

「糖化力分別定量キット」取扱い説明書

商品コード: 60212



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。

この製品は、糖化力と α -グルコシダーゼ活性を測定する液状試薬で構成されています。

〔用途〕

米麹抽出液中の糖化力分別定量に用います。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下さい。

〔測定原理〕

糖化力測定用基質の 4-ニトロフェニル β -マルトシド(G2- β -PNP)はグルコアミラーゼおよび α -グルコシダーゼによって分解され、4-ニトロフェニル β -グルコシド(G1- β -PNP)を生じます。G1- β -PNP は共役酵素として添加した β -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。

α -グルコシダーゼ活性測定用基質の 4-ニトロフェニル α -グルコシド(PNPG)には α -グルコシダーゼのみが作用し(麹菌のグルコアミラーゼは作用しません)、PNPが生じます。

それぞれの反応は、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 を波長 400 nm で吸光度を測定することにより糖化力または α -グルコシダーゼ活性を測定します。

分別定量法の原理は以下の通りです。

第一の基質(G2- β -PNP)に対して両酵素を含む測定試料を用いて測定を行った際のグルコアミラーゼの反応速度定数(Δ OD・mL/U)を k_1 、 α -グルコシダーゼの反応速度定数を k_2 、吸光度の増加量を A_1 (Δ OD)、測定試料中のグルコアミラーゼ活性を GLA (U/mL)、 α -グルコシダーゼ活性を GLS (U/mL)とすると、次の関係が成り立ちます。

$$A_1 = k_1 \times GLA + k_2 \times GLS \quad (1)$$

同様に、第二の基質(PNPG)に対するグルコアミラーゼの反応速度定数を k_3 、 α -グルコシダーゼの反応速度定数を k_4 、吸光度の増加量を A_2 とすると、

$$A_2 = k_3 \times GLA + k_4 \times GLS \quad (2)$$

が得られます。そして、これら(1)、(2)式から、

$$GLA = (k_4 \times A_1 - k_2 \times A_2) / (k_1 \times k_4 - k_2 \times k_3) \quad (3)$$

$$GLS = (k_3 \times A_1 - k_1 \times A_2) / (k_2 \times k_3 - k_1 \times k_4) \quad (4)$$

が導かれます。ここで、PNPG に対してはグルコアミラーゼが作用しませんので(2)式中の k_3 は 0 となります。次に、2つの基質を用いたそれぞれの反応で得られた吸光度変化量を、(3)式および(4)式に代入することで、測定試料中のグルコアミラーゼ活性および α -グルコシダーゼ活性を分別定量します。ここで、 k_1 、 k_2 、 k_3 および k_4 の値は、当社において精製グルコアミラーゼおよび精製 α -グルコシダーゼを用いて測定してありますので、〔測定方法〕の 4. 活性の計算方法 3)①式に測定値を代入することでグルコアミラーゼ活性を分別定量することができます。

〔特徴〕

1. 米麹抽出液を透析することなく、そのまま測定できます。
2. 測定試料中の α -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。

1.〔糖化力測定用〕

試薬名	主成分	数量
基質溶液	G2- β -PNP	30 mL 1本
酵素溶液	β -グルコシダーゼ	30 mL 1本
反応停止液	炭酸ナトリウム	120 mL 1本

2.〔 α -グルコシダーゼ活性測定用〕

試薬名	主成分	数量
基質溶液	PNPG	120 mL 1本
反応停止液	炭酸ナトリウム	60 mL 1本

〔測定方法〕

1. 測定試料の調製

米麹を所定法記載の方法^{*1)}で抽出します。すなわち、米麹 10g に 0.5% NaCl を含む 10 mM 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、濾紙で濾過し抽出液を得ます(抽出率 5 倍となります)。

糖化力の測定では、この抽出液を、蒸留水で 2 倍に希釈^{*2)}したものを測定試料とします。

α -グルコシダーゼ活性の測定では、この抽出液を希釈せずそのまま測定試料とします。

* 1) 第四回改正 国税庁所定分析法注解 213~214 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

糖化力測定用の基質溶液、酵素溶液、反応停止液および α -グルコシダーゼ活性測定用の基質溶液、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) 糖化力測定

- 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。
基質溶液 0.5 mL、酵素溶液 0.5 mL
- ② 測定試料(抽出液を 2 倍に希釈したものを)を 0.1 mL 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 2.0 mL 加え良く混合して、反応を停止させます。
- ④ 反応終了液を吸光度測定用セルに入れ、400 nm の波長で吸光度を測定します(測定試料の吸光度 \times 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 2.0 mL 加えて良く混合し、さらに測定試料を 0.1 mL 加えて再び混合します。この液の吸光度を④と同様にして測定します(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。

2) α -グルコシダーゼ活性測定

- ①小試験管に基質溶液 2.0 mL を入れ、37°C で約 5 分間予備加温します。
- ②測定試料(抽出液そのまま)を 0.1 mL 加え良く混合して、反応を開始します。
- ③37°C で正確に 10 分間反応させた後、反応停止液を 1.0 mL 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_{2s} 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°C で 15 分間加温後、反応停止液を 1.0 mL 加えて良く混合し、さらに測定試料を 0.1 mL 加えて再び混合します。この液の吸光度を④と同様にして測定します(ブランクの吸光度・計算方法の E_{2b} 値となります)。

4. 活性の計算方法

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- β -PNP 分解活性を指しています。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 μ mol の PNP を遊離する力価と定義します。

2) α -グルコシダーゼ活性の求め方

$$\begin{aligned} \alpha\text{-グルコシダーゼ活性(U/mL)} \\ &= (E_{2s} - E_{2b}) \times 0.171 \times D_f \end{aligned}$$

但し、 E_{2s} : 測定試料の吸光度、 E_{2b} : ブランクの吸光度、 D_f : 測定試料の希釈倍率(希釈していない場合は 1)

ここで得られた α -グルコシダーゼ活性とは PNPG 分解活性をさしています。 α -グルコシダーゼ活性の 1U はここで記した測定条件において、1 分間に 1 μ mol の PNP を遊離する力価と定義します。

3) 分別定量

糖化力中のグルコアミラーゼおよび α -グルコシダーゼ活性は、以下のようして求めます。

①グルコアミラーゼ活性(U/mL)

$$= (5.85 \times \Delta E - 14.1 \times \Delta E_2) / 34.22$$

但し、 $\Delta E = (E_s - E_b) \times D_f$ 、 $\Delta E_2 = E_{2s} - E_{2b}$ 、 D_f は糖化力測定に用いた測定試料の希釈倍率(2)とする。

② α -グルコシダーゼ活性(U/mL)

2) で求めた値となります。

4) 米麴中の活性値の求め方

分別定量で得られた各酵素活性(U/mL)を麴 1g あたりの活性値(U/g・麴)に変換するには、4.3)の計算式で得られた活性に抽出率(5)を掛けます。

すなわち、

$$\text{活性値(U/g・麴)} = \text{活性(U/mL)} \times \text{抽出率(5)}$$

【性能】

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。

特異性: 測定試料中のグルコース濃度の影響は糖化力測定においては少なくとも 100 g/L まで影響を受けません。 α -グルコシダーゼ活性測定においては測定試料中のグルコース濃度が 30g/L の場合、見掛け上酵素活性測定値は約 7% 低下します。また、両測定法とも測定試料中の α -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。

再現性: 両測定法ともに同一測定試料を 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: 両測定法ともに 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。

発色の安定性: 両測定法ともに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 となります。

すなわち、分別定量法で得られた米麴抽出液中のグルコアミラーゼ活性は、次のようにして所定法に換算できます。

所定法によるグルコアミラーゼ活性(U/g・麴)

$$= (144.6x) \times \text{抽出率}$$

但し、 x は分別定量で得られたグルコアミラーゼ活性(U/mL)

4. 3) の計算式にて求めた値)、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。

【使用上又は取扱い上の注意】

- ①本キットの試薬類は全て冷蔵庫(5°C)で保管して下さい。室温に放置した場合、測定値が低下します。また、試薬を凍結すると、糖化力測定用の酵素溶液が白濁したり、 α -グルコシダーゼ活性測定用の基質溶液中に難溶性の結晶が生じるなどの原因により、使用できなくなる場合があります。有効期限を過ぎたものは使用しないで下さい。
- ②糖化力測定用の基質溶液、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。

【廃棄の方法】

[糖化力測定用]の酵素溶液と基質溶液、および[α -グルコシダーゼ活性測定用]の反応停止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。また、[糖化力測定用]の反応停止液、および[α -グルコシダーゼ活性測定用]の基質溶液は、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。

【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

キッコー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.jpURL: <http://www.kikkoman.co.jp/bio/>