

乾燥キクラゲのβ-グルカン

作成者：香川県産業技術センター 主席研究員 田村 章  
主席研究員 佐々原 浩幸

## 1. キクラゲについて

### 1.1 概要

キクラゲ（木耳）は、キクラゲ目キクラゲ科キクラゲ属のキノコであり、春から秋にかけて、広葉樹のニワトコ、ケヤキなどの倒木や枯れ枝に発生する。主に、日本と中国で食用とされており、乾燥品として流通している。中華料理では、一般的な素材であるが、独自の歯ざわりが好まれることから佃煮としても販売されている。佃煮としてのキクラゲは、生姜、昆布ともに醤油、砂糖、ソルビット、調味料、酸味料、甘味料、増粘多糖類等を添加し製造されている。図1. 1-1にキクラゲを使用した佃煮製品を紹介する。



図1. 1-1 キクラゲ入り佃煮

### 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、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。

### 1. 2. 1 $\beta$ -グルカンを含む食品

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. $\beta$ -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、 $\alpha$ 型と $\beta$ 型が混在することはない、それぞれ $\alpha$ -グルカン、 $\beta$ -グルカンといわれている。天然に最も多く存在する多糖である。鎖のように手をつなぐ側鎖の多さが特徴であり、図2-1に構造式（一部）を示す。

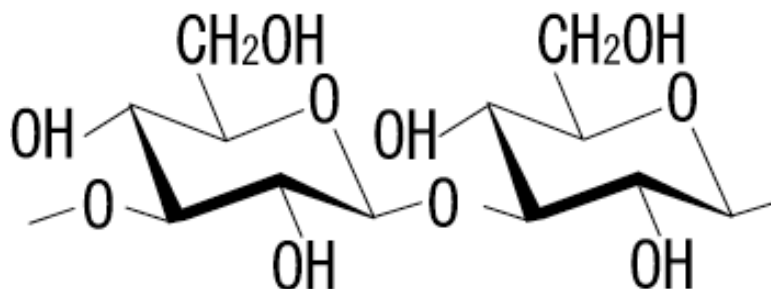


図2-1  $\beta$ -グルカンの構造式（一部）

### 3. 定量分析の方法について

キノコ類に含まれる $\beta$ 型グルカン量<sup>1)</sup>の測定に多用されている主な測定法は「酵素法」と呼ばれているもので、これは全グルカン量から、 $\alpha$ -グルカン量を差し引いた値として算出される。酵素法を用いる $\beta$ -グルカン量の定量方法について述べる。

#### 3. 1 準備する器具など

1. 電子天秤（300g以上測定できるもの）
2. スプーン
3. ビーカー（20mL容、200mL容、1L容）
4. メスフラスコ（1L容、50mL容）
5. pHメーター
6. こまごめピペット（5mL容）
7. メスシリンダー（100mL容）
8. マイクロピペット（10mL容、1mL容、0.1mL容）
9. 冷凍保存容器（2mL容程度）

10. ホモジナイザー
11. 篩 (0.5mm)
12. 電子天秤 (少数点以下 4 桁まで測定できるもの)
13. 薬包紙
14. ミクロスパーテル
15. コニカルチューブ (15mL 容)
16. ボルテックスミキサー
17. 恒温槽
18. 試験管立て
19. ガスコンロ
20. ナベ
21. ロート
22. 遠心分離機
23. 試験管 (16φ10cm)
24. セル
25. 分光光度計
26. スターラーバー (1cm)
27. マグネチックスターラー
28. 氷浴できる容器

[試薬]

1. 濃塩酸 (特級)
2. 水酸化カリウム (特級)
3. 酢酸 (特級)
4. 水酸化ナトリウム (特級)
5. イーストβ-グルカン測定キット (日本バイオコン株式会社製) (exo-1,3β-グルカナーゼ・β-グルコシダーゼ溶液、グルコースオキシダーゼ・ペロキシダーゼ溶液、アミログルコシダーゼ・インベルターゼ、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、標準酵母β-グルカン)

### 3. 2 試薬の調製

1. 2N KOH  
KOH 112g を水 800ml に溶かして 1L にする。
2. 200mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH5.0  
水 900mL に 11.6ml の酢酸を加え、4M (16g/100mL) 水酸化ナトリウムで pH5.0 にし、1L にする。4°C で保存する。
3. 1.2M 酢酸緩衝液 pH3.8  
水 800mL に 69.6mL の酢酸を加え、4M 水酸化ナトリウムで pH3.8 にし、1L にする。室温で保存する。
4. イーストβ-グルカン測定キット  
・exo-1,3-βグルカナーゼ及びβグルコシダーゼ (ボトル1) は、8mL の 200mM

- 酢酸ナトリウム (pH5.0) を加える。小分けし、 $-20^{\circ}\text{C}$  で 2 年間安定である。
- ・アミログルコシダーゼ/インベルターゼ混合液 (ボトル 2) は、 $4^{\circ}\text{C}$  で 2 年間安定である。
  - ・(ボトル 3) は、蒸留水で 1L にする。 $4^{\circ}\text{C}$  で 2 年間安定である。
  - ・(ボトル 4) は、ボトル 3 を 1L にした中に溶かす。 $4^{\circ}\text{C}$  で 2~3 ヶ月、 $-20^{\circ}\text{C}$  で 12 ヶ月安定である。
  - ・(ボトル 5) は、室温で 4 年間安定である。
  - ・(ボトル 6) は、室温で 5 年間安定である。

### 3. 3 分析用試料の前処理・調製方法及び酵素法による分析方法

#### 3. 3. 1 全グルカン ( $\alpha$ -グルカン+ $\beta$ -グルカン) オリゴ糖中の D-グルコース、ショ糖と遊離の D-グルコースの測定

##### (1) 全グルカン ( $\alpha$ -グルカン+ $\beta$ -グルカン) オリゴ糖中の D-グルコース、ショ糖と遊離の D-グルコースの溶解と部分分解処理

- ① 試料を 0.5mm 以下に粉砕する。
- ② 粉砕した試料約 50mg を 15mL 容のコニカルチューブに精秤し、タッピングによって試料をチューブ底に落とす。  
\*このとき、キットに同封されている Yeast glucan (ボトル 6) 約 100mg をポジティブコントロールとして測定する。(試料と同じ実験操作を行い、正確に測定されていることを確認するため)
- ③ 0.75mL の濃塩酸を添加し、キャップを閉めボルテックスミキサーで激しく攪拌する。その後、 $30^{\circ}\text{C}$  の恒温槽中で 45 分間保持する。  
この間、15 分ごとにボルテックスミキサーで混合する。
- ④ この後、5mL の蒸留水を加え、キャップを閉めボルテックスミキサーで混合する。
- ⑤ キャップを少し緩めて沸騰湯浴中に浸け、5 分後キャップを閉めて、さらに 2 時間保持する。
- ⑥ チューブを取り出し室温まで冷却した後、注意してキャップを開き、5mL の 2N KOH を加える。
- ⑦ チューブ内容物を定量的に 50mL のメスフラスコに 200mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH5.0 で洗いこむ。反転混合する。
- ⑧ 懸濁物を遠心分離 (1500g 10 分間) で除く。

##### (2) 全グルカン、オリゴ糖中の D-グルコース、ショ糖と遊離の D-グルコースの定量

- ① 遠心分離した溶液 0.1mL をそれぞれ 2 本の試験管 (16 $\phi$  10cm) の底に採取する。
- ② さらに 0.1mL の exo-1,3- $\beta$  グルカナナーゼ及び  $\beta$  グルコシダーゼ (ボトル 1) の入った 200mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH5.0 を上記試料の入った各々の試験管底付近に添加し、ボルテックスミキサーで混合する。これを  $40^{\circ}\text{C}$  で 60 分間保持する。
- ③ 3.0mL のグルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ試薬 (ボトル 3・4) を添加し、穏やかに混合した後、 $40^{\circ}\text{C}$  で 20 分間保持する。

\* 試薬のブランク及び D-グルコース (ボトル 5) の標準試料を同時に測定する。

試薬ブランクは 0.2mL の 200mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH5.0 に 3.0mL のグルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ試薬を添加したものである。

D-グルコースの標準は、0.1mL の D-グルコース標準溶液に 0.1mL の 200mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH5.0、3.0mL のグルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ試薬を添加したものである。

- ④ それぞれの試験管の 510nm の吸光度を測定する。

### 3. 3. 2 $\alpha$ -グルカン（植物性グリコーゲン+デンプン）、シヨ糖由来の D-グルコースと遊離の D-グルコースの測定

#### (1) $\alpha$ -グルカンの溶解、加水分解と定量、シヨ糖由来の D-グルコース及び遊離の D-グルコースの定量

- ① 粉碎した試料およそ 50mg を精秤し、15mL 容のコニカルチューブに入れタッピングによって試料をチューブ底に落とす。
- ② コニカルチューブに 1cm の長さのスターラーバーを入れた後、1mL の 2M KOH を加え、マグネチックスターラーの上に置いた氷浴中で、およそ 20 分間ペレットを懸濁する。
- ③ 混合を続けながら、4mL の 1.2M 酢酸緩衝液 pH3.8 を加える。すばやく、0.1mL のアミログルコシダーゼ/インベルターゼ混合液（ボトル 2）を添加し、よく混合した後、40℃の恒温槽に浸ける。
- ④ 時々、ボルテックスミキサーで混合しながら、40℃で 30 分間保持する。
- ⑤  $\alpha$ -グルカン含量が<10%である場合  
コニカルチューブを 1500g で 10 分間遠心分離する。
- ⑤  $\alpha$ -グルカン含量が>10%である場合  
コニカルチューブ内容物を定量的に 50mL のメスフラスコに蒸留水で洗いむ。反転混合する。懸濁物を遠心分離（1500g 10 分間）で除く。
- ⑥ 0.1mL をそれぞれ 2 本の試験管（16φ10cm）の底に採取し、3.0mL のグルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ試薬（ボトル 3・4）を添加し、穏やかに混合した後、40℃で 20 分間保持する。
- ⑦ それぞれの試験管の 510nm の吸光度を測定する。

試薬ブランクは 0.1mL の 1.2M 酢酸緩衝液 pH3.8 に 3.0mL のグルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ試薬を添加したものである。

D-グルコースの標準は、0.1mL の D-グルコース標準溶液に 3.0mL のグルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ試薬を添加したものである。

## 4. 分析例と定量分析結果

### 4. 1 計算式

全グルカン量 (g/100g)

$$= (\text{試料吸光度} / \text{標準吸光度}) \times 100 \times (50 / 0.1) \times 1 / 1000 \times (100 / W) \\ \times (162 / 180)$$

$\alpha$  グルカン量 (g/100g)

$$= (\text{試料吸光度} / \text{標準吸光度}) \times 100 \times (5.1 / 0.1) \times 1 / 1000 \times (100 / W) \\ \times (162 / 180)$$

試料吸光度：実測値－ブランク値

標準吸光度：実測値－ブランク値

W : 採取した試料量 (mg)

#### 4. 2 乾燥キクラゲの定量結果

##### 4. 2. 1 全グルカン量 (g/100g)

- ・乾燥キクラゲの採取量 51.9mg
- ・イーストβ-グルカンコントロール 75.4mg
- ・乾燥キクラゲの吸光度 0.442
- ・標準吸光度 1.126
- ・ブランク吸光度 0.020
- ・イーストβ-グルカンコントロール吸光度 0.964

以上の結果を上式に代入すると

乾燥キクラゲの全グルカン量は 33.1 (g/100g)、イーストβ-グルカンコントロールは 50.9 (g/100g) となった。ここで、イーストβ-グルカンコントロールは 59.5 (g/100g) の含有量であったことから、85.5%が測定されたこととなる。乾燥キクラゲの全グルカン量は 38.7 (g/100g) となった。

##### 4. 2. 2 α-グルカン量 (g/100g)

- ・乾燥キクラゲの採取量 54.1mg
- ・乾燥キクラゲの吸光度 0.058
- ・標準吸光度 1.158
- ・ブランク吸光度 0.014

以上の結果を上式に代入すると

乾燥キクラゲのα-グルカン量は 0.3 (g/100g) となった。

##### 4. 2. 3 β-グルカン量 (g/100g)

乾燥キクラゲのβ-グルカン量は、全グルカン量からα-グルカン量を差し引いたものであるから、 $38.7 - 0.3 = 38.4$  (g/100g) となる。このβ-グルカン量の値は、実試料そのものの含有量である。水分を 14.4%含有していたことから、乾物量当たりでは、 $38.4 \times 100 / 85.6 = 44.9$  (g/100g) となる。

## 5. 食品の分析結果例

佃煮キクラゲは、醤油等で加工されているため、水分含有量が多くなっており、粉碎するために乾燥する必要がある。135℃での加熱では、11 時間で恒量値に達するが、2 時間程の加熱で粉碎できる状態となる。13 時間及び 2 時間加熱した佃煮キクラゲを試料として分析した。13 時間加熱した佃煮キクラゲのβ-グルカン量は 14.9 (g/100g) であった。2 時間加熱した佃煮キクラゲのβ-グルカン量は 20.4 (g/100g) であった。また、乾燥しいたけのβ-グルカン量は、38.8 (g/100g) であった。

## 6. 分析上の留意、注意点

酵素法での測定結果は、 $\beta$ -グルカン総量が測定対象となっているため、有効成分と言われる 1-3 $\beta$ -グルカンや 1-6 $\beta$ -グルカンを分別して測定することができず、1-4 $\beta$ -グルカンであるセルロースやヘテログルカンなど、かなり広範囲のグルカン類を測定している。

## 7. その他

15mL 容のコニカルチューブは、2 時間程沸騰湯浴中に浸けこむので耐熱性があるものを使用する。

## 8. 定量法に関する引用・参考文献

1. 佐々原浩幸，吉岡直美，八木利枝，藤澤浩子，高橋尚美，木村功：食品系廃棄物の有効利用に関する研究，香川県産業技術センター研究報告，**2**，127-128 (2001)

—以上—

[トップページに戻る](#)