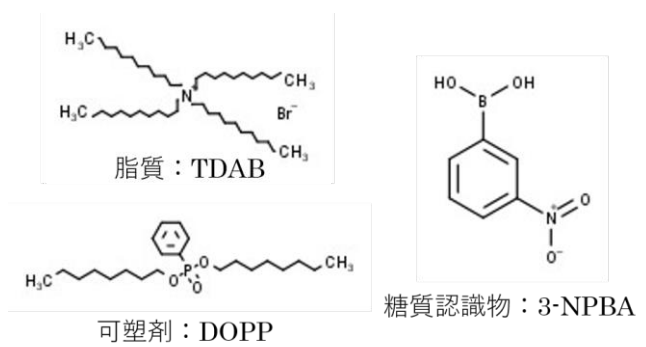


図3 膜成分の化学構造式

Fig. 3. Chemical structural of the component of the sensor membrane.

と環状エステルを形成することが知られており、糖認識化学センサを設計する上で重要な化学反応となっている^{19,20}。これまで、ボロン酸を用いた様々な糖センサの研究開発が行われている。なかでも、蛍光性色素を導入したボロン酸誘導体を用いて、蛍光スペクトルの変化として糖分子を読み出すことで、より簡便で高感度な糖分子の認識が報告された²¹。また、電気化学センサの分野において、電極表面にフェニルボロン酸を固定化して、糖の結合によって起こる電気信号の変化をフェリシアン酸イオンの電気化学応答を用いた糖センサが開発された²²。また、ボロン酸とジオール基の反応に伴う pH の変化を利用した比色センサアレイを用いた糖類の定性・定量的検出も報告された²³。しかし、これらのセンサは糖の識別に使用され、甘味センサとして甘味の情報を提供することが出来ない。

そこで、本研究では、比色センサの研究でも使われたフェニルボロン酸誘導体である 3-Nitrophenylboronic acid (3-NPBA) を脂質高分子膜に導入することで、糖質選択性を高めた甘味センサの開発を目指している。本論文では、ボロン酸を含む脂質高分子膜を用いたセンサ電極を作製し、ボロン酸の量による異なる糖質の応答特性を調べた。

2. 実験

2.1 センサ膜

脂質 tetradodecylammonium bromide (TDAB、東京化成工業)、可塑剤 dioctyl phenylphosphonate (DOPP、シグマ-アルドリッチ)、糖質認識サイト 3-Nitrophenylboronic acid (3-NPBA、東京化成工業)、支持材 polyvinyl chloride (PVC、富士フィルム和光純薬) をテトラヒドロフラン (THF) 溶媒中で混合し、ペトリシャーレに入れた後、ドラフト内で3日間乾燥させることで製膜した。膜成分の構造式は図3に示している。脂質 TDAB は両親媒性物質であり、膜の表面電荷と疎水性を調整する役割を持つ。可塑剤 DOPP は膜に柔軟性を与える同時に疎水性を調整する役割を持つ。3-NPBA はフェニルボロン酸誘導体の一種であり、糖質の認識サイトとして糖類のジオール基と結合し

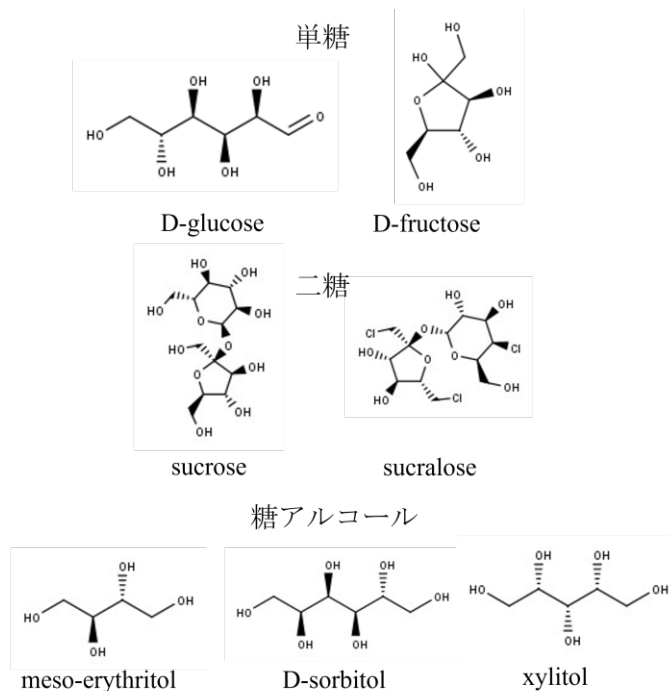


図4 単糖、二糖と糖アルコール

Fig. 4. Monosaccharides, disaccharides, and sugar alcohols.

て膜電位の変化を起こす役割を持つ。支持材 PVC は上記の膜成分を固定しセンサ膜を形成する役割を持つ。脂質 (0.05%) と可塑剤 (65%) の量は従来の甘味センサ (GL1) の場合と同じである。また、ボロン酸誘導体 3-NPBA の量による影響を明らかにするため、糖質認識サイトである 3-NPBA を 0-100 mg (0-5%) で 4 段階変化させた。測定する前に、センサ電極を基準液 (30 mM KCl) に 1 日浸漬して安定させる「プリコン測定」という手法が用いられた。

2.2 測定原理 測定には、(株) インテリジェントセンサーテクノロジー製の味認識装置 SA402B を用いた。測定手順は以下の通りである。

- (1) 基準液 (30 mM KCl) 中での膜電位 V_r を測定する。
- (2) サンプル溶液 (基準液ベース) 中での膜電位 V_s を測定する。
- (3) センサ電極を洗浄液 (30 vol% エタノール) で洗浄する。

V_s と V_r の差分 $V_s - V_r$ は応答値 (相対値) と呼ばれる。この手順を各サンプルに 5 回行い、センサ 4 本の平均値 ($n=20$) をデータとして採用した。

2.3 ボロン酸の濃度および糖類サンプルの選定 本実験では、ボロン酸の有無、およびその濃度の変化による糖類応答への影響を確認した。また、単糖 (D-グルコース、D-フルクトース)、二糖及びその合成甘味料 (スクロース、スクラロース)、糖アルコール (メソエリトリール、D-ソルビトール、キシリトール) 合計 7 種類の無荷電甘味物質を測定した。1M スクロース (閾値 0.01M) の甘味度を基準として、

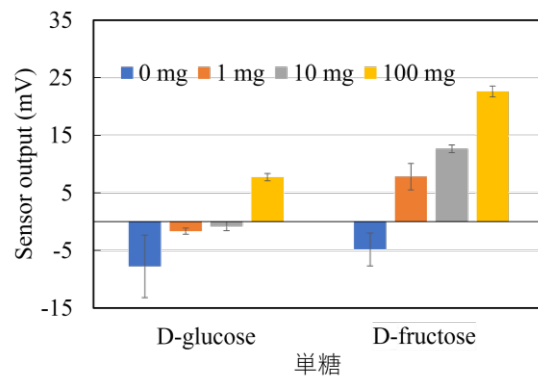


図5 単糖へのセンサ出力
3-NPBA の添加量 : 0-100mg

Fig. 5. Sensor outputs to monosaccharides. The addition amount of 3-NPBA: 0-100 mg.

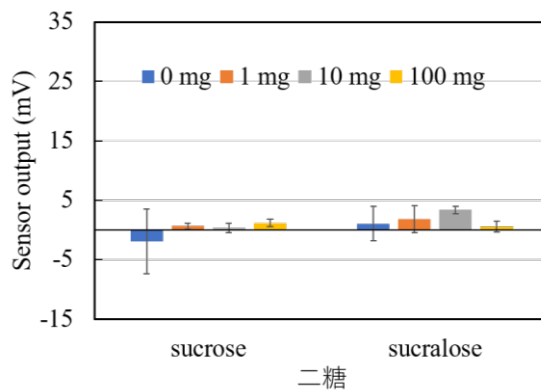


図6 二糖へのセンサ出力
3-NPBA の添加量 : 0-100mg

Fig. 6. Sensor output to disaccharides. The addition amount of 3-NPBA: 0-100 mg.

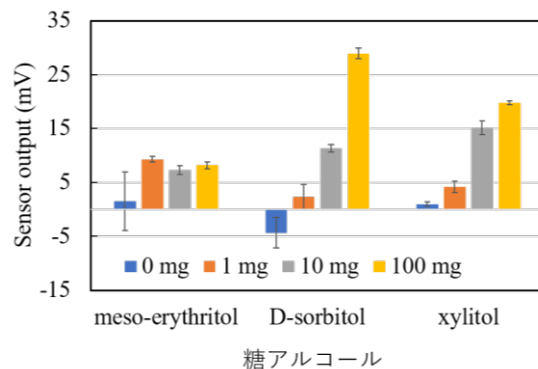


図7 糖アルコールへのセンサ出力。
3-NPBA の添加量 : 0-100mg

Fig. 7. Sensor output to sugar alcohols. The addition amount of 3-NPBA: 0-100 mg.

他の甘味物質の濃度はそれに合わせて調整した。すべての甘味サンプルは基準液ベースで作られた。各甘味物質の化学構造は図4に示している。

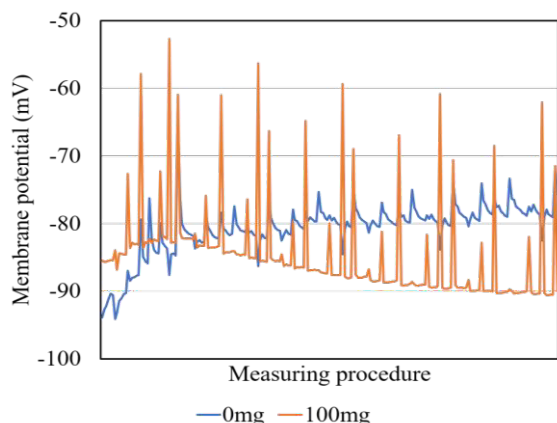


図8 測定中膜電位の変化。3-NPBAの添加量：0, 100mg

Fig. 8. The change in membrane potentials. The addition amount of 3-NPBA: 0, 100 mg.

3. 結果と考察

3.1 ボロン酸の濃度による影響 単糖の測定結果は図5に示している。単糖の場合、膜に含まれるボロン酸の量が増えると応答値も増加する傾向がみられた。D-グルコースとD-フルクトースはどちらも六炭糖であるが、D-フルクトースはケトース、D-グルコースはアルドース、2つの物質が構造異性体の関係にある。また、ボロン酸が添加されたセンサの応答値は、ボロン酸なしのセンサよりバラツキが小さくて安定性が高く見られた。これは、TDABのみの膜における表面電荷密度が低すぎたので、サンプル中の電解質に影響されやすいと考えた。ボロン酸の添加量0mgの場合、センサ応答値が負となった理由は、糖類由来の負荷電不純物と正荷電を示すセンサ膜の間に静電相互作用が起こったと考えられる。

二糖の測定結果は、図6に示している。膜に含まれるボロン酸の量が増えるとしても、二糖に対する応答値はほぼ変化せずゼロであった。一方、トリメリット酸を用いた従来の甘味センサ (GL1) のスクロースに対する応答値が約60mVであった¹⁸。今後、ボロン酸の種類(構造)を変えることで、二糖類への反応が低いという問題を解決していく。

糖アルコールの測定結果は、図7に示している。ボロン酸が添加されたセンサの応答値はボロン酸なしのセンサ応答値より明らかに高い。具体的に、メソエリトリールの場合、センサ応答値はボロン酸の添加量にほぼ影響されなかった。D-ソルビトールとキシリトールの場合、センサ応答値はボロン酸の添加量に比例することが分かった。ボロン酸10mg以上添加された場合、糖アルコールに対する応答値の大きさは、糖アルコールが持つジオール基の数に比例することが分かった。

3.2 膜電位の変化 膜電位(絶対値)の変化は図8に示している。ボロン酸なしの場合(青色)、測定回数に従って安定液中の膜電位(ベースライン)は-92mVから-80mVまで増加することを示した。一方、ボロン酸100mgが添加

された場合(オレンジ)、安定液中の膜電位(ベースライン)は-83mVと-90mVの間に変動したが、-90mVまで収束したことが見られた。ボロン酸は膜中で負の荷電を示しているため、安定時の電位はボロン酸なしの時より低いと示されている。

上記の結果によると、ボロン酸3-NPBAの濃度は単糖及び一部の糖アルコールに対する応答特性に大きな影響を与えることが分かった。また、トリメリット酸を修飾物として用いた従来の甘味センサ (GL1) の応答値が全て負の値となっていた。この点に対して、本研究においては、フェニルボロン酸誘導体3-NPBAを糖質認識サイトとして用いた場合、応答値が全て正の値となっている。そこで、膜電位の発生機構においては、フェニルボロン酸で作られた甘味センサの方は従来の甘味センサと異なると考えられる。先行研究により、膜電位の変化は膜表面電荷密度大きくに依存しているので、本研究では、フェニルボロン酸は糖類のジオール基と結合し、フェニルボロン酸の酸解離定数が変わることで、膜の表面電荷密度が変化し膜電位の変化を引き起こすと考えた^{10,13,24}。

4. まとめ

本研究では、「糖質インターフェース」と呼ばれるボロン酸を脂質高分子膜に添加することで、糖質への応答特性を調べた。その結果、脂質TDAB、可塑剤DOPP、ボロン酸3-NPBAの組成でセンサ膜を作製したところ、単糖と糖アルコールに対して高い正応答が得られたが、二糖に対する応答がほぼ得られなかった。また、ボロン酸の濃度の増加につれて単糖であるD-グルコース、D-フルクトースおよび糖アルコールであるD-ソルビトール、キシリトールに対する感度が大きくなったことが分かった。さらに、糖アルコールに対する応答値の大きさは、糖アルコールが持つジオール基の数に比例することが分かった。

この度、フェニルボロン酸誘導体として3-NPBAを採用した。このボロン酸は非荷電甘味物質のジオール基で結合を生じる事により、膜表面電荷密度の変化が起こり、非荷電甘味物質の電位測定を可能にした。ただ、未解決事項として、二糖類に対してほぼ応答しないこと、全体的な応答値が低いことが残されている。今後の課題としては、異なる種類のフェニルボロン酸誘導体を使用した場合において、糖質の種類に対する応答特性を調べることが挙げられる。また、膜に含むフェニルボロン酸誘導体の種類及び量を調整することにより、センサ感度の向上やセンサ出力とヒトの甘味官能値との相関性が求められる。

5. 謝辞

本研究は、本学総合研究機構の令和2年度研究費(研究スタートアップ支援制度)により実施したものである。ここに謝意を表す。さらに、実験にご協力頂いた田島健太郎(福岡工業大学工学部電子情報工学科4年生)君に感謝を表す。

文 献

1. Kovacic, P. & Somanathan, R. Mechanism of taste: electrochemistry, receptors and signal transduction. *Journal of Electrostatics* vol. 70 7–14 (2012).
2. Yoshida, R. *et al.* Modulation of sweet responses of taste receptor cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* **24**, 226–231 (2013).
3. Temussi, P. The sweet taste receptor: a single receptor with multiple sites and modes of interaction. *Adv. Food Nutr. Res.* **53**, 199–239 (2007).
4. SHALLENBERGER, R. S. & ACREE, T. E. Molecular Theory of Sweet Taste. *Nature* **216**, 480–482 (1967).
5. Toko, K. A taste sensor. *Meas. Sci. Technol.* **9**, 1919–1936 (1998).
6. Wu, X., Tahara, Y., Yatabe, R. & Toko, K. Taste sensor: Electronic tongue with lipid membranes. *Anal. Sci.* **36**, 147–159 (2020).
7. Kobayashi, Y. *et al.* Advanced taste sensors based on artificial lipids with global selectivity to basic taste qualities and high correlation to sensory scores. *Sensors* **10**, 3411–3443 (2010).
8. Tahara, Y. & Toko, K. Electronic tongues-a review. *IEEE Sens. J.* **13**, 3001–3011 (2013).
9. Yatabe, R. *et al.* Analysis of a lipid/polymer membrane for bitterness sensing with a preconditioning process. *Sensors* **15**, 22439–22450 (2015).
10. Toko, K., Hara, D., Tahara, Y., Yasuura, M. & Ikezaki, H. Relationship between the amount of bitter substances adsorbed onto lipid/polymer membrane and the electric response of taste sensors. *Sensors (Basel)*. **14**, 16274–16286 (2014).
11. Wu, X., Shiino, T., Tahara, Y., Ikezaki, H. & Toko, K. Quantification of pharmaceutical bitterness using a membrane electrode based on a hydrophobic tetrakis [3,5-bis (Trifluoromethyl) phenyl] borate. *Chemosensors* **9**, 1–13 (2021).
12. Akitomi, H. *et al.* Quantification of tastes of amino acids using taste sensors. *Sensors Actuators B Chem.* **179**, 276–281 (2013).
13. Wu, X. *et al.* Improved durability and sensitivity of bitterness-sensing membrane for medicines. *Sensors* **17**, 2541 (2017).
14. Yasuura, M., Shen, Q., Tahara, Y., Yatabe, R. & Toko, K. Development and investigation of a sweetness sensor for sugars - Effect of lipids. *Sensors Mater.* **27**, 351–358 (2015).
15. Yasuura, M., Tahara, Y., Ikezaki, H. & Toko, K. Development of a Sweetness Sensor for Aspartame, a Positively Charged High-Potency Sweetener. *Sensors* **14**, 7359–7373 (2014).
16. Yasuura, M., Okazaki, H., Tahara, Y., Ikezaki, H. & Toko, K. Development of sweetness sensor with selectivity to negatively charged high-potency sweeteners. *Sensors Actuators, B Chem.* **201**, 329–335 (2014).
17. Tahara, Y. *et al.* Development of sweetness sensor for high-potency sweeteners using lipid polymer membrane. in *2017 ISOCs/IEEE International Symposium on Olfaction and Electronic Nose (ISOEN)* 265–266 (2017). doi:10.1109/ISOEN.2017.7968932.
18. Toyota, K. *et al.* Sweetness sensor with lipid/polymer membranes: sweet-responsive substances. *Sensors Mater.* **23**, 465–474 (2011).
19. Brooks, W. L. A., Deng, C. C. & Sumerlin, B. S. Structure-Reactivity Relationships in Boronic Acid-Diol Complexation. *ACS Omega* **3**, 17863–17870 (2018).
20. 大瀬戸文夫, 中嶋和昭 & 新海征治. ボロン酸を含む「糖質インターフェース」の分子設計. *油化学* **43**, 845–856 (1994).
21. Worsley, G. J. *et al.* Measurement of glucose in blood with a phenylboronic acid optical sensor. *J. Diabetes Sci. Technol.* **2**, 213–220 (2008).
22. Takahashi, S. & Anzai, J. Phenylboronic acid monolayer-modified electrodes sensitive to sugars. *Langmuir* **21**, 5102–5107 (2005).
23. Musto, C. J. & Suslick, K. S. Differential sensing of sugars by colorimetric arrays. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 758–766 (2010).
24. Harada, Y., Tahara, Y. & Toko, K. Study of the relationship between taste sensor response and the amount of epigallocatechin gallate adsorbed onto a lipid-polymer membrane. *Sensors* **15**, 6241–6249 (2015).