

食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル

平成22年3月作成

四国地域イノベーション創出協議会
地域食品・健康分科会 編

s-food@m.aist.go.jp

裸麦の β -グルカン

作成者：愛媛県産業技術研究所

食品産業技術センター 主任研究員 森本 聡

主任研究員 大野一仁

1. 裸麦について

1. 1 概要

愛媛県では、裸麦の生産が盛んに行われておりその生産量は日本一を誇っている。裸麦は大麦の一種で、大麦はビールやしょうちゅうの原料となる二条大麦と麦茶や押し麦（麦飯）、麦みその原料となる六条大麦があり、この中でさらに皮麦と裸麦に分類される。また、裸麦は比較的耐寒性が弱いので、四国・中国・九州など瀬戸内地方を中心とした比較的温暖で降水量の少ない地域での栽培が多く、六条大麦の栽培は関東以北に多いのが特徴である。

1. 2 食品あるいは含有成分の機能性

β -グルカンは、免疫力や抵抗力を高める作用と体内のがん細胞や感染細胞を攻撃したりする作用があるといわれている。健康食品において、 β -グルカンといえば、 β -(1 \rightarrow 3)-D-グルカンというタイプの β -グルカンが免疫賦活作用やガンに対する予防効果、抑制効果などの効能が認められており、一般に β -グルカンとはこの種類を指します。一般の人が免疫賦活作用や抗がん作用を示すキノコ類の有効成分と答えるほど知名度は高い。免疫力の向上により、アレルギー反応の沈静化、血糖値を下げる、血圧を抑える、腸を刺激して便通をよくする作用、コレステロール値を低下させる働きなどがあるとされている。

また、愛媛県においては県産裸麦を主原料として用いた「麦みそ」の生産が盛んであり、麴歩合が高い甘口のみそとして特徴あるものとなっている。加えて愛媛県では、こだわりの製法で醸造された良質な麦みそを「愛あるブランド産品」として認定している。あわせて、この裸麦をパンやケーキの原材料の一部として用い、特色のある加工食品が各地で販売されている。



裸麦栽培の様子



裸麦を使った加工食品（試作品）
（食パン、クッキー、餅菓子など）

写真 1 - 1 裸麦および加工食品

1. 2. 1 β -グルカン類を含む食品

キノコ類には、アガリクス茸、まいたけ(舞茸)、干し椎茸、しめじ、ハナビラタケ、メシマコブ、カバノアナタケなどがある。酵母類には、パン酵母、黒酵母、オーツ麦、大麦などがある。海藻類には、フコイダンなどがある。

2. β -グルカンについての説明

グルカンとは、D-グルコースがグリコシド結合でつながったポリマーである。一つのグルカンの中に二つの結合様式が混在することはあるが、 α 型と β 型が混在することはなく、それぞれ α -グルカン、 β -グルカンといわれている。天然に最も多く存在する多糖類である。

3. 定量分析の方法について

大麦、小麦等穀物中に含まれる(1,3)(1,4) β -グルカンの測定に多用されている分析法は、酵素を用いた McCleary 法と呼ばれ比較的簡単に測定が可能である。この分析法は AACC(American Association of Clinical Chemists)、EBC(European Brewing Convention)、AOAC(Association of Official Chemists)、RACI(Royal Australian Chemical Institute)標準法等で認められている。

β -グルカン量は試料を粉碎したのち緩衝液で懸濁、リケナーゼを反応させて β -グルコオリゴ糖に分解、さらに β -グルコシダーゼを作用させ生成したグルコース量を測定し計算により算出される。酵素法を用いる β -グルカン量の測定方法について述べる。

3. 1 準備する器具など

1. 電子天秤 (0.1mg が精秤できるもの)
2. 電子天秤 (200g 以上が精秤できるもの)
3. 葉さじ
4. ビーカー
5. メスシリンダー
6. メスフラスコ
7. ふるい (0.5mm)
8. pH計
9. マイクロピペット (5ml、1ml、0.2ml 容量可変のもの) およびピペットチップ
10. コニカルチューブ (15ml 容、耐熱性のあるもの)
11. 恒温水槽 (40℃で保持可能、振とう機能があるとベター)
12. 恒温水槽もしくはガスコンロ (100℃、沸騰したまま保持可能)
13. ボルテックスミキサー
14. 遠心分離機 (1,000g)
15. ストップウォッチ
16. マグネチックスターラー
17. クラッシュアイス
18. 分光光度計 (510nm での測定が可能なもの)
19. キュベット (光路長 10mm)
20. 穀物粉碎用ミル

[試薬]

1. 99.5%エタノール(試薬特級)
2. リン酸二水素ナトリウム (二水和物 M.W 156.01) (試薬特級)
3. リン酸水素二ナトリウム (12 水和物 M.W 358.14) (試薬特級)
4. 酢酸(試薬特級)
5. 水酸化ナトリウム (無水) (試薬特級)
6. 蒸留水
7. β -グルカン測定キット (MIXED LINKAGE BETA-GLUCAN ASSY KIT) (日本バイオコン株式会社製)
(リケナーゼ溶液、 β -グルコシダーゼ溶液、グルコース測定試薬、グルコース試薬緩衝液、標準グルコース溶液、標準大麦粉繊維、標準オーツ麦繊維)

3. 2 試薬の調製

1. エタノール水溶液 (50% V/V)
99.5%エタノール 50ml と蒸留水 50ml を混合する。
2. 20mM リン酸緩衝液 (pH6.5)
20mM リン酸二水素ナトリウム溶液 (3.12g/l) と 20mM リン酸水素二ナトリウ

ム溶液 (7.16g/L) を約 7:3 の割合で混合、pH が 6.5 となるよう調整する。

3. 0.2M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0)

蒸留水約 900ml に 11.6ml の酢酸を加え混合、2M 水酸化ナトリウム溶液 (8.0g/l) で pH4.0 に調整したのち 1L にメスアップする。

4. 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0)

蒸留水約 900ml に 2.9ml の酢酸を加え混合、1M 水酸化ナトリウム溶液 (4.0g/l) で pH4.0 に調整したのち 1l にメスアップする。

5. β -グルカン測定キット

(ボトル 1) リケナーゼ

試薬 2 を加えて 20ml とする。100 検体分となるため、当日必要でないものは小分けにし、 -20°C で凍結保存し要時解凍して使用。 (-20°C で 2 年以上安定)

【溶液 1】

(ボトル 2) β -グルコシダーゼ

試薬 4 を加えて 20ml とする。100 検体分となるため、当日必要でないものは小分けにし、 -20°C で凍結保存し要時解凍して使用。 (-20°C で 2 年以上安定)

【溶液 2】

(ボトル 3) グルコースオキシダーゼ・ペルオキシダーゼ緩衝液

蒸留水を加えて 1L とする。ボトル 4 の酵素溶解に使用。

【溶液 3】

(ボトル 4) グルコースオキシダーゼ・ペルオキシダーゼ

溶液 3 を加え、凍結乾燥物を溶解させ 1L の酵素溶液とする。 (遮光ガラス瓶もしくは、アルミニウム箔で遮光して冷蔵保存、 $2\sim 5^{\circ}\text{C}$ で 3 ヶ月間安定)

【溶液 4】

(ボトル 5) グルコース標準液 (1.0mg/ml)

(ボトル 6) 標準大麦粉

(ボトル 7) 標準オーツ麦

3. 3 分析用試料の前処理・調整方法および分析方法

- (1) 試料を粉砕用ミル等を用い粉砕し 0.5mm 以下にする。
- (2) コニカルチューブに約 100mg を精秤する。
- (3) 0.2ml のエタノール水溶液 (50% V/V) を加え試料を分散させ、さらに 20mM リン酸緩衝液 (pH6.5) を 4.0ml 加えしっかりと栓をして、ボルテックスミキサーを用いてよく攪拌する。
- (4) 直ちにチューブを沸騰水浴中に入れ 60 秒間保持した後ボルテックスで攪拌、再度沸騰水浴中で 2 分間保持する。
- (5) チューブを 40°C 恒温水槽に入れ保温した後、酵素溶液【溶液 1】を 0.2ml 加えボルテックスで混合。 40°C 恒温水槽にて 1 時間保持する。(適宜攪拌する)
- (6) 0.2M 酢酸緩衝液 (pH4.0) を 5.0ml 加え混合し室温まで冷却する。
- (7) 遠心分離 (1,000g、10min) し、上清を 0.1ml ずつ 3 本のコニカルチューブに

分注する。

- (8) β -グルコシダーゼ (50mM 酢酸緩衝液、pH4.0) 溶液【溶液 2】を 0.1ml 加える。この時、酵素溶液を 2 本のチューブに入れ (反应用)、残りの 1 本 (ブランク) には酢酸緩衝液 (試薬 4) のみを加える。
- (9) 40℃で 10 分間反応させる。
- (10) グルコースオキシダーゼ・ペルオキシダーゼ混合試薬【溶液 4】を 3.0ml ずつ 3 本のコニカルチューブにそれぞれ加え、40℃で 20 分間反応させる。
- (11) 室温に冷却し、1 時間以内に分光光度計を用いて 510nm の吸光度を測定する。
- (12) 以下により D-グルコースの検量線の作成を行う。

	①	②	③
D-グルコース標準液 (1.0mg/ml)	0.00ml	0.05ml	0.10ml
酢酸緩衝液 (pH4.0)	0.10ml	0.05ml	0.00ml
蒸留水	0.10ml	0.10ml	0.10ml
GOD・POD 混合試薬【溶液 4】	3.00ml	3.00ml	3.00ml

4. 分析例と定量分析結果

4. 1 分光光度計による分析例

β -グルカンの定量には標準溶液を用いて作成した D-グルコースの検量線から濃度を算出する。以下に典型的な検量線を示す。

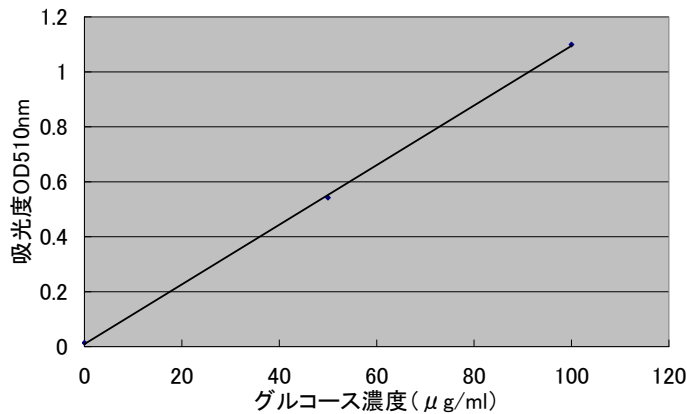


図 4. 1 - 1 D-グルコースの検量線

4. 2 計算式

$$\begin{aligned} \beta\text{-グルカン (g/100g)} &= \Delta A \times F \times 94 \times (1/1000) \times (100/W) \times (162/180) \\ &= \Delta A \times 8.46 \times F / W \end{aligned}$$

ΔA : サンプルの吸光度 - ブランクの吸光度

F : 100 / (グルコーススタンダードの吸光度 - 試薬ブランクの吸光度)
94 : 総液量
W : 試料の乾燥重量 (mg)

5. 食品の分析結果例

上記手法を用いて、大麦の一種である「裸麦」と裸麦を原料として用いた食品中のβ-グルカンの定量分析を行った。その結果を下記に示す。

表5-1 裸麦と裸麦利用食品のβ-グルカン含量

試料名	β-グルカン含量 (g/100g)
マンネンボシ (裸麦品種)	4.8
イチバンボシ (裸麦品種)	4.2
パン*	1.6
クッキー*	2.5

※原料の一部に裸麦を使用

6. 分析上の留意、注意点

1. 分析方法(4)において沸騰水浴中で加熱を行う際、混合が不十分であると「ダマ」が生じることで均一な溶液とならず、分析結果にばらつきが生じるため、溶液に均一に分散するように気をつけること。
2. 麦を含む食品(パンなど)に含まれるβ-グルカンを分析する際には、油脂分を前処理によって除く必要がある。また、麦の含量が少ない時など検量線から外れる際には適宜液量を変更すると良い。

7. その他

特になし。

8. 定量法に関する引用・参考文献

1. McCleary, B. V. and 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.

—以上—

[トップページに戻る](#)