

Megazyme

β-グルカン分析法

(β1,3:-1,4 混合型 / マクレリー法)

MIXED-LINKAGE

BETA-GLUCAN

ASSAY PROCEDURE

(McCLEARY METHOD)

K-BGLU 08/18

K-BGLU

(用手法 100 回分)

AACC Method 32-23.01

AOAC Method 995.16

EBC Methods 3.10.1, 4.16.1 and 8.13.1

ICC Standard Method No. 166

Codex Type II Method

日本バイオコン株式会社

はじめに - INTRODUCTION -

醸造、食品および原材料産業では長年に渡り大麦、麦芽、麦汁およびビール中の混合結合型β-グルカンを正確で簡単かつ信頼できる方法を開発する必要性を認識されてきました。メガザイム法は、これら全ての要件を満たしています。測定は簡単で、1日に50～100サンプルの分析が可能です。この方法は、オート麦やオート麦繊維製品中のβ-グルカンの測定にも適しています(最新法、4ページ参照)。

原理 - PRINCIPLE -

サンプルを pH 6.5 の緩衝液中に懸濁して水和後、精製リケナーゼで反応させ濾過します。次に濾液を分取し、精製β-グルコシダーゼで完全に加水分解します。生成したD-グルコースをグルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ試薬で定量します(スキーム1、12ページ)。

正確さ - ACCURACY -

弊社研究室におけるオート麦および大麦試料による分析では、標準誤差3%未満が容易に達成できます。

評価 - EVALUATION -

最新のβ-グルカン分析法は、AOACインターナショナル(995.16法)、AACC(32-23.01法)およびICC(第166法)により承認を得ています。この方法のオリジナルバージョンも、王立オーストラリア化学研究所の分析委員会およびヨーロッパ醸造条約により承認されました。

特異性 - SPECIFICITY -

この測定法はβ-1,3;-1,4-D-グルカンに対して特異性が高いです。

キット - KITS -

100検体分析用キットを提供しております。キットには以下のものが含まれます。

- ボトル1:** リケナーゼ[特異的、エンド-β-(1-3)(1-4)-D-グルカン4グルカノヒドロラーゼ]懸濁液(1mL)。4°Cで3年以上安定です。
- ボトル2:** β-グルコシダーゼ(1mL)懸濁液。4°Cで3年以上安定です。
- ボトル3:** GOPOD試薬緩衝液。緩衝液(50mL, pH 7.4)、*p*-ヒドロキシ安息香酸およびアジ化ナトリウム(0.095% w/v)含有。4°Cで4年以上安定です。
- ボトル4:** GOPOD試薬酵素。グルコースオキシダーゼ、パーオキシダーゼと4-アミノアンチピリン。凍結乾燥粉末。-10°C以下で5年以上安定です。
- ボトル5:** D-グルコース標準液(5mL, 1.0mg/mL)。0.2% (w/v)安息香酸溶液。室温で5年以上安定です。
- ボトル6:** 標準化済大麦粉末標準品。β-グルカン含量はバイアルラベルに記載。室温で5年以上安定です。
- ボトル7:** 標準化済オート麦粉末標準品。β-グルカン含量はバイアルラベルに記載。室温で5年以上安定です。

試薬溶液／懸濁液の調製

- PREPARATION OF REAGENT SOLUTIONS/SUSPENSIONS -

1. ボトル1の内容物(リケナーゼ)を 20mM リン酸緩衝液(pH 6.5)で 20.0mL に希釈します。適量ずつポリプロピレンチューブに分注し冷凍保存します。
-10℃以下で2年以上安定です。使用中は冷蔵又は氷冷にて保管願います。

NOTE: リケナーゼがボトル2のβ-グルコシダーゼで汚染されていないことが不可欠です。混入することがないように、取扱いに留意して下さい。

2. ボトル2の内容物(β-グルコシダーゼ)を 50mM 酢酸緩衝液(pH 4.0) 20.0mL に溶解します。適量ずつポリプロピレンチューブに分注し冷凍保存します。
-10℃以下で2年以上安定です。使用中は冷蔵又は氷冷にて保管願います。
3. ボトル3(GOPOD試薬緩衝液)の内容物を蒸留水 1L に溶解します(これが溶液3です)すぐに使用します。

NOTE:

1. 緩衝液濃度が高いため、保存中に塩の結晶が生じることがあります。
この緩衝液を蒸留水で 1L に希釈する際には、結晶を完全に溶解して下さい。
2. この緩衝液には、0.095% (w/v) のアジ化ナトリウムが含まれています。
これは有毒化学物質ですので、留意してお取り扱い下さい。

4. ボトル4の内容物を 20mL の溶液3に溶解し、これを残りの溶液3のボトルに全量に移します。このボトルをアルミニウム箔で覆い、試薬を遮光保管します。
これがグルコース測定試薬(GOPOD試薬)です。
2~5℃で約3ヶ月、-10℃以下で12ヶ月以上安定です。
凍結保存する場合は、1回の分析で使い切れる適量ずつ小分けにして保存して下さい。
決して凍結／融解を繰り返さない下さい。
試薬を新しく調製した際に、試薬が淡く黄色~ピンク色を呈していることがあります。着色は4℃で2~3ヶ月保存している間にさらに強くなります。この試薬の吸光度は、蒸留水に対し 0.05 未満でなければなりません。それを上回る場合は新しい試薬をご用意下さい。
- 5,6,7. ボトル5、6、7は付属のものをそのまま使用して下さい。室温で5年以上安定です。

緩衝液(供給外のもの)

1. リン酸ナトリウム緩衝液(20mM、pH 6.5)
オルトリン酸二水素ナトリウム二水和物($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 3.12g を蒸留水 900mL に溶解し、100mM 水酸化ナトリウム(4g/L)を用いて pH 6.5 に調整し(約 50mL 必要)、1 L に定容します。4℃で保管願います。
2. 酢酸ナトリウム緩衝液(50mM、pH 4.0)
氷酢酸 2.9mL を蒸留水 900mL に加え、1M 水酸化ナトリウムを加えて pH 4.0 に調整し、1 L に定容します。4℃で保管願います。
3. 酢酸ナトリウム緩衝液(200mM、pH 4.0)
氷酢酸 11.6mL を蒸留水 900mL に加え、1M 水酸化ナトリウムを加えて pH 4.0 に調整し、1 L に定容します。4℃で保管願います。

機器(推奨):

1. ポリエチレン製試験管／キャップ付(35mL 容)
2. ガラス試験管(12mL 容)
3. マイクロピペッター、例 Gilson Pipetman®(20 μ L、100 μ L)
4. ポジティブディスプレイメント方式ピペッター、例 Eppendorf Multipette®
- 5.0mL Combitip® (緩衝液、 β -グルコシダーゼ溶液各 0.1mL 分注用)
5. 定量ディスプレインサー
- 0~5.0mL (リン酸緩衝液分注用)
- 3.0mL (グルコースオキシダーゼ／パーオキシダーゼ試薬分注用)
- 0~25.0mL (蒸留水分注用)
6. 実験室用オーブン
7. 分析用上皿天秤
8. 510nm に設定した分光光度計(8ページ、有用なヒント1を参照)
9. ボルテックスミキサー
10. 50°C設定の恒温水槽(旧バージョンでは40°C、8ページ参照)
11. 実験室用タイマー(ストップウォッチ)
12. ワットマン No.41 濾紙
13. 遠心分離機(麦芽、麦汁、ビールの調製用)
14. 0.5mm 篩付き実験室ミル (例 Frisch pulverisette 14®)
15. 沸騰水浴

標準品ならびに諸注意 - CONTROLS AND PRECAUTIONS -

1. 分析のセットごとに試薬ブランクと D-グルコース標準(50 μ g と 100 μ g、片側または両方、2連)を含めて下さい。
試薬ブランクは、蒸留水 0.1mL+酢酸緩衝液 0.1mL+GOPOD試薬 3.0mL
グルコース標準液は、D-グルコース標準液(50 μ g または 100 μ g /0.1mL)0.1mL+酢酸緩衝液 0.1mL+GOPOD試薬 3.0mL からなります。
2. 各分析セットには、大麦粉末標準品を少なくとも1本含めて下さい。
3. GOPOD試薬の新しいバッチごとに、D-グルコース標準液 100 μ g による最大発色時間を確認する必要があります。これは通常約15分です。
4. リケナーゼ調製品(ボトル1)が β -グルコシダーゼ調製品(ボトル2)に汚染されていないことが必須です。混入することがないように留意してお取り扱い下さい(逆の場合は問題ではありません)。

(A) オート麦および大麦の、粉末または繊維試料分析方法 - 最新法 (AOAC 法 995.16、AACC 法 32-23、ICC 標準法 No.168)

この手順は各種乾燥試料、特に高濃度の β -グルカンを含有する試料(例えばオート麦加工製品)の分析に理想的です。

分析手順

1. 遠心ミル等を使用し、大麦、オート麦または繊維試料(約 50g)を粉砕して 0.5mm の篩を通過させます。
2. 粉末試料(80~120mg)をガラス製遠心管(16×120mm、17mL 容)に精秤します。遠心管を軽く叩いて試料を遠心管の底に落とします。
3. 試料を 50% v/v エタノール水溶液 0.2mL で濡らせて分散させます。次にリン酸緩衝液(20mM, pH6.5) 4.0mL を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌します。
4. 攪拌後、遠心管を直ちに沸騰水浴中に入れ、60秒間煮沸します。ボルテックスミキサーで激しく攪拌し、さらに2分間煮沸し、再度攪拌します。
5. 遠心管を50℃の恒温水槽に移し、5分間恒温化します。
6. リケナーゼ(10 U) 0.2mL を加え、攪拌します。遠心管をパラフィンフィルムで密封し50℃で1時間反応させます。また反応中はボルテックスミキサーで時折り(3~4回程度)激しく攪拌します。メガザイム社 Multi-stir 恒温水槽(D-IBMKIII)など連続攪拌機能付の恒温水槽を推奨します。
7. 酢酸緩衝液(200mM, pH 4.0) 5.0mL を加え、ボルテックスミキサーで遠心管を激しく攪拌します。
8. 遠心管を室温で5分放置後、遠心します(1,000×g、10分)。マイクロピペッターを使用して、3本の試験管(12mL 容)の底に 0.1mL ずつ、慎重かつ正確に分注します。
9. 50mM 酢酸緩衝液(pH 4.0)に溶解した β -グルコシダーゼ(0.2 U) 0.1mL を試験管のうち2本に加えます(サンプル)。3本目(反応ブランク)には 50mM 酢酸緩衝液(pH 4.0) 0.1mL を加えます。試験管を50℃で10分間反応させます。
10. 全ての試験管にGOPOD試薬(3.0mL)を加え、50℃でさらに20分間反応させます。
11. 恒温水槽から試験管を取り出し、1時間以内に 510nm の吸光度を試薬ブランクに対して測定します。

NOTE: 試験管、すなわち分析試料 0.1mL 中の D-グルコース量は 4~100 μ g の範囲である必要があります。そのために β -グルコシダーゼ処理前のサンプル溶液の糖濃度が 0.04~1.0g/L になるよう、200mM 酢酸緩衝液(pH 4.0)で希釈しておきます。これは元試料中の β -グルカン含量 0.35~8.5%に相当します。例えばサンプルに 20%の β -グルカンが含まれている場合は、 β -グルコシダーゼ反応用に分注するサンプルを 200mM 酢酸緩衝液(pH 4.0)で3倍に希釈しておきます。

また β -グルカン含量が高いサンプルの場合(例 Oatwell[®]; β -グルカン 50%以上)では、リケナーゼ処理後、サンプル量を 50mg に減らし、容量を 200mM 酢酸緩衝液(pH 4.0)で 100mL に定容する必要があります。

(B) 調理済、焼上げ済または押出成形された穀物製品の分析方法 - 最新法 (AOAC 法 995.16, AACC 法 32-23, ICC 標準法 No.168).

調理済、焼上げ済または押出成形された穀物製品中の β -グルカンを測定する場合、試料はエタノールで前処理し、遊離糖を除くとともに油脂量を低減する必要があります。

分析手順

1. 遠心ミル(Fritsch pulverisette14®または同等品)を使用し、食品試料(約 50g)を粉碎して0.5mm の篩を通過させます。
2. 粉末試料(約 200mg)をガラス製遠心管(16×120mm、17mL 容)に精秤します。遠心管を軽く叩いて試料を遠心管の底に落とします。
3. 試料に 50%v/v エタノール 5.0mL を加え、沸騰水浴中で5分間煮沸します。ボルテックスミキサーで攪拌し、さらに 50%v/v エタノール 5.0mL を加えます。
4. 遠心管を 1,800×g (約 3,000rpm)で10分遠心します。上清は廃棄します。
5. 50%v/v エタノール 5.0mL を加えて沈殿を再懸濁し、ボルテックスミキサーで攪拌します。さらに 50%v/v エタノール 5.0mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、遠心分離後上清を廃棄します(上記工程4と同様)。
6. ペレットをリン酸緩衝液(20mM, pH 6.5) 4.0mL に懸濁し、50°Cで5分間、予備加温します。
7. リケナーゼ(10 U) 0.2mL を加え、攪拌します。遠心管をパラフィンフィルムで密封し50°Cで1時間反応させます。また反応中はボルテックスミキサーで時折り(3~4回程度)激しく攪拌します。メガザイム社 Multi-stir 恒温水槽(D-IBMKIII)など連続攪拌機能付の恒温水槽を推奨します。
8. 酢酸緩衝液(200mM, pH 4.0) 2.0mL を加え、ボルテックスミキサーで遠心管を激しく攪拌します。
9. 実施例(A)の工程8より進めます。

(C) ミルクシェーキ、ヨーグルトその他の液体製品の分析方法 (アルコール沈殿)

1. ガラス製遠心管(16×120mm、17mL 容)を精秤します。
2. 試料 3mL を遠心管に入れ、沸騰水浴中で5分間煮沸します。放置して室温に戻します。
3. 95%エタノール 3.0mL を加えボルテックスミキサーで攪拌し、さらに 95%エタノール 5.0mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌します。
4. 遠心管を 1,800×g (約 3,000rpm)で10分遠心します。上清は廃棄します。
5. 50%v/v エタノール 8.0mL を加えて沈殿を再懸濁し、ボルテックスミキサーで攪拌します。さらに 50%v/v エタノール 5.0mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、遠心分離後上清を廃棄します(上記工程4と同様)。
6. ペレットをリン酸緩衝液(20mM, pH 6.5)に懸濁し、精秤済の遠心管を用いて重量を元に容量を 4.0mL に調整します。50°Cで5分間、予備加温します。
7. 実施例(A)の工程6より進めます。

NOTE: 試料の分析吸光度がグルコース標準の吸光度を超える場合、定量域で測定するため試料を 200mM 酢酸緩衝液(pH 4.0)で希釈した後に β -グルコシダーゼ処理します。

算出法（固形サンプル）

$$\begin{aligned}\beta\text{-グルカン}(\% \text{ w/w}) &= \Delta A \times F \times \frac{FV}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \times D \\ (\text{有姿}) & \\ &= \Delta A \times \frac{F}{W} \times FV \times D \times 0.9\end{aligned}$$

ここで:

- ΔA = 試薬ブランクに対する β -グルコシダーゼ処理サンプル吸光度
- F = $\frac{100(\text{グルコース } \mu\text{g})}{\text{吸光度}(\text{グルコース } 100\mu\text{g})}$ (吸光度を μg に換算するファクター)
- FV = 最終液量
(例えば、実施例(A)でオート麦または大麦粉末を処理した場合; 9.4mL
実施例(B)調理済、焼上げ済または押出成形穀物製品の場合; 6.4mL
4ページ Note 記載の β -グルカンが 50%を越える試料の場合; 100mL)
- 0.1 = サンプル分析液量
- 1/1000 = $\mu\text{g} \rightarrow \text{mg}$ 換算
- 100/W = サンプル重量当たりの β -グルカン含量表示のための換算ファクター
- W = 分析に使用したサンプルの「有姿」秤量値 (mg)
- 162/180 = 遊離 D-グルコースの分析値を β -グルカン中の存在形式であるアンヒドログルコースに換算するためのファクター
- D = β -グルコシダーゼ反応前のさらなる希釈 (必要な場合)

乾物当り β グルカン(% w/w) 濃度は以下の通り

$$\text{有姿 } \beta\text{-グルカン}(\% \text{ w/w}) = \frac{100}{100 - \text{水分}(\% \text{ w/w})}$$

算出法（液状サンプル； g/100mL）

$$\begin{aligned}\beta\text{-グルカン(g/100mL)} \\ &= \Delta A \times F \times \frac{9.2}{3.0} \times 1000 \times \frac{1}{1000} \times \frac{1}{1000} \times \frac{162}{180} \times D \\ &= \Delta A \times F \times D \times 0.00276\end{aligned}$$

ここで：

- ΔA = 試薬ブランクに対する β -グルコシダーゼ処理サンプル吸光度
- F = $\frac{100(\text{グルコース } \mu\text{g})}{\text{吸光度(グルコース } 100\mu\text{g})}$ （吸光度を μg に換算するファクター）
- 9.2/3.0 = 容量補正ファクター（試料 3.0mL がエタノール処理され、9.2mL になる）
（即ち、4.0mL+リケナーゼ 0.2mL+酢酸緩衝液 5.0mL）
- 1000 = 容量調整ファクター（分析に供した 0.1mL を 100mL 当りに換算）
- 1/1000 = $\mu\text{g} \rightarrow \text{mg}$ 、 $\text{mg} \rightarrow \text{g}$ 換算
- 162/180 = 遊離 D-グルコースの分析値を β -グルカン中の存在形式であるアンヒドログルコースに換算するためのファクター
- D = β -グルコシダーゼ反応前のさらなる希釈（必要な場合）

NOTE： 上記は、メガザイムウェブサイト(www.megazyme.com)の各製品ページからダウンロード可能な Megazyme *Mega-Calc*™ を使用することで簡単に計算できます。

(D) 欧州醸造コンベンションにより承認された大麦の測定方法 (EBC 法 3.10.1)

分析手順

1. 遠心ミル等を使用し、大麦試料を粉砕して 0.5mm の篩を通過させます。
(均一かつ微細な粉砕が重要です)
2. 水分既知*の粉末大麦試料(約 500mg)をポリプロピレン試験管(ページ3、機器1)に精秤します (* 9ページ、分析結果例の脚注参照)。
3. 各試験管に 50%v/v エタノール 1.0mL を加え、試料を分散させます。
4. リン酸緩衝液(20mM, pH 6.5) 5.0mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌します。
5. 試験管を沸騰水浴に入れ、約2分間煮沸します(有用なヒント2, 3参照)。試験管を取り出し、ボルテックスミキサーで激しく攪拌します。沸騰水浴に戻し、さらに3分間煮沸します(ゲル塊を生じないように2分後に取り出し、攪拌します)。
6. 40°Cまで冷却し、リケナーゼ(10 U) 0.2mL を加え、攪拌します。
試験管に蓋をして40°Cで1時間反応させます。
7. 蒸留水を添加して試験管の液量を 30.0mL に調整します(8ページ、有用なヒント1参照)。
8. 試験管の中身を十分に攪拌し、一部をワットマン濾紙 No.41 で濾過するか、
1,000×g で10分遠心します。
9. 上清を 0.1mL ずつ、3本の試験管の底部に注意深く正確に分注します。
10. 3本のうち1本に酢酸緩衝液(50mM, pH 4.0)を入れ(反応ブランク)、残り2本に酢酸緩衝液(50mM, pH 4.0)に溶解した β -グルコシダーゼ(0.2 U) 0.1mL を添加します(サンプル)。
40°Cで15分間反応させます。
11. それぞれの試験管にGOPOD試薬 3.0mL を添加し、40°Cで20分間反応させます。
(3ページ、「標準品ならびに諸注意」3を参照)
12. 夫々のサンプル(A_{glc})並びに試薬ブランク(A_{Bl})について 510nm の吸光度を測定します。

NOTE: キットに含まれているGOPOD試薬の場合、呈色は室温で少なくとも2時間は安定です。

有用なヒント

1. 試料をリケナーゼ処理した後、ディスペンサーで蒸留水 24.0mL を分注して反応液量*を 30.0mL に調整することをお勧めします。

* 反応液の液量は 6.0mL ですが、加熱工程により約 0.2mL が失われると推定されます。

2. 分析手順の工程5において、5分間の煮沸後に溶液が非常に粘調になった場合は、蒸留水 5.0mL を加え、ボルテックスミキサーで十分に攪拌します。リケナーゼ反応後、蒸留水 19.0mL を加えて容量を 30.0mL に調整します。

NOTE: 溶液が粘調なままでは、リケナーゼの作用に支障が生じます。
蒸留水を 5.0mL 加えることでこの問題が軽減します。

3. 分析手順の工程5でポリプロピレンではなくガラス試験管を使用すると時間が短縮できます。最初の煮沸時間を45秒とし、ボルテックスミキサーで攪拌後、沸騰水浴中でさらに45秒間煮沸します(すなわち、煮沸時間は合計1分半となります)。

分析結果の例

試料	サンプル重量 (mg)		吸光度 (510nm)			β-グルカン
	生体重	乾燥重 (補正值)	A _{BI}	A _{glc}	ΔA	%(w/w)
例 Clipper	495	420	0.012	0.460	0.448	2.86
				0.455	0.443	2.83

$$\text{乾燥重量} = \text{生体重} \times \frac{100 - \text{水分}\%}{100}$$

* 一般に、水分は近赤外分光(NIR)法により測定できます。
また粉末試料 0.5g を80℃、20時間乾燥させる重量減少法による測定も可能です。
穀物粉末標品の水分含有量は概ね10～14%の範囲です。

(E) 欧州醸造コンベンションで承認された麦芽、穀物、ビール、麦芽の検定方法

麦芽 (EBC 法 4.16.1)

1. 麦芽粉末(0.5mm の篩を通過するよう製粉済)または麦汁製造工程より採取した凍結乾燥済み大麦試料 1.0g に、50%v/v エタノール 5.0mL を加えます。
2. 沸騰水浴中で5分間煮沸します。内容物をボルテックスミキサーで混合し、さらに 50%v/v エタノール 5.0mL を加えて混合します。
3. 1,000×g で10分間遠心し、上清を廃棄します。
4. ペレットを 50%v/v エタノール 10.0mL に再懸濁し、遠心して上清を捨てます(上記の工程3と同様)。
5. ペレットをリン酸緩衝液(20mM, pH 6.5) 5.0mL に懸濁します。
6. 大麦試料の β-グルカン測定法の工程5から分析を続けます。

使用済み穀物

使用済みの穀物は必要な場合、約75℃の温水で洗浄します。試料を凍結乾燥後、粉碎し0.5mm の篩を通します。次に麦芽試料の β-グルカン含有量の手順に従い分析し、計算します。

ビールまたは麦汁 (EBC 法 8.13.1)

1. ビール試料の一定量を約80℃に加熱して脱気し、冷却します。
2. 麦汁または脱気したビール 5.0mL を秤量済の遠心管(12mL 容)に入れ、硫酸アンモニウム結晶の微粉碎品 2.5g を加えます。
3. 遠心管をパラフィンフィルムで密封し、泡立ちを防ぐため注意深く反転させて硫酸アンモニウムを溶解します。
4. 4℃で約20時間放置します。
5. 卓上型遠心機で 1,000×g で10分間遠心します。

6. 上清を廃棄します。
7. ペレットに 50%v/v エタノール 1.0mL を加え、十分にボルテックスして再懸濁します。さらに 50%v/v エタノール 10.0mL を添加し、反転させて良く混合します。
8. 1,000×g で5分間遠心し、上清を廃棄します。
9. 上記の工程7と8の、ペレットを再懸濁してエタノール洗浄する手順を繰り返します。
10. 上清を廃棄します。
11. ペレットをリン酸緩衝液 (20mM、pH 6.5) に再懸濁します。
液量は麦汁の場合は 4.8mL (重量)、ビールの場合は 1.8mL (重量) とします。
12. リケナーゼ (10 U) 0.2mL を加え、40℃ で5分間反応させます。
1,000×g で10分間遠心し、大麦試料の β-グルカン測定法の工程9から分析を続けます。

NOTE: β-グルカン含量が低い麦汁サンプルの場合は、サンプル液量を増やして (最大 0.5mL) β-グルコシダーゼ処理します。ブランクも同じ液量で操作して下さい。D-グルコース標準液も蒸留水で液量を調整する必要があります。また計算式もこれに応じて変更します。

算出法

大麦、麦芽および使用済み穀物の場合

$$\begin{aligned} \beta\text{-グルカン}(\% \text{ w/w}) &= \Delta A \times F \times 300 \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \\ &= \Delta A \times \frac{F}{W} \times 27 \end{aligned}$$

麦汁の場合

$$\begin{aligned} \beta\text{-グルカン}(\text{mg/L}) &= \Delta A \times F \times 10,000 \times \frac{1}{1000} \times \frac{5}{5} \times \frac{162}{180} \\ &= \Delta A \times F \times 9 \end{aligned}$$

ビールの場合

$$\begin{aligned} \beta\text{-グルカン}(\text{mg/L}) &= \Delta A \times F \times 10,000 \times \frac{1}{1000} \times \frac{2}{5} \times \frac{162}{180} \\ &= \Delta A \times F \times 3.6 \end{aligned}$$

ここで:

ΔA	= 試薬ブランクに対する β -グルコシダーゼ処理サンプル吸光度
F	= $\frac{100(\text{グルコース } \mu\text{g})}{\text{吸光度(グルコース } 100\mu\text{g})}$ (吸光度を μg に換算するファクター)
300	= 容量補正ファクター (すなわち試料 30.0mL 中の 0.1mL を分析)
10,000	= 容量換算ファクター (分析に供した 0.1mL を 1L 当りに換算)
1/1000	= $\mu\text{g} \rightarrow \text{mg}$ 換算
100/W	= サンプル重量当たりの β -グルカン含量表示のための換算ファクター
W	= 分析に供した試料の乾燥重量 (9ページの分析例を参照)
5/5	= 容量補正ファクター。麦汁試料の場合 5.0mL を処理し、5.0mL に調整する (すなわち、4.8mL+リケナーゼ 0.2mL)
2/5	= 容量補正ファクター。ビール試料の場合 5.0mL を処理し、2.0mL に調整する (すなわち、1.8mL+リケナーゼ 0.2mL)
162/180	= 遊離 D-グルコースの分析値を β -グルカン中の存在形式であるアンヒドログルコースに換算するためのファクター

NOTE: 上記は、メガザイムウェブサイト(www.megazyme.com)の各製品ページからダウンロード可能な Megazyme *Mega-Calc*TMを使用することで簡単に計算できます。

方法の比較

メガザイムの新規 β -グルカン分析法を、研究室間の相互評価が得られている AACC 法 32-22(元のメガザイム法の AACC 修正)1と比較した結果、両法は非常に類似した結果を示しました。

メガザイムの「新規法」による結果を表1に示します。この新規法では1人の分析者が1日当たり100を超えるサンプルが分析可能です。これは、AACC 法 32-22 の約 20 サンプルと比較すると歴然です。

表1. 新規酵素法によるオート麦 β -グルカン測定の性能評価^a

サンプル	乾物 平均%	S_r	S_R	RSD _r %	RSD _R %	r^b	R^c
オート麦粉末	2.73	0.083	0.241	3.1	8.8	0.232	0.675
オート麦ふすま	6.39	0.296	0.456	4.6	7.1	0.829	1.277
押しオート麦	4.27	0.283	0.315	6.6	7.4	0.792	0.882
オート麦ふすま(朝食用)	3.93	0.484	0.484	12.3	12.3	1.355	1.355
インスタント・オート麦ふすま	8.00	0.480	0.524	6.0	6.6	1.344	1.467

a 8研究機関の分析結果に基づく。統計の外れ値は認められなかった

b $r = 2.8 \times S_r$

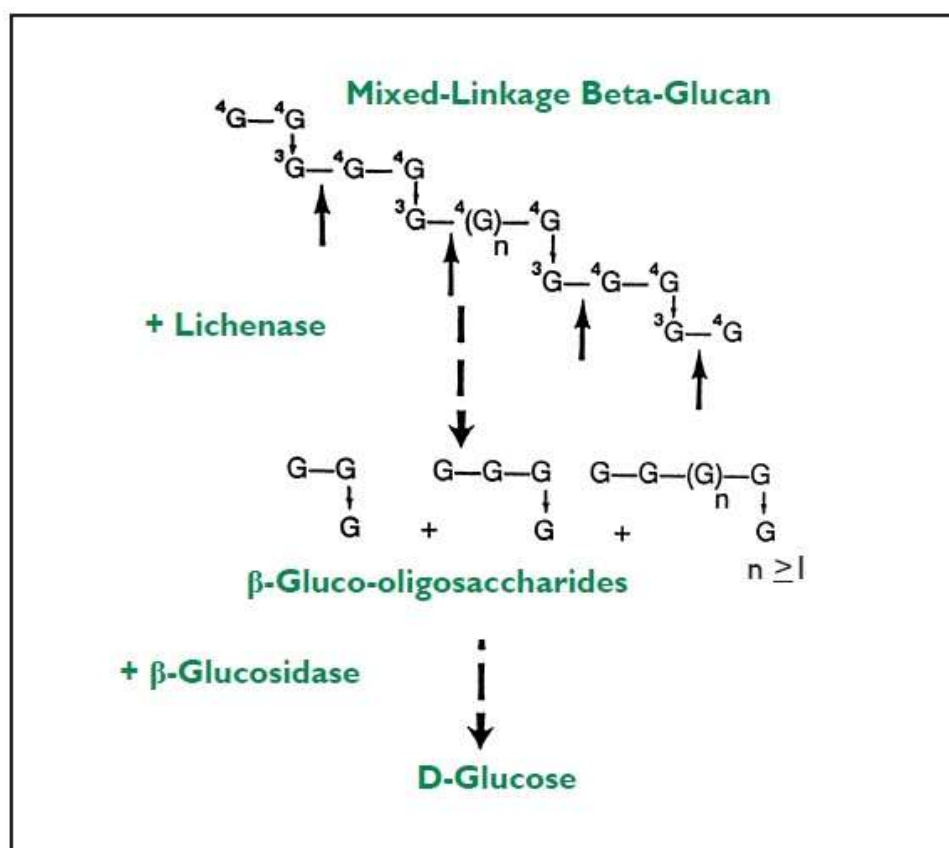
c $R = 2.8 \times S_R$

酵素活性の標準化

β -グルコシダーゼについて、*p*-ニトロフェニル β -グルコシドを基質として標準化を行ないました。1単位は40°C、pH 4.0 において、10mM *p*-ニトロフェニル β -グルコシドから1分あたり1マイクロモルの *p*-ニトロフェノールを遊離するのに必要な酵素量として定義しました。リケナーゼ活性は、大麦 β -グルカン(10 mg/mL)を基質とし、40°C、リン酸緩衝液(pH 6.5)中で Nelson/Somogyi 還元糖法を用いて測定しました(参考文献1を参照)。1単位の活性は、定義された分析条件下で1分あたり1マイクロモルの D-グルコースに相当する還元糖量を遊離するのに必要な酵素量として定義しました。

文献

1. McCleary, B. V. & Glennie-Holmes, M. (1985). Enzymic quantification of (1-3)(1-4)- β -D-glucan in barley and malt. *J. Inst. Brew.*, **91**, 285-295.
2. McCleary, B. V. & Nurthen, E. J. (1986). Measurement of (1-3)(1-4)- β -D-glucan in malt, wort and beer. *J. Inst. Brew.*, **92**, 168-173.
3. McCleary, B. V. & Codd, R. (1991). Measurement of (1-3)(1-4)- β -D-glucan in barley and oats: A streamlined enzymic procedure. *J. Sci. Fd. Agric.*, **55**, 303-312.
4. McCleary, B. V. & Mugford, D. C. (1992). Interlaboratory evaluation of β -glucan analysis methods. "The changing role of oats in human and animal nutrition". Proceedings of the Fourth International Oat Conference, Adelaide, Australia. Oct 19-23.



スキーム1. 混合結合型 β -グルカン分析法の概念図

日本バイオコン株式会社

名古屋本社

〒454-0852 名古屋市中川区昭和橋通三丁目 23 番地1 バイオコンビル
TEL 052-661-8105 (代表) FAX 052-659-0888

TEL 052-659-4898 (試薬担当直通)

E-mail : info@biocon.co.jp

Homepage : <http://www.biocon.co.jp>

この小冊子に記載されている情報は、当社が知る限りにおいて事実かつ正確に記載されていますが、使用条件が当社の管理範囲外であるため、本文中にどのような推奨や示唆があったとしても、如何なる使用も特許を侵害しないということを保証しているものではありません