

Megazyme

フラクタンHK分析法

フラクトオリゴ糖 (FOS) 並びにフラクタン測定用

FRUCTAN

ASSAY PROCEDURE

for the measurement of
FRUCTO-OLIGOSACCHARIDES (FOS) and
FRUCTAN POLYSACCHARIDES

K-FRUCHK 04/18

(組換えイヌリナーゼ使用)

K-FRUCHK

(用手法 50 回分)

AOAC Method 999.03

AACC Method 32.32.01 の変法

高濃度の D-グルコース、D-フラクトース、シュクロース、マルトースを含む
サンプルには不向きです。その場合は K-FRUC 分析法を参照願います。

日本バイオコン株式会社

はじめに - INTRODUCTION -

フラクタンは、1つ以上のフラクトシル-フラクトース結合を持ち、この構造が大部分を占めるものと定義されています¹。これは多糖ばかりでなく2糖のイヌリノビオースを含むオリゴ糖にも当てはまります。この定義に含まれる物質は、D-グルコシル置換基を含んでも含まなくても構いません。オリゴ糖と多糖の区別は、明確な特性を持つか否かによって行われてきました¹。

フラクタンは植物界に広く存在しており、これらは単子葉・双子葉類や緑藻類中に見出されます。フラクタンは分子の横造と分子量によって異なり、イヌリン型、レバン型、及び分岐型の3種類に大別されます。イヌリン型はほとんどまたは全てが(2→1)フラクトシル-フラクトース結合で構成され、レバン型はほとんどまたは全てが(2→6)フラクトシル-フラクトース結合です。分岐型は(2→1)、(2→6)の両方の結合が混合しています(例 イネ科のグラミナン)。

これまで植物製品や食品中のフラクタンを測定する方法がいくつか開発されており、その中にはフラクタンを D-フラクトースと D-グルコースまで加水分解して測定する方法が良いとされてきました。この方法ではショ糖、D-フラクトース、D-グルコースを分離し測定しなければならない問題があります。Pontis はショ糖を酵母由来の結晶インベルターゼで分解し、生じた D-グルコースと D-フラクトースを元々存在している単糖とともに水酸化ナトリウム中で加熱して破壊することにより除去する手法を報告しています³。しかし、酵母インベルターゼは低重合度(DP)のフラクトオリゴ糖(FOS)も加水分解してしまいます²。

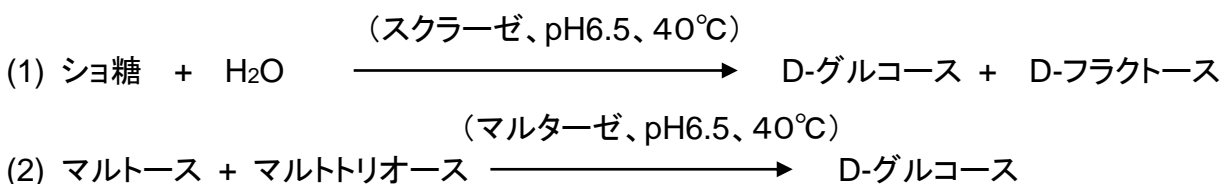
別の分析法としてはアミログルコシダーゼ、アミログルコシダーゼとイヌリナーゼ(フラクタナーゼ)処理後、または未処理のサンプル抽出物をキャピラリーガスクロマトグラフィー(CGC)またはHPLCで分析する方法があります⁵。サンプル中のシュクロース、D-フラクトースおよび D-グルコースを測定することにより、遊離 D-グルコースおよび D-フラクトース、シュクロース、澱粉およびフラクタンの推定値を算出することが可能です。

ここで紹介している分析法^{2,8}は、チコリ、ダリア、エルサレムアーティチョーク、タマネギ、小麦の茎葉およびリュウゼツラン由来のフラクタンに特異的です。これらのうち、リュウゼツラン科(Agavaceae)由来の高度に分岐した(2→1)、(2→6)フラクタンは最も酵素消化し難いことが知られていますが、本操作条件下で完全に加水分解することができます。

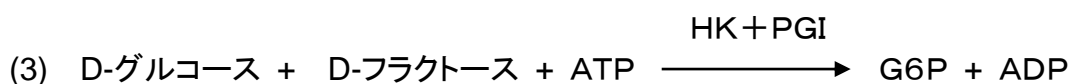
この方法は **K-FRUC** キットのような水素化ホウ素還元工程を含まないので、部分加水分解イヌリン(例; Raftilose P-95[®])も過小評価されません。しかしながら、本法は高濃度の D-グルコース、D-フラクトース、シュクロースまたはマルトースを含有するサンプルではサンプルブランクの吸光度が高くなるため、適していません。フラクタン含有量の大きな過小評価に繋がります。

原理 - PRINCIPLE -

スクロースおよび低重合度(DP) マルトオリゴ糖(サンプル中に存在する場合は、シュクララーゼ/マルターゼにより D-フラクトースと D-グルコースに加水分解されます²。一方、澱粉と高重合度のマルトデキストリンは加水分解されません。(1) (2)

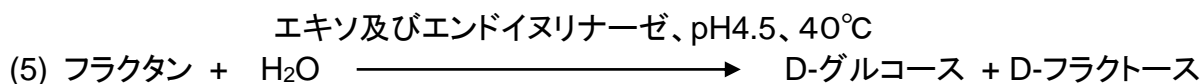


pH 調整後、ヘキソキナーゼ/ホスホグルコースイソメラーゼ/グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼにより遊離 D-グルコースと D-フラクトースを分析しサンプルのブランク値を得ます(3) (4)。



この反応で生成するNADPH量は、D-グルコースと D-フラクトース量に化学量論的に同一です。NADPHは 340nm における吸光度増加により測定することができます。

サンプルのフラクタン含有量は、サンプルを超純度(組換え/アフィニティー精製)エキソおよびエンドイヌリナーゼ処理することによりフラクタンを D-フラクトースおよび D-グルコースに加水分解し(5)、次いで D-グルコース+D-フラクトースを分析して定量します(3)(4)。



特異性、感度、直線性と精度

- SPECIFICITY, SENSITIVITY, LINEARITY AND PRECISION -

この分析法は、ほぼ大部分が(2→1) フラクトシル-フラクトース結合(イヌリン)、一定量の(2→1)と(2→6)フラクトシル-フラクトース結合(タマネギ、イネ科植物、リュウゼツラン)からなるフラクタンに特異的です。ヘキソキナーゼ/ホスホグルコースイソメラーゼ/グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼによる定量法は、D-グルコースおよび D-フラクトースに特異的です。

吸光度差の最小値は 0.010 です。これはサンプル量が 0.20mL の場合、分析試料中の濃度 33.7mg/L に相当します(シュークラーゼ/マルターゼ処理前の、酢酸緩衝液で希釈後の濃度)。検出限界はサンプル量が 0.20mL の場合、分析試料中の濃度 67.4mg/L で、吸光度差 0.02 に相当します。

この分析は 4~80μg の D-グルコース又は D-フラクトース間で直線性を示します。同一サンプルを2本1組で分析した場合、吸光度のバラつきは 0.005~0.010 の範囲で発生し、これはサンプル量が 0.20mL の場合、D-グルコース+ D-フラクトース濃度 16.9~33.7mg/L に相当します。

サンプル調製中にサンプルが希釈される場合、結果に希釈係数 F を掛ける必要があります。サンプル調製時、例えば 10g/L を秤量する場合、0.02~0.05g/100g の誤差が生じます。

本法はフラクタンの **K-FRUC** 分析法に基づいています。この手順は AOAC 並びに AACC インターナショナルの支援の下、研究機関の相互評価を得ています⁷。シュークロース、マルトース、マルトデキストリンおよび澱粉は測定されません。ガラクトシルスクロオリゴ糖が存在する場合、酵素的に除去する必要があります。4ページの「標準品と諸注意 4」を参照して下さい。

阻害 - INTERFERENCE -

サンプル中の阻害物質の有無は、フラクタンを内部標準として用いることで検出が可能です。標準品の定量的回収が可能です。サンプルの取扱いと抽出におけるロス、最初の抽出時に D-グルコースまたは D-フラクトースを加えて添加回収試験を行うことで確認できます。

安全性 - SAFETY -

一般的な安全基準に則って使用して下さい。この製品の安全な使用および取扱いの詳細については日本バイオコンまでお問い合わせ下さい。

キット - KITS -

50 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: 緩衝液(25 mL, pH 7.6)。保存剤として 0.02% w/v アジ化ナトリウム含有。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル2: NADP⁺+ATP。-10°C以下で5年以上安定です。
- ボトル3: シュークラーゼ/マルターゼ、BSAを含む凍結乾燥粉末。-10°C以下で5年以上安定です。
- ボトル4: フラクタナーゼ(組換え、アフィニティー精製エキソおよびエンドイヌリナーゼ)。凍結乾燥粉末。-10°C以下で5年以上安定です。
- ボトル5: ヘキソキナーゼ+グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ+PGI懸濁液、2.25mL。4°Cで4年以上安定です。
- ボトル6: D-フラクトース標準液(0.5mg/mL)、0.2% (w/v)安息香酸溶液。室温で4年以上安定です。
- ボトル7: フラクタン標準粉末。ダリアフラクタンの α -セルロース存在下凍結乾燥品。乾燥条件下、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. 付属のボトル1をそのまま使用して下さい。4°Cで2年以上安定です。
2. ボトル2の内容物を蒸留水 12mL に溶解します。4°Cで1年以上、-10°C以下で2年以上安定です。凍結の際は凍結/融解の繰り返しを避けるため、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。
3. ボトル3の内容物(スクラーゼ/マルターゼ)を緩衝液1(100mM マレイン酸緩衝液、pH 6.5、下記参照)11mL 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°C以下で2年以上安定です。
4. ボトル4の内容物(フラクタナーゼ)を緩衝液2(100mM 酢酸緩衝液、pH 4.5、下記参照)11mL 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°C以下で2年以上安定です。
5. 付属のボトル5をそのまま使用して下さい。4°Cで2年以上安定です。最初に開封する前に、ゴム栓に付着した可能性のあるタンパク質を混合するためボトルを振って下さい。その後、ボトルを直立させて保管します。使用前にボトルを軽く振り混ぜて下さい。4°Cで4年以上安定です。
6. 付属のボトル6をそのまま使用して下さい。室温で4年以上安定です。
7. 付属のボトル7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 (キット提供外)

緩衝液1: マレイン酸ナトリウム緩衝液(100mM、pH6.5)

マレイン酸 11.6g (Sigma M0375 または同等品)を蒸留水 900mL に溶解します。2M 水酸化ナトリウムで pH6.5 に調整し、1Lに定容します。4°Cで保存します。

緩衝液2: 酢酸ナトリウム緩衝液(100mM、pH4.5)

氷酢酸 5.8mL を蒸留水 900mL に加えます。2M 水酸化ナトリウムで pH 4.5 に調整し、1L に定容します。4°Cで保存します。

装置(推奨)

1. ガラス試験管(丸底; 16×100mm)、ガラスビーカー(100mL、200mL 容。パイレックス等)
2. メスフラスコ(100mL、200mL 容)
3. マイクロピペッター、例 Gilson Pipetman®(100µL および 200µL)
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®
(シュークラージェ、イミダゾール緩衝液 0.2mL、フラクタナーゼ 0.1mL 等分注用)
5. 分析用天秤
6. 340nm に設定した分光光度計、使い捨てプラスチックキュベット(紫外部対応のもの)
7. ボルテックスミキサー
8. 恒温水槽(40°C設定)
9. オプション: ブロック式ヒーター(3mL プラスチックキュベットを加温するためのもの)
10. ホットプレート付マグネティックスターラー
11. パラフィンフィルム
12. 卓上型遠心分離機(1000×g 対応のもの)、もしくはワットマン No.1 濾紙と漏斗(9cm)
13. 実験室用タイマー(ストップウォッチ)

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

1. フラクトースから6ホスホグルコン酸に変換に要する時間は25°Cで10分です。フラクトース標準液を用いた吸光度変化をチェックして、反応が完了することを確認して下さい。
2. HK/PGI/G6P-DH反応が正しく進行していることを確認するため、各分析ごとにフラクトース標準液を同時に測定します。この時、溶液6(フラクトース標準; 0.5mg/mL)0.1mL、蒸留水 2.2mL、溶液1(イミダゾール緩衝液)0.2mL、および溶液2(NADP⁺/ATP溶液)0.1mL をプラスチックキュベットに加えて混合し、3分後に 340nm の吸光度を測定します(A₁)。次に懸濁液5(HK/PGI/G6P-DH)0.02mL を加え、25°Cで10分間反応させ、吸光度を測定します(A₂)。
3. 各分析ごとに**フラクタン標準粉末**を分析します。この粉末のフラクタン含有量はバイアルラベルに記載されています。12~100%w/w フラクタン含有サンプル(5ページ)の手順に従い、但しサンプル秤量と最終容量を1/5に減らして実施します。すなわち、サンプル 200mg を80°Cに加温した蒸留水 80mL で抽出後、100mL に定容します。
4. **ガラストシルスクロオリゴ糖**を含むサンプルを分析する際は、*A. niger* α-ガラクトシダーゼ (**E-AGLANP**) 処理で除去することをお勧めします。試料 0.2mL にα-ガラクトシダーゼ(200 U/mL; 50mM 酢酸緩衝液、pH 4.5)50µLを加え(ステップC. 1の後)、シュークラージェ/マルターゼ混合液(酵素溶液1)を添加する前に40°Cで30分間反応します。この酵素処理によりガラクトシルスクロオリゴ糖を完全に加水分解し、D-ガラクトースを遊離します。

分析手法

A. フラクタン抽出

乾燥試料を粉砕して、0.5mm の篩を通過させます。脂質の多いサンプル(例 チョコレート)を鋭利なナイフで薄く細かく削ります。柔らかい食品(例、スプレッド)はそのまま分析します。全ての試料は、秤量前に室温に戻しておきます。

フラクタン含量が0～12%(w/w)の場合

1. 試料約 1.0g を 100mL 容ガラスビーカーに精秤し、約80℃に加熱した蒸留水 40mL を加えます。ビーカーをホットプレート付マグネティックスターラーに乗せ、約80℃に加熱しながらサンプルが完全に分散するまで15分間攪拌します。
2. 室温まで冷却後、全量を 50mL 容メスフラスコに移し蒸留水で定容後、十分に混合します。
3. サンプルに著量(例えば30～60%w/w)の D-グルコース、D-フラクトース、シュークロースが含まれる場合、分析前にサンプルを5～10倍希釈します。D-グルコース、D-フラクトース、シュークロースにマルトースも含まれる場合、**K-FRUC** 分析キットでの定量をお勧めします。

フラクタン含量が12～100% (w/w)の場合 (またはフラクタンと糖が含まれる場合)

1. 試料約 1.0g を 800mL 容ガラスビーカーに精秤し、約80℃に加熱した蒸留水 400mL を加えます。ビーカーをホットプレート付マグネティックスターラーに乗せ、約80℃に加熱しながらサンプルが完全に分散するまで15分間攪拌します。
2. 室温まで冷却後、全量を 500mL 容メスフラスコに移し蒸留水で定容後、十分に混合します。

B. サンプル処理

1. サンプルの一定量をワットマン No.1 濾紙(9cm)で濾過し、直ちに分析します。濾液にまだ濁りがある場合はさらにワットマン GF/A ガラス繊維濾紙で濾過をします。
この濾液を低温で数時間放置すると、フラクタンが沈殿してくることがあります。このような場合、試料を80℃近くまで再加熱し、室温に戻してから分析します。

C. シュークロースと低重合度マルトオリゴ糖の加水分解

1. 試料(フラクタン約 0.1～2.0mg/mL 含有)0.2mL をガラス試験管(16×100mm)底部に正確に分注します。
2. 溶液3(シュークラゼ/マルターゼ混合液)0.2mL を夫々添加し、40℃で30分間反応させます。
3. 各試験管をボルテックスミキサーで激しく攪拌しながら、緩衝液2(100mM 酢酸緩衝液、pH 4.5)0.5mL を加えます。これを**溶液A**と呼びます。

D. フラクタンの加水分解

1. プラスチック分光光度計キュベット(3.0mL、光路1cm)に、**溶液A**を正確かつ慎重に 0.2mL ずつ分注します(2連)。
2. 片側のキュベット底部に溶液4(フラクターゼ溶液)0.1mL を加え、もう片側には緩衝液2(100mM 酢酸緩衝液、pH 4.5)0.1mL を加えます。共に良く混合し、パラフィンフィルムにてキュベットに蓋をします。
3. 蓋をしたキュベットをブロックヒーターにて40℃、30分加熱し、サンプル側のフラクタンをフラクトースとグルコースに完全に分解します。

E. フラクタンの定量

波長:	340nm
キュベット	光路 1cm (ガラスもしくはプラスチック)
反応温度	約 25°C
反応最終容量	2.62mL
サンプル溶液	D-グルコース、D-フラクトースとして 4~100 µg (サンプル液量 0.20mL)

空気を対照(レファレンス側にセルを入れない)、または水を対照に分析

ピペットでキュベットに添加	糖類	フラクタン+糖類
サンプル溶液	0.20 mL	0.20 mL
溶液4 (フラクタナーゼ)	-	0.10 mL
緩衝液2 (酢酸緩衝液)	0.10 mL	-
すべての溶液をキュベット底部に入れるよう留意して下さい。内容物をゆっくりと回転させて混合し、キュベットに蓋をして、ヒートブロックまたは恒温槽にて40°C、30分間反応します。次に以下のものを添加し反応開始:		
蒸留水 (約25°C)	2.00 mL	2.00 mL
溶液1 (緩衝液、pH 7.6)	0.20 mL	0.20 mL
溶液2 (NADP ⁺ /ATP)	0.10 mL	0.10 mL
混合*し、試薬添加の約3分後、反応液の吸光度測定(A ₁) 次に以下のものを添加し反応開始:		
懸濁液5 (HK/PGI/G6P-DH)	0.02 mL	0.02 mL
混合*し、反応液の吸光度測定(A ₂)を測定しながら反応が終了するのを待ちます(約10~12分)。15分後も反応が終了していない場合、5分間の吸光度変化がなくなるまで5分間隔で吸光度を測定する**。		

* プラスチック製スパテルで攪拌するか、キュベット蓋またはパラフィンフィルムでキュベットに蓋をして穏やかに回転させる。

** 吸光度が増加し続ける場合、試料中の色素化合物や酵素の影響による可能性がある。これらの干渉物質は試料調製中に除去される可能性がある。

算出法 (用手法)

「糖類」と「フラクタン+糖類」それぞれについて吸光度差(A₂-A₁)を分析し、それぞれ以下の式からΔA_{糖類}、ΔA_{フラクタン+糖類}を求めます。

「糖類」サンプル中の D-グルコース、D-フラクトースの定量

$$\Delta A_{\text{糖類}} = A_2 - A_1 \quad (\text{「糖類」サンプル分析より})$$

「フラクタン+糖類」サンプル中の D-グルコース、D-フラクトースの定量

$$\Delta A_{\text{フラクタン+糖類}} = A_2 - A_1 \quad (\text{「フラクタン+糖類」サンプル分析より})$$

十分に正確な結果を得るにはΔA_{糖類}、ΔA_{フラクタン+糖類}は少なくとも0.100の吸光度差が必要です。

「糖類」と「フラクタン+糖類」の濃度は、以下のように計算することができます。

$$c = \frac{V \times Mw}{\epsilon \times d \times v} \times \frac{0.9}{0.2} \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

ここで:

- V = 最終反応液量 (mL)
Mw = D-グルコース、D-フラクトースの分子量
 ϵ = 340nm におけるNADPHの分子吸光係数 = 6,300 (L/mol/cm)
d = 光路 (cm)
v = サンプル液量 (mL)。
0.9/0.2 = サンプル 0.2mL をシュークララーゼ/マルターゼ 0.2mL と反応させ、酢酸緩衝液 0.5mL を加えて 0.9mL とする。ここから 0.2mL を分取し、フラクターゼ処理する(すなわち、0.9mL 中の 0.2mL を分析)。

「糖類」濃度は以下の通り

$$c = \frac{2.32 \times 180.16}{6300 \times 1.0 \times 0.2} \times \frac{0.9}{0.2} \times \Delta A_{\text{糖類}} \quad [\text{g/L}]$$
$$= 1.6858 \times \Delta A_{\text{糖類}} \quad [\text{g/L}]$$

「フラクタン+糖類」濃度は以下の通り

$$c = \frac{2.32 \times 180.16}{6300 \times 1.0 \times 0.2} \times \frac{0.9}{0.2} \times \Delta A_{\text{フラクタン+糖類}} \quad [\text{g/L}]$$
$$= 1.6858 \times \Delta A_{\text{フラクタン+糖類}} \quad [\text{g/L}]$$

従って、「フラクタン」濃度は以下の通りとなります

$$c_{\text{フラクタン}} = (c_{\text{フラクタン+糖類}} - c_{\text{糖類}}) \times \frac{162}{180} \quad [\text{g/L}]$$

162/180 = 算出した遊離フラクトース、グルコース濃度をフラクタン中の存在形式であるアンヒドロフラクトースとアンヒドログルコースに換算するファクター

サンプルを調製中に希釈した場合は、計算結果に希釈係数 F を乗じる必要があります。固体および半固体サンプルを秤量後分析する場合、含有量(g/100g)は、秤量値から以下のように算出されます。

フラクタン含量

$$= \frac{\text{フラクタン濃度 [g/L サンプル液]}}{\text{サンプル重量 [g/L サンプル液]}} \times 100 \quad [\text{g/100g}]$$

ここで 1g を 100mL で抽出した場合、サンプル重量 [g/L サンプル液] = 10

ここで 1g を 500mL で抽出した場合、サンプル重量 [g/L サンプル液] = 2

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。

文献

1. Lewis, D. H. (1993). Nomenclature and diagrammatic representation of oligomeric fructans - a paper for discussion. *New Phytologist*, **124**, 583-594.
2. McCleary, B. V. & Blakeney, A. B. (1999). Measurement of inulin and oligofructan. *Cereal Foods World*, **44**, 398-406.
3. Pontis, H. G. (1966). Observations on the *de novo* synthesis of fructosans *in vivo*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**, 416-423.
4. Pontis, H. G. (1990). Fructans. “*Methods in Plant Biochemistry*” (P. M. Dey and J. B. Harborne, Eds.), Academic Press, New York, pp 353-369.
5. Quemener, B., Thibault, J. -F. & Coussement, P. (1993). Determination of inulin and oligofructose in food products, and integration in the AOAC method for measurement of total dietary fibre. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.*, **27**, 125-132.6.
6. Uchiyama, T. (1993). Metabolism in microorganisms. Part II. Biosynthesis and degradation of fructans by microbial enzymes other than levansucrase. “*Science and technology of fructans*” (M. Suzuki and N. J. Chatterton, Eds.), CRC Press, pp 170-190.
7. McCleary, B. V, Murphy, A. & Mugford, D. C. (2000). Determination of Oligofructans and Fructan Polysaccharides in Foodstuffs by an Enzymatic/Spectrophotometric Method: Collaborative Study. *J. AOAC International*, **83**, 356-364.
8. McCleary, B. V. & Rossiter, P. (2004). Measurement of novel dietary fibres. *J. AOAC International*, **87**, 707-711.

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