

Megazyme

www.megazyme.com

総食物繊維測定キット

取扱説明書

K-TDFR-100A/K-TDFR-200A 04/17
(100/200 分析/キット)

対応分析法:

AOAC Method 985.29
AOAC Method 991.42
AOAC Method 991.43
AOAC Method 993.19
AACC Method 32-05.01
AACC Method 32-06.01
AACC Method 32-07.01
AACC Method 32-21.01



はじめに

食物繊維は水溶性・不溶性の多糖類や難消化性オリゴ糖などの親水性化合物に加え、クチン、スベリン、リグニンのような膨潤性のない、程度の異なる疎水性化合物を含む複雑な有機物質の混合物です。本取扱説明書に示す総食物繊維量の測定手順は、Leeら¹および Proskyら^{2,3}による方法 (AOAC 991.43、AOAC 985.29、AACC 32-07.01、AACC 32-05.01) に基づいています。

なお、Megazyme Total Dietary Fiberキットに含まれる酵素は、AACC Method 32-21.01やAACC Method 32-06.01など、その他の食物繊維分析法にも使用することができます。

測定原理 (総食物繊維)

総食物繊維は、乾燥した試料を用いて2反復の測定で求めます (脂質含量が10 %を超える場合は脱脂処理を行います)。試料は、耐熱性 α -アミラーゼを用いて約100 °Cで加熱し、澱粉の糊化・加水分解・低分子化を行います。続いて、60 °Cでプロテアーゼ (タンパク質の可溶化・低分子化) およびアミログルコシダーゼ (澱粉由来低分子断片をグルコースへ分解) と反応させます。その後、4倍量のエタノールを加え、水溶性食物繊維を沈殿させ、低分子化したタンパク質および澱粉由来のグルコースを除去します。得られた残渣をろ過し、78 %エタノール、95 %エタノール、アセトンで順に洗浄した後、乾燥重量を測定します。得られた2つの残渣のうち、一方はタンパク質含量の測定に使用し、もう一方は525 °Cで灰化し灰分量を求めます。総食物繊維含量は、乾燥残渣重量からタンパク質量と灰分量を差し引いた値として算出します。

本製品の大きな利点は、酵素試薬が高純度であり、夾雑酵素活性を含まず、さらに酵素活性値が標準化されている点にあります。難消化性澱粉の測定では、標準化された α -アミラーゼ活性の重要性が広く認知されています。また、本製品同梱のアミログルコシダーゼはセルラーゼ活性をほとんど含まない一方、他の一般的なアミログルコシダーゼにはセルラーゼが混在しており、その結果食物繊維構成多糖類の1つである β -グルカンの分解および測定結果の過小評価を引き起こすことがあります。本製品同梱の酵素試薬はすべて、安定化された液状で即使用可能な状態となっています。

適用範囲

本測定方法は、穀類、果物および野菜、穀類加工品、果実加工品、ならびに各種食品に適用されます。

酵素の純度および標準化

Megazyme® 酵素試薬の耐熱性 α -アミラーゼ、プロテアーゼおよびアミログルコシダーゼの有効性および純度は、AOAC 985.29法、AOAC 991.43法、ならびに AACC 32-05.01法において推奨されている基準に従い、評価されています。

Megazyme® α -アミラーゼ (*Bacillus licheniformis* 由来: **E-BLAAM**) は、活性値3,000 U/mL (Ceralpha法) を有し、プロテアーゼ (E-BSPRT) は50 mg/mL [約350 U/mL (チロシン相当量として)] の濃度で供給されています。また、アミログルコシダーゼは200 U/mL (p-ニトロフェニル β -マルトシド基質使用時) もしくは3,300 U/mL (可溶性澱粉基質使用時) の濃度で供給されています。本アミログルコシダーゼの活性は、従来の総食物繊維測定法で用いられてきた濃度の150 %に相当するため、本試験では0.3 mLではなく0.2 mLを使用します。

本製品の大きな利点は、酵素試薬が高純度であり、夾雑酵素活性を含まず、さらに酵素活性値が標準化されている点にあります。難消化性澱粉の測定では、標準化された α -アミラーゼ活性の重要性が広く認知されています。また、本製品同梱のアミログルコシダーゼはセルラーゼ活性をほとんど含まない一方、他の一般的なアミログルコシダーゼにはセルラーゼが混在しており、その結果食物繊維構成多糖類の1つである β -グルカンの分解および測定結果の過小評価を引き起こすことがあります。本製品同梱の酵素試薬はすべて、安定化された液状で即使用可能な状態となっています。

Megazyme® アミログルコシダーゼ (*Aspergillus niger* 由来: **E-AMGDF**) は、実質的にセルラーゼ活性を含まない一方、総食物繊維の測定に用いられる他社製酵素試薬では、活性値で比較した際に最大1 %程度のセルラーゼの混入が認められる場合があります。この濃度の夾雑酵素の混入は、 β -グルカン量を最大で10~15 %過小評価する原因となります。

Megazyme® 酵素の測定および標準化に用いられている評価方法の詳細については、別途提供可能です。

Megazyme® 総食物繊維測定キット

100回または200回測定用の試薬キットを提供しています。本キットには、以下の試薬が同梱されています。

Megazyme® 総食物繊維測定キット (100分析/キット: **K-TDFR-100A**)

- ボトル1** : 耐熱性 α -アミラーゼ [10 mL、約3,000 U/mL (Ceralpha法) ; 約10,000 U/mL (可溶性澱粉基質使用時)] (**E-BLAAM**)
- ボトル2** : 精製プロテアーゼ [10 mL、50 mg/mL、約350 U/mL (チロシン相当量として)] (**E-BSPRT**)
- ボトル3** : 精製アミログルコシダーゼ [20 mL、3,300 U/mL (可溶性澱粉基質使用時)] (**E-AMGDF**)

Megazyme® 総食物繊維測定キット (200分析/キット:K-TDFR-200A)

ボトル1 : 耐熱性α-アミラーゼ [20 mL、約3,000 U/mL (Ceralpha法) ; 約10,000 U/mL (可溶性澱粉基質使用時)] (**E-BLAAM**)

ボトル2 : 精製プロテアーゼ [20 mL、50 mg/mL、約350 U/mL (チロシン相当量として)] (**E-BSPRT**)

ボトル3 (2本): 精製アミログルコシダーゼ [20 mL、3,300 U/mL (可溶性澱粉基質使用時)] (**E-AMGDF**)

分析グレードのセライト (珪藻土) は別売りとなっております (**G-CEL-500G**)。

Megazyme® 食物繊維測定用標準品キット (K-TDFC)

本キットは、Megazyme® 総食物繊維測定キットと併用し、酵素試薬の有効性および純度を確認する目的で使用します。本キットには、下記に示す各標準品がそれぞれ1本の試薬瓶に充填されています。

本キットには、少なくとも10回分の評価に必要な量の標準品が含まれます。

標準品	量
β-グルカン (大麦由来)	1 g
ハイアミロースコーンスターチ	10 g
澱粉 (小麦由来)	10 g
カゼイン	5 g
ペクチン	1 g
カラマツガラクトン	1 g

総食物繊維測定法1:

総食物繊維、水溶性食物繊維、不溶性食物繊維の定量

AOAC 991.43法「Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fiber in Foods」(First Action 1991)ならびにAACC 32-07.01法「Determination of Soluble, Insoluble, and Total Dietary Fiber in Foods and Food Products」に基づく分析法。

定義

本法は、AACC 32-05.01法 (総食物繊維測定法)、AACC 32-21.01法 (水溶性／不溶性食物繊維測定法:オート麦製品用)を簡略化した改良法です (注 1、6ページ参照)。

- 1. 原理:** 乾燥食品試料 1 gを2反復で、耐熱性α-アミラーゼ、プロテアーゼ、アミログルコシダーゼによる段階的な酵素消化を行います。
- 2. 水溶性／不溶性食物繊維の定量:** 不溶性食物繊維をろ過により回収し、残渣を加温した蒸留水で洗浄します。ろ液および洗浄液を合わせ、95 %エタノールを4倍量添加して水溶性食物繊維を沈殿させます。沈殿物はろ過・乾燥します。水溶性食物繊維および不溶性食物繊維の残渣はいずれも、タンパク質、灰分およびブランク補正を行い、最終的な水溶性食物繊維定量値および 総食物繊維定量値の算出に使用します。
- 3. 総食物繊維の定量:** 水溶性食物繊維をエタノールで沈殿させた後、残渣をろ過・乾燥・秤量します。総食物繊維定量値は、タンパク質および灰分含量で補正します。

適用範囲

本測定方法は、穀類、果物および野菜などの加工食品および原材料中の、水溶性、不溶性および総食物繊維含量の測定に適用されます。

装置

1. トールビーカー (400 mLおよび600 mL)

2. るつぼ形ガラスろ過器[Corning社 No. 32940-50C (Pyrex® 50 mL, pore size: Coarse, ASTM 40~60 µm) もしくは同等品]を以下の手順で準備する。
 - a. マッフル炉 (525 °C) で一晩灰化する。
 - b. 吸引しながらセライトおよび灰を除去する。
 - c. 室温で1時間、2 % Micro洗浄液 (3ページ、試薬7) に浸漬する。
 - d. ガラスろ過器を水およびイオン交換水ですすぐ。
 - e. 最終洗浄として、15 mLアセトンですすぎ自然乾燥させる。
 - f. 約1.0 gのセライトをガラスろ過器に加え、130 °Cで恒量になるまで乾燥させる。
 - g. デシケーター内で約1時間冷却後、セライトを含むガラスろ過器の重量を記録する。
3. 吸引ろ過瓶 (1 L)
4. 吸引ろ過瓶用ゴム製アダプター
5. 真空装置 (真空度の調整が可能な真空ポンプまたはアスピレーター)
6. 振とう恒温槽 (20-24 L、蓋付き、100 °Cで保持可能なもの、自動タイマー付き)
7. 天秤 (0.1 mgを正確に量り取れるもの)
8. 送風定温乾燥機 (2台、それぞれ103 ± 2 °Cと130 ± 3 °Cに設定する)
9. タイマー
10. デシケーター (シリカゲルもしくは同等の乾燥剤を使用、シリカゲルは130 °Cで隔週一晩乾燥し使用する)
11. pHメーター
12. マイクロピペットおよびチップ (50-200 µL用、5 mL用)
13. 分注用／計量用器具
 - a. 15 ± 0.5 mLを量り取れるもの (78 % エタノール、95 % エタノール、アセトン用)
 - b. 40 ± 0.5 mLを量り取れるもの (バッファー用)
14. メスシリンダー (500 mL)
15. マグネチックスターラーおよび攪拌子
16. ゴム製スパチュラ
17. マッフル炉 (525 ± 5 °C)

試薬

1. 95 % (v/v) エタノール
2. 78 % (v/v) エタノール
821 mLの95 % (v/v) エタノールを1 Lメスフラスコに加え、イオン交換水で定容し、十分に混合する。液面位置を確認し、必要に応じイオン交換水を加えて1 Lに調整し使用する。
3. アセトン (試薬特級)
4. 総食物繊維測定用酵素試薬 (0-5 °Cで保管)
 - a. 耐熱性α-アミラーゼ (**E-BLAAM**) : 3,000 U/mL (Ceralpha法)
 - b. プロテアーゼ (**E-BSPRT**) : 50 mg/mL、350 U/mL (チロシン相当量として)
 - c. アミログルコシダーゼ (**E-AMGDF**) : 200 U/mL (p-ニトロフェニル β-マルトシド基質使用時) もしくは3,300 U/mL (可溶性澱粉基質使用時)
5. イオン交換水
6. セライト (分析用グレード、**G-CELITE**)
7. 洗浄液 (Micro-90、International Products Corp., Trenton, NJ)
イオン交換水で 2% 溶液を調製し使用する。
8. 0.05 M MES-TRIS緩衝液 pH 8.2 (24 °Cにおいて)
19.52 gの2-モルホリノエタンスルホン酸 (MES: **B-MES250**) および12.2 gのトリスヒドロキシメチルアミノメタン (TRIS: **B-TRIS500**) をイオン交換水1.7 Lに溶解し、6.0 N水酸化ナトリウム水溶液でpH 8.2に調整後、イオン交換水で2 Lに定容し使用する。
9. 0.561 N 塩酸
6 N 塩酸 93.5 mLをメスフラスコ内のイオン交換水約700 mLに加え、1 Lに定容し使用する。
10. pH標準液 (pH 4.0、7.0、10.0)

酵素の純度

適切な酵素活性が確保されており、かつ不要な酵素活性が含まれていないことを確認するため、下記に示す標準試料を用い、試験手順全体に沿った評価試験を行います。新規ロットの酵素試薬はすべて評価試験を行う必要があります。また、過去6ヶ月以内に評価試験を実施していない酵素試薬についても、同様に試験を実施します。

または、本取扱説明書の11～12ページに要約されている評価方法を用いて、酵素活性および純度を評価することも可能です。

標準試料	評価対象となる酵素	試料重量 (g)	想定回収率 (%)
ペクチン (柑橘類由来)	ペクチナーゼ ^a	0.1	90～95 ^c
β-グルカン (大麦由来)	β-グルカナーゼ (セルラーゼ) ^a	0.1	95～100
澱粉 (小麦由来)	アミラーゼ ^b	1.0	0～1
カゼイン	プロテアーゼ ^b	0.3	0～2
ハイアミロース澱粉	アミラーゼ	1.0	～30 ^d

a 本試験において、存在してはいけない酵素の活性。

b 本試験において、十分機能していなければならない酵素の活性。

c ペクチン (柑橘類由来) はエタノールの添加により完全には沈殿形成しないため、想定回収率は低くなる。

d 本標準試料は酵素分解に耐性を持つ澱粉を高レベルで含有します。そのため、想定回収率の正確な値は、本試験で使用する耐熱性α-アミラーゼの活性レベルに影響されます。

操作手順

1. ブランク試験

821 mLの95 % (v/v) エタノールを1 Lメスフラスコに加え、イオン交換水で定容し、十分に混合する。液面位置を確認し、必要に応じイオン交換水を加えて1 Lに調整し使用する。

a. 各測定時に、試薬由来の残渣の測定値への影響を考慮するため、試料と並行でブランク試験を2反復で実施する。

2. 試料

a. 乾燥試料1.000 ± 0.005 gを2反復で正確に400 mLのトールビーカーに秤量する。

b. 各ビーカーに40 mLの0.05 M MES-TRIS 緩衝液 (pH 8.2) を加え、攪拌子を入れる。マグネチックスターラー上で攪拌し、試料が溶液中に完全に分散するまで混合する (ダマの形成を防ぎ、酵素が試料に十分作用できるようにするため)。

3. 耐熱性α-アミラーゼによる分解

a. 低速で攪拌しながら、50 μLの耐熱性α-アミラーゼ溶液を加える。

b. 各ビーカーをアルミホイルで覆う。

c. アルミホイルで覆ったビーカーを98～100 °Cの振とう恒温槽に入れ、継続的に攪拌しながら30分間反応させる。すべてのビーカーを恒温槽に入れた時点で時間の計測を開始する。

4. 冷却

a. すべてのトールビーカーを恒温槽から取り出し、60 °Cまで冷却する。

b. アルミホイルを外す。

c. 必要に応じて、ビーカー内壁に付着したリング状残渣や底部のゲル状残渣をスパチュラでかき落とす。

d. マイクロピペットを用い、10 mLの蒸留水でビーカー内壁およびスパチュラを洗い流す。

e. 恒温槽内の高温の水の一部を排出し、冷水を加えて水温を60 °Cに調整する。

5. プロテアーゼによる分解

a. 各ビーカーにプロテアーゼ溶液100 μLを加える。

b. 再度ビーカーをアルミホイルで覆う。

c. 60 ± 1 °Cの振とう恒温槽で、継続的に攪拌しながら30分間反応させる。恒温槽の温度が60 °Cに到達した時点で時間の計測を開始する。

6. pHの確認

a. ビーカーを振とう恒温槽から取り出す。

b. アルミホイルを外す。

c. 攪拌しながら、5 mLの0.561 N 塩酸をビーカーに加える。

d. pH を測定し、pH 4.1～4.8であることを確認する。必要に応じ5% 水酸化ナトリウム水溶液または5 %塩酸を加えpHを調整する (注2、6ページ参照)。

7. アミログルコシダーゼによる分解

- a. 攪拌子で攪拌しながら、200 μ Lのアミログルコシダーゼ溶液を加える。
- b. アルミホイルで覆う。
- c. 60 ± 1 °Cの振とう恒温槽で、継続的に攪拌しながら30分間反応させる。恒温槽の温度が60 °Cに到達した時点で時間の計測を開始する。

A.不溶性食物繊維

8. ろ過の準備

- a. セライトを含むガラスろ過器の風袋重量を0.1 mgの精度で秤量する
- b. 約3 mLの蒸留水を用い、ガラスろ過器内のセライト層を湿らせ、層を均一にならす。
- c. 吸引しながら、セライトをガラスろ過板上に均一な層として形成させる。

9. 手順7で得た酵素反応液を、るつぼ形ガラスろ過器でろ過しながら吸引ろ過瓶で回収する。

10. 70 °Cに加温した蒸留水10 mLを用いて、るつぼ型ガラスろ過器上の残渣を2回洗浄する。この際、まずは酵素反応液が入っていたビーカーを70 °Cに加温した蒸留水の一部を用いてすすぎ、内容物を完全にくるつぼ型ガラスろ過器に移しながら洗浄を行う。ろ液および洗浄液は、水溶性食物繊維の定量のため、あらかじめ風袋重量を測定した600 mLトールビーカーに移す(水溶性食物繊維の定量については、6ページの水溶性食物繊維測定法手順11へ進む)。

11. 以下の溶媒各10 mLで残渣を2回ずつ洗浄する：

- a. 95 %エタノール
- b. アセトン

12. 残渣を含むガラスろ過器を103 °Cで一晩乾燥させる。

13. ガラスろ過器をデシケーター内で約1時間放冷する。食物繊維残渣およびセライトを含むガラスろ過器を0.1 mgの精度で秤量する。残渣重量を求めるため、風袋重量(乾燥後のガラスろ過器およびセライトの重量)を差し引く。

14. タンパク質および灰分の定量

各食物繊維について、2反復の残渣のうち一方をタンパク質分析に使用し、もう一方を灰分分析に供する。

- a. 残渣のタンパク質分析はケルダール法で行う。タンパク質量(g)の算出には、すべての場合において窒素換算係数6.25を用いる。
- b. 灰分分析では、2つ目の残渣を525 °Cで5時間灰化する。デシケーター内で放冷し、0.1 mg単位で秤量する。乾燥後のガラスろ過器およびセライトの重量を差し引き、灰分量を求める(6ページの注3参照)。

B.水溶性食物繊維

1-10. 不溶性食物繊維測定法手順 1～10に従う。

11. 不溶性食物繊維測定法手順10で得られたろ液および洗浄液を、風袋重量を測定したビーカーに移し、全重量を秤量する。

12. 水溶性食物繊維の沈殿

- a. 60 °Cに加温した95 %エタノールを4倍量加える。エタノールの一部をとり、不溶性食物繊維測定法の手順10で使用したろ過瓶をすすぐ。または、ろ液および洗浄液の混合溶液の重量を80 gに調整し、60 °Cに加温した95 %エタノールを320 mLを加える。
- b. 室温で60分間静置し、沈殿させる。

13. ろ過の準備

- a. セライトを含むガラスろ過器の風袋重量を0.1 mgの精度で秤量する。
- b. 洗浄瓶を用い78 %エタノール15 mLでガラスろ過器内のセライト層を湿らせて均一にならす。
- c. 吸引しながら、セライトをガラスろ過板上に均一な層として形成させる。

14. ろ過

- a. 水溶性食物繊維測定法の手順12で得られた沈殿を含む酵素処理液を、ガラスろ過器でろ過する。
- b. 78%エタノール入り洗浄瓶およびゴム製スパチュラを用い、ビーカー内の残存粒子をすべてガラスろ過器に洗い込む。

15. 洗浄

吸引しながら、以下の洗浄液15 mLずつを用いて残渣を順次2回洗浄する(6ページの注4参照)。

- a. 78 %エタノール
- b. 95 %エタノール
- c. アセトン

16. 残渣を含むガラスろ過器を103 °Cで一晩乾燥させる。

17. 不溶性食物繊維測定法手順13および14に進む。

C.総食物繊維

1-7.手順1～7に従う。

8. エタノールによる食物繊維の沈殿

- 各試料に、60℃に加熱した95%エタノール225 mLを加える。液量は加熱後のものを測定するようにする。エタノールと試料溶液の容量比は4:1となる。95%エタノールを誤って65℃まで加熱した場合は、膨張による体積補正のため228 mLを加える。
- すべての試料を大きなアルミホイルで覆う。
- 室温で60分間静置し、沈殿させる。

9. 水溶性食物繊維測定法の手順13～17へ進む。

結果の算出：

$$\text{総食物繊維 (\%)} = \frac{\frac{R_1 + R_2}{2} - p - A - B}{\frac{m_1 + m_2}{2}} \times 100$$

R_1 = 試料 m_1 の残渣重量₁

R_2 = 試料 m_2 の残渣重量₂

m_1 = 試料重量₁

m_2 = 試料重量₂

A = R_1 の灰分重量

p = R_2 のタンパク質重量

B = ブランク

$$= \frac{BR_1 + BR_2}{2} - BP - BA$$

BR = ブランクの残渣重量

BP = BR_1 のブランクタンパク質重量

BA = BR_2 のブランク灰分重量

注：これらの計算は、ネオジェンウェブサイト (www.neogen.com) の製品ページ経由でダウンロード可能な「Megazyme Mega-Calc™」を使用することで簡略化できます。

注：

1. 本法とAACC 32-05.01法および32-21.01法との相違点を以下に示す。

- 従来法の0.08 Mリン酸緩衝液 (pH 6.0) 50 mLの代わりに、0.05 M MES-TRIS緩衝液 pH 8.2 (24℃において) 40 mLを使用する。MES-TRIS緩衝液のpHは温度により変化する。MES-TRIS緩衝液のpH (pH 8.2、24℃において) は、85～90℃では6.9～7.2、55～60℃では7.4～7.6に変化する。耐熱性 α -アミラーゼの至適pHは、60℃ではpH 6.0付近であるが、温度上昇に伴い変化し、90℃ではpH 7.0付近となる。
- 本法では高活性酵素を使用するため、耐熱性 α -アミラーゼの使用量を200 μ Lから50 μ Lに減量している。
- 耐熱性 α -アミラーゼによる処理後、ビーカー内壁に残ったリング状の付着物は、必要に応じてかき落とす。耐熱性 α -アミラーゼによる処理後、ピペットを用いて蒸留水10 mLを加え、スパチュラおよびビーカー内壁を洗浄する。
- プロテアーゼ処理ではpH調整が不要なため、反応混合液に水酸化ナトリウム溶液は加えない。
- アミログルコシダーゼ処理の際に、0.561 N塩酸5 mLを加える。
- 総食物繊維の定量において、沈殿工程で加える95%エタノール量は280 mLではなく225 mLに変更する。水溶性／不溶性食物繊維の定量においては、ろ液および洗浄液の合計重量を100 gではなく80 gに調整する。そのため、60℃の95%エタノールは320 mLを加える。または、ろ液および洗浄液の混合溶液の重量を測定し、4倍量の95%エタノールを加える。この変更により、総ろ過量は375～400 mLに減少する (7～8ページの図1および図2参照)。

2. 溶液のpHは温度低下に伴い上昇するため、pH調整を行う直前までビーカーを60℃の恒温槽に入れておくことが重要である。通常、ほとんどのオート麦、大麦、小麦およびトウモロコシ製品では、追加のpH調整 (5%塩酸または5%水酸化ナトリウム水溶液を使用) は不要である。このような既知の製品については、0.561 N塩酸5 mLを加えた後のpH確認手順を省略できる。ただし、異常を検出するため、ブランクのpHを定期的に確認することを推奨する。ブランクが適正pH範囲外の場合は、試料のpHも確認する。

3. 不溶性食物繊維残渣を95%エタノールおよびアセトンで洗浄する操作が遅れると、不溶性食物繊維値が過大に算出されるおそれがある。したがって、不溶性食物繊維残渣は、ろ過後速やかに洗浄することが推奨される。

4. 一部の試料ではガム状物質が表面に形成され液体を閉じ込めることがある。この場合、スパチュラで膜層を破る。

参考文献

1. Lee, S. C., Prosky, L. & DeVries, J. W. (1992). Determination of total, soluble, and insoluble, dietary fiber in foods - enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **75**, 395-416.
2. Prosky, L., Asp, N. G., Schweizer, T. F., DeVries, J. W. & Furda, I. (1988). Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: Interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 1017-1023.
3. Prosky, L., Asp, N. G., Schweizer, T. F., DeVries, J. W. & Furda, I. (1992). Determination of insoluble and soluble dietary fiber in foods and food products: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **75**, 360-367.

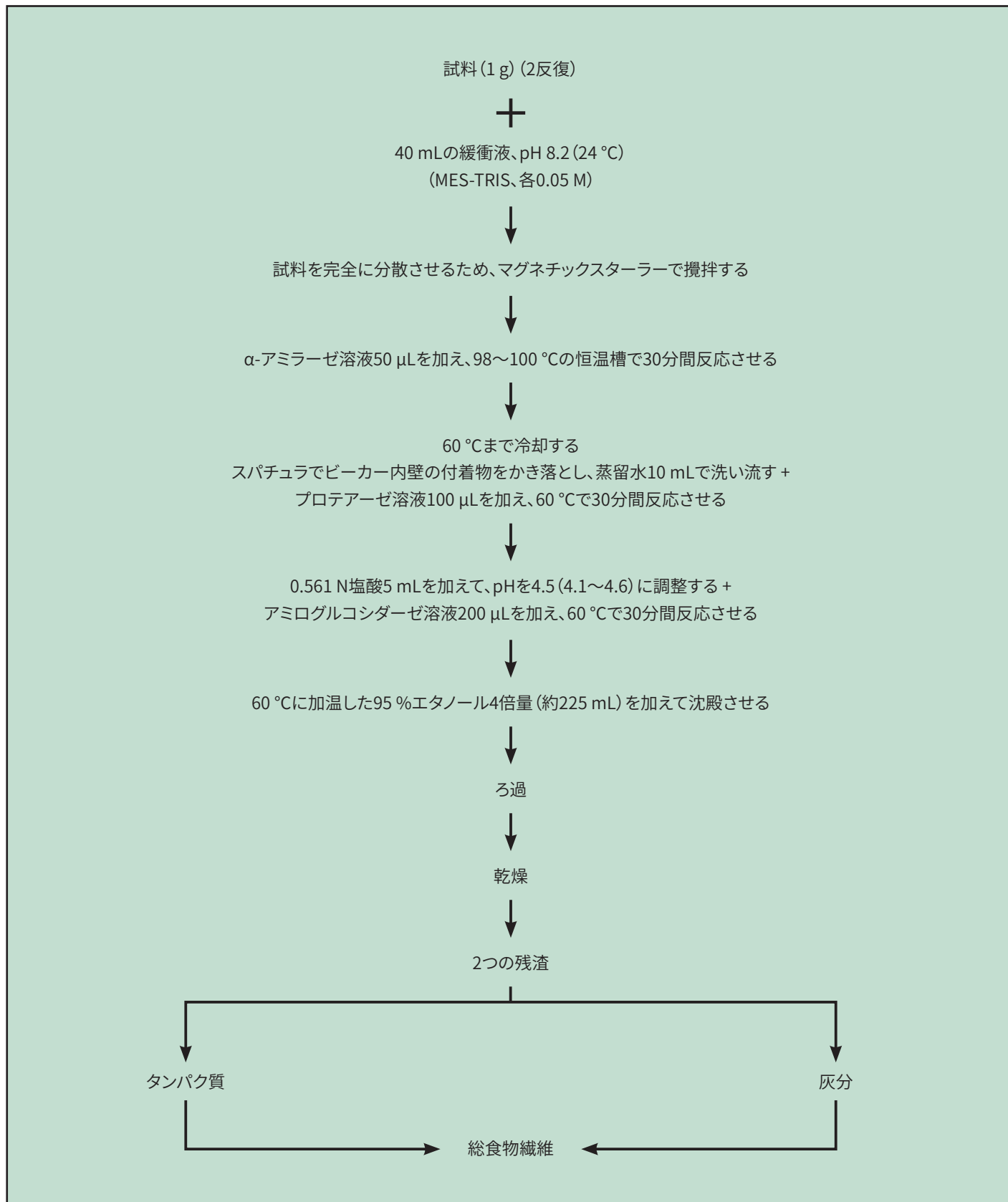


図1. 総食物繊維定量法の分析手順

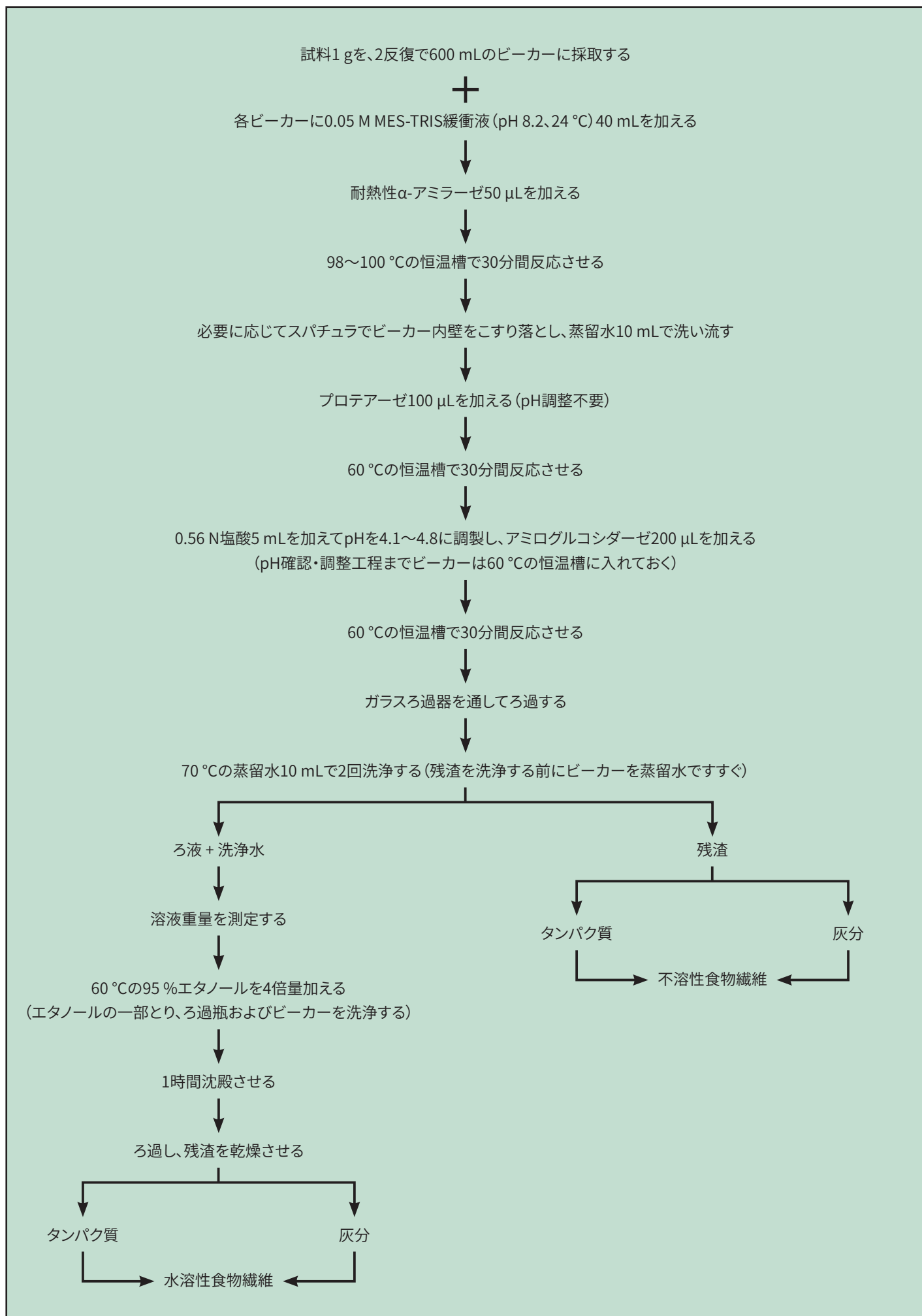


図2. 水溶性／不溶性食物繊維定量法の分析手順

測定法2:

総食物繊維の定量

AACC 32-05.01法およびAOAC 985.29法に基づく。

装置

1. 分注器
 - a. 95 %エタノール用: 280 ± 2.0 mL
 - b. 78 %エタノール、95 %エタノール、アセトン用: 10 ± 0.5 mL
 - c. 緩衝液用: 50 ± 0.5 mL
2. その他の装置は、本取扱説明書2～3ページの記載と同様とする。

試薬

1. 0.08 Mリン酸緩衝液 (pH 6.0) の調製
リン酸水素二ナトリウム無水物 (Na_2HPO_4) 1.400 g (または二水和物 1.753 g) およびリン酸二水素ナトリウム一水和物 (NaH_2PO_4) 9.68 g (または二水和物 10.94 g) を、約 700 mL の蒸留水に溶解する。蒸留水を加えて全量を 1 L とし、pHメーターで pH を確認する。
2. 0.275 N水酸化ナトリウム溶液の調製
ACSグレードの水酸化ナトリウム 11.00 g を、適切な安全対策を講じたうえで、1 L メスフラスコ中の蒸留水約 700 mL に溶解する。放冷後、蒸留水を加えて全量を 1 L とする。
3. 0.325 N塩酸の調製
既知力価のストック溶液 (1.0 N HCl 325 mL) を 1 L メスフラスコにとり、蒸留水で標線まで希釈する。

操作手順

試料の調製

総食物繊維は、乾燥した低脂肪または脂肪を含まない試料について、そのままの状態 で定量する。試料を均質化し、70 °C の真空乾燥機で一晩乾燥させる。デシケーター内で放冷し、再秤量して乾燥による重量減少を記録する。乾燥試料の一部を、0.3～0.5 mmメッシュの篩を通るまで乾式粉碎する。加熱できない試料の場合は、粉碎前に凍結乾燥する。脂肪含量が高く (10 %超)、適切に粉碎できない場合は、粉碎前に試料 1 g あたり石油エーテル 25 mL を用いて 3 回脱脂する。複数の食品から構成される検体を分析する際は、総食物繊維を定量する前に必ず脂肪を抽出除去する。脂肪除去による重量減少を記録する。最終的な食物繊維含量 (%) は、除去した水分および脂肪について補正する。乾式粉碎した試料は、分析実施まで密閉瓶に入れてデシケーター中で保管する。

操作手順

試薬由来の残渣の測定値への影響を考慮するため、試料と並行して全手順でブランク試験を行う。

1. 試料 1 g を、2 反復で 400 mL トールピーカーに 0.1 mg の精度で秤量する。2 つの試料重量の差は 20 mg 未満とすること。各ピーカーに 50 mL のリン酸緩衝液 (pH 6.0) を加え、pHメーターで pH を確認する。pH が 6.0 ± 0.1 でない場合は調整する。
2. 耐熱性 α -アミラーゼ溶液 50 μL を加える。
3. ピーカーをアルミホイルで覆い、沸騰水浴中に入れる。98～100 °C で 15 分間反応させる。5 分ごとに穏やかに振とうする。
注: 恒温槽内のピーカー数が多く、ピーカー内容物が 98～100 °C に到達しにくい場合は、反応時間を延長する。温度計を用いて、ピーカー内容物が 98～100 °C で 15 分間保持されたことを確認する。沸騰水浴中で合計 30 分間処理すれば十分である。
4. 溶液を室温まで冷却する。
5. 0.275 N水酸化ナトリウム溶液 10 mL を加え、pH を 7.5 ± 0.1 に調整する。pHメーターで pH を確認する。
6. プロテアーゼ溶液 100 μL を加える。
7. ピーカーをアルミホイルで覆い、60 °C で攪拌しながら 30 分間反応させる。
8. 冷却後、0.325 N塩酸 10 mL を加え、pH を 4.5 ± 0.2 に調整する。pHメーターで pH を確認する。
9. アミログルコシダーゼ 200 μL を加え、アルミホイルで覆い、60 °C で攪拌しながら 30 分間反応させる。
10. 60 °C に加温した 95 %エタノール 280 mL を加える (加熱前に液量を測定する)。室温で 60 分間静置し、沈殿させる。
11. セライトを含むガラスろ過器を 0.1 mg の精度で秤量し、洗浄瓶を用い 78 %エタノールでガラスろ過器内のセライト層を湿らせ、均一にならす。

12. 吸引により、セライトをガラスろ過板上に均一な層として形成させる。吸引しながら、沈殿物を定量的にガラスろ過器に移す。
13. 残渣を、78 %エタノール (20 mL × 3回)、95 %エタノール (10 mL × 2回)、およびアセトン (10 mL × 2回) で順次洗浄する。ろ過中にガム状物質が形成され、残渣内に液体が滞留してろ過が進まなくなる場合がある。その場合は、スパチュラで表面の膜を破り、ろ過を促進する。ろ過工程全体を通して注意深く断続的に吸引を行うことで、長時間のろ過を避けることができる。
14. 残渣を含むガラスろ過器を、70 °Cの真空乾燥機または105 °Cの送風乾燥機で一晩乾燥させる。
15. デシケーター内で放冷し、0.1 mg単位で秤量する。ガラスろ過器およびセライトの重量を差し引き、残渣の重量を求める。
16. 2反復の残渣のうち一方を用いて、AACC 46-13法によりタンパク質を定量する。窒素係数は6.25とする。
17. 2反復のもう一方の残渣は525 °Cで5時間灰化する。デシケーター内で放冷し、0.1 mgまで秤量する。ガラスろ過器およびセライトの重量を差し引き、灰分量を求める。

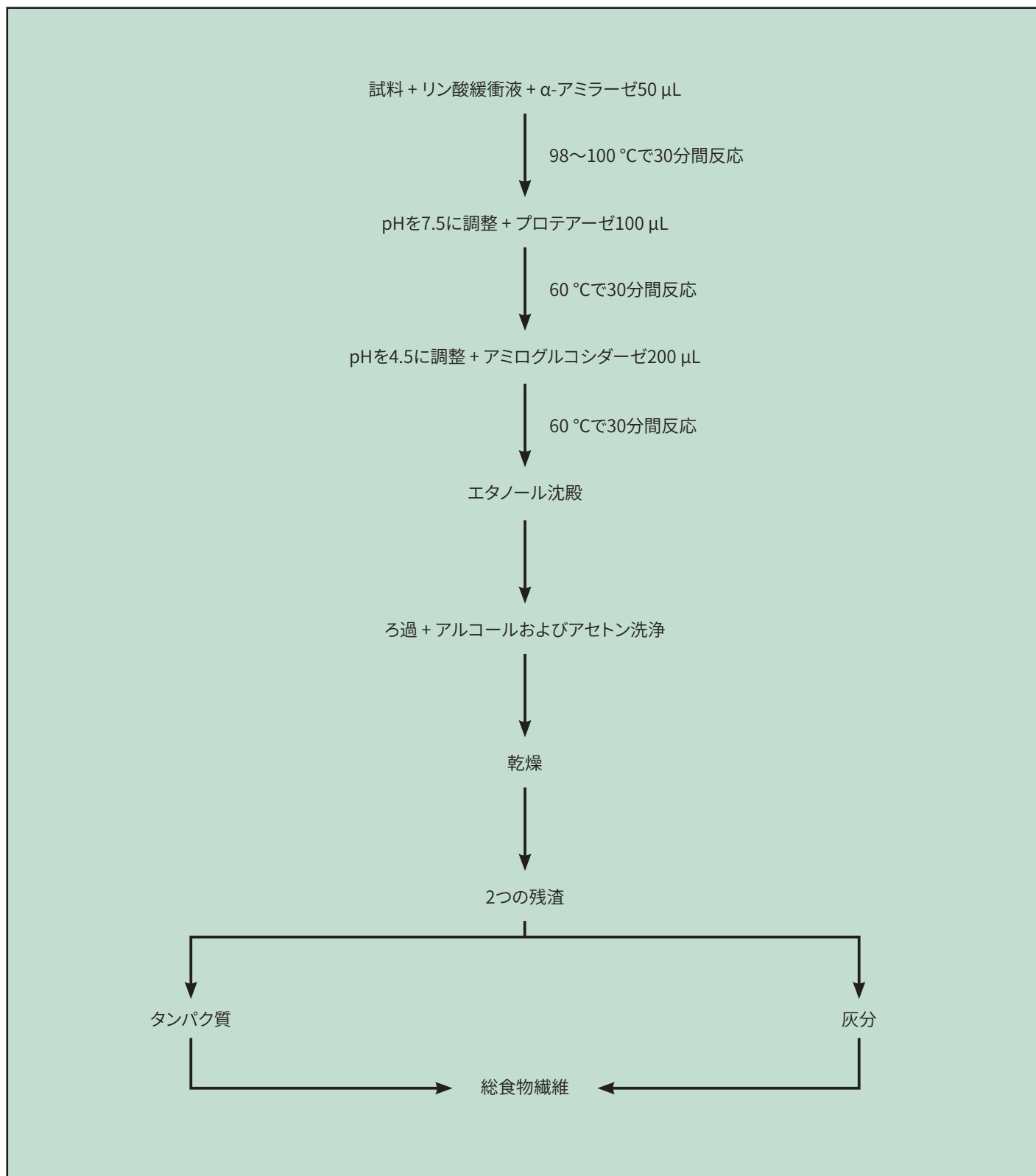


図3. 総食物繊維定量法の分析手順

結果の算出:

未補正平均ブランク残渣 (UABR)	=	2反復のブランクで得られた残渣重量の平均値 (mg) (手順15)
ブランクのタンパク質残渣 (BPR)	=	UABR × ブランク中のタンパク質含量 (%) (手順16) / 100
ブランクの灰分残渣 (BAR)	=	UABR × ブランク中の灰分含量 (%) (手順17) / 100
補正ブランク (CB)	=	UABR - BPR - BAR
未補正平均試料残渣 (USAR)	=	2反復の試料で得られた残渣重量の平均値 (mg) (手順15)
試料のタンパク質残渣 (SPR)	=	USAR × 試料中のタンパク質含量 (%) (手順16) / 100
試料の灰分残渣 (SAR)	=	USAR × 試料中の灰分含量 (%) (手順17) / 100
補正済み試料残渣 (CSR)	=	USAR - SPR - SAR - CB
総食物繊維含量 (TDF%)	=	100 × CSR / 試料重量 (mg)

試料調製時に脱脂または乾燥を行った場合は、除去した粗脂肪と水分のいずれか、または両方を考慮して、もとのTDF%に補正する。

注: これらの計算は、Megazymeウェブサイト (www.megazyme.com) の製品ページからダウンロード可能な「Megazyme Mega-Calc™」を利用することで簡略化できます。本取扱説明書の9ページをご参照ください。

参考文献:

1. Association of Official Analytical Chemists. (1985). *Official Methods of Analysis*, 14th ed., 1st suppl. Secs. **43**, A14-43, A20, p.399.
2. Association of Official Analytical Chemists (1986). *Changes in methods. J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 370.
3. Association of Official Analytical Chemists (1987). *Changes in methods. J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 393.
4. Prosky, L., Asp, N. G., Furda, I., DeVries, J. W., Schweizer, T. F. & Harland, B. F. (1985). Determination of total dietary fibre in foods and food products: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 677.
5. Prosky, L., Asp, N. G., Schweizer, T. F., DeVries, J. W. & Furda, I. (1988). Determination of insoluble, soluble, and total dietary fibre in foods and food products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 1017.

総食物繊維測定に用いる酵素の活性および純度の測定

AACC/AOAC INTERNATIONALの食物繊維分析法を適切に適用するには、使用する酵素が必要な活性を有し、かつ重要な夾雑酵素活性を含まないことが必須です。これまでに報告されている主な問題点は以下のとおりです。

- a. アミログルコシダーゼへのセルラーゼ、キシラナーゼおよびペクチナーゼの混入 (これによりβ-グルカン、アラビノキシランおよびペクチンが分解され、定量値が過小評価される)。
- b. 耐熱性α-アミラーゼ濃度のばらつき (難消化性澱粉の測定に影響) (参考文献1参照)。
- c. プロテアーゼへの1,3:1,4-β-グルカナーゼの混入 (β-グルカンの過小評価につながる)。

使用する酵素の活性基準

AACC/AOAC INTERNATIONALの食物繊維定量におけるα-アミラーゼ、アミログルコシダーゼおよびプロテアーゼの使用実績に基づく、正確で信頼性の高い測定に必要な活性は以下のとおりです。

アミログルコシダーゼ (*A. niger*): 1分析あたり0.2 mL

3,300 U/mL (可溶性澱粉基質を用いた還元糖定量法使用時)、または**200 U/mL** (AMG測定用試薬使用時: 過剰量のβ-グルコシダーゼ存在下でのp-ニトロフェニルβ-マルトシド基質使用時)。

耐熱性α-アミラーゼ (*B. licheniformis*): 1分析あたり0.05 mL

10,000 U/mL (可溶性澱粉基質を用いた還元糖定量法使用時)、または**3,000 U/mL** (Ceralpha試薬: 耐熱性α-グルコシダーゼ存在下でのブロック化p-ニトロフェニルマルトヘプタオシド基質使用時)。

プロテアーゼ (*B. licheniformis*, Subtilisin A): 1分析あたり0.10 mL

350 Tyrosine Units/mL (50 mg/mL, 7 Tyrosine Units/mg) (カゼインを基質とし、チロシン標準品を用いて測定)。
プロテアーゼ活性は、Megazyme® アゾカゼイン酵素基質 (**S-AZCAS**) を用いて簡便に測定することもできる。

詳細: McCleary, B. V. (1999). Enzyme Purity and Activity in Fiber Determinations. *Cereal Foods World*, **44**(8), 590-596.

重要な夾雑酵素活性

1. アミログルコシダーゼ中の夾雑酵素活性

食物繊維の定量に用いるアミログルコシダーゼ酵素製品を評価したところ、多くの製品（極めて高純度で高価な製品を除く）には、 β -グルカナーゼ（セルラーゼ）が夾雑酵素として相当量含まれていることが分かりました。一部の製品では、この夾雑活性が活性値ベースで最大1%に達し、その結果、 β -グルカンの定量値が最大で10~15%低く算出されることが確認されました。アミログルコシダーゼ中に混入するセルラーゼは、大麦 β -グルカンを基質とした粘度測定法、またはMegazyme® β -Glucazyme タブレット (T-BGZ) を用いることにより、確実に検出・定量できます。

アミログルコシダーゼに混入するセルラーゼが β -グルカンの粘度（すなわち分子サイズ）に及ぼす影響を図4に示します。試験は、酢酸ナトリウム緩衝液（50 mM、pH 4.5）中に懸濁した大麦 β -グルカン（10 mg/mL、10 mL）に、総食物繊維測定時と同じ使用量のアミログルコシダーゼ0.2 mLを加え、40 °CでC型U字管粘度計を内で保持します。一定時間ごとに粘度を測定し、比粘度は $(t-t_0)/t_0$ として算出しています。ここで、 t_0 は溶媒の流下時間、 t は反応液の流下時間を示します。

試験では2種類の酵素製品を比較しました。

A. Megazyme® アミログルコシダーゼ (*Aspergillus niger* 由来) (**E-AMGDF**) (他社の総食物繊維測定用市販品と同じAMG濃度に調製)

B. 食物繊維定量用として推奨されている他社のアミログルコシダーゼ市販品

試験の結果、Megazyme® アミログルコシダーゼ (*Aspergillus niger* 由来) (**E-AMGDF**) には、 β -グルカナーゼの混入は実質的に認められませんでした。一方で、他社の酵素製品には、夾雑酵素が無視できないレベルで含まれていることが確認されました。

2. プロテアーゼ中の夾雑酵素活性

プロテアーゼ中の β -1,3:1,4-グルカナーゼの混入度合いは、アミログルコシダーゼ中のセルラーゼ測定法を改変し、測定時のpHを7.5（リン酸ナトリウム緩衝液、50 mM）に変更することで評価できます。

3. α -アミラーゼ中の夾雑酵素活性

耐熱性 α -アミラーゼには、検出可能なレベルの夾雑酵素活性は認められませんでした。

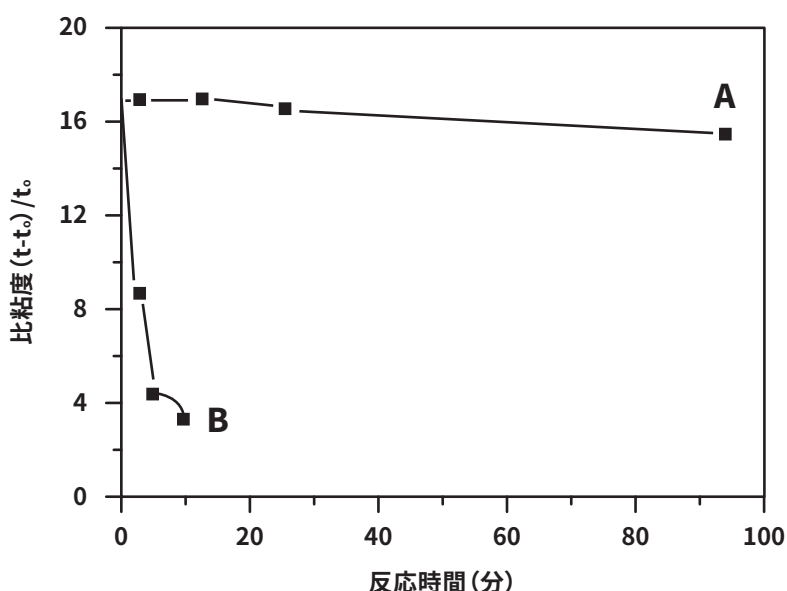


図4. 大麦 β -グルカンを基質とした粘度測定法によるアミログルコシダーゼ酵素製品中のセルラーゼ夾雑の評価（本文参照）。

A. Megazyme® アミログルコシダーゼ (*Aspergillus niger* 由来) (**E-AMGDF**)

B. 食物繊維定量に使用されている他社製アミログルコシダーゼ酵素



免責事項

本取扱説明書に記載された情報は、当社の知る限り正確かつ信頼できるものですが、使用条件は当社の管理外にあるため、本書に記載された推奨事項または提案について、明示または黙示を問わず、いかなる保証も行いません。また、本製品の使用が第三者の特許権を侵害しないことを保証するものではありません。なお、本取扱説明書は原文（英語版）を参考として和訳したものです。内容の正確性には十分配慮しておりますが、翻訳内容と原文との間に相違または解釈上の差異が生じた場合には、英語版原文を正式なものとして優先するものとします。

掲載の内容は、2026年8月現在のものです
NEOGEN、Megazymeは、Neogen社の商標です。

ネオジェンジャパン株式会社

<https://www.neogen.jp/>

NEO-464-A(0826)e.

Please Recycle. Printed in Japan.
© Neogen Corporation. All rights reserved.