

Megazyme

レジスタントスターチ (難消化性澱粉)分析法

RESISTANT STARCH ASSAY PROCEDURE

K-RSTAR 05/19

K-RSTAR
(用手法 100 回分)

AOAC Method 2002.02
AACC Method 32-40.01
Codex Type II Method

日本バイオコン株式会社

はじめに - INTRODUCTION -

定義上、レジスタントスターチ(難消化性澱粉;RS)とは、ヒトの小腸内酵素によって分解されない澱粉のことを示します。これらは大腸内で部分的にまたは完全に発酵されます。一般にRSは、総食物繊維(TDF)を構成する成分の1つであると考えられています。

酵素的加水分解に耐性を示す澱粉画分が存在することは、1982年 Englyst らにより、澱粉以外の多糖類を分析中に発見されました¹。この研究は Berry²に引き継がれ、Englyst ら¹の α -アミラーゼ/プルラーゼ処理を組み込み、生理学的条件をより忠実に模倣するために煮沸工程を廃したRS測定法が開発されました。

これらの条件下で試料中のレジスタントスターチ含量を測定したところ、はるかに高い値を示しました。この発見は、その後 Englyst らによる現在健康な回腸造ろう術患者の研究によって確認されました^{3~5}。

1990 年代初頭までに、RSの生理学的意義は完全に解明されました。欧州の研究プログラム EURESTA では、いくつかの新しい方法や変法が開発されました^{6,7}。Champ 法⁷は、Berry 法²を元にした変法でRSを直接測定するものです。基本的にサンプル量を 10mg から 100mg に増加させ、膵臓 α -アミラーゼのみで消化すること(Englyst¹や Berry²らのような膵臓 α -アミラーゼとプルラーゼの組合せではない)、反応 pH を 6.9 にする(Englyst¹と Berry²では pH5.2)という変更を加えています。RS測定は残渣に対して直接処理しています。Muir と O'Dea は咀嚼されたサンプルをペプシンで処理し、次に膵臓 α -アミラーゼとアミログルコシダーゼの混合物を pH5.0、37°Cで15時間振とう水浴中で処理する手順を開発しました⁸。遠心分離により残渣ペレット(RSを含む)を回収し、酢酸緩衝液で遠心分離洗浄を行なった後、RSを加熱、DMSO及び耐熱性 α -アミラーゼ処理の組合せにより消化します。

近年、Fausant ら⁹、Goni ら¹⁰、Akerberg ら¹¹および Champ ら¹²によって次々改変がなされました。これらの改変内容としては、使用する酵素濃度、酵素のタイプ(何れの場合も膵臓 α -アミラーゼを使用する一方、プルラーゼを除外もしくはアミログルコシダーゼに代替など)、試料の前処理法(チューイング)、反応 pH や α -アミラーゼ処理工程後のエタノールの添加の有無などで、これらの改変は何れもRS測定値にある程度の影響を示します。

RS測定法の改良における我々の目的は *in vivo* 条件を可能な限り反映した生理学的に有意な値を得ることができる、堅牢で信頼できる方法を提供することです(8ページ、表1参照)。これを実現するため、我々は膵臓 α -アミラーゼ濃度、反応 pH、 α -アミラーゼのマルトース阻害の重要性、アミログルコシダーゼの必要性または振盪および攪拌の分析値への影響、およびレジスタントスターチ含有残渣の回収並びに分析における問題など、ありとあらゆる工程を見直しました¹³。

このブックレットに記載されている我々が開発した新しい方法は、試料中のレジスタントスターチ、可溶性澱粉および総澱粉含量の測定を可能にします。24サンプルを24時間以内に分析することが可能です。この分析法は、AOAC インターナショナルと AACC インターナショナルの主催する研究所相互間評価を受け、両協会に AOAC 公式法 2002.02、AACC 法 32-40.01 として承認されました(8ページ、表2参照)¹⁴。

本法の原理 - PRINCIPLE OF THE CURRENT METHOD -

試料に膵臓 α -アミラーゼおよびアミログルコシダーゼ(AMG)を加え、振盪水浴中で37°C、16時間反応させ、可溶性の澱粉を2酵素の相互作用により可溶化し D-グルコースにまで加水分解します。等量のエタノールの添加により反応を停止させ、RSを遠心分離により沈殿として回収します。次に沈殿を 50%v/v エタノール中に懸濁させ2回遠心洗浄し、上清はデカンテーションによって廃棄します。残渣に 2M KOH を加え、氷水浴中でマグネチックスターラーを用い激しく攪拌し

RSを可溶化します。この溶液を酢酸緩衝液で中和し、AMGにより澱粉をグルコースに定量的に加水分解し、グルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ(GOPOD)試薬により測定したD-グルコース量が試料中のRS含量に相当します。可溶性の澱粉は、最初の上清と洗浄液を合せて100mLに定容し、GOPOD試薬でD-グルコース量を測定することで得られます。

適用性と正確性 – APPLICABILITY AND ACCURACY -

この方法は、2% w/w 以上のRSを含有する試料に適用することができます。この場合、±5%の標準誤差が日常的に達成できます。RS含有量が2% w/w 未満の試料では誤差がさらに大きくなります。

キット - KITS -

100 検体のレジスタントスターチ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: アミログルコシダーゼ[12mL、可溶性澱粉に対し 3,300 U/mL(または *p*-ニトロフェニルβ-マルトシド*に対し 200 U/mL)、pH 4.5、40°C]。AMG溶液は検出可能なD-グルコース量を含んでいません。4°Cで3年以上安定です。

* 製品コード:**R-AMGR3**として提供しています。

ボトル2: 膵αアミラーゼ(パンクレアチン、10g、3 Ceralpha U/mg)。
-10°C以下で3年以上安定です。

ボトル3: GOPOD試薬緩衝液。緩衝液(50mL、pH7.4)、*p*-ヒドロキシ安息香酸およびアジ化ナトリウム(0.09% 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+4-アミノアンチピリン。凍結乾燥品。-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: レジスタントスターチ標準品。レジスタントスターチ含有量はラベルに記載。
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. 付属のボトル1 (AMG； 溶液1)をそのまま使用して下さい。
この溶液は粘性があるのでポジティブディスプレイメント方式ディスペンサ、例えば5.0mLのCombitip®を装着したEppendorf Multipipette®を使用して下さい(0.1mL分注)。
4°Cで3年以上安定です。

希釈AMG(300 U/mL)。濃縮AMG溶液(ボトル1)2mLを0.1 M マレイン酸緩衝液(100mM、pH 6.0； 試薬1；提供外の試薬)20mLに加えて11倍希釈します。
5mL(または適量)ずつポリプロピレン容器に小分けにして凍結保存します。
-10°C以下で凍結／融解を繰り返しても5年間安定です。

2. 使用直前に、ボトル2(膵臓α-アミラーゼ)の内容物1gを分取し、マレイン酸緩衝液(100mM、pH6.0； 試薬1；提供外の試薬)100mLに懸濁し、5分間攪拌します。希釈AMG(300 U/mL)1.0mLを加えよく混合します。1,500×g以上で10分間遠心分離し、上清を慎重に分取します。この溶液(溶液2)は調製当日に使用して下さい。

3. ボトル3(GOPOD試薬緩衝液)の内容物全量を蒸留水で 1L に希釈します(溶液3)。

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、0.09% (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°Cで約3ヶ月、-10°C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°C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. ボトル5と6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。

試薬 (提供外の試薬) - REAGENTS (NOT SUPPLIED) -

試薬には分析グレードの純度のものをご使用下さい。

1. マレイン酸ナトリウム緩衝液

(100mM、pH6.0、2mM 塩化カルシウム+0.02% アジ化ナトリウム含有)

マレイン酸 23.2g (Sigma M0375 または同等品) を蒸留水 1600mL に溶解し、4M 水酸化ナトリウム(160g/L) で pH 6.0 に調整します。塩化カルシウム二水和物(CaCl₂·2H₂O) 0.6g とアジ化ナトリウム 0.4g を加えて溶解後、2L に定容します。4°Cで12ヶ月間安定です。

2. 酢酸ナトリウム緩衝液 (1.2M、pH3.8)

蒸留水 800mL に氷酢酸(1.05g/mL) 68.6mL を加え、4M 水酸化ナトリウムを用いて pH3.8 に調整後、蒸留水で 1L に定容します。室温で12ヶ月間安定です。

3. 酢酸ナトリウム緩衝液 (100mM、pH4.5)

蒸留水 900mL に氷酢酸 5.8mL を加え、4M 水酸化ナトリウムを用いて pH4.5 に調整後、蒸留水で 1L に定容します。4°Cで2ヶ月間安定です。

4. 水酸化カリウム溶液 (2M)

蒸留水 900mL を攪拌し、KOH 112.2g を注意しながら(必要なら防護メガネ等を着用) 徐々に添加して溶解します。

1L に定容後、密閉容器に保存します。室温で2年以上安定です。

5. 水性エタノール(約 50%v/v)。

エタノール(95%または 99%v/v) 500mL を蒸留水 500mL に加えます。

密閉容器に入れて保管して下さい。室温で2年以上安定です。

RS含量 0.6~78%の標準品セットをメガザイムから提供しております(K-RSTCL)

機器(推奨):

1. 粉碎ミル- 12 枚歯のロータと 1.0mm の篩、または類似の装置を備えた遠心分離式。サンプルが少量の場合はサイクロンミルを用いることができます
2. ミートミンサー- 手動または電気式、4.5mm のスクリーンを装備しているもの
3. 卓上型遠心分離機- 16×120mm のガラス試験管に対応で約 1,500g(約 3000rpm) が得られるもの
4. 往復振盪型恒温水槽 (Grant OLS200 または同等品)。振盪数: 100 回(往復) / 分、振幅: 35mm、37°C で反応
5. 水浴- 50±0.1°C を維持できるもの
6. ボルテックスミキサー
7. マグネチックスターラー
8. マグネチックスターラーバー - 5×15mm
9. pH メーター
10. 実験室用タイマー (ストップウォッチ)
11. 分析用天秤 (0.1mg の精度)
12. 分光光度計- 510nm の測定が可能で、フローセルが取り付けられていることが望ましい (光路長 10mm)
13. ピペッター- 100μL を分注可能なディスポーザブルチップ対応のもの。もしくは電動式ハンドヘルドディスペンサを使用することも可能
14. ポジティブディスプレイ方式ピペッター- 2.0mL、3.0mL、4.0mL を分注できる 50mL 容のチップを装備しているもの
15. ねじ口付試験管- スクリューキャップ付 16×125mm
[例 フィッシャーサイエンティフィック TKV-173-030B(試験管); TKV-178-020V(キャップ)]
16. ガラス試験管- 16×100mm、14mL 容
17. 試験管立てを入れ、氷水浴として使えるサイズのプラスチック製タッパー等 (図1参照)
18. 温度計- 37±0.1°C、50±0.1°C が測定可能なもの
19. メスフラスコ- 100mL、200mL、500mL、1L および 2L 容量

サンプルの準備:

穀物や凍結乾燥済の植物または食品のサンプル約 50g を粉碎機で粉碎し、1.0mm の篩を通します。全量を広口プラスチック容器に移し、振盪と反転で良く混合します。業務用澱粉調製品は通常、微粉末品が供給されるので粉碎の必要はありません。サンプルが水分の多い試料の状態 (例: 缶詰の豆、バナナ、ジャガイモ) の場合、手動または電動肉ミンサーで挽き、約 4.5mm のスクリーンを通過させます。乾燥試料の場合、AOAC 法 925.10 (15) により、水分の多い試料の場合 AOAC 法 925.10 に基づく凍結乾燥後のオープンによる乾燥により、それぞれ水分含有量を測定します。

分析手順: - ASSAY PROCEDURE -

(a) 可溶性の澱粉の加水分解

- i. ネジ口試験管 (16 x 125mm) にサンプル 100±5mg を精秤し、試験管の底を軽く叩いて、サンプルを試験管の底に落とします。

NOTE: 缶詰の豆や食品等、水分の多いサンプルの場合は、約 0.5g を精秤します。これらのサンプルでは、水分は通常 60~80% です。

- ii. 各試験管に AMG (3U/mL) (溶液2) 含有膵臓 α -アミラーゼ溶液 (10mg/mL) 4.0mL を添加します。
- iii. 試験管の蓋をしっかりと締めボルテックスミキサーで混合し、振盪恒温槽中に振盪方向と水平に取り付けます (7ページ、図2と3参照)。
- iv. 37°Cで連続振盪 (100ストローク (往復) /分) しながら**正確に16時間**反応させます。
- v. 水槽から試験管を取り出し、ペーパータオルで表面の余分な水をふき取ります。試験管の蓋を取り外し、ボルテックスミキサーで激しく攪拌しながら **99%v/v** エタノールを 4.0mL 加えます。
- vi. 蓋を外して試験管を 1,500g (約 3,000rpm) で10分間遠心分離します。
- vii. 慎重に上清をデカンテーションし、**50%エタノール 2mL** をボルテックスミキサーで激しく攪拌しながら加え、沈殿を再懸濁させます。さらに **50%エタノール 6mL** を加え試験管を攪拌し、**1,500×g** で10分間、再び遠心分離します。
- viii. 上清をデカンテーションし、この遠心洗浄工程をもう一度繰り返します。可溶性の澱粉を測定する際は、この上清と2回の洗浄液を回収しておきます。
- ix. 上清を慎重にデカンテーションし、吸水紙の上に試験管を逆さにし上清を極力除去します。

(b) レジスタントスターチの測定

- i. 各試験管にスターラーバー (5 x 15mm) を入れ、氷水浴中で攪拌しながら 2M KOH 2mL を添加し、約20分間攪拌して沈殿を再懸濁しRSを溶解します (6ページ、図1)。

NOTE :

1. ボルテックスミキサーでの混合は、澱粉が乳化する原因となるので使用しないで下さい。
2. KOH溶液を添加する際に試験管内容物が十分に攪拌されていることを確認して下さい。これにより澱粉が固まって溶けづらくなることを防ぎます。

- ii. マグネチックスターラー上で攪拌しながら、各試験管に 1.2M 酢酸緩衝液 (pH3.8) 8mL を加えます。ただちにAMG溶液 (溶液1, 3,300 U/mL) 0.1mL を添加し、良く混合した後、試験管を50°Cの恒温槽に入れます。
- iii. ボルテックスミキサーで時折り混合しながら30分間反応させます。
- iv. **RS含量が10%以上の試料の場合**； 洗瓶を用い、試験管の内容物を 100mL メスフラスコに全量移します。磁石を用いスターラーバーを試験管内に留めたまま、洗瓶で試験管に残る反応液を洗い出します。蒸留水で 100mL に定容し、よく混合した後、溶液の一部を 1,500g で10分間遠心分離します。
- v. **RS含量が10%以下の試料の場合**； 試験管からスターラーバーを取り出すか、一部を別の試験管 (または遠心チューブ) に取り、1,500g で10分間遠心分離します (希釈はしません)。乾燥したサンプルの場合、試験管内の最終容積は通常 10.3mL です。
水分を含むサンプルの場合、20mL メスフラスコに移し定容するもしくは容量補正など、適切な補正手段が必要です。
- vi. 工程 iv または v で得られた上清サンプル 0.1mL をガラス試験管 (16×100mm) に2連で分取し、GOPOD試薬 (溶液4) 3.0mL を加え、50°Cで20分間反応させます。
- vii. 反応液を試薬ブランクに対して 510nm の吸光度を測定します。

(c) 通常(可溶性)澱粉の測定

- i. 最初の反応の遠心分離で得られた上清液[5ページ、(a) vii]と、その後2回の50%エタノール洗浄上清[5ページ、(a) viii と(a) ix]と合わせて 100mL 容メスフラスコに移し、100mM 酢酸ム緩衝液(pH4.5)で定容し、良く攪拌します。
- ii. 希釈液 0.1mL を2連で分取し、希釈AMG溶液(300U/mL; 100mM マレイン酸緩衝液、pH 6.0) 10 μ L を加え、50 $^{\circ}$ Cで20分間反応させます。
GOPOD試薬(溶液4) 3.0mL を添加し、50 $^{\circ}$ Cでさらに20分間反応させます。
- iii. 試薬ブランクに対し、510nm での吸光度を測定します。
- iv. 可溶性の澱粉含量を計算します。

総澱粉量はレジスタントスターチ量と可溶性の澱粉量の合計です

試薬ブランクを準備 :	100mM 酢酸緩衝液(pH 4.5) 0.1mL+GOPOD試薬 3mL
グルコース標準液を準備 (4 連) :	D-グルコース(1 mg/mL) 0.1mL+GOPOD試薬 3mL



図1.
2M KOHによるRS可溶化処理時の
マグネティックスターラーと氷冷水浴
の状況

計算 - CALCULATIONS -

サンプル中のレジスタントスターチ可溶性の澱粉、総澱粉量(乾物当たり%)の計算方法は以下の通り。

$$\begin{aligned} & \text{レジスタントスターチ(g/試料 100g) (RS含量10\%以上):} \\ & = \Delta E \times F \times 100/0.1 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180 \\ & = \Delta E \times F/W \times 90 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{レジスタントスターチ(g/試料 100g) (RS含量10\%以下):} \\ & = \Delta E \times F \times 10.3^*/0.1 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180 \\ & = \Delta E \times F/W \times 9.27^* \end{aligned}$$

* 水分の多いサンプルでは適宜補正して下さい

$$\begin{aligned} & \text{通常(可溶性)澱粉(g/試料 100g):} \\ & = \Delta E \times F \times 100/0.1 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180 \\ & = \Delta E \times F/W \times 90 \end{aligned}$$

$$\text{総澱粉量} = \text{レジスタントスターチ} + \text{可溶性の澱粉}$$

ここで:

- ΔE = 試薬ブランクに対する反応液の吸光度
- 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)
- 100/0.1 = 容量の換算 (100mL から 0.1mL 分取)
- 1/1000 = $\mu\text{g} \rightarrow \text{mg}$ 換算
- W = サンプルの乾物重量
= “有姿重量” $\times [(100 - \text{水分}) / 100]$
- 100/W = サンプル重量当たりのRS量への換算
- 162/180 = グルコースのアンヒドログルコース(澱粉内の構造様式)換算
- 10.3/0.1 = RS含量10%以下の場合の容量換算(10.3mL から 0.1mL 分取)
サンプルは希釈されていないため最終容量は約 10.3mL となります。
水分の多いサンプルを測定する際は容量はこれより多くなりますので、定容等の操作を行ない、計算式はそれに応じて修正して下さい。

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。

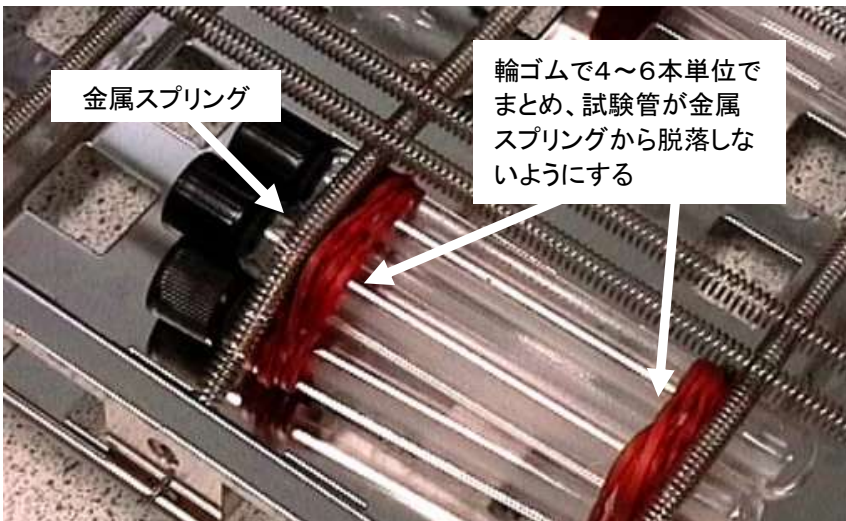


図2. 試験管の振盪型恒温槽トレイへの固定状況(接写)

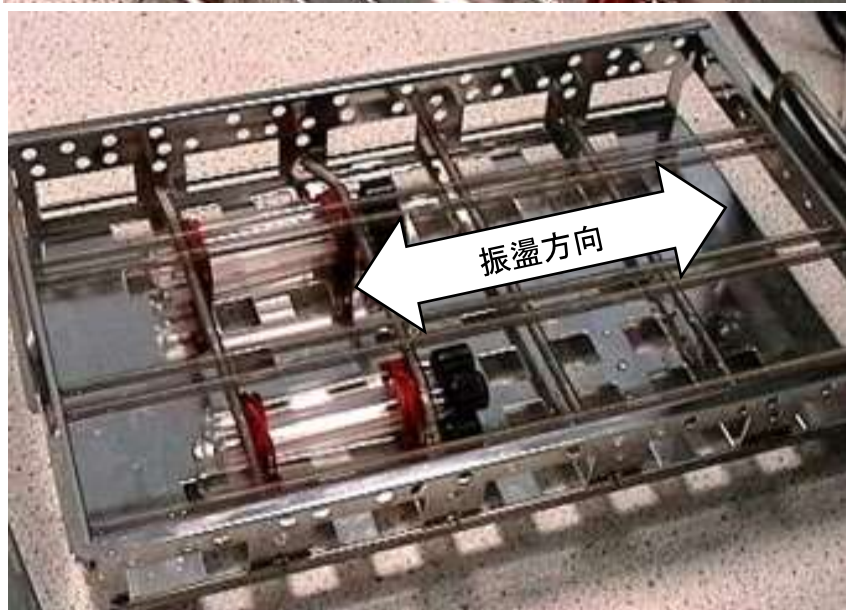


図3. 試験管の振盪型恒温槽トレイへの固定状況

表1. 各種 *in vitro* 分析法で得られたRS分析値の *in vivo* 結果との比較

澱粉起源	RS (<i>in vitro</i> 分析法と結果) ^a					RS (<i>in vivo</i>)
	Englyst	Faisant	Champ	McCleary	Goni ^b	
馬鈴薯澱粉(非加熱)	66.5	83	77.7	77	-	78.8
高アミロース澱粉(非加熱)	71.4	72.2	52.8	51.7	-	50.3
高アミロース澱粉(老化)	30.5	36.4	29.6	42.0	37.8 ^b	30.1
豆フレーク	10.6	12.4	11.2	14.3	15.3 ^c	9-10.9
コーンフレーク	3.9	4.9	4.3	4.0	4.7 ^c	3.1-5.0
缶詰豆	17.1	-	17.1	16.5	-	16.5
ActiStar TM (タピオカ製レジスタントスターチ) ^d	63 ^d	-	57 ^d	58.0	57 ^d	54 ^d

a 分析値はサンプル中の澱粉総量当たりのパーセンテージ。McCleary 以外のデータは、Goni ら(10) および ActiStarTM は Champ ら(16) の情報に基づく。

b ゴニ(Goni)ら(10)。

c ゴニ(Goni)ら(10)。(当社内の分析結果から豆フレークの澱粉含量を 40%、コーンフレークの澱粉含量を 70%と夫々仮定して、RSを澱粉総量のパーセンテージとして算出。

d 当社内で分析した McCleary の分析値を除き、Bernd Kettlitz 氏(Cerestar 社、ベルギー)から提供されたものです。「Englyst」データは Englyst Carbohydrate Services 社、「Champ」データはINRA研究所(フランス)、「Goni」データは Cerestar 社(ベルギー)の結果に基づきます。

表2. 各種澱粉試料の酵素消化によるレジスタントスターチ分析
(AOAC/AACC分析機関相互の分析結果)

サンプル	平均 RS% ^a	分析機関 数 ^b	S _r	S _R	RSD _r %	RSD _R %	r ^c	R ^d	HorRat ^f
Hylon VII TM (HAMS) ^e	46.29	37(0)	1.91	3.87	4.12	8.37	5.34	10.84	3.72
未熟バナナ	43.56	36(1)	1.39	3.69	3.18	8.47	3.88	10.34	3.74
生馬鈴薯澱粉	63.39	35(2)	2.66	3.77	4.20	5.94	7.45	10.54	2.77
CrystaLean TM , (老化HAMS) ^e	39.04	34(3)	0.77	2.00	1.97	5.13	2.15	5.61	2.23
ActiStar TM , RS	48.28	36(1)	1.12	2.81	2.32	5.83	3.14	7.87	2.61
インゲン豆(缶詰)	4.66	35(2)	0.11	0.21	2.42	4.58	0.32	0.60	1.44
コーンフレーク	2.20	34(3)	0.08	0.24	3.43	10.9	0.21	0.67	3.08

a 有姿当たりの分析値(バナナ、インゲン豆、コーンフレークは凍結乾燥品の意味)

b 共同分析機関数(統計から外した機関数)

c $r = 2.8 \times S_r$

d $R = 2.8 \times S_R$

e ハイアミロース・トウモロコシ澱粉

f 化学物質分析法の性能指標の一つ。実験で求めた相対標準偏差と、計算式から求めた相対標準偏差の予測値の比。再現性試験の妥当性評価法として用いられる。

文献

1. Englyst, H., Wiggins, H. L. & Cummins, J. H. (1982). *Analyst*, **107**, 307-318.
2. Berry, C. S. (1986). *J. Cereal Sci.*, **4**, 301-314.
3. Englyst, H. N. & Cummins, J. H. (1985). *Am. J. Clin. Nutr.*, **42**, 778-787.
4. Englyst, H. N. & Cummins, J. H. (1986). *Am. J. Clin. Nutr.*, **44**, 42-50.
5. Englyst, H. N. & Cummins, J. H. (1987). *Am. J. Clin. Nutr.*, **45**, 423-431.

6. Englyst, H. N., Kingman, S. M. & Cummins, J. H. (1992). *European J. Clin. Nutr.*, **46 (Suppl. 2)**, S33-S50.
7. Champ, M. (1992). *Eur. J. Clin. Nutr.*, **46 (Suppl. 2)**, S51-S62.
8. Muir, J. G. & O'Dea, K. (1992). *Am. J. Clin. Nutr.*, **56**, 123-127.
9. Faisant, N., Planchot, V., Kozlowski, F., Pacouret, M. -P., Colonna, P. & Champ, M. (1995). *Sciences des Aliments*, **15**, 83-89.
10. Goni, I., Garcia-Diz, E., Manas, E. & Saura-Calixto, F. (1996). *Fd. Chem.*, **56**, 445-449.
11. Akerberg, A. K. E., Liljberg, G. M., Granfeldt, Y. E., Drews, A. W. & Bjorck, M. E. (1998). *Am. Soc. Nutr. Sciences*, **128**, 651-660.
12. Champ, M., Martin, L., Noah, L. & Gratas, M. (1999). "Complex Carbohydrates in Foods" (S. S. Cho, L. Prosky & M. Dreher, Eds.), pp.169-187, Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
13. McCleary, B. V. & Monaghan, D. A. (2002). *J. AOAC International*, **85**, 665-675.
14. McCleary, B. V., McNally, M. & Rossiter, P. (2002). *J. AOAC International*, **85**, 103-1111.
15. Official Methods of Analysis (2000). **17th Ed.**, *AOAC INTERNATIONAL*.
16. Champ, M., Kozlowski, F. & Lecannu, G. (2000). "Advanced Dietary Fibre Technology" (B. V. McCleary & L. Prosky, Eds.), pp 106-119, Blackwell Science Ltd., Oxford, UK.

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 : bj-megazyme@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