

## 「糖化力測定キット」取扱い説明書

商品コード: 60211



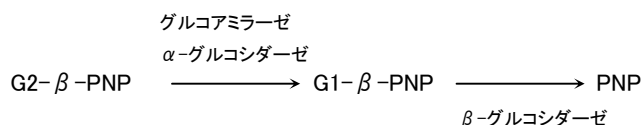
## 注意！

- 1) キット中の試薬を飲んだり、素手で触れたり、目に入れたりしないで下さい。
- 2) 取扱い説明書の〔使用上または取扱い上の注意〕に従って取扱って下さい。

## 〔用途〕

米麴抽出液中の糖化力の測定に用います。このキットは製造管理、研究用途以外の目的では使用できませんのでご注意ください。

## 〔測定原理〕



基質の 4-ニトロフェニル  $\beta$ -マルトシド(G2- $\beta$ -PNP)は、グルコアミラーゼおよび  $\alpha$ -グルコシダーゼによって分解され、4-ニトロフェニル  $\beta$ -グルコシド(G1- $\beta$ -PNP)を生じます。G1- $\beta$ -PNP は共役酵素として添加した  $\beta$ -グルコシダーゼによってさらに分解され、4-ニトロフェノール(PNP)が生じます。反応は、炭酸ナトリウムを加えることにより停止しますが、同時に反応液の pH がアルカリ側となり、PNP の発色が最大になります。この PNP を 400nm で定量することにより糖化力を測定します。

## 〔特徴〕

- 1)測定値は、測定試料中のグルコアミラーゼと  $\alpha$ -グルコシダーゼによる G2- $\beta$ -PNP 分解活性を示します。これは、測定試料中の糖化力(グルコース生成力)と考えられます。
- 2)米麴抽出液を透析することなく、そのまま測定できます。
- 3)測定試料中の  $\alpha$ -アミラーゼの影響を受けません。

## 〔キットの構成〕

本製品は以下の試薬より構成されています。

試薬名	主成分	数量
基質溶液	G2- $\beta$ -PNP	60 mL 1本
酵素溶液	$\beta$ -グルコシダーゼ	60 mL 1本
反応停止液	炭酸ナトリウム	120 mL 2本

## 〔測定方法〕

## 1.測定試料の調製

米麴を所定法記載の方法\*1で抽出します。すなわち、米麴 10g に 0.5% NaCl を含む 10mM 酢酸緩衝液(pH 5.0)を 50 mL 加え、低温室(5℃以下)で一夜、または室温(15~20℃)で 3 時間ときどき振りまぜながら浸出した後、濾紙で濾過します(抽出率 5 倍となります)。この濾液を、希釈液\*2で 2 倍に希釈したものを測定試料とします。

\*1 第四回改正 国税庁所定分析法注解 213 から~214 頁

\*2 希釈液には、0.5% NaCl を含む 10mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0)を用いますが、10 mM 酢酸緩衝液(pH 5.0) または、蒸留水でも代用可能です。

## 2.測定試薬の調製

基質溶液、酵素溶液および反応停止液は開栓して、そのまま使用します。

## 3.測定操作法

- 1)小試験管に下記反応液を調製し、37℃で約 5 分間予備加温します。
  - ①基質溶液 0.5mL
  - ②酵素溶液 0.5mL
- 2)測定試料(米麴抽出液を 2 倍に希釈したものを 0.1mL 加え、良く混合して反応を開始します。
- 3)37℃で正確に 10 分間反応させた後、反応停止液を 2.0mL 加え良く混合して、反応を停止させます。
- 4)この反応終了液を吸光度測定用セルに入れ、400nm の波長で吸光度を測定します(測定試料の吸光度・計算方法の  $E_s$  値となります)。なお、吸光度測定時の対照は蒸留水とします。
- 5)ブランク値の測定は、上記反応液 1)を 37℃で 15 分間加温後、反応停止液を 2.0mL 加えて良く混合し、さらに測定試料を 0.1mL 加えて再び混合します。この液の吸光度を 4)と同様に測定します(ブランクの吸光度・計算方法の  $E_b$  値となります)。

注意！酵素溶液の容器の底に可溶性の白色沈澱が生じる場合がありますが、その際には泡立たぬよう静かに混合し、沈澱を溶解した後にご使用下さい。

## 3. 4.糖化力の計算方法

## 1)糖化力の求め方

$$\begin{aligned}
 \text{糖化力(U/mL)} &= (E_s - E_b) \times 0.171 \times D_f \\
 &= (E_s - E_b) \times 0.342^{*3}
 \end{aligned}$$

\*3 測定試料を 2 倍に希釈した場合。

但し、 $E_s$ : 測定試料の吸光度、 $E_b$ : ブランクの吸光度、 $D_f$ : 測定試料の希釈倍率。

ここでの糖化力とは G2- $\beta$ -PNP 分解活性をさしています。糖化力の 1U はここで記した測定条件において、1 分間に 1  $\mu$  mol の PNP を遊離する力価と定義します。

## 2)米麴の糖化力の求め方

$$\begin{aligned}
 \text{糖化力(U/g 麴)} &= (E_s - E_b) \times 0.171 \times D_f \times \text{抽出率} \\
 &= (E_s - E_b) \times 1.71^{*4}
 \end{aligned}$$

\*4 この計算は、米麴を所定法通りに抽出し(抽出率 5 倍)、得られた抽出液を 2 倍に希釈して( $D_f=2$ )測定試料とした場合。

## 〔性能〕

- 1) ブランク値: 本測定系においてブランク値の吸光度は、通常 0.2 以下です。
- 2) 特異性: 測定試料中のグルコース濃度が少なくとも 100 g/L まで、また測定試料中の  $\alpha$ -アミラーゼ濃度が 725 U/mL (所定法による測定値) までは測定値に影響を受けません。
- 3) 再現性: 同一測定試料を 10 回同時に測定するとき、吸光度の CV 値は 1% 以下です。測定範囲: E (測定試料測定時の吸光度  $E_s$  - ブランク測定時の吸光度  $E_b$ ) が 1.6 まで定量性があります。
- 4) 発色の安定性: 反応終了液の吸光度は、室温(25°C)において、2 時間経過後も変化は見られません。

## 〔相関性〕

本法(x)と国税庁所定分析法(y)との間で、精製グルコアミラーゼを測定試料として相関性を検討したところ、

回帰式は、 $y = 144.6x$ 、相関係数  $r$  は 0.999 でした。

但し、 $x$  および  $y$  の単位は U/mL です。

すなわち、

$$\begin{aligned} & \text{所定法によるグルコアミラーゼ活性 (U/mL)} \\ & = 144.6x \end{aligned}$$

および、

$$\begin{aligned} & \text{所定法によるグルコアミラーゼ活性 (U/g・麴)} \\ & = (144.6x) \times \text{抽出率} \end{aligned}$$

の各式にて所定法に準じて表現することが出来ます。

但し、 $x$  は本測定法で得られた糖化力 ((U/mL)(4.1) にて求めた値)、抽出率は所定法に準じて米麴を抽出し抽出液を測定試料とした場合では 5、透析液を測定試料とした場合には 10 となります。

(注) 本測定法で得られた米麴抽出液中の糖化力を所定法に準じて表現するには、上式にて計算できますが、本測定法によって得られた値はグルコアミラーゼ活性と  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性の和となるため、所定法によるグルコアミラーゼ活性測定値よりも高い値となります。

## 〔廃棄の方法〕

酵素溶液および基質溶液の容器はガラス製、キャップはポリプロピレン製、パッキンはポリエチレン製になっています。反応停止液は、本体はポリエチレン製、キャップはポリプロピレン製です。廃棄の際は、各々を分別して、都道府県・市町村が定める廃棄物の適正処理に従って廃棄処理してください。

## 〔使用上又は取扱い上の注意〕

- ① 本キットの試薬類はすべて冷蔵庫(5°C)にて保管して下さい。室温に放置した場合、測定値が低下します。また、試薬を凍結しますと酵素溶液が白濁して使用できなくなります。有効期限を過ぎたものは使用しないで下さい。
- ② 基質溶液、酵素溶液は混合した状態でも冷蔵庫(5°C)にて 2 週間は保存可能ですが、なるべく使用時に混合して下さい。
- ③ 酵素溶液は保存中に少量の可溶性白色沈澱が生じる場合があります。沈澱が生じた場合には、酵素溶液を泡立たぬよう静かに混合し、沈澱を溶解してからご使用下さい。沈澱が生じても酵素活性は維持されていますので測定には影響しません。
- ④ 反応終了液中に含まれる 4-ニトロフェノール (PNP) は急性毒性物質の指定を受けています。反応終了液中に含まれる量はごく微量ですが、安全確保の点から次のことに御注意下さい。

基質溶液、反応液(基質溶液+酵素溶液)、反応終了液を口に入れたり、直接手で触れたりしないで下さい。使用後の器具を洗浄する際は、手袋を使用して下さい。誤って飲み込んだ場合は、口を良くすすいだ後、直ちに医師に連絡を取り指示を受けて下さい。手に付いた場合は、水で良く洗浄して下さい。また、食品類への混入がないよう充分ご注意下さい。排水排出の際は、地下水及び上水道へ混入しないよう注意して下さい。

## 〔保存方法〕

- 1) キットの保存: 冷暗所にて 5°C で保存。
- 2) 品質保持期限: 本キットの外箱に記載。

## 〔保証〕

製造元では、本製品が所期の品質を有することおよび、本製品に不具合があった場合代替の製品を提供することを保証しますが、それ以外の保証は致しません。製造元は、特別な若しくは結果として生じる損害または、本製品の使用から直接的または間接的に生じる費用を含むいかなる損害にも責任を負いません。

## 〔参考文献〕

今井泰彦、徳武昌一、山次信幸、鈴木 勝: 醸協, 91, 51-57 (1996).

製造元

キッコマンバイオケミファ株式会社

〒105-0003 東京都港区西新橋 2-1-1

Tel: 03-5521-5490 Fax: 03-5521-5498

E-mail: biochemifa@mail.kikkoman.co.jp

URL: <http://www.kikkoman.co.jp/bio/>

©2011 Kikkoman Food Products Company (2011041)