

食物繊維測定法及びβ-グルカン特異検出試薬によるレイシ, ヒメマツタケ抽出物及び市販アガリクス製品中のβ-グルカン量測定

鈴木 公美*, 植松 洋子*, 平田 恵子*,
飯田 憲司*, 鎌田 国広*

Measurement of β-Glucan in Mannentake Extract, Himematsutake Extract and Agaricus Product by Dietary Fiber Measuring Method and Specific Reagent for Detection of β-Glucan

Kumi SUZUKI*, Yoko UEMATSU*, Keiko HIRATA*,
Kenji IIDA* and Kunihiko KAMATA*

Keywords: レイシ抽出物 mannentake extract, ヒメマツタケ抽出物 himematsutake extract, アガリクス・ブラゼイ agaricus blazei, β-グルカン β-glucan, 食物繊維 dietary fiber, 既存添加物 existing food additives

緒 言

近年の健康ブームにより、消費者の健康に対する関心は高く、いわゆる健康食品は大きな市場を形成している¹⁾。

これらの健康食品に使われている健康食品素材のなかには、「既存添加物名簿」²⁾に記載されている既存添加物(天然添加物)に相当するものも含まれている。

今回、既存添加物名簿に記載され、健康食品素材としても使われているレイシ抽出物、ヒメマツタケ抽出物及び市販アガリクス製品を入手した。

これらのキノコは様々な生理機能を持つことが報告されている。なかでも抗腫瘍活性はよく知られており、抗腫瘍活性を期待した健康食品が多数市販されている。これらの抗腫瘍活性の活性本体のひとつがβ-グルカンであるといわれている³⁻¹⁰⁾。

しかし、レイシ抽出物、ヒメマツタケ抽出物及び市販アガリクス製品中のβ-グルカン量を測定した報告は見当たらない。

そこで、著者らは、β-グルカンが食物繊維の一種であることから³⁾、衛生試験法収載サウスゲートの変法¹¹⁾を準用し、これらのβ-グルカン(非デンプン非セルロースグルカン類)量の測定を行った。

サウスゲートの変法は操作が煩雑で時間を要するので、β-グルカン量の簡易測定法として(1-3)-β-D-グルカンを特異的に検出する市販の検出試薬キット¹²⁻¹⁴⁾の適用も併せて試みたので報告する。

実験方法

1. 試料 平成12年度に入手した、レイシ抽出物2製品、ヒメマツタケ抽出物3製品、市販アガリクス製品5製品、原体2

製品(アガリクス茸菌糸体1製品、ヒメマツタケ乾燥品1製品)の計12製品を試料とした。

2. 試薬 β-グルカン特異検出試薬キット:ピージースターAキット(カプトガニ血球抽出物よりエンドトキシン感受性因子およびコアグュロゲンを除去し、発色合成基質を添加した主剤と、標準カードラン及びジアゾカップリング発色用の試薬をセットにしたキット)、マルハ(株)製。β-グルカンフリー水:日本薬局方 注射用水 大塚蒸留水、大塚製薬(株)製。熱安定α-アミラーゼ溶液:ターマミル120L, Novo Nordisk社製。アミログルコシダーゼ溶液:アミログルコシダーゼ, Sigma社製。グルコース:ブドウ糖(無水), 和光純薬工業(株)製特級。その他試薬:市販特級品。

3. 器具 β-グルカンフリーキャップ付試験管(以下、キャップ付試験管):ラウンドチューブ(ツープポジション キャップ付, ポリスチレン製, 5 mL及び14mL容), ベクトン・ディッキンソン(株)製。エンドトキシンフリーチップ:パイオクリーンチップワコー, 和光純薬工業(株)製。

4. 装置 分光光度計:(株)島津製作所製 UV-2200, 恒温水槽:ヤマト科学(株)製 WATER BATH INCUBATOR BT-23, ガスクロマトグラフ:Hewlett Packard 社製HP6890 (FID)。

5. 食物繊維測定法による非デンプン非セルロースグルカン類量の測定 試験溶液の調製は衛生試験法, 食物繊維(2)サウスゲートの変法による定量¹¹⁾に準じて行い、得られたグルコースをアセチル化し、GCで測定した。

1) 液体試料の前処理 液体試料10.0 gを50 mL共栓付き遠沈管に採取し、沸騰水浴上で大部分の水分を蒸発させ試験に供した。

2) 試験溶液の調製 粉末試料は0.2 gを50 mL共栓付き遠沈管に採取し、また、液体試料は前処理した試料に、それ

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

ぞれ0.05 mol/Lリン酸緩衝液(pH 6.0) 6 mLと熱安定 α -アミラーゼ溶液50 μ Lを加えた。これらの遠沈管を沸騰水浴に入れ、アルミはくで覆い、5分毎に攪拌し、内部の温度が95以上になってから30分間加熱した。冷却後、0.1 mol/L酢酸塩緩衝液(pH 4.5) 4 mL及びアミログルコシダーゼ溶液20 μ Lを加えてよく混和後、アルミはくで覆い、60 水浴中で振とうしながら30分間反応させた。酵素処理した試料液に4倍量のエタノールを加え10分間放置後、遠心して上清を取り除いた。さらに残渣を80 %エタノール10 mLで洗浄し、遠心して上清を除いた。この洗浄操作を2回繰り返した。この残渣に0.5 mol/L 硫酸 10 mLを加え、冷却管を付け、水浴中で2.5時間加熱し、加水分解した。冷却後、同容量のエタノールを加え混和、遠心し、上清を100 mLピーカーに移した。さらに残渣を50 %エタノール10 mLで洗浄し、遠心して上清を、先の100 mLピーカーに合わせた。この洗浄操作を2回繰り返した。得られた上清を1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で中和し約pH 7.0とした。この中和した試料溶液を減圧濃縮した後、水で10 mLとし、試験溶液とした。

3) 標準溶液の調製 グルコース100 mgを精秤し水に溶解して正確に10 mLとし標準原液とした。標準原液をグルコースが10~1000 μ g/mLを含有するように水で適宜希釈し標準溶液とした。

4) アセチル化 標準溶液及び試験溶液各100 μ LをGCオートサンプラー用バイアルに採取し、窒素気流下で溶媒を留去し、ピリジン、無水酢酸各100 μ Lを加え、50~60 , 15分間で、アセチル化した。アセチル化試薬を50~60 , 窒素気流下で留去し、残渣を酢酸エチル1 mLに溶解し、GC用試験溶液とした。

5) ガスクロマトグラフィー (GC) 条件 カラム: SGE 15QC5 / BPX5 (0.53 mm \times 15 m, 膜厚1 μ m)。カラム温度: 150 (2 min)-1 / min-158 -5 / min-280 。カラム流量: 13.00 mL/min。キャリアーガス: ヘリウム。注入方法: スプリットレス注入。注入口温度: 250 検出器温度: 320 。注入量: 1 μ L

6. β -グルカン特異検出試薬キットによる標準カードラン換算(1-3)- β -D-グルカン量の測定 ビージスター-Aキットを用いてエンドポイント法で行った。

1) 試験溶液の調製 粉末試料10 mgをキャップ付試験管に採取し、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液10 mLを加え、良く攪拌した。また、液体試料は約1 mLをキャップ付試験管に採取してその重量を量り、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液1 mLを加え、良く攪拌した。これらを恒温水槽で37 , 1時間インキュベートした後、試験溶液とした。

2) 試験操作 本キットの使用説明書に従った 標準カードラン(カードラン凍結乾燥品)を β -グルカンフリー水を用いて溶解し、10及び50 pg/mLの標準カードラン溶液を調製した。次に、主剤を付属の主剤溶解用緩衝液を用いて溶解した。標準カードラン溶液および主剤溶液は氷水で氷冷した。標準カードラン溶液、試験溶液、ブランクとして β -グルカンフリー水各0.1 mLをあらかじめ主剤溶液0.1 mLを入

れ氷水で氷冷したキャップ付試験管に添加、攪拌し、直ちに37 , 30分間インキュベートした。30分経過後、直ちに氷水で冷却し、発色試薬と反応させた。1時間以内に545 nmと630 nmにおける吸光度を測定し、545 nmの吸光度から630 nmの吸光度を差し引いた値を求めた。

3) (1-3)- β -D-グルカン量の算出 10及び50 pg/mLの標準カードラン溶液を主剤と反応させたものの吸光度から、 β -グルカンフリー水を主剤と反応させたもの(試薬ブランク)の吸光度を差し引いた値を用いて検量線を作成した。試験溶液を主剤と反応させたものの吸光度から試薬ブランクの吸光度を差し引いた値について、検量線から試験溶液中の標準カードラン換算(1-3)- β -D-グルカン濃度(pg/mL)を算出した。得られた値に希釈倍率を乗じて試料中の標準カードラン換算(1-3)- β -D-グルカン量を算出した。

結果及び考察

グルカンはグルコースを構成糖とする多糖の総称であり、D-グルコース残基どうしの結合様式によっていろいろな種類があり、微生物、植物、動物界に広く分布している。

また、(1-3)- β -D-グルカンの1次構造は、大きく分けて微生物由来の直鎖型(カードラン)、キノコ由来の高度分岐型(レンチナン、シイタケ由来等)に分類することができる³⁾。

1. 測定原理

1) 食物繊維測定法による非デンプン非セルロースグルカン類量の測定 キノコ及びキノコ製品中の β -グルカン量の測定に衛生試験法、食物繊維(2)サウスゲートの変法¹¹⁾を準用した。サウスゲートの変法では多糖をデンプン、水溶性非セルロース多糖類、水不溶性非セルロース多糖類、セルロース及びリグニンに分別してから定量する方法であり、操作は煩雑であるが、食物繊維の全容を評価するのに優れている試験法である。

キノコ及びキノコ製品中の抗腫瘍活性の活性本体のひとつとされる β -グルカンは、デンプン、セルロース及びリグニン以外の水溶性非セルロース多糖類と水不溶性非セルロース多糖類分画に含まれると考えられる。そこで、サウスゲートの変法を一部変更し、水溶性非セルロース多糖類と水不溶性非セルロース多糖類の分画を分離せず合わせて加水分解し、得られたグルコース(非デンプン非セルロースグルカン類)をアセチル化してGCで測定した。

2) β -グルカン特異検出試薬キットによる標準カードラン換算(1-3)- β -D-グルカン量の測定 本キットの原理は、カプトガニ血球抽出物中に存在する(1-3)- β -D-グルカン感受性因子(G因子)に試料中の(1-3)- β -D-グルカンが作用することにより、(1-3)- β -D-グルカン依存性のカプトガニ血液凝固カスケード反応が活性化される。この反応により生成する凝固酵素により発色合成基質が分解されパラニトロアニリンが遊離する。遊離したパラニトロアニリンを発色試薬によりジアゾカップリングさせ、生成した赤色素の量を比色定量することで試料中の(1-3)- β -D-

表1. 分析結果

No.	種類	形態	非デンプン非セルロース グルカン類 (mg/g)	標準カードラン換算 (1 3)- β -D-グルカン (mg/g)	
1	レイシ抽出物	粉末	41	2.2	
2		粉末	46	8.5	
3	ヒメマツタケ抽出物	粉末	260	0.1	
4		粉末	230	0.13	
5		粉末	12	0.073	
6	市販アガリクス製品	液体	0.4	0.00067	
7		液体	0.2	0.00054	
8		液体	0.1	0.0002	
9		粉末	6.5	0.0016	
10		粉末	3.4	0.017	
11	原体	アガリクス茸菌糸体	粉末	35	0.24
12		ヒメマツタケ	キノコ乾燥品	56	2.3

グルカン量を定量するものである。

本キットは標準品としてカードランを用いている。カードランは、グルコースが直鎖状に1, 3位で β -結合した(1 3)- β -D-グルカンである。そのため、本キットを用いて測定した β -グルカン量を標準カードラン換算(1 3)- β -D-グルカン量とした。

なお、本キットは(1 3)- β -D-グルカン直鎖の大きさや長さ、分岐度、その構造等により反応が低下することがある。

2. 測定結果 食物繊維測定法を用いて測定した非デンプン非セルロースグルカン類量と β -グルカン特異検出試薬キットを用いて測定した標準カードラン換算(1 3)- β -D-グルカン量の結果を表1に示した。

1) 食物繊維測定法による非デンプン非セルロースグルカン類量

(1) レイシ抽出物 2製品は41及び46 mg/gとほぼ同等の含量値を示した。

(2) ヒメマツタケ抽出物 試料3, 4は共に200 mg/g以上であったが、試料5は12 mg/gと少なく、各製品間で含量に大きな差が認められた。

(3) 市販アガリクス製品 これら市販アガリクス製品5製品は、いわゆる健康食品として市販されているものである。粉末製品の方が液状製品より、非デンプン非セルロースグルカン類含量が多い傾向が得られた。粉末製品は6.5及び3.4 mg/g、液状製品は0.1~0.4 mg/gであり、各製品間で差が認められた。

(4) 原体 ヒメマツタケ抽出物や市販アガリクス製品の原料であるアガリクス茸菌糸体及びヒメマツタケ乾燥品について測定した結果、アガリクス茸菌糸体は35 mg/g、ヒメマツタケ乾燥品は56 mg/gであった。これら2製品は、試料3~10の製品の直接の原料ではないので一概に比較することはできないが、原体の方が、市販アガリクス製品より含量が多いことが認められた。

これらの結果より、試料中の非デンプン非セルロースグルカン類量を製品の種類毎に比較すると、ヒメマツタケ抽

出物の2製品が最も多く、次にレイシ抽出物と原体、ヒメマツタケ抽出物の1製品、市販アガリクス製品の順であった。

2) β -グルカン特異検出試薬キットによる標準カードラン換算(1 3)- β -D-グルカン量

(1) レイシ抽出物 2製品中の標準カードラン換算(1 3)- β -D-グルカン量は2.2及び8.5 mg/gであり、他の種類の製品と比較し高い値であった。

(2) ヒメマツタケ抽出物 試料3, 4, 5, はいずれも約0.1 mg/gであった。

(3) 市販アガリクス製品 市販アガリクス製品中の標準カードラン換算(1 3)- β -D-グルカン量は0.0002~0.017 mg/gであった。これらの製品は、いわゆる健康食品として市販されているものであるが、製品間で含量に約100倍近い差が認められた。

(4) 原体 アガリクス茸菌糸体は0.24 mg/g、ヒメマツタケ乾燥品は2.3 mg/gであった。ヒメマツタケ抽出物や市販アガリクス製品より標準カードラン換算(1 3)- β -D-グルカンを多く含有する傾向が得られた。

これらの結果より、試料中の標準カードラン換算(1 3)- β -D-グルカン量を製品の種類毎に比較すると、レイシ抽出物、原体、ヒメマツタケ抽出物、市販アガリクス製品の順で多い傾向が得られた。

3) 食物繊維測定法と β -グルカン特異検出試薬キットの比較 食物繊維測定法による非デンプン非セルロースグルカン類量の測定結果と β -グルカン特異検出試薬キットによる標準カードラン換算(1 3)- β -D-グルカン量の測定結果の比較を行った。 β -グルカン特異検出試薬キットにより得られた標準カードラン換算(1 3)- β -D-グルカン量の方が食物繊維測定法により得られた非デンプン非セルロースグルカン類量よりも低い測定値を示した。これは、食物繊維測定法がデンプン、セルロース及びリグニン以外の食物繊維分画について加水分解し、得られた総グルコースを測定しているのに対し、 β -グルカン特異検出試薬キットは(1 3)- β -D-グルカンを選択的に測定しているため等と考えら

れる。

次に、食物繊維測定法を用いて測定した非デンプン非セルロースグルカン類量とβ-グルカン特異検出試薬キットを用いて測定した標準カードラン換算(1→3)-β-D-グルカン量との関係を図1に示した。グラフは両対数グラフを用い、グラフ中の番号は表1に示した試料番号に対応する。

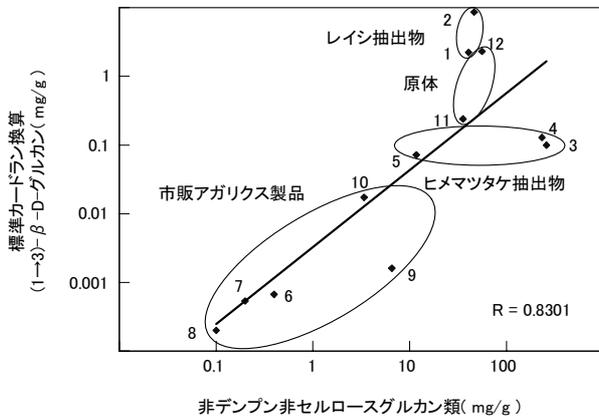


図1. 非デンプン非セルロースグルカン類量と標準カードラン換算(1→3)-β-D-グルカン量との関係

両試験法の測定値(常用対数として表したもの)間には、 $\log Y = 1.1165 \log X - 2.3691$ ($R = 0.8301$)と相関が認められた。

このことより、β-グルカン特異検出試薬キットは、キノコ及びキノコ製品中のβ-グルカン量の相対的な比較測定法及び製品の簡易な品質管理試験法として適用できることが示唆された。また、測定操作の面において、β-グルカン特異検出試薬キットは食物繊維測定法に比較して操作性が優れており、また、測定時間も短時間で終わる等の利点を有していることが認められた。

ま と め

1. 食物繊維測定法及びβ-グルカン特異検出試薬キットによるレイシ抽出物、ヒメマツタケ抽出物、市販アガリクス製品、原体中のβ-グルカン量を測定した。

2. 両試験法から得られた値は、レイシ抽出物、ヒメマツタケ抽出物、原体に比べ、市販アガリクス製品では低含量であり、製品間で含量に大きな差が認められた。

3. β-グルカン特異検出試薬キットは、食物繊維測定法に比較して、操作性が優れており、また、測定時間も短くてすむ等の利点を有している。

4. 両試験法から得られた値には相関が認められた。また、β-グルカン特異検出試薬キットは、キノコ及びキノコ製品中のβ-グルカン量の相対的な比較測定法及び製品の品質管理試験法として実用に供しうる方法であると考えられる。

文 献

- 「食品と開発」編集部：食品と開発，36 (3)，20-36，2001.
- 厚生省生活衛生局長通知，“既存添加物名簿収載品リスト”平成8年5月23日，衛化第56号(1996)
- 水野卓，川合正允編著：キノコの化学・生化学，1992，学会出版センター，東京
- 「食品と開発」編集部：食品と開発，32 (7)，48-51，1997.
- 難波宏彰：食品と開発，35 (3)，9-10，2000.
- 井上良計：フードケミカル，(6)，62-67，1996.
- 山下明宏，高下崇：ジャパンフードサイエンス，39 (9)，38-42，2000.
- 山下明宏，高下崇，秋山めぐみ，他：食品と開発，34 (9)，60-61，1999.
- 宿前利郎：薬学雑誌，120 (5)，413-431，2000.
- 大野尚仁：日本細菌学雑誌，55 (3)，527-537，2000.
- 日本薬学会編，衛生試験法・注解2000，186-191，2000，金原出版，東京.
- Muta, T., Seki, N., Takaki, Y., et al.: *J. Biol. Chem.*, 270, 892-897, 1995.
- Kitagawa, T., Tsuboi, I., Kimura, S., et al.: *J. Chromatogr. Biomedical Applications.*, 567, 267-273, 1991.
- 明田川純，田村弘志，田中重則：防菌防黴，23 (7)，413-419，1995.