

Megazyme

グルコマンナン分析法

GLUCOMANNAN

ASSAY PROCEDURE

K-GLUM 08/18

K-GLUM
(用手法 50 回分)

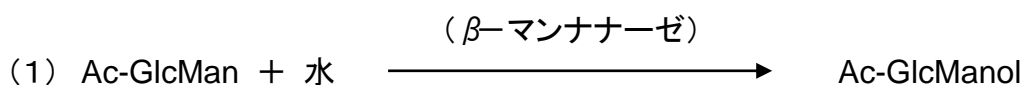
日本バイオコン株式会社

はじめに - INTRODUCTION -

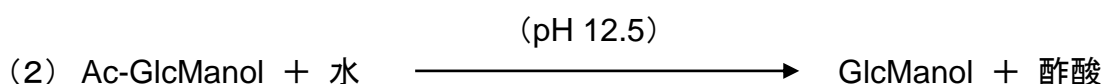
グルコマンナンは D-グルコシルおよび D-マンノシル残基が β -1,4 結合した直鎖状多糖類であり、そのグルコース:マンノース(Glc:Man)比はその起源により大きな幅があります。例えばコンニャク (*Amorphophallus konjac*) グルコマンナンの Glc:Man 比は約 2:3 であり、アロエベラでは 1:2、サレップ (ラン科植物; *Orchis mureo*) では約 1:4 の比を有しています。これらの多糖類は全てアセチル化されており、これにより水に溶けやすくなっています。グルコマンナンはある種の植物属において塊茎細胞壁の主要な貯蔵炭水化物となっており、植物の特定の生長段階でグルコマンナンは分解され、エネルギー源となります。唯一産業的に利用されているグルコマンナンはコンニャクのもので、この多糖類はイナゴマメのガラクトマンナンと同様に寒天、カラギーナンおよびキサンタンと相互作用して粘度の増加やゲルを形成します。この相互作用はペットフード産業で缶詰のドッグフードに利用されています。また近年グルコマンナンはゼリー菓子に使用されるようになりましたが、この用途では一部の消費者において窒息死の危険性があることが判明しました。このため欧米ではこれらの菓子が禁止となり、またグルコマンナンの正確な分析法が必要になりました。

原理 - PRINCIPLE -

グルコマンナンの定量には数段階の酵素反応と、多糖類からアセチル基を除去するための高い pH での処理が必要になります。第1の酵素反応では、エンド- β -マンナーゼによりアセチル化グルコマンナン (Ac-GlcMan) をアセチル化グルコマンノオリゴ糖 (Ac-GlcManol) に分解します (1)。グルコマンナン含量の高いサンプルではこの反応を脱アセチル化前に行うことが適切ですが、グルコマンナン含量の低いサンプルでは逆に脱アセチル化工程 (2) を先に行う方が便利です。

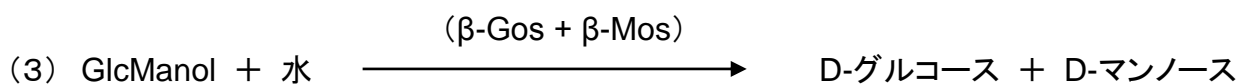


重合度 (DP) 2~6 のアセチル化グルコマンノオリゴ糖まで加水分解した後、pH を 12.5 まで上げることによりオリゴ糖は脱アセチル化されます (2)。

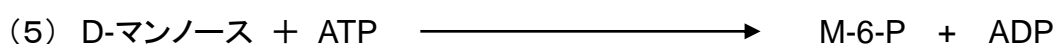
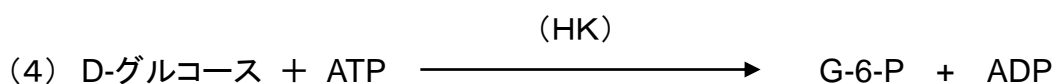


グルコマンナンを高濃度含有する試料 (例えばコンニャク粉) では、多糖の脱アセチル化がポリマーの自己会合を引き起こし酵素加水分解に耐性をもたらすこととなりますので、脱アセチル化前に β -マンナーゼで加水分解することが重要です。

脱アセチル化後、 β -グルコシダーゼ (β -Gos) と β -マンノシダーゼ (β -Mos) の相互作用によりグルコマンノオリゴ糖は D-グルコースと D-マンノースに定量的に加水分解されます (3)。

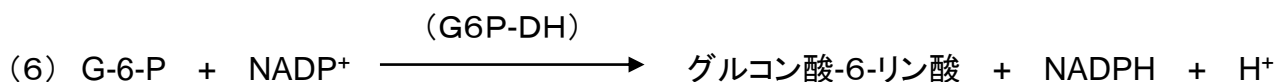


D-グルコースと D-マンノースはヘキソキナーゼ (HK) およびアデノシン-5'-三リン酸 (ATP) との反応によりリン酸化されてグルコース-6-リン酸 (G-6-P) (4)、マンノース-6-リン酸 (M-6-P) (5) に変換され、同時にアデノシン-5'-二リン酸 (ADP) が生成します。



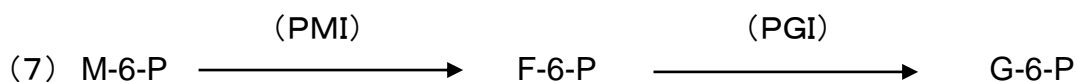
G-6-Pはグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6P-DH) の存在下、グルコン酸-6-リン酸に酸

化されますが、同時にNADP⁺がNADPHに還元されます(6)。



この反応で生成するNADPH量は D-グルコース量と化学量論的に等しく、340nm における吸光度増加により測定することができます。

一方、M-6-Pはホスホマンノースイソメラーゼ(PMI)とホスホグルコースイソメラーゼ(PGI)の連続作用により、フラクトース-6-リン酸(F-6-P)を経てG-6-Pに変換されます(7)。



G-6-PはNADP⁺存在下、(6)の反応に従いグルコン酸-6-リン酸およびNADPHを形成し、D-マンノース量に等しい吸光度の上昇が生じます。

特異性、感度、直線性と精度

- SPECIFICITY, SENSITIVITY, LINEARITY AND PRECISION -

この分析法はグルコマンナンおよびその分解物に特異的です。サンプル抽出物中の遊離 D-グルコース、D-マンノース、D-フラクトースは調製工程中の水和エタノール洗浄または水素化ホウ素還元によって除去されます。さらに付け加えると、サンプル抽出物に残存している遊離 D-グルコース、D-マンノース、D-フラクトースはβ-グルコシダーゼとβ-マンノシダーゼによるグルコマンノオリゴ糖の加水分解前に試料溶液を分析することにより測定することが可能です。

この分析法の最小吸光度差は 0.010 です。粉末試料の場合、これは試料 100g あたり 0.368g に相当します。検出限界は 100g あたり 0.694g であり、これは吸光度差 0.020 に相当します。

この分析法は、グルコマンナン 4~80μg の範囲に渡り直線性があります。2連測定した際に 0.005~0.010 の吸光度差が生じることがあり、これは試料 100g あたりのグルコマンナン量として 0.174~0.348g に相当します。同様に試料の秤量時、例えば 0.10g / 250mL を調製する場合、0.001~0.002g / 0.10g の誤差が予測されます。

グルコマンノオリゴ糖がβ-グルコシダーゼとβ-マンノシダーゼにより完全に加水分解されたことを確認するために、反応時間を推奨時間と推奨時間の2倍の双方で行なうと良いです。この際、グルコマンナン定量値は同じである必要があります。

阻害 - INTERFERENCE -

グルコマンナンの加水分解が、分析法のそれぞれの工程で決められた時間内に完了している場合、一般的に阻害が生じていないと結論付けることができます。D-グルコースと D-マンノースの定量測定では、反応終了時にキュベットに D-グルコースと D-マンノース(0.1mL 中に約 20μg)を加えることで確認することができます。吸光度が有意に増加すれば、阻害が生じていないことを示します。

試料中の妨害物質の存在は、内部標準(例えば、グルコマンノオリゴ糖)を加えることによって確認することができます。標準品の量的な回収が可能ではありません。サンプルの取り扱いおよび抽出におけるロス回収実験、すなわち抽出工程の最初にサンプルにグルコマンナンまたはグルコマンノオリゴ糖を添加することにより確認することができます。

安全性 - SAFETY -

すべての化学物質に適用される一般的な安全対策を遵守する必要があります。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(25mL、pH4.5) 防腐剤としてアジ化ナトリウム(0.02%w/v)含有。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル2: 緩衝液(25mL、pH7.6) 塩化マグネシウムと防腐剤としてアジ化ナトリウム(0.02%w/v)含有。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル3: NADP⁺ とATP。-10°C以下で5年以上安定です。
- ボトル4: β-マンナーゼ懸濁液(1.2mL)。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル5: β-グルコシダーゼ+β-マンノシダーゼ懸濁液、1.1mL。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル6: ヘキソキナーゼ+グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ懸濁液 2.2mL。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル7: ホスホグルコースイソメラーゼ+ホスホマンノースイソメラーゼ懸濁液 2.2mL。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル8: D-グルコース+D-マンノース標準液(各 0.2mg/mL)。室温で2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の内容物を蒸留水で約450mLに希釈します。pHを確認し必要であれば1M HClまたは1M NaOHを用いpH4.5に調整します。500mLに定容し、十分に密閉したメジウム瓶に保存します。4°Cで保存して下さい。微生物汚染を防ぐためにトルエン2滴を添加すれば4°Cで12ヶ月間、トルエンを添加しない場合は4°Cで2ヶ月間安定です。希釈緩衝液をポリプロピレン容器中に適量ずつ分注して-10°C以下で冷凍保存して下さい。その場合2年以上安定になります。
2. 付属のボトル2をそのまま使用して下さい。4°Cで2年以上安定です。
3. ボトル3の内容物を12mLの蒸留水に溶解します。
4°Cで1年以上、または-10°C以下で2年以上安定です(凍結／融解の繰り返しを避けるため、一定量ずつポリプロピレンチューブに分けて凍結します)。
- 4-7. 付属のボトル4, 5, 6, 7をそのまま使用して下さい。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。4°Cで2年以上安定しています。
8. 付属のボトル8をそのまま使用して下さい。室温で2年以上安定しています。

機器 (推奨) : - EQUIPMENT (RECOMMENDED): -

1. メスフラスコ(50mL および 100mL 容)
2. 使い捨てプラスチックキュベット(光路 1cm、3.0mL; 340nm 対応のもの)
3. マイクロピペッター、例 Gilson Pipetman®(20μL、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ト、例 Eppendorf Multipette®
 - 5.0mL Combitip®(緩衝液2 0.2mL、NADP⁺/ATP溶液 0.1mL 分注用)
 - 25.0mL Combitip®(蒸留水 2.0mL 分注用)
5. 分析用天秤
6. 分光光度計(340nm に設定;吸光度の経時変化を追跡記録できるものを推奨;図1)
7. ボルテックスミキサー
8. サーモスタット付きホットブロックヒーター(35°C設定)
9. 実験室用タイマー(ストップウォッチ)
10. ワットマン GF/A ガラス繊維ろ紙(9cm)
11. ホットプレート機能付マグネチックスターラー

操作 - PROCEDURE -

波長	340nm
キュベット	1cm (ガラスまたはプラスチック)
温度	ヒートブロック式ヒーター付で35°C制御できるものが望ましい。 なければ約25°C。
最終液量	2.86 mL
サンプル溶液	D-グルコース+D-マンノース 4~80μg/キュベット/0.5mL 試料 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	ブランク	サンプル
蒸留水 (約35°C)	0.02 mL	-
サンプル溶液	0.50 mL	0.50 mL [†]
懸濁液5 (β-Gos/β-Mos)	-	0.02 mL
混合*し、キュベットに蓋をして35°C、20分反応 次に以下のものを添加:		
蒸留水 (約35°C)	2.00 mL	2.00 mL
溶液2 (緩衝液)	0.20 mL	0.20 mL
溶液3 (NADP ⁺ /ATP)	0.10 mL	0.10 mL
混合**し、25~30°Cで反応。試薬添加の約3分後、反応液の吸光度測定(A ₁)		
懸濁液6 (HK/G6P-DH)	0.02 mL	0.02 mL
混合**し、反応継続。 反応終了(約5分)後、反応液の吸光度測定(A ₂)。5分後も反応が終了していない場合、2分間の吸光度変化がなくなるまで2分間隔で吸光度を測定する。 次に以下のものを添加:		
懸濁液7 (PGI/PMI)	0.02 mL	0.02 mL
混合**し、反応継続。 反応終了(約20分)後、反応液の吸光度測定(A ₃)。20分後も反応が終了していない場合、2分間の吸光度変化がなくなるまで2分間隔で吸光度を測定する。		

* サンプルと懸濁液5をキュベットの底部に入れ、反応液を穏やかに攪拌して混合する。

** 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 Parafilm®でキュベットに蓋をして穏やかに反転させる。

† サンプル量を 0.50mL 以下で実施する際は、蒸留水を不足量添加して下さい

計算 - CALCULATIONS -

ブランクとサンプルの吸光度差 (A_2-A_1) と (A_3-A_2) から以下の式を元に $\Delta A_{D\text{-glucose}}$ 、 $\Delta A_{D\text{-mannose}}$ 、 $\Delta A_{\text{glucomannan}}$ の値を算出します。

D-グルコースの定量 (グルコマンナン由来):

$$\Delta A_{D\text{-glucose}} = (A_2-A_1)_{\text{sample}} - (A_2-A_1)_{\text{blank}}$$

D-マンノースの定量 (グルコマンナン由来):

$$\Delta A_{D\text{-mannose}} = (A_3-A_2)_{\text{sample}} - (A_3-A_2)_{\text{blank}}$$

グルコマンナンの定量 (グルコマンナン由来):

$$\Delta A_{\text{glucomannan}} = (A_3-A_1)_{\text{sample}} - (A_3-A_1)_{\text{blank}}$$

正確な結果を得るために $\Delta A_{\text{glucomannan}}$ 値は少なくとも吸光度 0.100 が必要です。

グルコマンナン%量(w/w)は以下の式で算出できます。

$$= \frac{\Delta A_{\text{glucomannan}}}{6300} \times \frac{V}{1000} \times MW \times \frac{FEV}{v} \times \frac{100}{w} \times F$$

ここで:

$$\Delta A_{\text{glucomannan}} = (A_3-A_1)_{\text{sample}} - (A_3-A_1)_{\text{blank}}$$

$$6300 = 340\text{nm における NADPH の分子吸光係数 (L/mol/cm)}$$

$$\Delta A_{\text{glucomannan}}/6300 = \text{NADPH のモル濃度換算ファクター}$$

$$V = \text{キュベット反応の最終液量 (mL)}$$

$$V/1000 = \text{NADPH のモル濃度 (すなわち反応液中の D-グルコース + D-マンノースのモル数) をモル数に変換するファクター}$$

$$MW = \text{グルコマンナン鎖中での存在様式であるアンヒドロ-D-グルコース / D-マンノースの分子量 (162.14)}$$

$$FEV = \text{最終抽出液量 (例 コニャク粉末では 250mL、ゼリー菓子では 50mL または 100mL など)}$$

$$v = \text{キュベット中に添加するサンプル液量}$$

$$FEV/v = \text{最終抽出物中のグルコマンナンのグラム数への換算ファクター}$$

$$w = \text{抽出に使用したサンプルグラム数 (g)}$$

$$100/w = \text{グルコマンナンのサンプル中含量% (w/w)}$$

$$F = \text{希釈率 (抽出後、サンプル処理法により操作中に希釈が生じる。例えばサンプル抽出法 (d) のゼリー菓子では 2mL のサンプルが抽出処理後 4mL に調整される、すなわち F = 2)}$$

コンニャク粉末を7～8ページのサンプル調製例(a)に従い抽出した場合、

グルコマンナン (g/100g) :

$$= \frac{\Delta A_{glucomannan}}{6300} \times \frac{V}{1000} \times MW \times \frac{FEV}{v} \times \frac{100}{w} \times F$$

ここで:

$$\Delta A_{glucomannan} = (A_3 - A_1)_{sample} - (A_3 - A_1)_{blank}$$

$$V = 2.86 \text{ mL}$$

$$MW = 162.14$$

$$FEV = 250 \text{ mL}$$

$$v = 0.5 \text{ mL}$$

$$w = 0.100 \text{ g}$$

$$F = 1 \text{ (希釈無し)}$$

$$= \frac{\Delta A_{glucomannan}}{6300} \times \frac{2.86}{1000} \times 162.14 \times \frac{250}{0.5} \times \frac{100}{0.100} \times 1$$

$$= \Delta A_{glucomannan} \times 36.8 \text{ (g/100g)}$$

ゼリー菓子を8ページのサンプル調製例(b)(c)に従い抽出した場合、

グルコマンナン (g/100g) :

$$= \frac{\Delta A_{glucomannan}}{6300} \times \frac{V}{1000} \times MW \times \frac{FEV}{v} \times \frac{100}{w}$$

ここで:

$$\Delta A_{glucomannan} = (A_3 - A_1)_{sample} - (A_3 - A_1)_{blank}$$

$$V = 2.86 \text{ mL}$$

$$MW = 162.14$$

$$FEV = 100 \text{ mL}$$

$$v = \text{分析に使用したサンプル液量(0.1~0.5 mL)}$$

$$w = \text{ゼリー重量(およそ 12~18 g)}$$

$$= \frac{\Delta A_{glucomannan}}{6300} \times \frac{2.86}{1000} \times 162.14 \times \frac{100}{v} \times \frac{100}{w}$$

$$= \Delta A_{glucomannan} \times 0.736/w \times 1/v \text{ (g/100g)}$$

ゼリー菓子を9ページのサンプル調製例(d)に従い抽出した場合、

グルコマンナン (g/100g) :

$$= \frac{\Delta A_{\text{glucomannan}}}{6300} \times \frac{V}{1000} \times MW \times \frac{FEV}{v} \times \frac{100}{w} \times F$$

ここで:

$\Delta A_{\text{glucomannan}}$	=	$(A_3 - A_1)_{\text{sample}} - (A_3 - A_1)_{\text{blank}}$
V	=	2.86 mL
MW	=	162.14
FEV	=	50 mL
v	=	分析に使用したサンプル液量(0.1~0.5 mL)
w	=	ゼリー重量(およそ 12~18 g)
F	=	2 (2倍希釈)

$$= \frac{\Delta A_{\text{glucomannan}}}{6300} \times \frac{2.86}{1000} \times 162.14 \times \frac{50}{v} \times \frac{100}{w} \times 2$$

$$= \Delta A_{\text{glucomannan}} \times 0.736/w \times 1/v \quad (\text{g/100g})$$

D-マンノースのみからなる加水分解物でも D-マンナン量は同じ計算式を用いて測定できます。

$$\text{D-グルコース} : \text{D-マンノース比} = \Delta A_{\text{D-glucose}} : \Delta A_{\text{D-mannose}}$$

サンプル調製例 - SAMPLE PREPARATION EXAMPLES -

(a) コンニャク (*Amorphophallus konjac*) 粉末中のグルコマンナンの測定

0.5mm の篩を通した粉碎済試料を約 0.100g 精秤します。ガラス製の丸底試験管 (16×120mm) に入れ、試験管を軽く叩いて全ての試料を試験管の底に落とします。各試験管に 80% (v/v) 水和エタノール 5mL を添加し、試験管攪拌機で攪拌し、85~90°C で5分間反応させます。さらに水和エタノール 5mL を加え、Parafilm®で試験管に封をしてボルテックスミキサーで注意深く攪拌します。1500g で10分間遠心分離し、上清を慎重にデカントして廃棄します。沈殿を 80% (v/v) 水和エタノール 5mL に再懸濁し、さらに 80% (v/v) 水和エタノールを 5mL 加えます。試験管を攪拌し、1,500g で10分間遠心分離します。上清を注意深くデカントして廃棄し、吸水紙を用いて余分な液体を除去します。

NOTE : この一連の洗浄工程により、サンプル中に存在する低分子の糖(D-グルコースや D-フラクトースなど)が除かれます。

沈殿を 8mL の溶液1 (pH 4.5) に再懸濁し、試験管をボルテックスミキサーで激しく攪拌して完全に分散させます。試験管を直ちに沸騰水浴に置き、30秒間加熱します。試験管を取出し、ボルテックスミキサーで激しく攪拌します。この加熱攪拌工程をもう一度繰り返します。最後に、グルコマンナンを完全に水和するために試験管を沸騰水浴中で4分間加熱します。試験管を取出し、ボルテックスミキサーで激しく攪拌した後40°Cの恒温水槽中に入れます。5分後、β-マンナナーゼ

(懸濁液4) 20 μ L を添加し、ボルテックスミキサーで30秒間激しく攪拌します。試験管を40 $^{\circ}$ Cで60分間、ボルテックスミキサーで時折り激しく攪拌(約2~3回)しながら反応させます。あるいは、マグネチックスターラーで試験管の内容物を連続的に攪拌しながら加温できる Megazyme Multistir 恒温水槽など(日本バイオコンにお問い合わせ下さい)を利用すると便利です。

反応液を 200mL 容ビーカーに全量移し、容量を約 70mL まで増やします。1M NaOH を滴下して溶液の pH を約 12.5 に調整し、室温で10分間放置してグルコマンノオリゴ糖を完全に脱アセチル化します。200mM リン酸緩衝液 (pH6.5) (供給対象外) 20mL を加え、1M HCl を滴下して pH を 6.5 に調整します。溶液を全量 250mL 容メスフラスコに移し、蒸留水を用いて定容し、良く混合します。

標準的な場合、粉碎乾燥コンニャクについてはサンプル量は 0.5mL が適切であり、コンニャクグルコマンナン精製品についてはサンプル量 0.2mL が適切です。

(b) ゼリー菓子中のグルコマンナンの測定 (残糖除去手順 1: 透析)。

「カップ入ゼリー」1つの内容物全量を、予め計量した 100mL 容メジウム瓶に移し、精秤します(通常 12~18g)。蒸留水 20mL を加え、中身入りの瓶を電子レンジの最大出力で約45秒間加熱します(温度は80~90 $^{\circ}$ Cに上昇)。サンプルによっては、この処理で均質な溶液になります(透明になる必要はありません)。完全に溶解しない試料の場合、Ultra-turrax[®]または Polytron[®]ホモジナイザー(または同等品)を用いて20秒間ホモジナイズし、ゼリーの粒を完全に分散させます。最少量の蒸留水(約 5mL)でホモジナイザシャフト等を洗浄し、洗液を回収します。2M NaOH 溶液 3.0mL を加え(pH を約 12.5 に上昇)、完全に混合します。溶液を室温で10分間放置してグルコマンノオリゴ糖を完全に脱アセチル化します。次に 2M 酢酸 10.0mL を加え、透析膜(平面幅 2.5cm \times 長さ約 40cm)に全量移します。透析膜に封をして水道水の流水中で一晚透析します。透析膜の内容物を 100mL 容メジウム瓶に移し、約 10mL の蒸留水で透析膜をすすぎ、これもメジウム瓶に加えます。溶液を電子レンジで約80 $^{\circ}$ Cに加熱し、室温まで冷却します。2M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 1mL と β -マンナナーゼ(懸濁液4) 20 μ L を加え、40 $^{\circ}$ Cで30分間反応させます。2M NaOH で pH を 6.5 に調整し、200mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) で 100mL に定容します。十分に混合した後、ワットマン No.1 濾紙で一定量を濾過します。

標準的には、分析に必要な液量は 0.1~0.5mL です。

(c) ゼリー菓子中のグルコマンナンの測定 (残糖除去手順2: 水素化ホウ素還元)

「カップ入ゼリー」1つの内容物全量を、予め計量した 200mL 容ビーカーに移し、精秤します(通常 12~18g)。蒸留水 40mL を加え、ビーカーをラップ等で軽く覆い、電子レンジの最大出力で約45秒間加熱します(温度は80~90 $^{\circ}$ Cに上昇)。サンプルによっては、この処理で均質な溶液になります(透明になる必要はありません)。完全に溶解しない試料の場合、Ultra-turrax[®]または Polytron[®]ホモジナイザー(または同等品)を用いて20秒間ホモジナイズし、ゼリーの粒を完全に分散させます。最少量の蒸留水(約 5mL)でホモジナイザシャフト等を洗浄し、洗液を回収します。2M NaOH 溶液 2.0mL および水素化ホウ素ナトリウム 1g を加え十分に混合し、ドラフト内で室温2時間反応させます(還元糖を糖アルコールに変換)。

NOTE: この反応中並びにその後の酢酸による中和工程で、水素ガスが発生します。従いまして、これらの操作は換気の良いドラフト内で行われることが不可欠です。

溶液を十分に攪拌しながら、2M 酢酸 20mL を注意深く少量ずつ加え、残留する水素化ホウ素ナトリウムを分解します(ビーカーからの「発泡飛沫」による溶液のロスに注意します)。2M HCl で pH を 4.5 に調整します。 β -マンナナーゼ 20 μ L を添加して良く混合し、40 $^{\circ}$ Cで30分間反応させます。2M NaOH で pH を 6.5 に調整後、溶液を 100mL メスフラスコに移し、200mM リン酸緩衝液 (pH6.5) で定容します。十分に混合した後、ワットマン No.1 濾紙で一定量を濾過します。

標準的には、分析に必要な液量は 0.2~0.5mL です。

(d)ゼリー菓子中のグルコマンナンの測定（残糖除去手順3:アルコール沈殿）。

「カップ入ゼリー」1つの内容物全量を、予め計量した 100mL 容ビーカーに移し、精秤します（通常 12~18g）。蒸留水 20mL を加え、ビーカーをラップ等で軽く覆い、電子レンジの最大出力で約45秒間加熱します（溶液が沸騰し始めるまで）。サンプルによっては、この処理で均質な溶液になります（透明になる必要はありません）。このようなサンプルの場合、溶液を 50mL 容メスフラスコに全量移し、蒸留水で定容して良く混合します。メジウム瓶に溶液を保存し、密栓して分析を待ちます。電子レンジで完全に溶解しない試料の場合、Ultra-turrax®または Polytron®ホモジナイザー（または同等品）を用いて20秒間ホモジナイズし、ゼリーの粒を完全に分散させます。最少量の蒸留水でホモジナイザシャフト等を洗浄し、洗液とともに 50mL 容メスフラスコに全量移し蒸留水で定容して良く混合します。

調製したばかりの試料（まだ熱い状態）2mL を、予め秤量したガラス試験管（16×120mm）にポジティブディスプレイメント方式ディスプレインサー（例えば、25.0mL 容の Combitip®を装着した Eppendorf Multipette®）を用いて分注し、ボルテックスミキサー上で激しく攪拌しながら 95% (v/v) エタノール 2mL を添加します。攪拌を続けながら 95% (v/v) エタノールをさらに 6mL、2mL ずつ添加します。2分後、試験管を再度軽く攪拌し、多糖沈殿物に付着した気泡を除きます（遠心分離の際に多糖が沈殿するように）。卓上型遠心分離機で試験管を 1500g、10分間遠心分離します。多糖類沈殿物を試験管底部から動かさない様に注意して水和エタノール上清をデカントします。試験管に 80% (v/v) 水和エタノール 2mL を加え、ボルテックスミキサーで激しく攪拌して、多糖沈殿物を完全に分散させます。さらに 80% (v/v) 水和エタノール 8mL を試験管に添加し、攪拌します。試験管を 1500g で10分間遠心分離し、上清をデカントします。80% (v/v) 水和エタノールで再懸濁させ、遠心分離するこの工程をもう一度繰り返し、上清をデカントします。この操作により分析サンプルからほぼ全ての遊離糖を除去することができます。

試験管に溶液1 (pH 4.5) 2mL を加え、ボルテックスミキサーで激しく攪拌します。試験管を沸騰水浴中で2分間煮沸し、ボルテックスミキサーで攪拌して完全に溶解させます。試験管を40℃の恒温槽に置き、5分間予熱します。β-マンナナーゼ（懸濁液4）20μL を添加し、10分間反応させます。2M NaOH を 0.1mL 添加し、室温で10分間反応させます（グルコマンノオリゴ糖の脱アセチル化）。0.8M HCl を 0.1mL、200mM リン酸緩衝液（pH 6.5）を 1.8mL を加えて pH を約 6.5 に調整します。試験管を秤量し、正確なサンプル量を求めます（通常 4.00mL）。標準的には、分析に必要な液量は 0.1~0.5mL です。

NOTE: グルコマンナンから残糖類を除去するための手順の中で、透析法を推奨します。しかし本法が上手く機能するためには、指定した平面幅の透析膜を使用しなければならず、少なくとも16時間、流水で透析をする必要があります。他の方法ではグルコマンナン含量を 10~20%過小評価する傾向があります。

NOTE: 各種のゼリー菓子について分析すると D-グルコースおよび D-マンノースの双方か、または D-マンノースのみが検出されます。D-マンノースのみが検出される試料では、この糖はβ1,4-D-マンナン由来です。一方 D-グルコースと D-マンノースの双方が検出される場合、これらはグルコマンナン由来です。グルコマンナンの起源原料は、測定された D-グルコースと D-マンノースの比からおおよそ推測することができます。

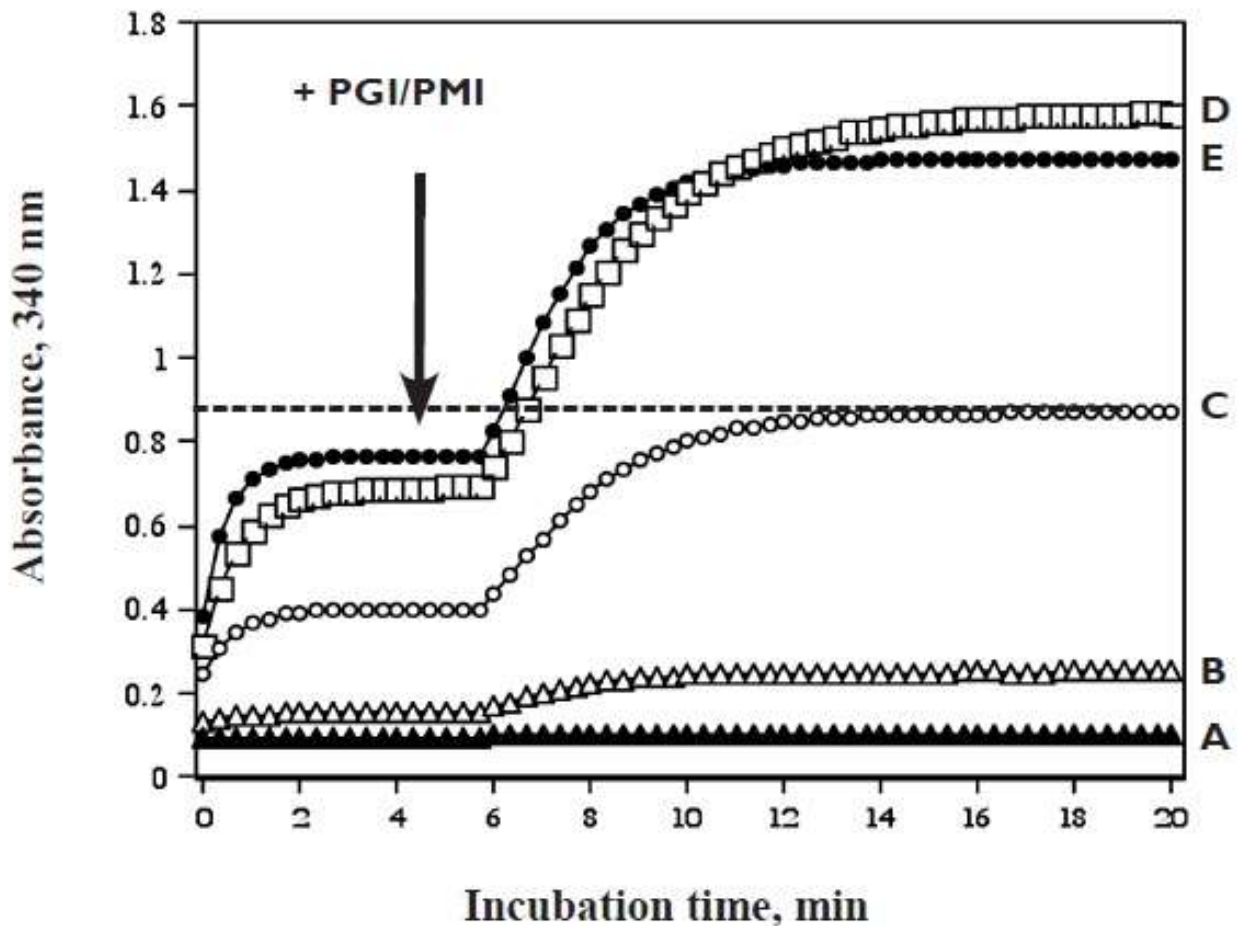


図1. コンニャクグルコマンナン β -マンナーゼ加水分解物中のD-グルコースおよびD-マンノースの測定

HK/G6P-DH(D-グルコース測定用)添加により反応を開始。矢印で示された時点で、PGI/PMI酵素液を加えてM-6-PをF-6-Pに変換し、次いでHK/G6P-DH系によりG-6-Pに変換する。ゼリー菓子のグルコマンナンを手順(b)に従い調製し、反応液の0.1mL(B)、0.5mL(C)、並びに1.0mL(D)添加してD-グルコースおよびD-マンノース含量を分析した。また試料ブランク(A)およびD-グルコース+D-マンノース標準液(各50 μ g)(E)を同時に測定した。

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