

原著論文

コンニャク精粉の Cellulase 加水分解生成物について、 $^1\text{H-NMR}$ と HPLC による D-グルコース / D-マンノース比の測定

奥 浩之^{*,†}

(受付日：2020年1月14日 受理日：2020年5月19日 オンライン発行日：2020年7月21日)

コンニャクグルコマンナンのグルコース / マンノース比は1:1.6と多くの文献に記載されてきた。現在の標準的な方法では、希硫酸による酸加水分解後に HPLC による組成分析が行われている。実際に市販のコンニャク精粉4種類（平成28年度産の赤城大玉、みやままさり、特等粉、低臭化コンニャク精粉）について分析を行ったところ1:1.46~1:1.53となった。酸加水分解では分解後の残渣が多く生成するため、我々は Cellulase による酵素加水分解と生成物の組成分析を行った。HPLC 分析による組成比は1.02 (± 0.09)~1.19 (± 0.02)となった。さらに核磁気共鳴分光法 ($^1\text{H-NMR}$) によって組成比を求めたところ1:1.185 (± 0.010)~1:1.266 (± 0.004)となった。本研究により、コンニャク精粉を酵素により加水分解した生成物においてはグルコースの割合が増加（またはマンノースの割合が低下）して測定されることが明らかとなった。

キーワード：コンニャクグルコマンタン、グルコース、マンノース、加水分解、Cellulase、核磁気共鳴分光法、アセチル基

Monosaccharide composition of commercial Konjac refined powder by using $^1\text{H-NMR}$ and HPLC analyses

Hiroyuki Oku^{*,†}

To establish a qualitative method for the monosaccharide composition analysis of Konjac glucomannan (KGM) in Konjac refined powder by the two techniques, $^1\text{H-NMR}$ (nuclear magnetic resonance) and HPLC (high performance liquid chromatography). The hydrolyzed samples treated with cellulase in acetate buffer were separated on a HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography) column using an 80% acetonitrile aq. eluent, and monitored on a refractive index (RI) detector. In both analytical methods, good separation was achieved for mannose and glucose and thus the composition of two reducing monosaccharides was obtained successfully. In this experiment, we used four types of commercial Konjac flour products, Akagi Ohdama, Miyama Masari, Tokuto Powder, and Timak Mannan (a specially purified powder of konjac glucomannan which does not have any trimethylamine smells). From HPLC analyses, composition ratio of D-glucose/D-mannose was in the range of 1.02 (± 0.09)–1.19 (± 0.02). From $^1\text{H-NMR}$ analysis, composition ratio was in the range of 1:1.185 (± 0.010)–1:1.266 (± 0.004). Compared with the acid-hydrolyzing method, our procedure has several advantages, such as yielding only small amount of residuals after enzymatic hydrolysis.

Key words: Konjac flour, Cellulase, $^1\text{H-NMR}$, HPLC, glucose, mannose, acetylation

Journal of Nutritional Food, 17(1), 34–44, 2020

[†] Corresponding author (E-mail: oku@gunma-u.ac.jp)

*Division of Molecular Science, Graduate School of Science & Engineering, Gunma University, Ota, Gunma 373-0057

*群馬大学大学院理工学府分子科学部門・産学連携部門 〒373-0057 群馬県太田市本町29-1

I. はじめに

コンニャク芋に多く含まれるコンニャクグルコマンナンはD-グルコースとD-マンノースがおよそ1:1.6の割合で主に β -1,4結合により重合した高分子化合物と考えられている^{1, 2)}。食用としてのコンニャクは和食に欠かせない伝統食品であるが、近年は健康食材としての側面も注目され、さまざまな加工食品に用途が広がっている。大規模な臨床試験データでは証明できていないが^{3, 4)}、ヒトの消化管ではほとんど消化されない食物繊維として便通改善作用⁵⁾があると考えられている。また、糖やコレステロールなどの吸収抑制効果⁵⁾によってメタボリック症候群における血糖値やコレステロール・中性脂肪値の改善などにも効果があると期待されている⁵⁾。このようにコンニャクグルコマンナンは機能性に富んだ食品素材として注目されている。

コンニャク芋からグルコマンナンを得るには、水洗して頂芽をえぐり取ったコンニャク芋を数mm幅に切り、火力乾燥することでコンニャク荒粉を得る。さらに荒粉は粉碎され、飛子と呼ばれる軽いデンプン質粒子⁶⁾を除くことで、最終的に重いグルコマンナン粒子である精粉が残る。精粉は精製後の品質により等級分けされ、特等粉は最上位の等級である。さらに様々な食品素材として用いる際に要求されるコンニャク臭(trimethylamineに由来)の除去が行われた精粉も市販されている。

グルコマンナンの定性分析法には、現在の標準的な方法では、希硫酸による酸加水分解とHPLCによるD-グルコース(Glc)とD-マンノース(Man)の組成分析が行われている⁷⁾。酸加水分解では分解後の残渣が多く生成してしまうため、今回我々はCellulaseによる残渣が非常に少なく温和な加水分解反応と、反応生成物について組成分析を行ったので報告する。

II. 方法

1. コンニャク精粉試料

本論文で使用したコンニャク精粉試料はオリヒロブランド株式会社製の下記4製品である。

- a) 特等粉“あかぎおおだま”2837 Lot.29. 3. 30,
- b) 特等粉“みやままさり”28年度産Lot.254番号2017.02.23 45448, c) 特等粉Lot.29. 03. 10-1,
- d) 低臭化コンニャク精粉Lot.29.04.27-1. それぞれ a) あかぎ (Akagi Ohdama), b) みやま (Miyama Masari), c) 特等粉 (Tokuto Powder), d) 低臭化精粉 (Timak Mannan⁸⁾) と略称する。低臭化精粉は蒟蒻以外の加工食品向けとして trimethylamine 臭の除去が行われた精粉である。また、測定試料に用いた“あかぎおおだま”、“みやままさり”は、日本において長く栽培されてきた在来種・備中種・支那種に由来するいくつかの系統をもとに群馬県農業技術センターにて改良された品種である。

2. 分子量分布の測定

測定は一般財団法人日本食品分析センターに依頼した。

- 1) 試験溶液の調製：検体約0.01gを採取し、0.1 mol/L硝酸ナトリウム溶液10mLを加えた。室温で一晩放置した後、孔径0.45 μ mのメンブランフィルターでろ過し、得られた液を試験溶液とした。標準試料には昭和電工から購入したpullulan P-2500 (Mw=2,350,000), P-400 (Mw=344,000), P-200 (Mw=200,000), P-50 (Mw=47,100), P-20 (Mw=21,100), P-5 (Mw=5,900), P-1 (Mw=1,420), およびMaltotrioseを用いて検量線を作成した。
- 2) 分子量分布の測定：標準溶液及び試験溶液についてサイズ排除カラムを用いるHPLC装置に注入した。得られた結果を480 IIデータステーションGPCプログラム(システム・インストルメンツ(株))を用いて解析した。なお、各ピークの分子量の推定は分子量標準品の溶出時間及び分子量をもとに作成した検量線を用いて行った。
- 3) HPLC測定条件：機種Shodex GPC-101 [昭和電工(株)], 検出器示差屈折計RI-71S [昭和電工(株)], カラムTSKgel GMP W_{XL} (ϕ 7.8mm \times 300mm) [東ソー(株)] を2本連結, カラム温度40°C, 移動相0.1 mol/L硝酸ナトリウム溶

液, 流量 1.0 mL/min, 注入量 100 μ L.

3. 酸加水分解とHPLCによるGlc-Man比の測定

測定は一般財団法人日本食品分析センターへ依頼した.

1) 酸加水分解の条件⁷⁾

各試料 (600 mg) を 72% 硫酸 (6 mL) 中室温で 1 時間かくはん後, 4% 硫酸に希釈してオートクレープ中 (121°C) 1 時間反応を行った, 後に, 冷却・中和を行い, 定容 (200 mL), ろ紙によるろ過後に希釈 (100 倍) した. 0.22 μ m フィルターによりろ過し試験溶液とした.

2) HPLCクロマトグラムの測定

測定は, 標準溶液及び試験溶液について以下の条件により検出を行った⁹⁾. 得られたクロマトグラムは標準品の溶出時間及び溶出面積をもとに作成した検量線により解析した. HPLC測定条件: 機種 LC20A システム [(株)島津製作所], 検出器: 蛍光分光光度計 RF-20AXS [(株)島津製作所], カラム: TSKgel SUGAR AXI, ϕ 4.6 mm \times 150 mm [東ソー(株)], カラム温度 60°C, 移動相 0.5 mol/L ホウ酸緩衝液 (pH 8.7), 流量 0.4 mL/min, 注入量 20 μ L, 蛍光励起波長 320 nm, 蛍光測定波長 430 nm, ポストカラム反応液 1% (w/v) L-アルギニン溶液, 反応液流量 0.7 mL/min, 反応温度 150°C.

4. 酵素加水分解と核磁気共鳴分光法 (¹H-NMR, ¹³C-NMR) によるGlc-Man比の測定

1) 酵素加水分解

クロコウジカビ (*Aspergillus niger*) 由来の Cellulase は東京化成(株)より購入した. この酵素はクロコウジカビの培養上精に由来しており複数の多糖類の加水分解酵素を含有した製品である. 各試料について 3 ロットずつ加水分解を行った. 15 mL フェルコンチューブに各試料 (300 mg) と Cellulase 30 mg と 0.1 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.7, 25°C) 6.5 mL の順に加えた. 72 時間回転かくはん装置で反応させた後, 残渣を 0.22 μ m フィルターによりろ過して除いた. 各試料溶液は凍結乾燥を行った後, 50 mg 試料を D₂O 600 μ L に溶解させ試験溶

液とした. 加水分解酵素に Mannase ではなく Cellulase を用いた理由は, 特殊な試薬ではなく入手が容易であること, 複数の酵素の複合体として Mannase よりも糖モノマーへの分解には適していること¹⁰⁾ の 2 点である.

2) ¹H-NMR スペクトルの測定

ECA-600 NMR spectrometer [日本電子(株)] を用いて測定した. 水シグナル消去のため, HDO シグナルを観測中心にセットして, DANTE パルス (強度 40 dB) を用いてスペクトル測定を行った. ¹H-NMR スペクトル測定条件: パルス角 45 度, 待ち時間 9 秒, 観測幅 20 ppm, 積算回数 16 回. 試料溶液には標準物質として TSP-*d*₄ を添加しており trimethylsilyl 基を 0 ppm として解析を行った. この TSP-*d*₄ シグナルを用いて qNMR 測定を行うことも可能である.

3) ¹³C-NMR スペクトルの測定

ECA-600 NMR spectrometer [日本電子(株)] を用いて, 定量測定に用いられるゲート付き ¹H デカップリング法を用いて ¹³C-NMR スペクトル測定を行った. ¹³C-NMR スペクトル測定条件: パルス角 45 度, 待ち時間 9 秒, 観測幅 120 ppm, 積算回数 432 回.

4) NMR スペクトルからのGlc-Man比の解析

データ処理には Delta5.0.5 [日本電子(株)] を用いた. 例えば, ¹H-NMR スペクトルの場合, Figure 3 に例示した糖モノマーの C1H ピークのみを成分分析に用いた. 1.95 ppm の酢酸シグナルの積分値を 500 とした時の α Glc, β Glc, α Man, β Man の積分値がそれぞれ 62.30, 93.02, 131.20, 55.26 であり, Glc-Man 比は 1:1.200 と算出される. また, ¹³C-NMR スペクトルの場合, Figure 4 に例示したように糖モノマーの C1 ピークがよく分離できている. 23.2 ppm の酢酸シグナルの積分値を 500 とした時の α Glc, β Glc, α Man, β Man の積分値がそれぞれ 148.45, 209.47, 288.05, 135.97 であり, Glc-Man 比は 1:1.185 と算出される. ほかに例えば C2 と C5 ピークを合わせることで Glc-Man 比を算出することができる. その場合, Glc の α C2 + α C5, β C2, β C5 の積分値がそれぞれ 246.50, 235.51, 249.51,

Manの α C2, α C5, β C2, β C5の積分値がそれぞれ324.90, 298.19, 137.78, 139.89であり, Glc-Man比は1:1.231と算出される. これらの作業を4種類のコンニャク精粉試料について各3試料ずつ測定し, 平均値と標準偏差を計算してTable 2に示した.

5. 酵素加水分解とHPLCによるGlc-Man比の測定

1) 試料調製

上記NMR測定に用いた各試料のD₂O溶液(試験溶液)を使用した. はじめに分析カラムの汚染を防ぐために, 固相抽出カラムを通して前処理を行った. すなわち, Sep-Pak C18 Plus Short Cartridge (WAT020515, 360 mg Sorbent per Cartridge [Waters社])をMeOH 3 mLにて活性化, H₂O 3 mLにて平衡化した. 後に, 試験溶液0.8 mLとH₂O 5 mLを混合した希釈試験溶液を固相カートリッジに通した. そして流出液を回収し, これを前処理液とした. 180 μ Lアセトニトリルをあらかじめ入れておいた0.5 mLエッペンチューブへ, 前処理液20 μ Lを添加した. 10分ほど静置後, ピペッティングによって混合し, 0.22 μ mフィルターを通して濾過を行った. 測定待ち時間での試料溶液の蒸発を防ぐためにHPLC試料管は12°Cに冷却したオートサンプラー上にセットして次項のHPLC測定を行った. GlcとManの標準試料も同様に固相抽出カラムを通して前処理を行った. 本論文ではGlcとManの比率をのみを測定する定性分析が目的であることから, 固相抽出カラムを通した際の回収率の議論を行っていない. 定量測定時には回収率実験も合わせて行う必要がある点については留意すべきである.

2) HPLCクロマトグラムの測定

標準溶液及び試験溶液について以下により測定を行った⁷⁾. 得られたクロマトグラムは標準品の溶出時間及び溶出面積をもとに作成した検量線により解析した. HPLC測定条件: 機種Shimadzu Prominence HPLCシステム [(株)島津製作所], 検出器示差屈折率検出器RID-20A検出器温度40°C [(株)島津製作所], カラムShodex column HILICpak

VG-50, ϕ 4.6 mm \times 150 mm [昭和電工(株)], カラム温度40°C, 移動相80%アセトニトリル水溶液, 流量0.4 mL/min, 注入量10 μ L.

6. ギ酸アンモニウム緩衝液を用いた酵素加水分解と核磁気共鳴分光法 (¹H-NMR) によるアセチル化割合の測定

1) 酵素加水分解

各試料について3ロットずつ加水分解を行った. 50 mLファルコンチューブに各試料(1000 mg)とCellulase 100 mgと0.1 Mギ酸アンモニウム緩衝液(pH 4.1, 25°C) 25 mLの順に加えた. 72時間回転かくはん装置で反応させた後, 残渣を0.22 μ mフィルターによりろ過して除いた. 各試料溶液は凍結乾燥を行った後, D₂O 800 μ Lに溶解させた.

2) ¹H-NMRスペクトルの測定

上記, 4節(2)Glc-Man比の測定と同様に行った.

III. 結果と考察

1. GPCによる分子量分布の測定

試料は0.1 mol/L硝酸ナトリウム水溶液を用いた. Figure 1にGPCクロマトグラムのうち“あかぎおおだま”のデータを, Table 1に4種類の試料について解析データを示した. 何れの試料も分子量10⁶以上のピーク面積が65~76%を占める分子量分布が得られた. ピークトップの分子量は標準試料の分子量よりも大きいため, 校正曲線に直線性があると仮定しての数値であるが, 約3.3~3.8 \times 10⁶を示した. 少なくとも2.56 \times 10⁶より大きいことを示すGPCデータが得られた. これまでに報告されている分子量は, Sugiyamaら¹¹⁾は我が国在来のコンニャクイモ3種類のグルコマンナン水溶液(アセチル化と脱アセチル化処理後, 硝酸ナトリウムを含有しない純水へ溶解)を静的光散乱法により測定を行い, 支那種M_w=1.90 \times 10⁶, 在来種M_w=1.12 \times 10⁶, 備中種M_w=0.676 \times 10⁶を報告している. 一方, Xuら¹²⁾は中国国内メーカーのコンニャクグルコマンナン(0.2 mol/L硝酸ナトリウム水溶液)について光散乱法とGPCを組み合わせた測定を行い, やや低めのM_w=1.90 \times 10⁵について報告している.

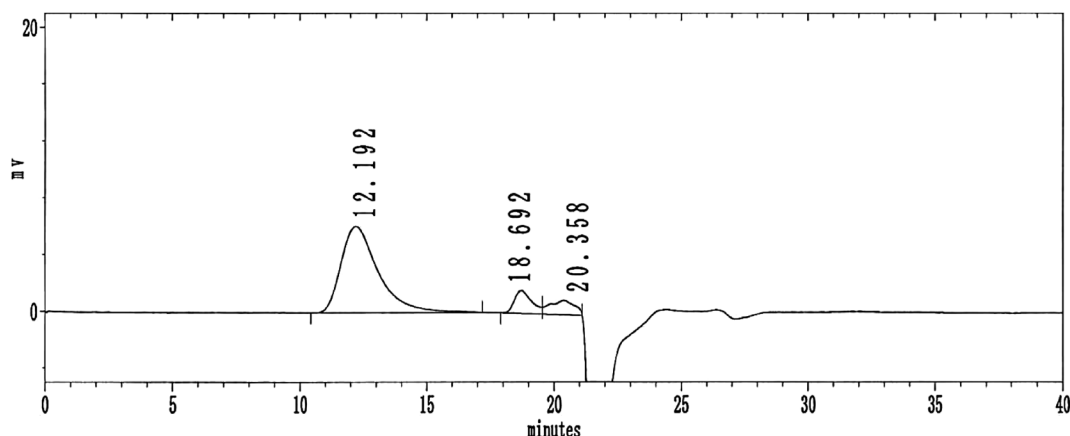


Fig. 1 An example of gel permeation chromatogram (GPC) for an aqueous 0.1 mol/L NaNO_2 solution of konjac powder (Akagi-Ohdama 0.01 g/10 mL)

Table 1 Summarized data of molecular weight distribution from GPC chromatograms for the four types of commercial konjac powder

	Species /			
	Akagi Ohdama	Miyama Masari	Tokuto (Highest Grade) Powder	Timak Mannan ⁸⁾ *
Peak top time	12.192	12.117	12.248	12.243
Peak top Mw	3.48×10^6	3.79×10^6	3.27×10^6	3.29×10^6
Molecular Weight Range/Peak Area (%)				
$>1 \times 10^6$	68	65	67	76
$1 \times 10^6 - 1 \times 10^5$	12	9	13	14
$1 \times 10^5 - 1 \times 10^4$	1	trace	trace	1
$1 \times 10^4 - 1 \times 10^3$	10	9	9	5
$<1 \times 10^3$	9	17	11	4
Total	100	100	100	100

*Specially purified powder without any konjac-potato smells.

Because of good linearity at the molecular weight range ($10^6 - 10^3$), the equation can be described as $\log_{10} M = -0.4869489T + 12.4789565$.

それぞれで分子量が異なるのは同じサトイモ科コンニャク属コンニャク種 (*Amorphophallus konjac*) であっても品種・栽培環境の違いや試料溶液の作製条件 (アセチル化反応における酸性環境に由来する加水分解¹¹⁾) の違いが原因になったと考えられる。

2. HPLC装置によるGlc-Man組成比の測定

希硫酸による加水分解とHPLC測定は現行の測定法によるデータ取得を目的としたため一般財団法人日本食品分析センターへ依頼した。すなわち、硫酸加水分解試料をホウ酸緩衝液移動相・イオン交換分析カラム・ポストカラムラベル化・蛍光検出器を

用いてHPLC分析測定を行った。Glc-Man組成比は1:1.46から1:1.52の間を示した (Table 2)。

一方、Cellulaseによる加水分解とHPLC測定は新しい測定法によるデータ取得を目的として実施を行った。すなわち、酵素加水分解試料を高濃度アセトニトリル移動相・HILIC分析カラム・示差屈折計を用いたHPLC分析) で得られたデータを再解析してまとめた。Figure 2にはHPLCクロマトグラムを示した。HILIC分析カラムの特性として見かけ上GlcよりもManのピーク面積が小さく表れるため、標準試料を同時に測定して補正を行った。得られたGlc-Man組成比は1:1.0から1:1.1の間を

Table 2 Comparison of Mannose/Glucose ratio for the four types of commercial konjac powder

Types of commercial konjac powder	Standard analytical method (4% H ₂ SO ₄ hydrolysis and HPLC analysis)	HPLC analytical method* (Cellulase hydrolysis)	¹ H-NMR spectral method* (Cellulase hydrolysis)	¹³ C-NMR spectral method* (Cellulase hydrolysis)	
				α C1- β C1	α C2+ α C5- β C2+ β C5
AkagiOhdama	1:1.46	1:1.11 (\pm 0.09)	1:1.202 (\pm 0.002)	1:1.12 (\pm 0.14)	1:1.17 (\pm 0.07)
MiyamaMasari	1:1.48	1:1.11 (\pm 0.09)	1:1.199 (\pm 0.010)	1:1.21 (\pm 0.05)	1:1.15 (\pm 0.04)
Tokuto (Highest Grade) Powder	1:1.46	1:1.02 (\pm 0.09)	1:1.185 (\pm 0.010)	1:1.32 (\pm 0.04)	1:1.12 (\pm 0.04)
Timak ⁸⁾ #Mannan	1:1.52	1:1.09 (\pm 0.01)	1:1.266 (\pm 0.004)	1:1.06 (\pm 0.05)	1:1.14 (\pm 0.03)

* $n=3$ samplings and measurements in each konjac powder. The number in the parentheses represents the standard deviations from the mean, σ .

#Specially purified powder without any konjac-potato (trimethylamine) smells.

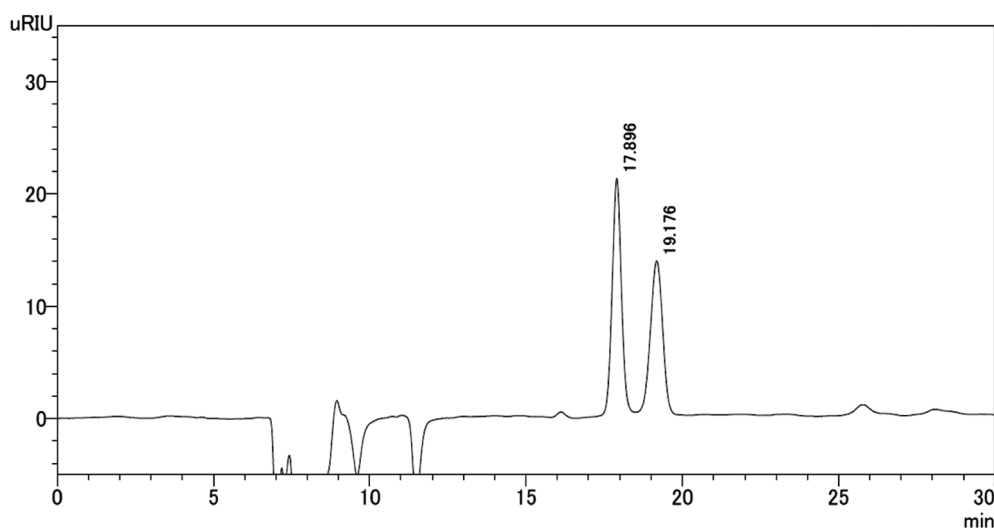


Fig. 2 An example of HPLC chromatogram data of the cellulase hydrolyzed sample (from Akagi-Ohdama, 10mg/0.4mL)

示した (Table 2).

従来法において使用されたポストカラムラベル化・蛍光検出はさまざまな食品中から抽出したグルコマンナンを測定するのに適した方法である。筆者らの試料は分析を妨害する夾雑物がないため、HPLC測定に示差屈折計を用いた。また、Glc-Man組成比の違いはHPLC分析法ではなく加水分解法の違いによって生じたと考えられる。これを詳細に検討するため、次に分子構造レベルでのGlc-Man組成比の測定を目的として核磁気共鳴分光法 (¹H-NMR, ¹³C-NMR) による分析を行った。

3. 核磁気共鳴分光法 (¹H-NMR, ¹³C-NMR) による Glc-Man 組成比の測定

Figure 3には¹H-NMRスペクトルを示した。本スペクトルからCellulaseによる加水分解によって単糖まで分解されると理解できる。また、微量のdimerが観測されるものの、trimerは観測されることがわかった。¹H-NMR測定における水シグナルの除去は、HDOシグナルを観測中心にセットして、DANTEパルス (強度40dB) を用いてスペクトル測定を行った。また、Glc-Manの組成比の決定には、明瞭に観測できるC1Hのピーク¹⁰⁾ (glucoseの α -anomer 5.23 ppm, β -anomer 4.64 ppm; mannoseの α -anomer 5.18 ppm, β -anomer

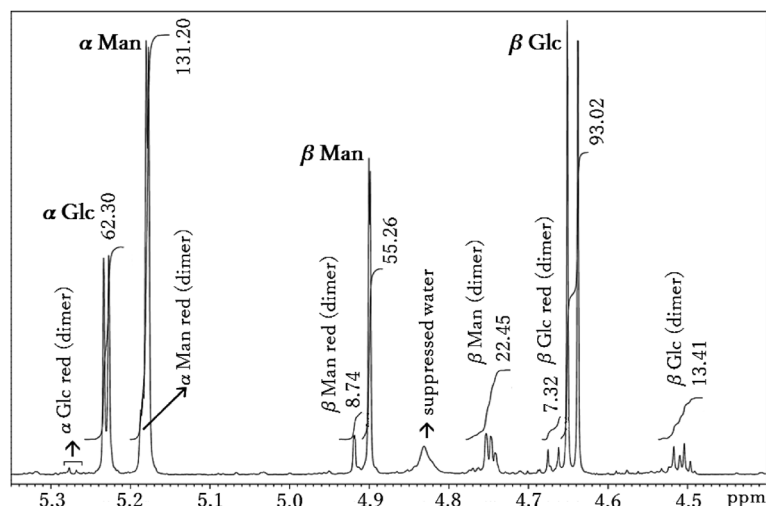


Fig. 3 An example of the anomeric region $^1\text{H-NMR}$ spectrum of cellulase-hydrolyzed konjac flour in D_2O (in the case of Akagi-Ohdama, 10 mg/0.4 mL, 23°C)

Cellulase hydrolysis was done in 0.1 M $\text{CH}_3\text{COO.NH}_4$ buffer (pH = 4.7). NMR signals shown in the figure were well separated and mostly attributed to the hydrogen atoms linked to C1 of both glucose and mannose. Small signals were assignable to the hydrolyzed residuals of Glc and Man dimers.¹²⁾

4.90 ppm) が適している。その他シグナルではピーク間の重なりのため組成比の決定に使用できない。留意すべき点は下記の3点である。すなわち、(1)各シグナルがHDOシグナルの周波数に近い場合水シグナル消去は定量性を保つようにパルス強度 (60–40 dB) を弱めにする。 (2) アノマー平衡構造6種類のうち6員環構造の α -pyranoseと β -pyranoseのみを測定していること (残り4種類の存在量は実用上検出できないほど少ないが¹³⁾)。 (3) 定量対象としているシグナルに、目的以外のシグナルが小さくても重なってしまう場合は解析データが不正確になってしまうこと。また、 $^1\text{H-NMR}$ 測定を用いる場合、一般に糖モノマーのC1Hピークのみが成分分析に使われるが、Figure 3は超高磁場の測定装置を用いて測定されたためmannoseの α -anomer (5.176 ppm) シグナルの左裾にdimer由来の小さなシグナル (5.184 ppm) の重なりが観測された。このように注意すべき点があるものの、本研究の $^1\text{H-NMR}$ 測定では揃ったGlc-Man組成比 (ティマックマンナン試料のみ1:1.27, その他3試料は1:1.20から1:1.19) が得られた。

Figure 4には $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルと各シグナルの帰属¹⁴⁻¹⁶⁾を示した。 $^{13}\text{C-NMR}$ 測定において定量測定を行うためには高濃度溶液を用いての測定が望

ましいが、実際には高粘度のためにNMR測定に適した試料とならなかった。スペクトルにノイズが多く残っているのは、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定と同じ試料を用いたためである。 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルではシグナル分離に優れているため、十分な積分を行うことができれば、ほぼすべてのシグナルを用いてGlc-Man組成比の決定を行うことができる。Table 2には $\alpha\text{C1-}\beta\text{C1}$ および $\alpha\text{C2+}\text{C5-}\beta\text{C2+}\text{C5}$ の各シグナルを用いてGlc-Man組成比を算出した。本研究のスペクトルではノイズが多いため $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの場合に比較してばらつきの大きな測定値 (1:1.32から1:1.06) が観測された。

一般にNMR分光法は試料溶液に含まれる化合物の各部分構造に由来する ^1H や ^{13}C シグナルの化学シフトと積分値の比率によって分析を行う手段として広く用いられている方法である。つまり、本論文にて示したNMRスペクトル中のシグナルは、すべてGlcとManに帰属していくことができる。次に各シグナルの積分比を比較することで、GlcとManの比率を示すことができる。本論文では、この積分値の比較をもって「NMR法による定性分析」と述べることにする。一方、厳密な定量NMR分析法に基づいた方法では、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルより得られるGlcとManの積分値をそれぞれ標準試料と比

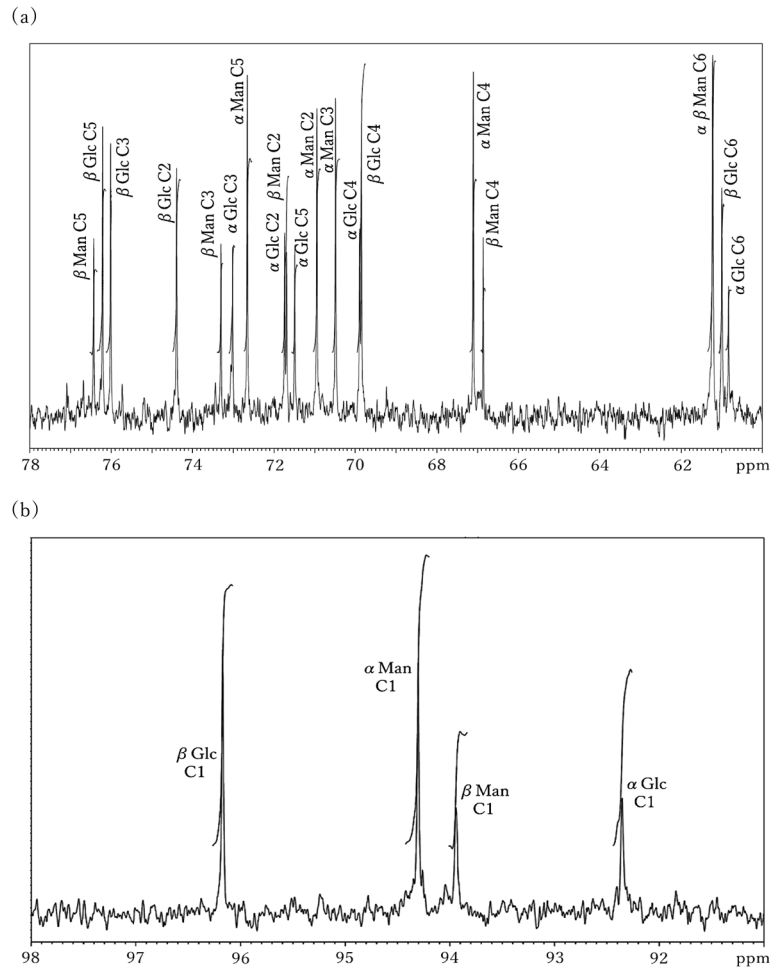


Fig. 4 150MHz ^{13}C -NMR spectrum of cellulase-hydrolyzed konjac flour in D_2O (from Akagi-Ohdama, 10 mg/0.4 mL, 23°C)

Cellulase hydrolysis was done in 0.1 M $\text{CH}_3\text{COO}\cdot\text{NH}_4$ buffer (pH = 4.7). All the NMR signals shown in the figure were well separated and assigned.^{13, 14)}

較して、溶液中の濃度を求めた後に、GlcとManの比率を算出することが求められる。本論文で示した定性分析法は簡便ではあるものの ^1H -NMRスペクトル測定条件（例えば、測定時のパルス幅、繰り返し時間、溶液粘度、積分曲線の取り方）による影響を受けやすい点は留意すべきである。

4. Glc-Man組成比の考察

Table 2には、本研究のHPLCや核磁気共鳴分光測定によって得られたGlc-Manの組成比をまとめた。酸加水分解生成物の組成分析では、一般に述べられている1:1.6¹⁾に近い分析値1:1.46~1:1.52が得られた。一方、本研究で行った酵素加水分解とその生成物をHPLCやNMR測定によって分析するとおよそ1:1.2の組成比を示すことが明らかとなった。

以上のように様々な測定法から検証することで、Glc-Man組成比の違いは加水分解法の違いによって生じたと結論できた。この原因は酸加水分解時に生じてしまう不溶成分に由来すると考えている。例えば100g精粉を分析すると褐色の不溶成分が10gより多く生成する。一方酵素加水分解では100mgのうち2mgの無色の不溶成分しか残らない。すなわち硫酸による加水分解においては、分析されないコンニャク精粉成分が非常に多くなってしまいう問題点があるとわかった。酵素加水分解は反応時間が72時間と長時間かかる欠点はあるが、不溶性残渣がほとんど見られないこと、強酸を使わない温和な方法という点で従来法よりも優れている。一般に強酸は糖を脱水する作用があるので、温和な酵素加水分解を分析に用いる有用性もあると提案したい。

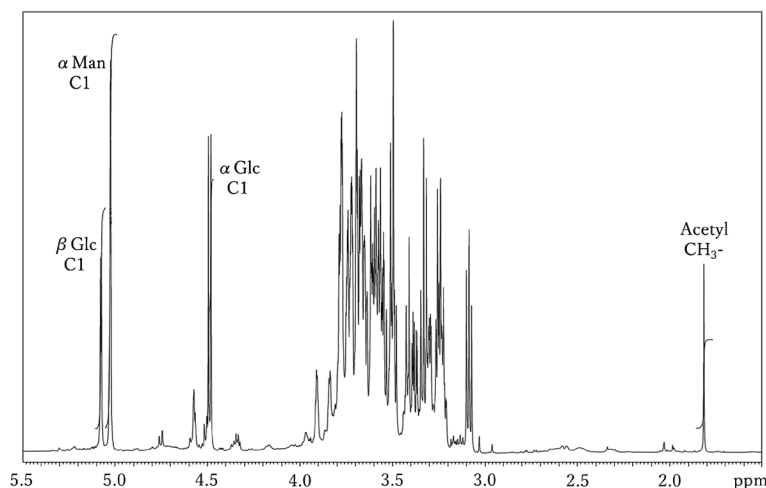


Fig. 5 600MHz $^1\text{H-NMR}$ spectra of cellulase-hydrolyzed Akagi Ohdama konjac flour (10mg/0.4mL) in D_2O . Cellulase hydrolysis was done in 0.1 M HCOO.NH_4 buffer (pH = 4.7). Due to the peak overlap $\beta\text{Man C1}$ and H $_2\text{O}$ signals at 4.7 ppm, $\beta\text{Man C1}$ is disappeared by the water suppressed $^1\text{H-NMR}$ measurements.

Table 3 Degree of acetylation calculated from 600 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectra

Normalized peak area	Akagi Ohdama*	Miyama Masari*	Tokuto Powder*	Timak Mannan*#
αGlc	225 (± 19)	269 (± 27)	238 (± 23)	246 (± 74)
βGlc	287 (± 22)	320 (± 61)	257 (± 32)	296 (± 54)
Acetyl	100	100	100	100
Glc-Acetyl ratio	1:0.196 (± 0.013)	1:0.172 (± 0.023)	1:0.203 (± 0.018)	1:0.191 (± 0.039)
Deduced Glc-Man-Acetyl ratio	1:1.202:0.196	1:1.199:0.172	1:1.185:0.203	1:1.266:0.191
Degree of Acetylation	8.9%	7.8%	9.3%	8.4%

* $n = 3$ samplings and measurements in each konjac powder. The number in the parentheses represents the standard deviations from the mean, σ .

#Specially purified powder without any konjac-potato smells.

Cellulase hydrolysis was done in 0.1 M HCOO.NH_4 buffer (pH = 4.7). Peak area obtained from $^1\text{H-NMR}$ spectra were normalized to acetyl group. Each sample were averaged from four spectral data.

コンニャク精粉は粒子表面がよく磨かれるような製造プロセスを経ていることから、精粉中にグルコマンナン（および水溶性の無機塩）以外の成分が含まれることは少ないと推測される。さらに $^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルでグルコマンナン以外のシグナルがほとんど見当たらなかったことから（例えばFigure 5）、精粉は化学的に純度の高い物質であることを示唆している。そのため、本研究の方法で酵素加水分解後の残渣が少なかったことは妥当な結果であると考えられる。本研究は現在も継続中であり、本論文では酵素加水分解により産生されたモノマーとしてのGlcとManの比率を報告するのみとして、コンニャク精粉中の「グルコースとマンノースの含有量」および酸加水分解時にみ

られる不溶性成分についての定量的な議論、さらには硫酸加水分解生成物のHILICカラムやNMRによる分析は今後の課題としたい。

5. 核磁気共鳴分光法 ($^1\text{H-NMR}$) によるアセチル化割合の測定

Figure 5には $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示した。アセチル化割合の決定には、明瞭に観測できるアセチル基 (1.82 ppm) とGlc/ManのC1Hシグナルを用いた。しかしながら本試料においては $\beta\text{Man C1}$ ピークが水ピークと4.7 ppmにおいて重なってしまい、 $\beta\text{Man C1}$ シグナルの測定ができなかった。水シグナルはpHや溶質の性質や濃度によってシフトしやすい。そのため解析にはGlcシグナルのみを

用いてGlc-Acetyl組成比を求めた。Table 3には、測定により得られたアセチル化割合を示した。すなわちGlc-Acetyl組成比は1:0.172 (± 0.023) ~ 1:0.203 (± 0.018)であった。Glc-Man組成比1:1.185 (± 0.010) ~ 1:1.266 (± 0.004)から計算するとアセチル化割合は7.8~9.3%が得られた。従来引用されてきた文献値は17残基中に1個の割合(5.9%)であると述べられている^{17, 18)}。本研究で得られたアセチル化割合が従来値と異なっているのは加水分解や測定方法の違いによって生じたと考えている。

VI. 結論

グルコマンナンの定性分析法として、現在の標準的な方法である希硫酸による酸加水分解とHPLC測定によるGlc-Man残基の組成分析が行われてきた。本研究においては、市販されている4種類のコンニャク精粉製品について、室温と弱酸性の温和な条件で反応させたCellulaseによる加水分解生成物を用いて組成分析を行った。本研究において酵素加水分解により産生されたモノマーとしてのGlcとManの比率(1:1.2)は、一般的に知られている組成比(1:1.6)と異なることが明らかとなった。組成値が異なる理由は研究を積み重ねる必要はあるが、不溶性成分が明らかに少ないことから精密な組成分析に向いている。以上の研究を通して、市販コンニャク精粉について、主成分のグルコマンナンが有する一定の特徴的な構造(分子量の分布、Glc-Man残基の組成比、アセチル化割合)を調べることに資する新規で温和な分析手法を提案することができた。

利益相反

本研究はオリヒロプランデュ株式会社が群馬大学(論文著者)へ提供された寄付金によって実施された。本研究に関して、オリヒロプランデュ株式会社からの寄付金以外の支払いはない。また著者はオリヒロプランデュ株式会社との雇用関係、及びオリヒロプランデュ株式会社の社員と親族等の血縁関係はない。

参考文献

- 1) Maeda M, Shimahara H, Sugiyama N: Detailed examination of the branched structure of Konjac glucomannan. *Agric. Biol. Chem.*, **44**(2), 245-252, 1980.
- 2) 沖 増哲編著:『こんにゃくの科学』第2版(広島女子大学地域研究叢書), 溪水社, 1993.
- 3) Onakpoya I, Posadzki P, Ernst E: The efficacy of glucomannan supplementation in overweight and obesity: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *J. Am. Coll. Nutr.*, **33**(1), 70-78, 2014.
- 4) Zalewski BM, Chmielewska A, Szajewska H: The effect of glucomannan on body weight in overweight or obese children and adults: A systematic review of randomized controlled trials. *Nutrition*, **31**(3), 437-442.e2, 2015.
- 5) EFSA Panel on Dietetic Products: Nutrition and Allergies (NDA): Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to konjac mannan (glucomannan) and reduction of body weight (ID 854, 1556, 3725), reduction of post-prandial glycaemic responses (ID 1559), maintenance of normal blood glucose concentrations (ID 835, 3724), maintenance of normal (fasting) blood concentrations of triglycerides (ID 3217), maintenance of normal blood cholesterol concentrations (ID 3100, 3217), maintenance of normal bowel function (ID 834, 1557, 3901) and decreasing potentially pathogenic gastro-intestinal microorganisms (ID 1558) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA J.*, **8**(10), 1798, 2010.
- 6) 丹羽達也, 前川邦子, 衛藤英男, 清水 篤, 清水康夫, 加藤宏治: こんにゃく飛粉の化学成分. こんにゃく飛粉の有効利用に関する研究(1). *日本食品科学工学会誌*, **48**(12), 943-947, 2001.
- 7) 財団法人日本健康・栄養食品協会: 特定保健用食品試験検査マニュアル, 112-116, 1999.
- 8) <http://www.orihiro.com/english/rawmaterial/index.html> (2019年7月22日閲覧)
- 9) Mikami H, Ishida Y: Post-column fluorometric detection of reducing sugars in high performance liquid chromatography using arginine. *Bunseki Kagaku*, **32**(6), E207-E210, 1983.
- 10) Cescutti P, Campa C, Delben F, Rizzo R: Structure of the oligomers obtained by enzymatic hydrolysis of the glucomannan produced by the plant *Amorphophallus konjac*. *Carbohydr. Res.*, **337**(24), 2505-2511, 2002.

- 11) Sugiyama N, Shimahara H, Andoh T, Takemoto M, Kamata T: Molecular weights of Konjac mannans of various sources. *Agric. Biol. Chem.*, **36**(8), 1381–1387, 1972.
- 12) Xu M, Li D-S, Li B, Wang C, Zhu Y-P, Lv W-P, Xie B-J: Comparative study on molecular weight of Konjac glucomannan by gel permeation chromatography-laser light scattering-refractive index and laser light-scattering methods. *J. Spectrosc.*, **2013**, 1–4, 2013.
- 13) Zhu Y, Zajicek J, Serianni AS: Acyclic forms of [1-¹³C] aldohexoses in aqueous solution: Quantitation by ¹³C NMR and deuterium isotope effects on tautomeric equilibria. *J. Org. Chem.*, **66**(19), 6244–6251, 2001.
- 14) Katsuraya K, Okuyama K, Hatanaka K, Oshima R, Sato T, Matsuzaki K: Constitution of konjac glucomannan: Chemical analysis and ¹³C NMR spectroscopy. *Carbohydr. Polym.*, **53**(2), 183–189, 2003.
- 15) Roslund MU, Tähtinen P, Niemitzc M, Sjöholma R: Complete assignments of the ¹H and ¹³C chemical shifts and $J_{H,H}$ coupling constants in NMR spectra of D-glucopyranose and all D-glucopyranosyl-D-glucopyranosides. *Carbohydr. Res.*, **343**(1), 101–112, 2008.
- 16) Gurst JE: NMR and the Structure of D-Glucose. *J. Chem. Educ.*, **68**(12), 1003–1004, 1991.
- 17) Dave V, McCarthy SP: Review of konjac glucomannan. *J. Environ. Polym. Degrad.*, **5**(4), 237–241, 1997.
- 18) Kato K, Matsuda K: Studies on the chemical structure of konjac mannan. Part I. Isolation and characterization of oligosaccharides from partial acid hydrolysate of the mannan. *Agric. Biol. Chem.*, **33**(10), 1446–1453, 1969.