

## ノート

# こんにゃく粉とでん粉との混合調製品中のこんにゃく粉の分解条件の検討

竹内 孝幸\*, 藤田 正憲\*, 桐山 文男\*, 笹川 邦雄\*\*, 古賀 哲\*\*

## Examination on Condition that Hydrolysis of Konjac Powder in Konjac Powder and Starch Preparations

Takayuki TAKEUCHI\*, Masanori FUJITA\*, Fumio KIRIYAMA\*, Kunio SASAKAWA\*\*, Satoshi KOGA\*\*

\*Nagoya Customs Laboratory

2 - 3 - 12, Irifune, Minato-ku, Nagoya - shi, Aichi-ken, 455 - 0032 Japan

\*\*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

531 Iwase, Matsudo - shi, Chiba-ken, 271 - 0076 Japan

The hydrolysis and determinations of konjac powder in the preparations of mixture of konjac and starch was investigated by HPLC.

In case of using barium hydroxide for neutralization of sulfuric acid for hydrolysis, liquid chromatogram stable baseline was obtained. It's impossible to calculate the starch weight content from glucose by hydrolysis formation, because some amounts of glucose from the source of konjac powder was added under the condition of starch hydrolysis method by enzyme or acid. So we investigated to hydrolyze completely of konjac powder by acid or by enzyme and acid. Judging from recovered weight ratio of mannose, the best hydrolysis condition of konjac powder is to hydrolyze for 6 hours using 1N-sulfuric acid, after hydrolyze by enzyme (cellulase) for 1 hour.

## 1. 緒 言

近年のダイエットブームにともなう低カロリー食品ブームによりこんにゃく粉を使用した各種製品が多数製造されているが、国産こんにゃく粉が高価であることから、これらの原料として種々のこんにゃく粉調製品(具体的にはこんにゃく粉とでん粉、こんにゃく粉とカラギーナン又はこんにゃく粉と砂糖の混合調製品、こんにゃく粉に水を加えてゼリーしたものなど)が輸入されている。これらの調製品は、こんにゃく粉の含有量により実行関税率表における分類が異なり、その税率格差が大きいため、こんにゃく粉の定量分析が極めて重要である。

従来税関分析<sup>1)</sup>における、こんにゃく粉調製品中のこんにゃく粉の定量分析は、試料を酸により加水分解し、生成したマンノースを高速液体クロマトグラフ (HPLC) により定量し、試料中のこんにゃく粉含有量を算出していた。しかし、この方法は、クロマトグラムのベースラインが不安定であり、試料の加水分解についても長時間を要する等の点で問題があった。

そこで、本研究は、クロマトグラムのベースラインの安定性についての検討を行うとともに、こんにゃく粉とでん粉調製品中のこんにゃく粉の定量を目的とした試料の加水分解条件の検討を行ったので報告する。

## 2. 実 験

### 2.1 試料および試薬

#### (1) 試 料

加工タピオカでん粉 (輸入品: 中国産)

こんにゃく粉 (輸入品: 中国産)

#### (2) 試 薬

標準試料

グルコース, マンノース: 試薬特級 (片山化学製)

内部標準物質

リボース: 試薬特級 (片山化学製)

酵素

\*名古屋税関業務部分分析部門 〒455-8535 愛知県名古屋市港区入船 2-3-12

\*\*大蔵省関税中央分析所 〒271-0076 千葉県松戸市岩瀬 531

-アミラーゼ (from *Bacillus subtilis*), グルコアミラーゼ (from *Rhizopus niveus*) : (生化学工業製), セルラーゼ (from *Aspergillus niger*) : (東京化成製)

除たん白剤 A

2.0%硫酸亜鉛水溶液

除たん白剤 B

1.8%水酸化バリウム水溶液

## 2. 2 測定装置および測定条件

(1)HPLC : 島津 LC - 6A システム

カラム : 三菱化成 MCI GEL CK08EH

(8mm I.D.×300mm)

カラム温度 : 40

移動相 : 水

流速 : 0.5ml/min

検出器 : 日立 L3300RI 検出

(2)HPLC : 島津 LC-10AD システム

カラム : 島津 Shim-pack SCR - 101P

(7.9mm I.D.×300mm)

カラム温度 : 70

移動相 : 水

流速 : 0.4ml/min

検出器 : Shodex RI-71

## 2. 3 酸加水分解物の中和方法の検討

希硫酸にフェノールフタレインを加え, 水酸化ナトリウムまたは水酸化バリウムで中和, ろ過後, 0.45  $\mu$ m のメンブレンフィルターを通して HPLC にて分離した。

## 2. 4 でん粉加水分解条件によるこんにゃく粉の分解程度の検討

こんにゃく粉を酵素<sup>2)</sup>と酸<sup>3)</sup>の2方法で分解した。分解方法は, まず試料 0.3g を 50ml ナス型フラスコに精秤し, 酵素分解の場合は水 10ml に分散後, 2N 水酸化ナトリウム 2ml を加

え 45 で 15 分間 化, 2N 酢酸で中和後, 酵素溶液 2ml (グルコアミラーゼ 75u/ml, -アミラーゼ 1500u/ml, 0.2M 酢酸緩衝液)を加え 45 で 2.5 時間分解, 除たん白剤 A, B 各 20ml を加えたものに, 酸分解の場合は 0.3M 硫酸 40ml に分散し 100 で 2.5 時間分解したものに, それぞれフェノールフタレインを加え水酸化バリウムで中和, 内部標準を加え 200ml に定容, ろ過後 0.45  $\mu$ m のメンブレンフィルターを通して HPLC により定量した。

## 2. 5 こんにゃく粉の最適加水分解条件の検討

試料を酸と酵素・酸併用の2方法で分解した。分解方法はまず試料 0.5 g (でん粉 0.3g, こんにゃく粉 0.2g) を 50ml ナス型フラスコに精秤し, 酸分解の場合, 1N または 2N 硫酸 20ml に分散し, 100 で加水分解したものに, 酵素分解・酸分解併用の場合は, セルラーゼ 25mg を加え 0.1M 酢酸緩衝液 15ml に分散し 40 で分解後, 4N または 8N 硫酸 5ml を加え (試料に対してそれぞれ 1N または 2N となる)100 で分解したものに, それぞれフェノールフタレインを加え水酸化バリウムで中和, 内部標準を加え 200ml に定容, ろ過後 0.45  $\mu$ m のメンブレンフィルターを通して HPLC により定量した。なお分解条件 Table1 に示す。

## 3. 結果および考察

### 3. 1 酸加水分解物の中和方法の検討

水酸化ナトリウムで中和した場合のクロマトグラムを Fig.1 に示す。MCI GEL CK08EH カラムでは測定開始後約 10 分に硫酸イオンのピークが現われ, Shim-pack SCR - 101P カラムでは測定開始後 12 分ころからブロードなピークが長時間にわたり現われた。

水酸化バリウムで中和した場合のクロマトグラムを Fig.2 に示す。Fig.1 に対し, どちらのカラムもベースラインは安定し

Table 1 Hydrolysis condition of konjac powder

	Concentration of sulfuric acid	Hydrolysis of konjac powder	
		By enzyme(hr.)	By acid(hr.)
Hydrolysis by acid	1 N and 2 N	—	6
		—	12
		—	24
Hydrolysis by enzyme and acid	1 N	0.5	6
		1	6
	1 N and 2 N	2	6
		4	6
		6	6
		1	2
	1 N	1	3
		1	4
		1	5
		1	6
		1	7

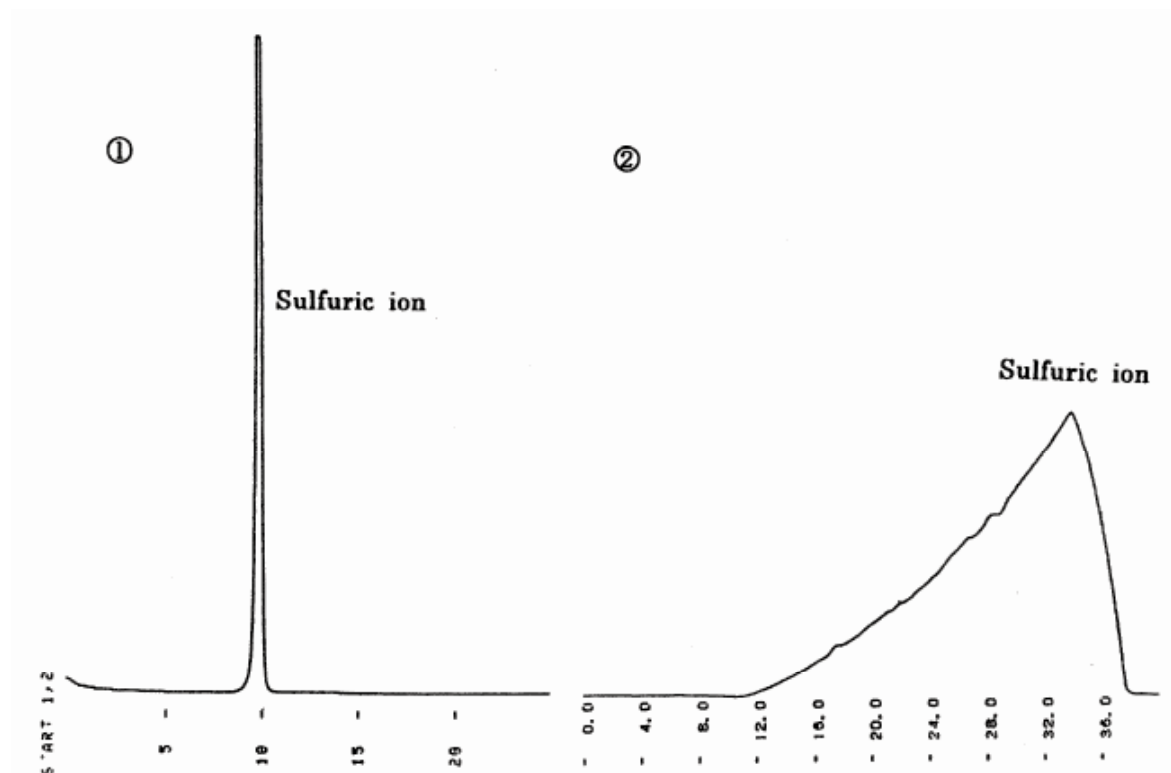


Fig.1 High Performance Liquid Chromatogram of sulfuric acid was neutralized by sodium hydroxide

Column:MCI GEL CK08EH ( 8.0mm I.D.×300mm )

Column:Shim-pack SCR-101P ( 7.9mm I.D.×300mm )



Fig.2 High Performance Liquid Chromatogram of sulfuric acid was neutralized by barium hydroxide

Column:MCI GEL CK08EH (8.0mm I.D.×300mm)

Column:Shim-pack SCR-101P (7.9mm I.D. ×300mm)

ていた。

この結果、水溶性の硫酸ナトリウムを生成する水酸化ナトリウムよりも、不溶性の硫酸バリウムを生成する水酸化バリウムで中和した方が硫酸イオンの影響を受けないことがわかった。

### 3. 2 でん粉加水分解条件によるこんにゃく粉の分解程度の検討

こんにゃく粉分解時のクロマトグラムを Fig.3 に示す。こんにゃく粉を酵素分解又は酸分解した結果、ともに 14 分過ぎにグルコースを検出し、15 分過ぎにマンノースも検出した。でん粉は分解するとグルコースを生じ、こんにゃく粉は分解するとグルコースとマンノース(=2:3 文献値<sup>4)</sup>)を生じることが知られている。でん粉加水分解条件によりこんにゃく粉が分解されなければ、でん粉の分解生成物であるグルコース量から、

でん粉を算出できる。しかし、でん粉加水分解条件では酵素分解、酸分解ともに、こんにゃく粉が一部加水分解されており、グルコース量からでん粉量を算出することはできないことがわかった。

### 3. 3 こんにゃく粉の最適加水分解条件の検討

酸分解のみ行った場合の分解時間と、こんにゃく粉重量に対するマンノース重量の回収割合の関係を Table 2 に示す。硫酸濃度がマンノース回収割合に与える影響をみると、2N 硫酸よりも 1N 硫酸で分解した方がマンノース回収割合が大きく、こんにゃく粉を分解するには、1N 硫酸の方がよかった。しかし、酸分解のみによるこんにゃく粉の分解では、マンノース回収割合が最大でも 52%程度と、理論値 60% (こんにゃく粉は 2:3 の割合でグルコースとマンノースに分解される。) よりかなり

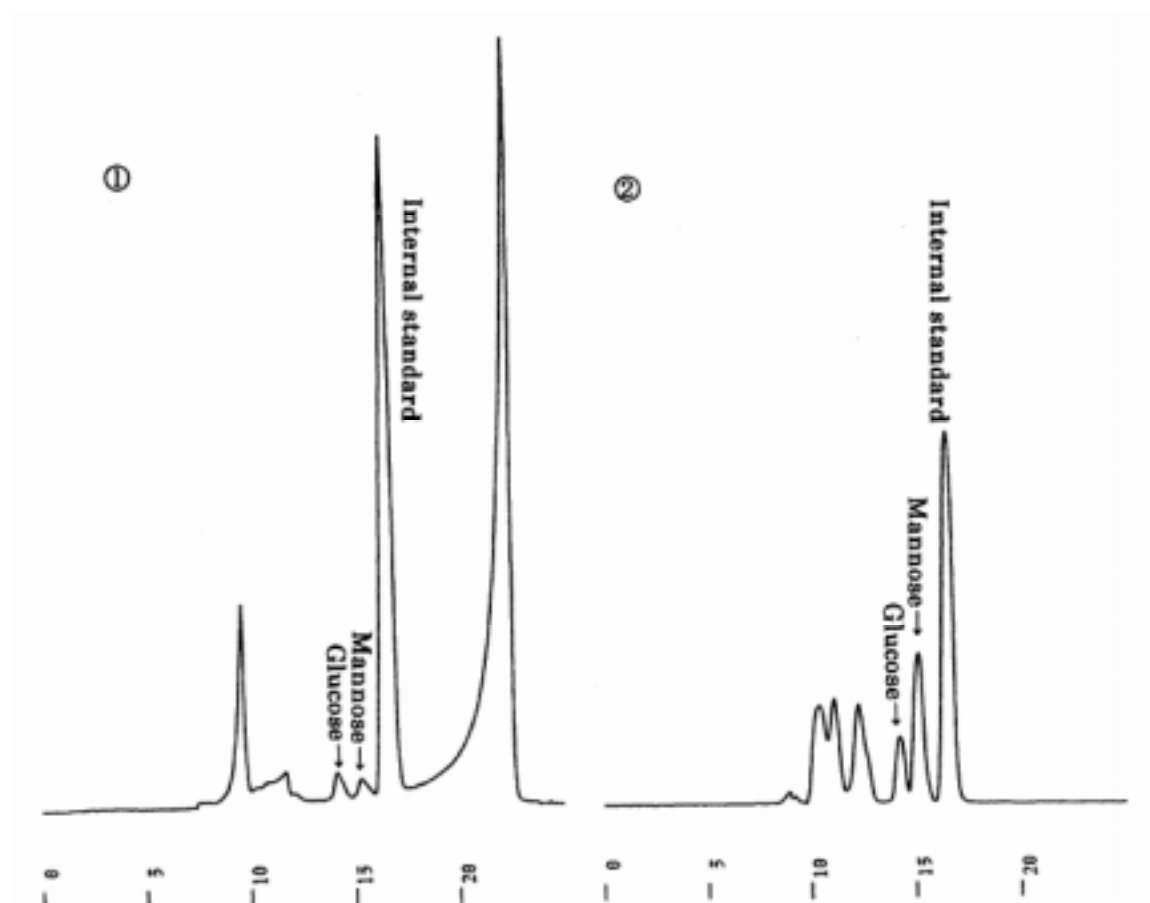


Fig.3 High Performance Liquid Chromatogram of konjac powder was hydrolyzed on hydrolysis condition of starch by enzyme or acid (Column:MCI GEL CK08EH (8.0mm I.D.×300mm) )

Hydrolysis by enzyme

Hydrolysis by acid

Table 2 Relationship between hydrolysis time and recovery ratio of mannose weight as konjac weight (Hydrolysis by acid)

Hydrolysis time by acid(hours)	Recovery rate of mannose weight as konjac weight(%)	
	In 1N-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	In 2N-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
6	51.80	47.24
12	51.86	50.18
24	52.24	51.26

Table 3 Relationship between hydrolysis time and recovery ratio of mannose weight as konjac weight (Hydrolysis by enzyme and acid)

Hydrolysis time(hours)		Recovery rate of mannose weight as konjac weight(%)	
By enzyme	By acid	In 1N-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	In 2N-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
0.5	6	51.46	—
1	6	59.61	54.95
2	6	57.86	54.79
4	6	58.69	55.49
6	6	58.28	55.80

Table 4 Relationship between hydrolysis time and recovery ratio of mannose weight as konjac weight (Hydrolysis by enzyme and acid)

Hydrolysis time(hours)		Recovery rate of mannose weight as konjac weight in 1N-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)
By enzyme	By acid	
1	2	53.41
1	3	56.77
1	4	57.19
1	5	58.16
1	6	59.61
1	7	59.24

小さい値を示しており、酸分解のみでこんにゃく粉を完全分解することは難しいことがわかった。なお、グルコース及びマンノースの定量については内部標準にリボースを用いた内標法により行った。

佐藤らは<sup>5)</sup>こんにゃく粉をセルラーゼ処理してオリゴ糖を得ている。そこで、セルラーゼ処理したこんにゃく粉を酸分解すればより完全に分解できるのではないかと考え酵素分解と酸分解の併用を試みた。酵素分解と酸分解を併用した場合の酵素分解時間による、こんにゃく粉重量に対するマンノース重量の回収割合の関係を Table 3 に示す。酵素分解時間の長短にかかわらず、2N 硫酸よりも 1N 硫酸の方がマンノース回収割合が大きく、Table 2 の結果と併せて、こんにゃく粉を分解するには 1N 硫酸の方がよいことがわかった。また、1N 硫酸の場合、マンノース回収割合は酵素分解 1 時間、酸分解 6 時間の時最大で、酵素分解時間がそれ以上になっても理論値に近い割合を示していることから、酵素分解時間が、マンノース回収割合に与える影響は 1 時間の酵素処理でほぼ一定となり、それ以上酵素処理時間が長くなっても差はあまり認められなかった。以上より、酸分解のみでこんにゃく粉を分解するよりも、酵素分解と酸分解を併用する方が明らかに有効であることがわかった。

酵素分解と酸分解を併用した場合の酵素分解 1 時間後の酸分解時間による、こんにゃく粉重量に対するマンノース重量の回収割合の関係を Table 4 に示す。マンノース重量の割合は、酸分解時間が 6 時間の時最大で、7 時間と時間が長くなってもたいした変化はみられないが、時間が短くなるにつれて値は徐々に小さくなった。Table 3.4 の結果から判断すると、こんにゃく粉の完全加水分解条件として、試料を酵素（セルラーゼ）で

1 時間分解した後、1N 硫酸で 6 時間酸分解するのが最適と考えられる。

#### 4. 要 約

こんにゃく粉とでん粉の混合調製品中のこんにゃく粉の定量分析を精度よく行うために、その加水分解について、HPLC 分析でのクロマトグラムベースラインを安定させる方法及び、試料の加水分解条件の検討を行った。クロマトグラムのベースラインを安定させる方法として、試料を酸分解した後中和する際、水酸化バリウムを用いると不溶性の硫酸バリウムを生成し、硫酸イオンの影響をまぬがれることがわかった。

試料の加水分解条件の検討として、まず、でん粉加水分解条件（酵素分解、酸分解の 2 方法）によりこんにゃく粉が分解されるかを検討した。こんにゃく粉はでん粉加水分解条件により一部分解されたため、でん粉のみを分解してその分解生成物であるグルコースの量からでん粉量を算出することはできないことがわかった。そこで、こんにゃく粉の最適加水分解条件の検討を行った結果、酸分解は 2N 硫酸よりも 1N 硫酸の方がよく、また、酸分解のみでこんにゃく粉を分解するよりも、酵素分解と酸分解を併用する方が明らかに有効であった。こんにゃく粉の完全加水分解条件をマンノース回収重量の割合から判断すると、試料を酵素（セルラーゼ）で 1 時間分解した後、1N 硫酸で 6 時間酸分解するのが最適と考えられる。

今後数々のこんにゃく粉原料についても同様の結果が得られるか検討を進めるとともに、こんにゃく粉調製品で精度よくこんにゃく粉量が定量。算出できるか検討する必要がある。

#### 文 献

- 1) 早野弘道, 熊澤勉; 本誌, 30, 39 (1991)
- 2) 山口真奈美, 熊澤勉, 関川義明; 本誌, 34, 22 (1995)
- 3) 小原哲二郎; 改定食品分析ハンドブック, 建帛社
- 4) 沖増哲; こんにゃくの科学, 溪水社
- 5) 佐藤利夫, 森谷昭彦, 水口純, 鈴木周一; 日化誌, 91, 11, 1071 (1970)