キクイモの貯蔵条件がイヌリンの分解と
プレバイオティクス効果に及ぼす影響

森　田　　朗

新潟大学大学院　自然科学研究科　博士後期課程

生命・食料科学専攻

目次

序論

第１章　キクイモの収穫時期の決定とイヌリンの抽出法の検討

緒論

第１節　調査・実験方法

1-1　キクイモの収穫時期

1-2　抽出する水の量

1-3　活性炭による影響

1-4　抽出温度

第２節　結果と考察

2-1　キクイモ塊茎の収穫時期

2-2　抽出する水の量

2-3　活性炭による影響

2-4　抽出温度

まとめ

第２章　キクイモにおけるイヌリンの貯蔵中の分解とプレバイオティクス効果

緒論

第１節　実験方法

1-1　キクイモの貯蔵方法

1-2　貯蔵中におけるイヌリン含量(全糖量)

1-3　貯蔵中におけるイヌリンの分子量分布の変化

1-4　イヌリン抽出物の *Bifidobacterium* 属の菌株と *Lactobacillus* 属の菌株

に対する増殖効果

第２節　結果と考察

1-1　貯蔵中におけるイヌリン含量(全糖量)

1-2　貯蔵中におけるイヌリンの分子量分布の変化

1-3　イヌリン抽出物の *Bifidobacterium* 属の菌株と *Lactobacillus* 属の菌株に対する増殖効果

まとめ

第３章　キクイモ塊茎の減圧貯蔵によるイヌリンの分解への影響

緒論

第１節　実験方法

1-1　簡易真空容器による減圧貯蔵方法

1-2　減圧貯蔵によるイヌリン含量(全糖量)の変化

1-3　減圧貯蔵によるイヌリンの分子量分布の変化

第２節　結果と考察

1-1　簡易真空容器による減圧貯蔵方法

1-2　減圧貯蔵によるイヌリン含量(全糖量)の変化

1-3　減圧貯蔵によるイヌリンの分子量分布の変化

まとめ

総括

参考文献

謝辞

序論

フラクトオリゴ糖は，腸内有用細菌に利用される機能性糖として人の健康増進に有益であり，昨今，予防医学的概念の浸透からオリゴ糖摂取の有効性が重視されている。また，私たちの機能性食品への関心の高まりを反映するように，微生物を利用して製造されたフラクトオリゴ糖の市販品を普段の生活で目にするようになった。このフラクトオリゴ糖とさらにフルクトースが重合した多糖を総称してフルクタンと呼び，植物にはこの糖を組織に蓄積するものが存在する。近年，植物のフルクタン合成や分解に関わる酵素の細胞内の所在(図１)や働きが研究され，植物のフルクタン代謝研究やこれら酵素の遺伝子を利用した新たな機能をもった植物の作出といった応用技術が急速に発展しつつある[1)]。

フルクタンは主にスクロースにフルクトースが重合した三糖以上の糖の総称で，(フルクトースのみが重合したオリゴ糖と多糖も含む)このフルクタンは微生物，植物界に広く存在する。多くの被子植物がフルクタンを蓄積するが，最大なのは，キク目で約25 000 種である。単子葉植物ではイネ目で 8 000 種，ユリ目で 7 200 種，その他少数目を含めて総数 約 45 000 種，被子植物の約 15%もの種が何らかの生育ステージでこのフルクタンを蓄積する。

フルクタンは大きく分けて β(2→1)結合でフルクトースが重合するイヌリン型フルクタンと，主として β(2→6)結合で重合するレバン型フルクタンに分かれる。微生物のレバン型フルクタンは β(2→6)結合のみの直鎖が一般的であるが，植物によく見られるレバン型フルクタンは β(2→6)結合の他に β(2→1)結合ももっているものがあり，ムギ類に含まれる β(2→1)結合と(2→6)結合混合のフルクタンはグラミナンと呼ばれている。

イヌリン型フルクタンには，アスパラガスやタマネギにおいてネオケストース(三

糖)や四糖の 1^F，6^G-di-β-D-フルクトフラノシルスクロースや 6^G(1-β-D-フルクトフラノシル)$_2$ スクロースなど，スクロースを構成するグルコースの 6 位炭素の水酸基にもフルクトースまたは β(2→1)結合フルクトース鎖をもつものがあり，イヌリンネオシリーズとして分類されている。

植物に蓄積されるフルクタンの糖鎖の長さ(重合度 DP)は，30～50(5～9kDa) であるが，牧草類やチョウセンアザミには 100～250 のフルクタンを蓄積する種が存在する[1)]。

フルクタンを塊茎に蓄積するキクイモ（*Helianthus tuberosus* L. ）(図 2)は，北アメリカ原産のキク科ヒマワリ属の多年草植物である。その草丈は 1.5～3 m と高く，短日性で 9 月上旬頃に開花し，気温が 17℃以下に下がると地中に塊茎(図 3)を形成する。日本には江戸時代末期に飼料用作物として伝来し，戦後の食糧難の時代には食用として積極的に利用されていた[i)]。しかし，食生活が豊かになるにつれ消費は減少し，その強い繁殖力から野生化が問題となり，要注意外来生物に指定されている。一方，キクイモの塊茎には難消化性多糖類のイヌリンが豊富に含まれており，イヌリンの血糖値上昇抑制作用，整腸作用，高脂血症改善作用，免疫力増強作用などの機能性[2)3)]が注目され，近年ではキクイモを利用した 6 次産業化を推進している地域もある[4)]。 また，キクイモには白色種以外に紫色種も存在し，ポリフェノール成分を活用した機能性食品素材としての利用も期待されている[5)]。

キクイモ中のイヌリンは，D–フルクトースが β(2→1)結合で直鎖状に繋がったフルクタンの一種であり，末端のフルクトースに D–グルコースが α(1→2)結合した構造を持つ(図 4)。その糖鎖の長さはキクイモで 2～60 単位程度であり[6)]，平均鎖長は 14～19 単位と報告されている[7)8)]。イヌリンは，キクイモ以外にチコリ，ニンニク，ゴボウ，ニラ，タマネギなどの作物にも多く含まれ，その生鮮重あたりの含量は，チコリ

で 15～20%，ニンニクで 9～16%，ゴボウで 5～4%，タマネギで 2～6%であるのに対し[9]，キクイモ塊茎中の含量は 12～19 %と報告されており[10]，キクイモはイヌリンを非常に多く含む代表的食材の一つである。

キクイモ塊茎中のイヌリンの鎖長は，収穫時期により異なり，最大で 60 単位を超える[11]。しかし，収穫直後に豊富に含まれる高分子のイヌリンは，貯蔵中に内在性酵素の働きにより低分子化されていく。この反応を触媒する酵素が，フルクタンエキソヒドロラーゼ(1-FEH)であり，加水分解によりフルクタンのフルクトース末端から 1 分子ずつフルクトースを遊離する[12] (図 5)。また, 1-FEH により生じたスクロースは, 主にインベルターゼの働きにより最終的にグルコースとフルクトースへと分解される[13]。

多くの機能性が報告されているイヌリンの貯蔵中の分解による減少は，作物の商品価値や機能の低下を招くため，イヌリンを豊富に含むキクイモやチコリなどでは，イヌリンの減少を防ぐための貯蔵法などに関する研究が現在まで行われてきている[11][14]。

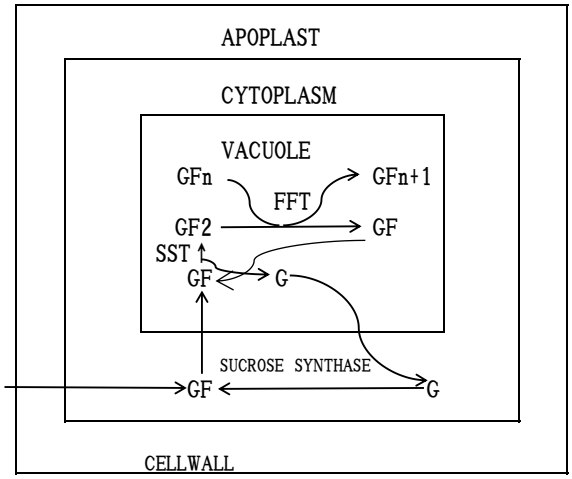
生物活性は，一般に温度に依存する。そこで低温貯蔵によりイヌリンの分解を抑制する試みがなされているが，イヌリン含量の低下を抑制できたという報告はなされてない。一方，Van den Ende らは，チコリの根においてイヌリンの分解に関わる FEH の合成が植物体を気温 14℃以上のハウスに移すことで抑制されることを報告している[15]。このことは，低温ではなく常温で貯蔵することでイヌリンの分解を抑制できる可能性を示唆している。

そこで本研究では，常温貯蔵がイヌリンの分解に及ぼす影響を明らかにすることを目的に，キクイモ塊茎からのイヌリン抽出する方法を検討し(第 1 章)，キクイモを 90 日間，20℃と 5℃で貯蔵し，貯蔵中のイヌリンの含量と分子量の変化を調べた。また *Bifidobacterium* 属菌など腸内有用細菌や *Lactobacillus* 属菌に対するイヌリンの増殖

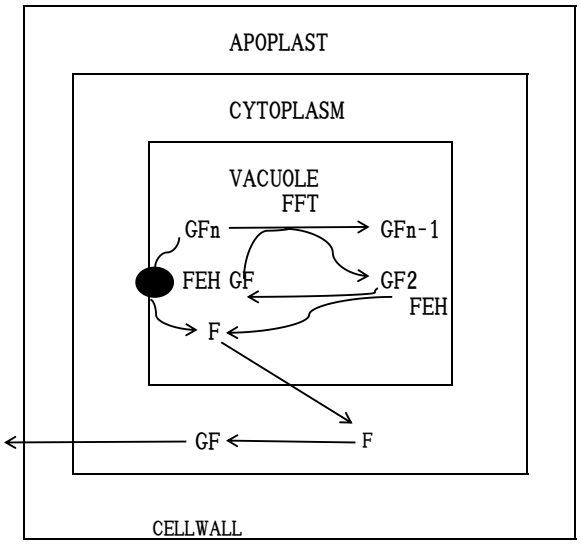
効果は分子量により異なることが知られている[16]。そこで次に，ゲル濾過クロマトグラフィーによりキクイモの抽出物を高分子画分と低分子画分に分け，それらの *Bifidobacterium* 属菌や *Lactobacillus* 属菌に対する増殖効果を調べた。さらに，収穫直後と 20℃で貯蔵したキクイモの抽出物の *Bifidobacterium* 属菌や *Lactobacillus* 属菌に対する増殖効果を比較し，常温貯蔵がキクイモのプレバイオティクス効果を向上させるかどうか検討した(第 2 章)。

最後に本研究の中心課題である貯蔵中のキクイモ塊茎のイヌリンの分解を抑制させるため，常温減圧貯蔵を試み，キクイモを 90 日間，20℃と 5℃で減圧貯蔵し，貯蔵中のイヌリン含量と分子量の変化を調べた(第 3 章)。

本論文は、貯蔵中のキクイモ中のイヌリンのプレバオティクス効果と貯蔵中のイヌリンの分解を抑制させることのできる方法を検討し，まとめたものである。



FRUCTAN ACCUMULATION PHASE



FRUCTAN DEPOLYMERIZATION
DURING FLOWERING SPROUTING STORAGE

図１　植物細胞内のフルクタン合成と分解[13)]

○フルクタン合成酵素(キク科)

1-SST(sucrose　sucrose　fructsyl　trnsferase)　　図中では SST

1-FFT(fructan　fructan fructsyl　trnsferase)　　図中では FFT

○フルクタン加水分解酵素(キク科)

1-FEH(Fructan 1-exohydrolase　: 1-FEH,　EC3.2.1.80)　図中では FEH

図２　キクイモ（*Helianthus tuberosus* L.）

図３　キクイモの塊茎

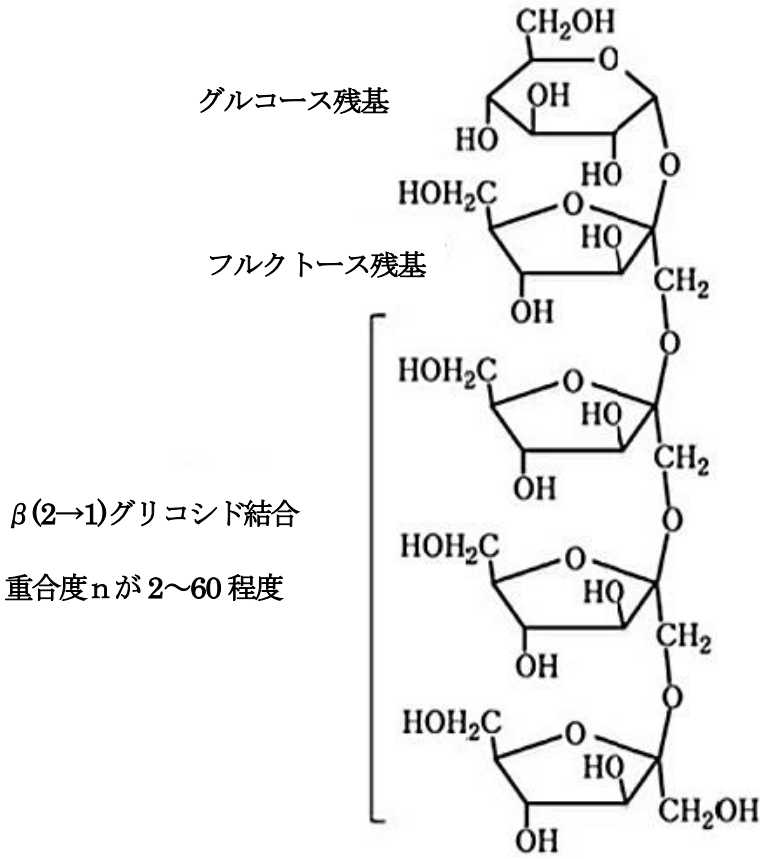
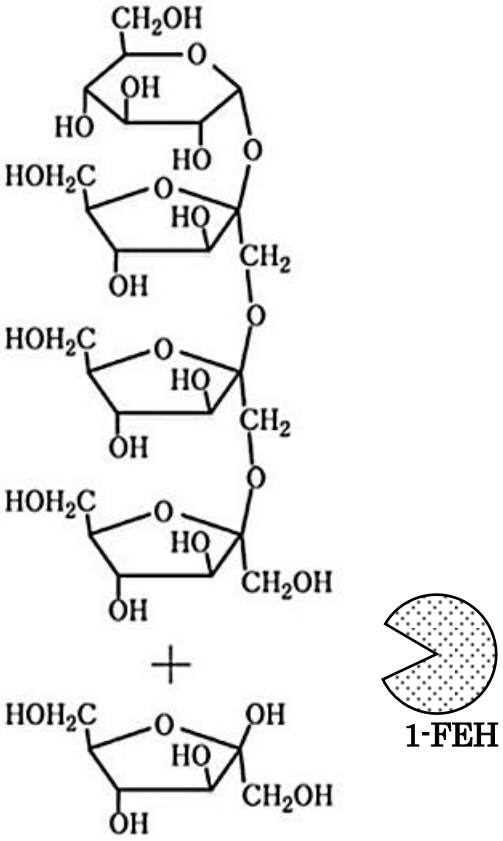


図４　イヌリンの構造



末端フルクトースの遊離

図 5　1-FEH(Fructan 1-exohydrolase：1-FEH，EC3.2.1.80)

第１章　キクイモの収穫時期の決定とイヌリンの抽出法の検討

緒論

本研究では，貯蔵中のキクイモのイヌリン含量や分子量の変化を調べることから，研究材料として収穫直後のイヌリン含量や鎖長が最大である収穫直後の塊茎を用いる必要がある。松本らは，佐賀市内で 2016～2018 年度おける月ごとの平均気温と収穫時期がキクイモ塊茎中のイヌリン含量および鎖長に及ぼす影響を調べた。佐賀市内の平均気温は，11 月から 2 月までそれぞれ 13.3 ℃，8.2 ℃，5.9 ℃，7.1 ℃となり，塊茎乾燥粉末 100 g 中のイヌリン含量は，11 月上旬は 2016 年度 40.7 g，2018 年度 44.3 g で，12 月上旬は 2016 年度 30.0 g，2018 年度 25.3 g，1 月上旬は 2016 年度 24.3 g，2018 年度 22.9 g，2 月上旬は 2016 年度 19.3 g，2018 年度 18.9 g であったと述べており，両年ともに，平均気温が低下し収穫時期が遅くなるほどイヌリン含量が低下する傾向が見られたと報告している[11)]。また，イヌリンの鎖長の最高値は 2016 年度の 11 月の収穫では 63 ± 1.1 で，多くのフルクトースが重合していた。一方，12 月の収穫では 55 ± 0.7，1 月の収穫では 46 ± 0.5 になり，鎖長は含量と同様，収穫時期が遅いほど低い値になったとも報告している[11)]。このことから，イヌリン含量と鎖長が最大なキクイモを収穫するには，佐賀市内では，11 月上旬が最適であると結論づけている。

上記の報告をもとに本研究では，ここ最近の月平均最高気温の変化で収穫日を定めることにした。なお，収穫時期は，キクイモの葉や茎の地上部が完全に枯れた状態，塊茎が大きく重くなる時期，12 月の上旬に新潟市の生産者がキクイモを最初に収穫することも参考にしてキクイモ塊茎の収穫時期を決定した。

また，キクイモ塊茎からイヌリンを水で抽出する方法は，宮口らの方法[17)]を基本としたが，以下の点が検討の必要があった。

・宮口らの方法は，ダリアの球根等生ものを磨砕し布で絞り，しぼり汁から熱水でイヌリンを抽出する。

・石灰清浄後 pH 7 にし，活性炭を加え 60 ℃～70 ℃で温め脱色する。

本研究の実験方法では，凍結乾燥したキクイモ塊茎粉末から水でイヌリンを抽出するので，乾燥重量に加える水の量が明瞭ではなかった。熱水とあるが，適切な温度設定がなかった。さらに，活性炭により抽出液の褐色の色素だけでなく，低分子のイヌリンなどが吸着されるのではないかと活性炭の使用が分子量分布を調べるのに影響を及ぼすのではないかと推察した。

そのため，3 g に対する抽出水の適切な量，塊茎からイヌリンを抽出するときの温度，活性炭の使用について検討が必要と考えた。

50ml チューブでイヌリンを抽出する方法を検討し，最良方法を見いだした。

第１節　調査・実験方法

1-1　キクイモの収穫時期

キクイモは，気温が 17℃以下に下がると地中に塊茎を形成する。また，Van den Ende らは, チコリの根においてイヌリンの分解に関わる 1-FEH の合成が植物体を気温 14℃以上のハウスに移すことで抑制されることを報告している。

この 17℃～14℃を気温とする月間中でキクイモはイヌリンを合成すると考えられる。14℃をイヌリン合成のおよその下限とすると，収穫時期を月の平均の最高気温で決定できると考えた。ここ 10 年間の新潟市の 10 月～12 月の平均の最高気温を気象庁ホームページで調べた。

1-2　抽出する水の量

キクイモ塊茎からのイヌリン抽出については，宮口らの方法[17]，つまり水で抽出する方法で行った。

貯蔵中のイヌリン含量の変化やイヌリンの鎖長の分布，すなわち分子量分布の変化を調べるため，凍結乾燥したキクイモ粉末からイヌリンを抽出するための適切な水の量を調べた。

実験方法は下記のとおりである。

50 ml のチューブを使い，キクイモ粉末 3 g からイヌリンを抽出するときに加える水の量を粉末の 8 倍，10 倍，14 倍である 24 ml，30 ml，42 ml とし，回収したイヌリンを秤量して比較し最適な水量を決定した。

キクイモ塊茎からのイヌリンの抽出法(改変宮口らの方法)

1) 凍結乾燥したキクイモ粉末 3 g に超純水を加え 60℃，160 rpm で 60 分間振とう抽出した。

2) 10 000 ×g で 40 分間遠心分離して上清を回収した。

3) 回収した抽出液に活性炭 1 g を加え 70℃で 20 rpm で 60 分間振とうした。

4) 活性炭を濾過し、石灰清浄後減圧蒸留で 15 ml 程度に濃縮した。

5) 濃縮液にエタノールを加えイヌリンを析出させた。

6) 遠心分離し沈殿したイヌリンを凍結乾燥させた。

7) 回収したイヌリンを秤量した。

1-3　活性炭による影響

キクイモ塊茎から超純水でイヌリンを抽出すると，褐色の抽出液が得られる。この褐色の抽出液に活性炭を添加すると褐色は消え，アルコールにより析出されるイヌリンは白色の結晶となる。活性炭を使ってイヌリンを精製し，*Bifidobacterium* 属の菌の増殖を検討した研究もある[18]。

しかし，活性炭処理が脱色だけでなく，イヌリンの低分子部分までが活性炭に吸着されるのではないかと予想した。そこで，前出の抽出操作において活性炭処理と活性炭未処理で得られたイヌリン結晶を再度水に溶かし，各試料の全糖濃度が同じになるように調整後，その 1 ml をゲル濾過クロマトグラフィーに供した。ゲル濾過クロマトグラフィーの担体には，Bio-Gel P-2　Gel (BIO-RAD，分画分子量 100～1 800)を用い，カラムサイズは直径 1.5 cm，長さ 44 cm とし，溶離液は超純水を用い，流速 0.33 ml/分で 1 ml ずつ 60 本分画した。それぞれの画分の全糖量を改良フェノール硫酸法[19]で測定し，分子量分布を作成した。これをもとに活性炭の影響を調べた。使用したキクイモ塊茎は，2016 年 11 月 22 日胎内市産で収穫直後のものである。

1-4　抽出温度の検討

イヌリンを含む植物からアルコール類や水をつかった抽出方法がある。また，水を使った抽出には，80℃の熱水[4)18)20)]や冷水[21)]で抽出した報告がある。

ここでは，35℃から80℃までの温度で，キクイモ乾燥粉末から抽出されるイヌリンの分子量分布を調べ，高分子画分から低分子画分まで十分抽出できる温度を調べた。イヌリンの分子量分布を調べるゲル濾過クロマトグラフィーの操作は，1-3 と同様である。

第2節　結果と考察

2-1　キクイモ塊茎の収穫時期

17℃～14℃の気温でキクイモのイヌリンは合成されると考えられる。

表1-1「新潟市の気象観測統計」より新潟市の10月の月平均最高気温は，2016 年度前の 10 年間では，19.9℃～21.9℃の間にあり，平均は 20.9℃であった。また，同様に 11 月の最高気温の平均は 14.6℃となり，12 月での最高気温の平均は，8.6℃となり，新潟市では，12 月になると急に気温低下した。12 月に入ると月平均最高気温が 14 ℃を下回っていた(表 1-1）ことと，気温が高い 10 月下旬から 11 月上旬ではイヌリン含量の低下は見られない報告[11)]と，キクイモの地上部が完全に枯れるのが 11 月下旬，キクイモが新潟市場に出回る時期が 12 月初めであることから収穫時期を 11 月下旬の 20 日前後とした。さらに，12 月は，最高気温の平均が 8.6℃と下がり，キクイモ塊茎中の 1-FEH の合成が発現し，低温に晒されることによりイヌリンは急激に解重合が進むと考えられるので重合度の高いイヌリンを得るには収穫は 11 月下旬の霜が降りる前が適すると考えた。

表 1-1　新潟市の気象観測統計(国土交通省　気象庁より)

新潟市の直近 10 年間の月の平均最高気温

月／年	最高気温(℃)		
	10月	11月	12月
2007	20.8	15.3	8.5
2008	21.3	14.1	10.5
2009	20.8	15.3	8.5
2010	21.3	14.6	10.1
2011	20.8	15.6	7.1
2012	21.3	13.3	7.0
2013	21.9	13.6	8.1
2014	20.1	15.0	6.4
2015	19.9	15.1	10.1
2016	20.4	13.6	10.0
平均	20.9	14.6	8.6

2-2　抽出する水の量

50 ml のチューブを使い，キクイモ粉末 3 g からイヌリンを抽出するときに加える水の量を 8 倍，10 倍，14 倍とし，回収したイヌリンを秤量して比較した。

加える水を 24 ml，30 ml，42 ml としたとき，得られるイヌリンは，平均でそれぞれ 1.84 g，1.94 g，1.87 g となった(表 1-2)。キクイモ乾燥粉末に水をなじませ，50 ml チューブでイヌリンを十分に得るためには, 10 倍量の水で抽出することで高分子から低分子まで十分抽出できることがわかった。

表 1-2　水の量による抽出イヌリン結晶量(g/3g 乾燥物)

超純水の量	24 ml	30 ml	42ml
イヌリン含量 (g)	イヌリン含量 (g/3g乾燥物)	イヌリン含量 (g/3g乾燥物)	イヌリン含量 (g/3g乾燥物)
①	1.78	1.83	1.78
②	1.87	1.91	1.88
③	1.86	2.07	1.95
平均	1.84	1.94	1.87
標準誤差	0.03	0.06	0.04

イヌリン含量は析出したイヌリン結晶を秤量した.

①～③は 3 回の抽出のそれぞれの重量である。

2-3　活性炭による影響

活性炭処理と活性炭未処理のそれぞれで得られたイヌリン結晶を再度水に溶かし，各試料の全糖濃度が同じになるように希釈後，その 1 ml をゲル濾過クロマトグラフィーに供した。ゲル濾過クロマトグラフィーの担体には, Bio-Gel P-2　Gel (BIO-RAD, 分画分子量 100～1 800)を用い，カラムサイズは直径 1.5 cm，長さ 44 cm とし，溶離液は超純水を用い，流速 0.33 ml/分で 1 ml ずつ 60 本分画した。それぞれの画分の全糖量を改良フェノール硫酸法[19]で測定し，分子量分布を作成した。

図 1-1 より，スクロース周辺の低分子部分のほぼ全部と高分子部分の一部が活性炭に吸着されることがわかった。

活性炭で処理すると，精製度の高い白いイヌリン結晶が得られるが[17][18]，イヌリン抽出液の活性炭処理はイヌリンの低分子とフラクトオリゴ糖が大きく損失してしまいこの実験では分子量分布の特徴が明らかにされないことがわかったので，活性炭処理はしないこととした。

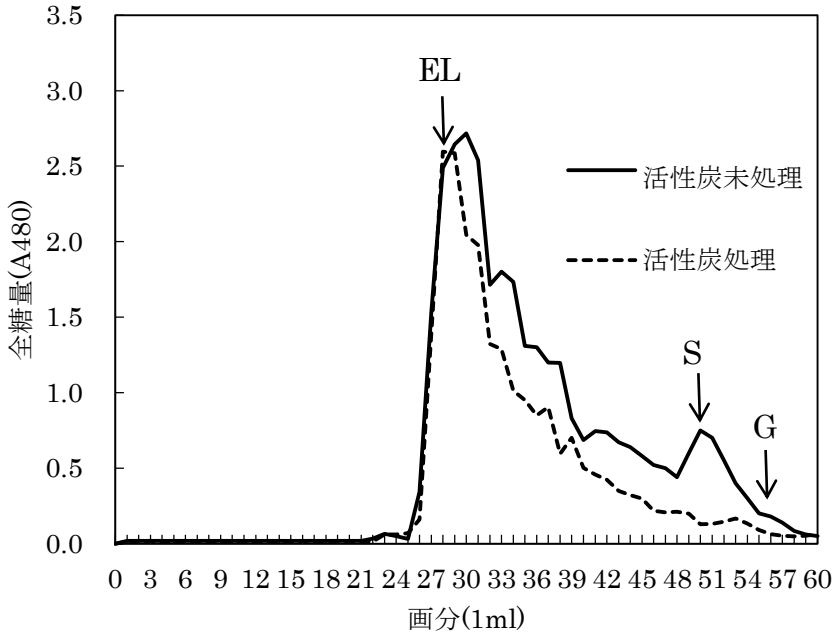


図 1-1　活性炭処理によるイヌリン分子量分布への影響

※分子量分布の EL は排除限界，S と G はスクロースとグルコースの溶出位置を示している。

2-4　抽出温度

図 1-2 より，抽出温度 70℃ではイヌリンの高分子部分から低分子部分までよく抽出できているように見える。しかし，抽出された画分を改良フェノール硫酸法で全糖を測定すると，夾雑な物質やセルロースなどの繊維質が反応し，時折突出した部分が存在する。この夾雑な成分が分子量分布の特徴を見極める支障となる。

抽出温度 45℃～95℃により，抽出されるイヌリン溶出率は高温ほど高いという報告がある[22]。しかし，本研究では，抽出温度 80℃では，60℃や 70℃に比べゲル濾過クロマトグラフィーにより高分子部分が溶出できず排除限界近くではピークが削られた。

また，図 1-3 の比較的低温の 35℃も 59℃抽出に比べると，低分子部分の抽出量は確保できているが，高分子部分の一部が抽出されない結果となった。

この 60℃近辺の抽出温度におけるイヌリンの分子量分布を比較すると，59℃が高分子から低分子まで抽出量が確保でき，また夾雑な成分が抽出されず最適な温度と考えられた。

以上のように，水でキクイモ塊茎からイヌリンを抽出する際，定温振とう機の温水の温度を正確に測定することに留意しなければならない。

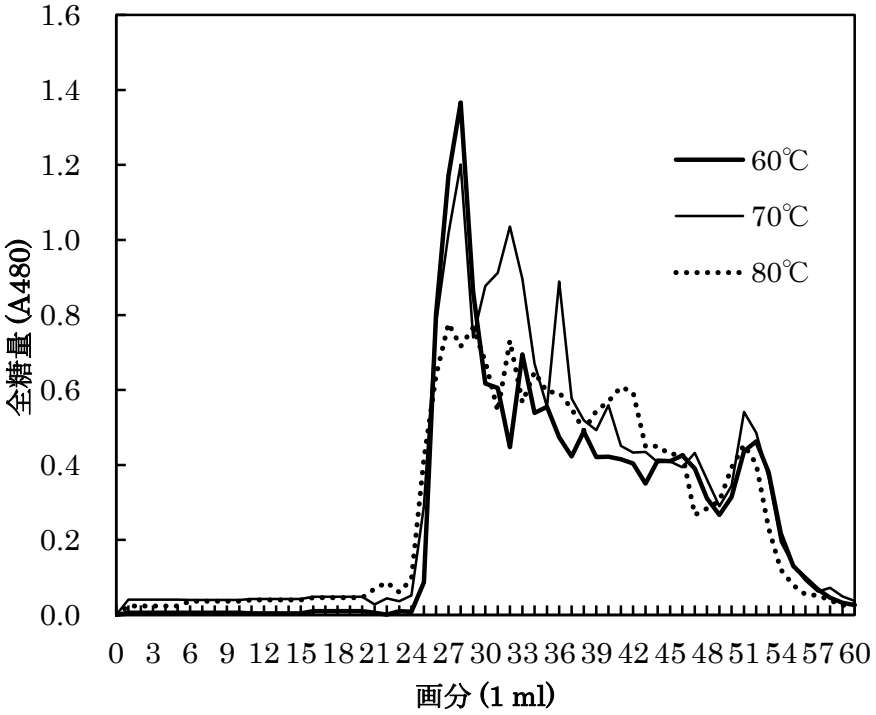


図 1-2　熱水抽出のイヌリン分子量分布

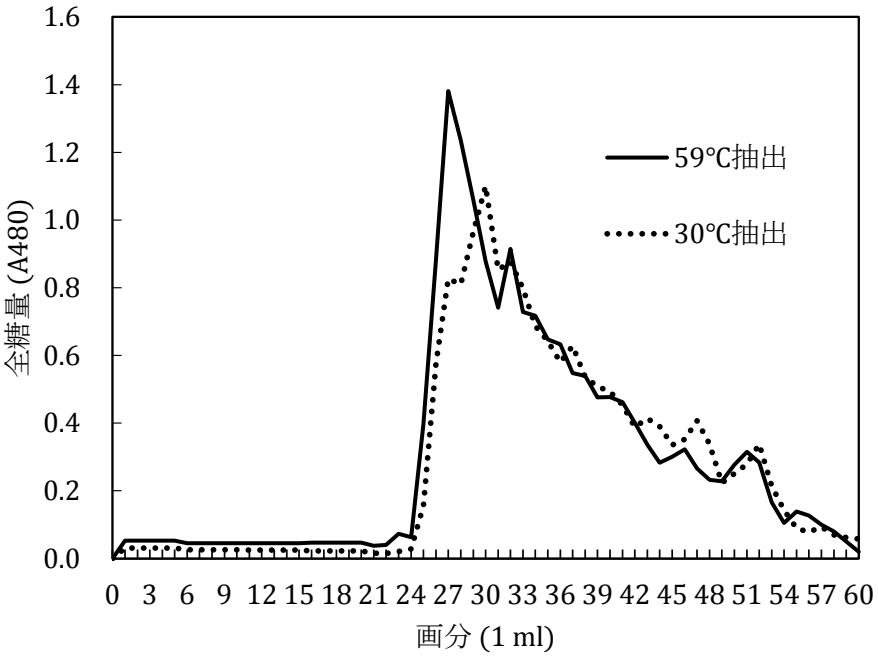


図 1-3　低温抽出のイヌリン分子量分布

第１章のまとめ

第１章は，キクイモ塊茎からイヌリンを抽出しイヌリン含量や分子量分布を調べるのに適切な条件を探った。条件を確定しておくことで，キクイモ塊茎の収穫直後や貯蔵中におけるイヌリン含量や分子量分布について適切なデータを収集することができる。以下条件をまとめた。

2-1　新潟市ではイヌリン含量と重合度が高いキクイモ塊茎は, 月最高気温の平均やキクイモ地上部の状態などを考慮して 11 月下旬に収穫する。

2-2　イヌリンを抽出する超純水の量は，50 ml のチューブを使う場合，試料の重量の 10 倍量が適切である。

2-3　抽出液の色素等を活性炭に吸着させせることで, 白いイヌリンの結晶は析出されるが，抽出液の成分であるスクロースやイヌリンの低分子部分のほぼ全部と高分子部分の一部が失われので，活性炭は使用しない。

2-4　イヌリンの抽出温度は，59℃が最適であり夾雑物や細かい繊維質が混在を極力防ぐことができる。抽出温度は室温にも影響されるので，振とう機の水槽の温度を的確に測定しておく。

以下の本研究に適した抽出法の条件を決定した。

1) 凍結乾燥したキクイモ粉末 3 g に超純水 30 ml を加え 59℃，160 rpm で 60 分間振とう抽出する。

2) 10 000 ×g で 40 分間遠心分離して上清を回収する。※①，②を 3 回繰り返す。

3) 回収した上清約 90 ml に飽和水酸化カルシウム水溶液を加え pH8 にし，つづいて，0.1 mol/L シュウ酸で pH7 にする。(石灰清浄)

4) 沈殿を濾過し，抽出液を減圧蒸留し濃縮する。

5) 濃縮抽出液にエタノールを加えイヌリンを析出させ，遠心分離後イヌリンを凍結乾燥し，秤量する。イヌリン含量を 100 g 乾物あたりの重量(g)に換算する。

6) ゲル濾過クロマトグラフィーに供する場合，濃縮液を 50 ml にメスアップする。

第2章　キクイモにおけるイヌリンの貯蔵中の分解とプレバイオティクス効果

緒論

キクイモ塊茎中のイヌリンは、鎖長が 2 ～ 60 程度の範囲に分布している。2015 年に機能性表示食品制度（消費者庁， 2015）[ii]が施行されたこともあり，近年は血糖値の上昇抑制[23]や，血中中性脂肪の低下[24]，整腸作用[25]などの機能が報告されているイヌリンに対して注目が高まり，キクイモを原料としたお茶やパン，チップス，漬物などの加工食品[4,26,27]が多数開発されている。これらの商品には機能性の面から，イヌリン含量が高いことが求められる。さらに，フルクトースの結合数が多く鎖長が長いいわゆる高重合度のイヌリンで高い整腸作用が見られることから[25]，イヌリンは含量だけでなく鎖長が長いことも求められる。そのため、イヌリン含量や鎖長を低下させないための研究が現在まで行われてきている[11,14]。

キクイモ塊茎は、貯蔵温度が高いと呼吸が活発となり乾物率が下がり、菌の増殖により腐敗も増える。発芽を抑制するためにもキクイモの貯蔵は0℃～2℃程度がよいというのが、キクイモの一般的な貯蔵方法である。しかし，低温では貯蔵中にフルクタンエキソヒドロラーゼ(1-FEH)によって低分子化されていく。これは、塊茎の休眠中では、フルクタン合成酵素（1-SST）の発現が抑制され、1-FEH の活性が高くなるからである。しかし、Van den Ende らは，同じキク科のチコリの根茎においてイヌリンの分解に関わる 1-FEH の合成が植物体を気温 14℃以上のハウスに移すことで抑制されることを報告している[15]。このことは，低温ではなく常温で貯蔵することでイヌリンの分解を抑制できる可能性を示唆している。そこで第 2 章では，常温保存がイヌリンの分解に及ぼす影響を明らかにすることを目的に，キクイモを 90 日間，20℃と 5℃で貯蔵し，貯蔵中のイヌリンの含量と分子量の変化を調べた。

また，*Bifidobacterium* 属菌など腸内有用細菌に対するイヌリンの増殖効果は分子

量により異なることが知られている[16]。そこで次に，ゲル濾過クロマトグラフィーによりキクイモの抽出物を高分子画分と低分子画分に分け，それらの *Bifidobacterium* 属菌に対する増殖効果を調べた。さらに，収穫直後と 20℃で貯蔵したキクイモの抽出物の *Bifidobacterium* 属菌に対する増殖効果を比較し，常温貯蔵がキクイモのプレバイオティクス効果を向上させるかどうか検討した。

同様にしてキクイモの抽出物を高分子画分と低分子画分に分け，それらの *Lactobacillus* 属菌に対する増殖効果を調べ，収穫直後と 20℃で貯蔵したキクイモの抽出物の *Lactobacillus* 属菌に対する増殖効果を比較した。*Bifidobacterium* 属菌は理化学研究所バイオリソース研究センターより入手し，*Lactobacillus* 属菌は，従前入手して所有のものである。

第１節　実験方法

1-1　キクイモの貯蔵方法

キクイモは，新潟市北区南浜で栽培し，2018 年 11 月 22 日に収穫したものを用いた。キクイモの塊茎は，乾燥防止のため土付きのまま湿らせた新聞紙で包み，通気性のある木箱にそれぞれの塊茎が重なったり密になりすぎないようにして敷き詰め，20℃と 5℃の定温暗室で貯蔵した。塊茎の乾燥は，組織の軟化や腐敗を引き起こす。このため湿らせた新聞紙は，7 日ごとに交換した。収穫直後，30 日，60 日，90 日貯蔵後に塊茎を水洗いし，皮を剥いて凍結乾燥して実験に用いた。

1-2　貯蔵中におけるイヌリン含量(全糖量)

イヌリンの抽出は，第 1 章で検討して決定した抽出法で行った。この方法ではイヌリンが特異的に抽出されるのではなく，水溶性糖類全てが抽出される。前出の方法凍結乾燥粉末 3 g に 30 ml の超純水を加え，温度計で 59℃に設定した往復恒温振とう機 PERSONAL-11（タイテック）により 160 rpm で 60 分間振とうした。振とう後，遠心分離機で 10 000×g, 40 分間遠心し上清を分取した。この抽出操作を 3 回繰り返し，約 90 ml の上清を得た。上清に液量が増えすぎないよう飽和 $Ca(OH)_2$ 水溶液を pH8.0 になるまで加え清浄化した後，シュウ酸により pH を 7.0 に調整し，過剰なカルシウムをシュウ酸カルシウムとして沈澱させ，他の沈殿物とともに濾紙で濾過した。濾液をロータリーエバポレーター（ビュッヒ）で減圧濃縮し，濃縮液を 50 ml に定容して抽出液として用いた。貯蔵期間ごとのイヌリン抽出液の濃度を改良フェノール硫酸法[19]で測定した。

1-3　貯蔵中におけるイヌリンの分子量分布の変化

抽出液の全糖量を改良フェノール硫酸法[19]により測定した。各試料の全糖濃度が同じになるように調整後，その 1 ml をゲル濾過クロマトグラフィーに供した。ゲル濾過クロマトグラフィーの担体には，Bio-Gel P-2　Gel (BIO-RAD，分画分子量 100～1 800)を用い，カラムサイズは直径 1.5 cm，長さ 44 cm とし，溶離液は超純水を用い，流速 0.33 ml/分で 1 ml ずつ 60 本分画した。それぞれの画分の全糖量を改良フェノール硫酸法で測定し，分子量分布を作成した。また，ミオグロビン（分子量 17 500），スクロース，グルコースを分析することでそれぞれカラムの排除限界，二糖と単糖の溶出位置を求めた。

1-4　イヌリン抽出物の *Bifidobacterium* 属の菌株と *Lactobacillus* 属の菌株に対する増殖効果

1)　実験に使用した *Bifidobacterium* 属の菌株と *Lactobacillus* 属の菌株

・*Bifidobacterium longum* subsp. *Longum*　(JCM1217)

・*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*　(JCM1222)

・*Bifidobacterium adolescentis*　(JCM1275)

Bifidobacterium 属の 3 菌株は理化学研究所バイオリソース研究センターより入手。

・*Lactococcus　lactis*

・*Weissella　cibaria*

上記 2 菌株は、教室所有。

・*Streoptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus*　(JCM20026)

上記 1 菌株は、理化学研究所バイオリソース研究センターより入手。

・*Lactobscillus　delbrueckii　blugaricus*　(NBRC13953)

・*Lactobscillus　casei*　(NBRC15883)

上記 2 菌株は、製品評価技術基盤機構より入手。

2)　*Bifidobacterium* 属の菌株の液体培地の種類と糖

Bifidobacterium 属の各菌を BIFIDOBACTERIUM MEDIUM（理化学研究所，JCM 培地番号 19:表 2-1）に接種し，40～48 時間，37℃でアネロパック（三菱ガス化学）を用いて嫌気培養することで前培養液を得た。上記培地には炭素源としてグルコースが 1%含まれている。そこで抽出液の全糖濃度を測定し，BIFIDOBACTERIUM MEDIUM に含まれるグルコースの代わりに抽出液を加え，121℃で 20 分間高圧蒸気滅菌することで炭素源として糖が 1%含まれる培地を調製した。

これに前培養液を接種し，37℃で嫌気培養した。経時的に培養液の 600 nm における吸光度を測定することで，菌の増殖を調べた。また，試験は 3 回以上行い，培養 22 時間後の培養液の濁度について Tukey-Kramer の多重検定により培地間で 5%水準で有意な差があるか調べた。

3) *Lactobacillus* 属の菌株液体培地の種類と糖

Lactobacillus 属の各菌株を MRS MEDIUM(表 2-2)に接種し，24 時間，30℃でアネロパック（三菱ガス化学）を用いて嫌気培養することで前培養液を得た。上記培地には炭素源としてグルコースが 0.5%含まれている。グルコースの代わりに抽出液を加え，121℃で 20 分間高圧蒸気滅菌することで炭素源として糖が 0.5%含まれる培地を調製した。これに前培養液を接種し，30℃で嫌気培養した。

経時的に培養液の 600 nm における吸光度を測定することで，菌の増殖を調べた。また，試験は 3 回以上行い，培養 23 時間後の培養液の濁度について Tukey-Kramer の多重検定により培地間で 5%水準で有意な差があるか調べた。

表 2-1　BIFIDOBACTERIUM MEDIUM（理化学研究所，JCM 培地番号 19）

19 BIFIDOBACTERIUM MEDIUM

組成	質量	備考
Casein peptone, tryptic digest	10 g	
Beef extract	5 g	(BD-Difco)
Yeast extract	5 g	(BD-Difco)
K_2HPO_4	3 g	リン酸二カリウム
Tween80	1 ml	
Carbon source	10 g	
Distilled water	1 L	

pH6.5

121℃　15分

※滅菌10分後、アスコルビン酸ナトリウムとL-システイン・HClの溶液をそれぞれ最終濃度が1.0%と0.05%になるように無菌的に添加します。

表 2-2　MRS 培地

MRS

組成	質量	備考
Peptone	10 g	
Beef extract	10 g	(BD-Difco)
Yeast extract	4 g	(BD-Difco)
$(NH_4)_3C_6H_5O_7$	2 g	クエン酸三アンモニウム
$C_2H_3NaO_2$	5 g	酢酸ナトリウム
$MgSO_4$・$7H_2O$	0.2 g	硫酸マグネシウム7水和物
$MnSO_4$・$4H_2O$	0.05 g	硫酸マンガン4水和物
K_2HPO_4	2 g	リン酸二カリウム
Tween80	1ml	
Carbon source	5 g	ブドウ糖　イヌリン等
Distilled water	1 L	

pH6.5

121℃　15分

第2節　結果と考察

1-1　貯蔵中におけるイヌリン含量(全糖量)と分子量の変化

キクイモの塊茎を20℃と5℃で90日間貯蔵した。5℃貯蔵のキクイモは，90日間外観に変化はなく，瑞々しい状態を保っていた。一方，20℃貯蔵のキクイモは，30日目頃に発芽したが，その後芽の伸長は見られず，90日目でも芽の大きさは5 ㎜程度に留まった。また，それ以外外観に大きな変化はなかった。キクイモの塊茎のように自発休眠を行う植物は，一定期間低温に晒すことで休眠を打破し，生育適温下で萌芽させることができる。今回用いたキクイモは2018年11月後半に収穫した塊茎であり，この年の新潟の11月の気温は5℃を下回る日が多かったことから，低温により休眠が打破され20℃での貯蔵中に発芽したと考えられる。幸いにもその後芽は伸長せず，実験に使用することができたが，これは低温に晒された期間が短く休眠の打破が十分でなかったことによるのかもしれない。キクイモを常温保存する際には，発芽を抑える工夫が必要である。

貯蔵中のキクイモにおけるイヌリン含量の変化を調べた。Saengthongpinitら（2005）は，キクイモの塊茎に含まれる糖質の約90%はイヌリンであり，全糖質に占める単糖類と二糖類の割合は，収穫直後と低温貯蔵後では約10%で変わらないと報告している[28]。そこでイヌリン含量は，改良フェノール硫酸法で簡便に測定できる全糖量で評価することとした。キクイモの全糖量は，20℃，5℃貯蔵ともに90日間通して減少した（表2-3）。最初の30日間で全糖量は，20℃，5℃貯蔵で各々23.4%，21.0%と大きく減少し，その後も緩やかに減少し続けた．松本ら（2021）は，キクイモを4℃で貯蔵すると，最初の1ヶ月でイヌリンが39%減少すると報告しており[11]，貯蔵初期に大きく減少する点で一致していた。また，20℃と5℃貯蔵の減少率を比較

すると，90 日間通して 20℃貯蔵の減少率の方がやや大きく，20℃での貯蔵によりイヌリンの分解を抑制することはできなかった。しかし，90 日後の減少率は，20℃で 37.4%，5℃で 31.1%と 6%しか差がなく，20℃で貯蔵することでイヌリンの分解が極端に進むこともなかった。

表 2-3 貯蔵中のキクイモ塊茎における全糖量の変化

貯蔵温度	20℃		5℃	
貯蔵日数 （日）	全糖量 (g/100g乾燥物)	減少率 (%)	全糖量 (g/100g乾燥物)	減少率 (%)
収穫直後	59.9±0.6 a	-	59.9±0.6 a	-
30	45.9±1.3 b	23.4	47.3±2.1 b	21.0
60	43.3±1.4 b	27.7	43.6±0.5 bc	27.2
90	37.5±1.3 c	37.4	41.3±1.5 c	31.1

全糖量は平均値と標準誤差（n=3），減少率は収穫直後に対する%を示している。

表中の異なる英文字間には Tukey-Kramer の多重検定により 5%水準で有意差がある。

1-2　貯蔵中におけるイヌリンの分子量分布の変化

次に，貯蔵中どのようにイヌリンが分解されていくのか，また20℃と5℃貯蔵で分解のされ方に違いがないか，イヌリンの抽出液をゲル濾過クロマトグラフィーで分析することにより調べた。図2-1，図2-2に示す通り，20℃と5℃貯蔵のいずれにおいても貯蔵期間が長くなるにつれて高分子のイヌリンが次第に減少し，分解が進むことがわかった。しかし，分解の最終産物であるフルクトースとグルコースの溶出位置にピークは見られず，分解で生じた単糖類は速やかに消費されることが示唆された。

20℃と5℃貯蔵を比較すると(図2-3)貯蔵30日目における排除限界付近のピーク（画分26～29：図2-3の網掛け部分）の大きさに違いが見られ，20℃では貯蔵初期に高分子のイヌリンが急速に分解されていた。チコリの塊茎は，一定期間1℃で貯蔵した後16℃以上にすることで休眠が打破され発芽する[13]。先述の通り，収穫前の新潟の気温は非常に低く，今回20℃貯蔵したキクイモの塊茎は，貯蔵前に一旦低温に晒された後に20℃に移されたため，伸長はしなかったが貯蔵初期に発芽しており，発芽がイヌリンの分解に関係したことも考えられる。

また，　20℃で60日及び90日貯蔵した時の画分47～53(図2-3　灰色帯部分)のピークが5℃に比べ顕著に大きかった。このピークにはスクロース及び鎖長3～4単位程度のフラクトオリゴ糖が含まれると推測される。20℃貯蔵において低分子の生成物が蓄積する理由として3つのことが考えられる。

1つ目は，20℃貯蔵におけるインベルターゼ活性の低下である。細胞壁，細胞質，液胞に存在するインベルターゼは，スクロースを分解し，解糖系などに必要なグルコースやフルクトースを供給する[13]。貯蔵温度がキクイモのインベルターゼ活性に及ぼす影響として，20℃における6週間の貯蔵はその活性を70%低下させるが，4℃にお

ける活性の低下は 20%未満であると報告されている [29]．このことから，20℃で長期間貯蔵した結果, インベルターゼ活性が低下し, スクロースが蓄積したと考えられる。

2つ目はスクロースによるイヌリン分解酵素 1-FEH の活性阻害である。1-FEH は, イヌリンを加水分解しスクロースを生成するが，スクロースの分解活性は極めて低く [13]，また 1-FEH の一部は，生成物であるスクロースによって阻害されることが知られている [30)~32]。したがって，蓄積したスクロースにより 1-FEH 活性が阻害され，スクロース及び鎖長の短いフラクトオリゴ糖が次第に蓄積したと考えられる。

3 つ目は，インベルターゼがもつフルクタン合成酵素としての働きである。インベルターゼは，本来の加水分解の逆反応であるフルクタン合成活性を示すことが明らかにされており，スクロース濃度が高いとフルクトースを付加して 1-ケストースを合成する [1]。このため，スクロースの蓄積により，合成反応が生じ，フラクトオリゴ糖（鎖長３単位）が増加したと考えられる。これら 3 つの理由により，20℃貯蔵のキクイモの塊茎には鎖長の短い生成物が 5℃貯蔵のものより多く含まれると推測される。

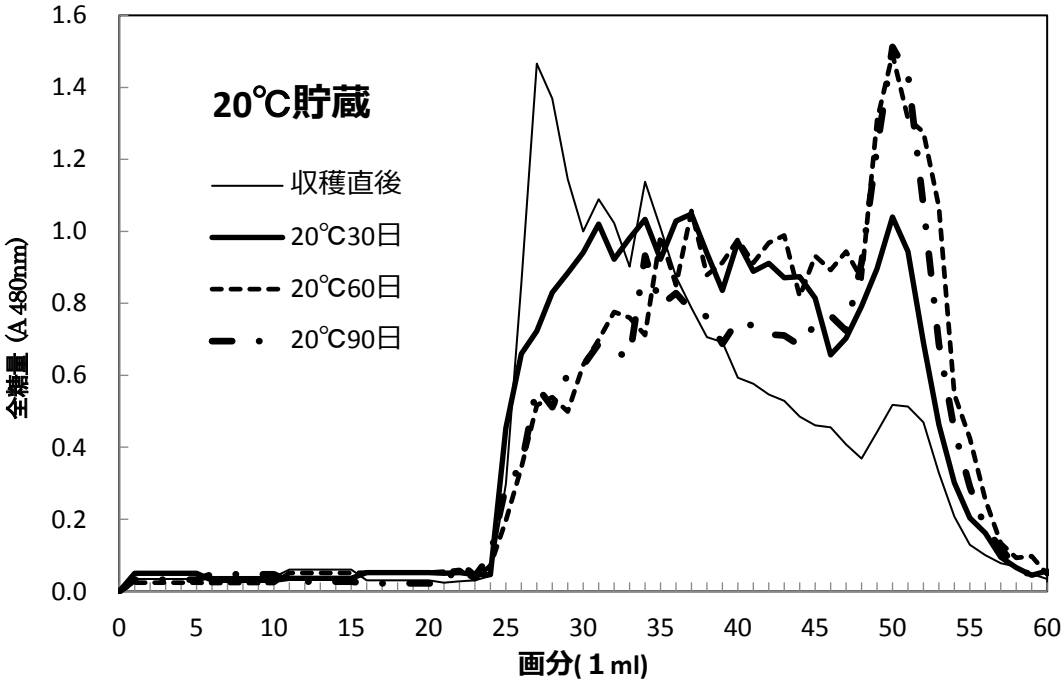


図 2-1　20℃貯蔵中におけるイヌリンの分子量分布の変化

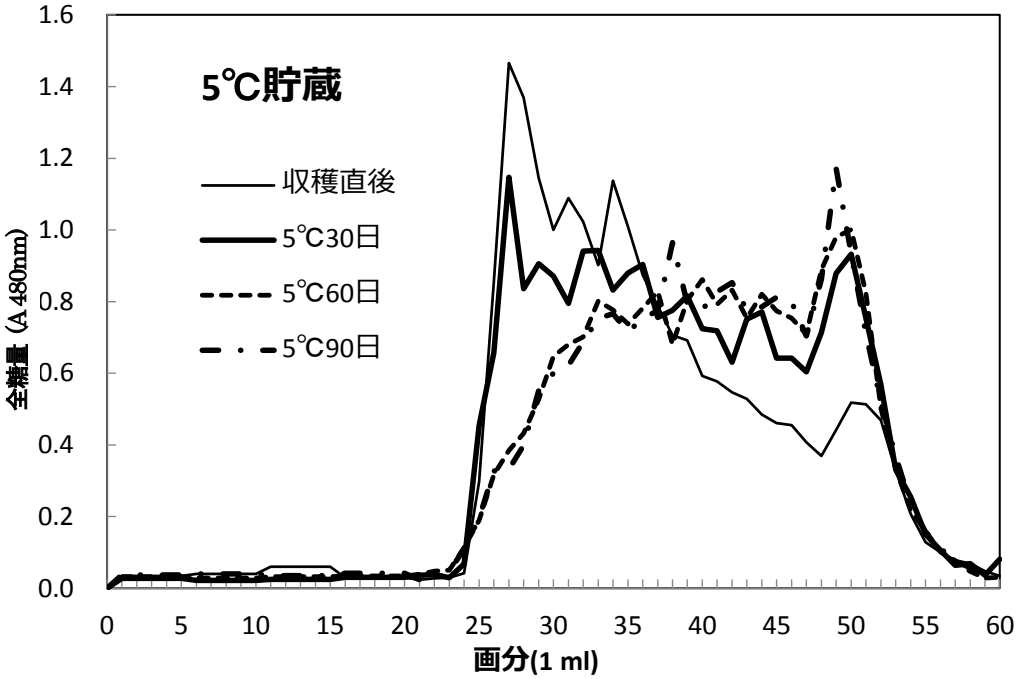


図 2-2　5℃貯蔵中におけるイヌリンの分子量分布の変化

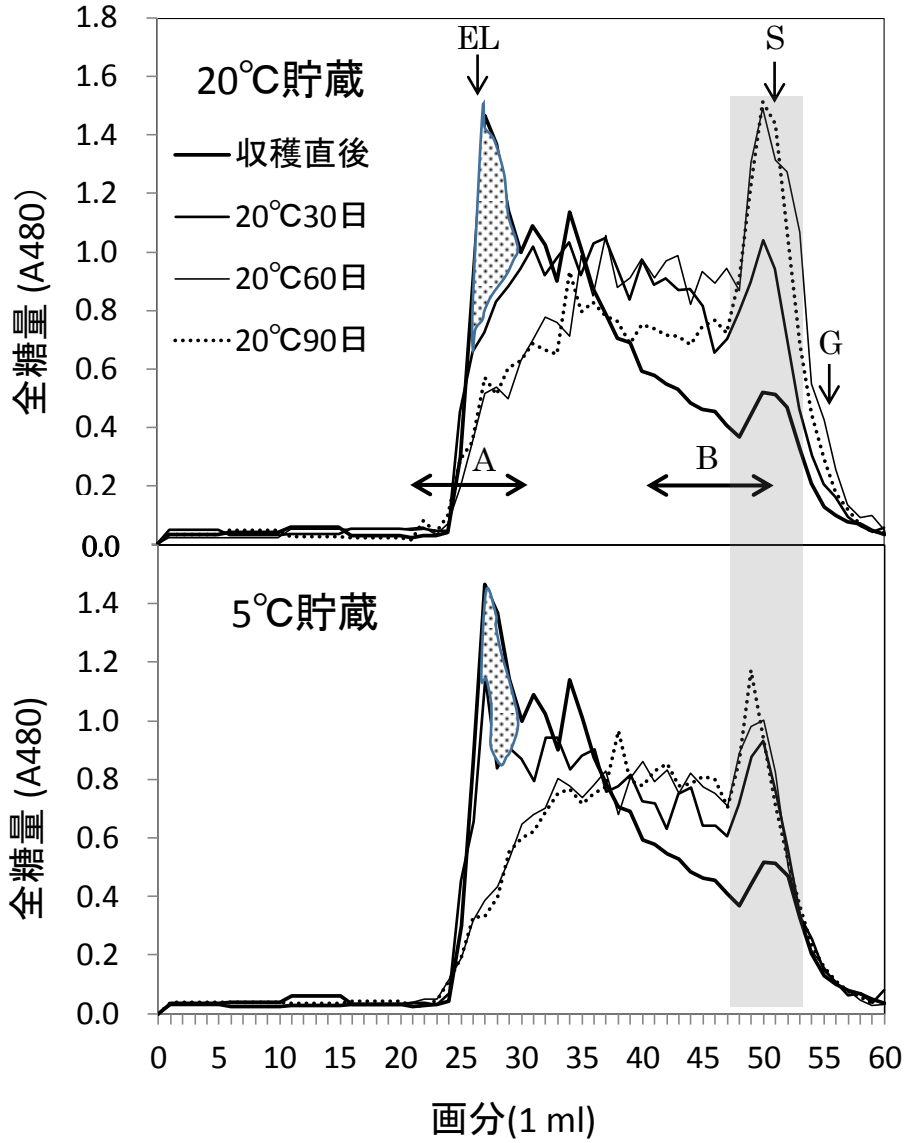


図 2-3　20℃と 5℃貯蔵中におけるイヌリンの分子量分布の比較

EL：排除限界分子量　　G：ｸﾞﾙｺｰｽ　　S：ｽｸﾛｰｽ

A：No.21～No.30　　B：No.41～No.50

1-3　イヌリン抽出物の *Bifidobacterium* 属の菌株と *Lactobacillus* 属の菌株に対する増殖効果

1)　キクイモ塊茎から抽出した高分子画分と低分子画分に対する増殖

イヌリン抽出液のゲル濾過クロマトグラフィーによる分析により，20℃で貯蔵したキクイモの塊茎には，鎖長 3～4 単位程度のフラクトオリゴ糖が多く含まれていることがわかった(図 2-3)。イヌリンの機能は鎖長により異なることが報告されており，例えば整腸作用は鎖長が長い方が効果が高く[25]，免疫力増強作用は鎖長が短い方が効果が高い[6]。また，イヌリンには善玉菌を増やし，悪玉菌を減らす腸内環境改善効果があることが知られており[33]，腸内環境改善効果は鎖長により異なり多くの *Bifidobacterium* 属菌と *Lactobacillus* 属菌とは鎖長 3 単位の 1-ケストースに対し最も高い資化性を示すと報告されている[34, 35, 36]。そこで，キクイモのイヌリン抽出液をゲル濾過クロマトグラフィーで分離し，鎖長により高分子画分と低分子画分に分け，それらを炭素源とした培地でヒトの腸由来の 3 種の *Bifidobacterium* 属菌と 5 種の *Lactobacillus* 属菌を培養し，菌の増殖を比較した。なお，ゲル濾過の担体の分画分子量から高分子画分（図 2-3 のＡ：画分 21～30）には鎖長 9 単位以上，低分子画分（図 2-3 のＢ：画分 41～50）には鎖長 3～6 単位程度の物質が含まれると推定され，それぞれの調製にはそれらを豊富に含む収穫直後と 20℃貯蔵 60～90 日のキクイモの抽出液を各々用いた。得られた高分子画分と低分子画分の分子量分布をゲル濾過クロマトグラフィーで分子量分布を確かめ，実験に使った(図 2-4)。

それらの培地で培養した結果，*Bifidobacterium* 属菌 3 種の菌全てが，低分子画分においてグルコースと有意な差がない良好な増殖を示した(図 2-5～図 2-7)。しかし，高分子画分においては培養 22 時間後の培養液の濁度がグルコースの半分程度と有意

に低く，高分子画分より低分子画分の方が *Bifidobacterium* 属菌に有意に資化されやすいことがわかった。*Lactobacillus* 属菌５種については，*Bifidobacterium* 属菌３種の増殖の程度に及ばないが，高分子画分より低分子画分の方が *Lactobacillus* 属菌 5 種においても有意に資化されやすいことが分かった(図 2-8～図 2-12)。

このことは，低分子画分には，多くの *Lactobacillus* 属菌や *Bifidobacterium* 属菌が高い資化性を示す 1-ケストースを含む鎖長の短いフラクトオリゴ糖が豊富に含まれることがその一因と考えられる。

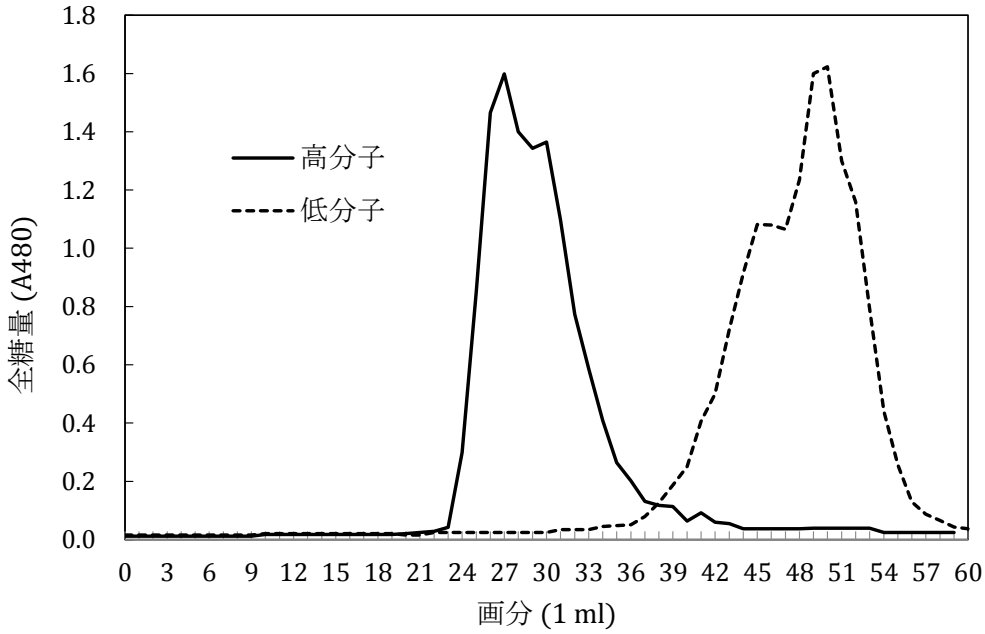


図 2-4　キクイモのイヌリン抽出液をゲル濾過クロマトグラフィーで分離後の高分子画分と低分子画分の分子量分布

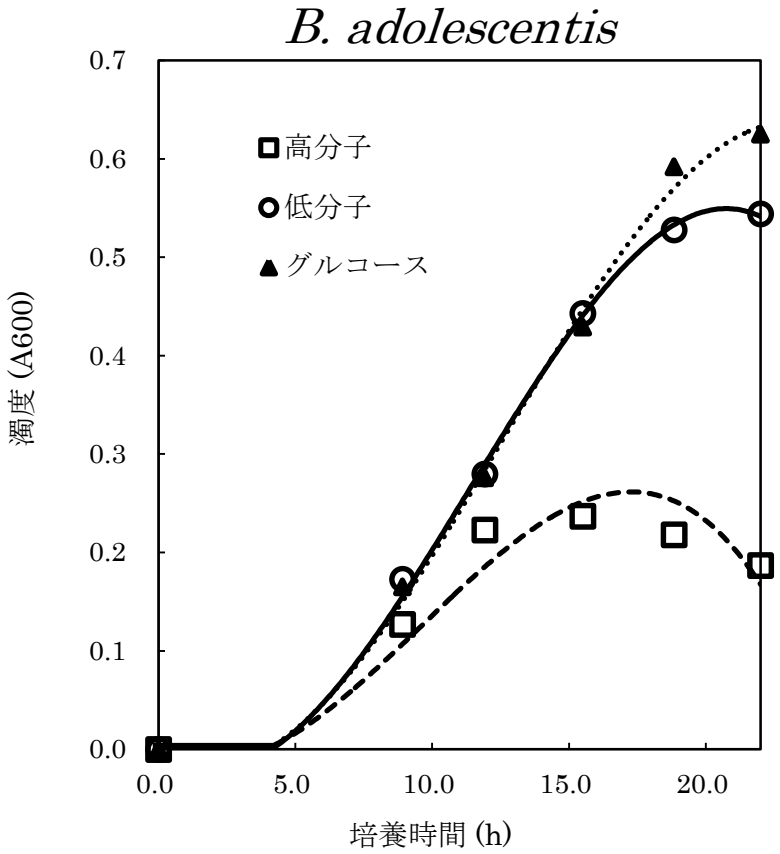


図 2-5 *B.adolescentis* の高・低分子画分中の増殖

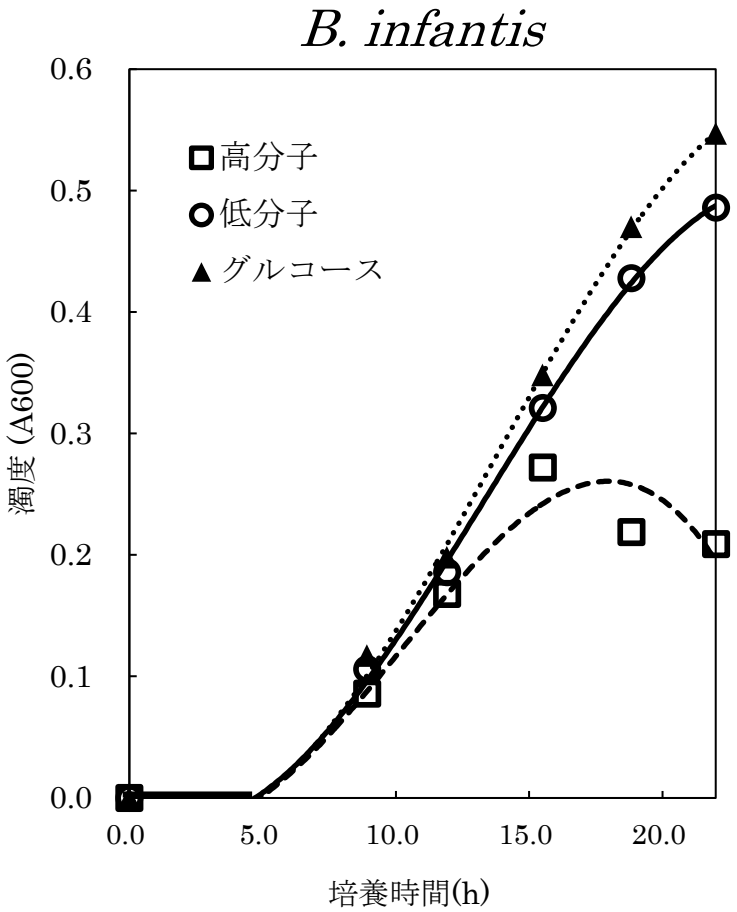


図 2-6　*B.infantis* の高・低分子画分中の増殖

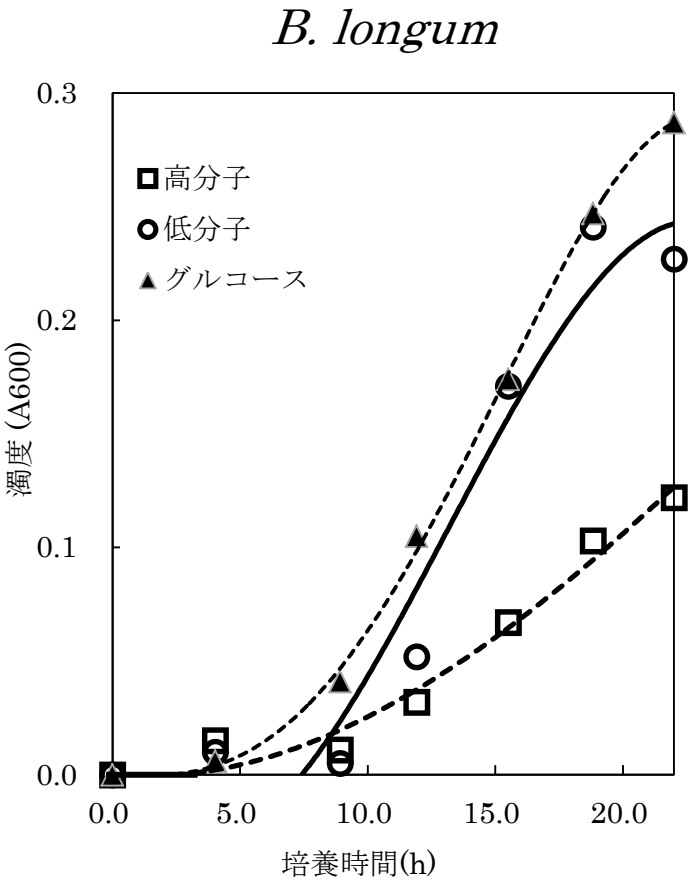


図 2-7　*B.Longum* の高・低分子画分中の増殖

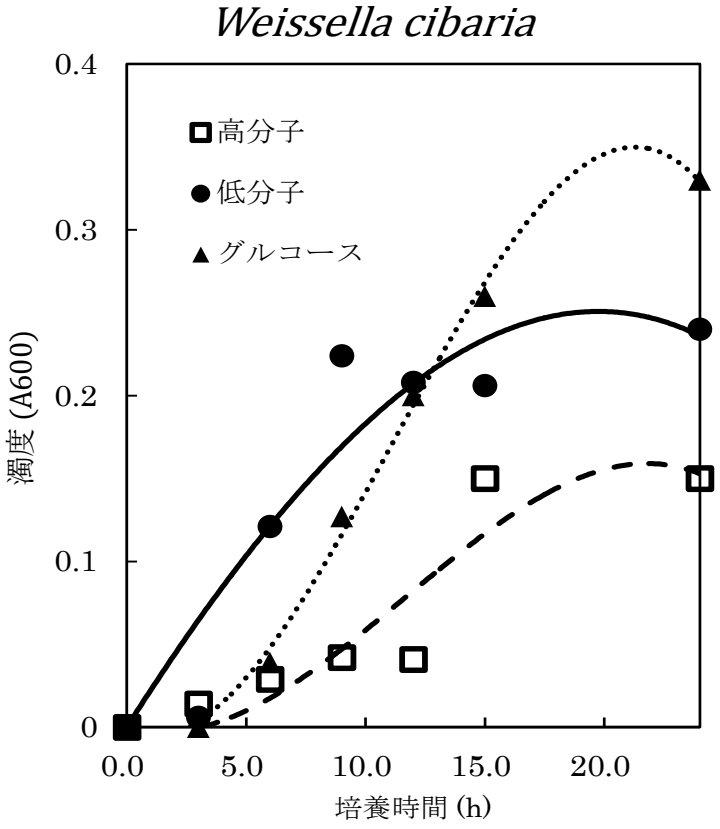


図 2-8　*Weissella　cibaria* の高・低分子画分中の増殖

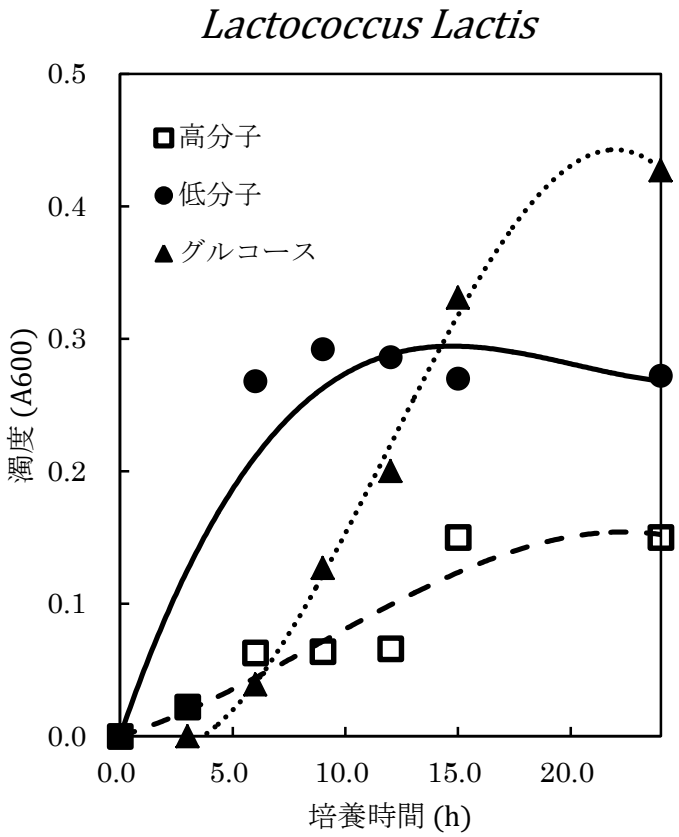


図 2-9　*Lactococcus　lactis* の高・低分子画分中の増殖

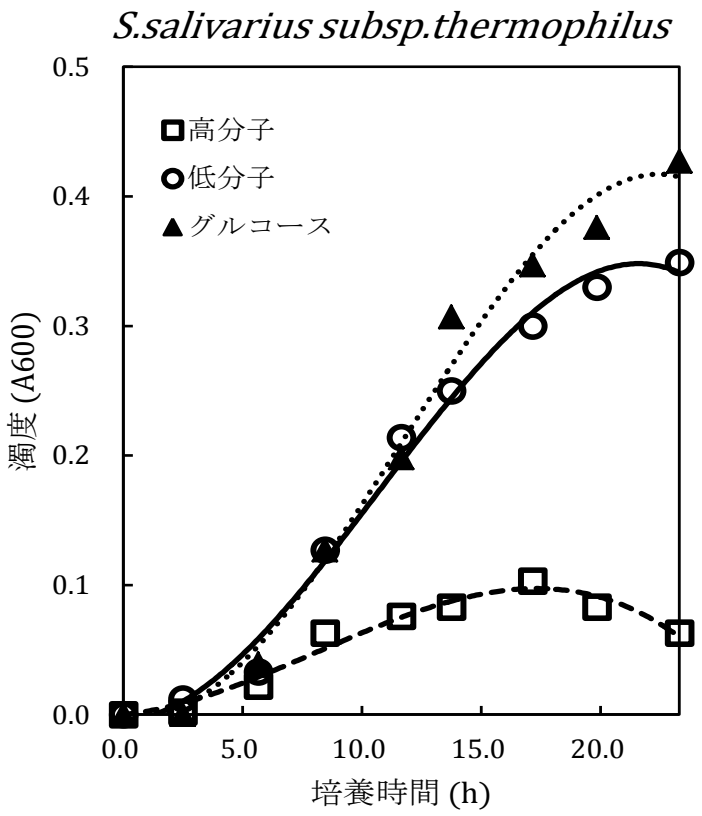


図 2-10　*S.salivarius* subsp.*Thermophilus* の高・低分子画分中の増殖

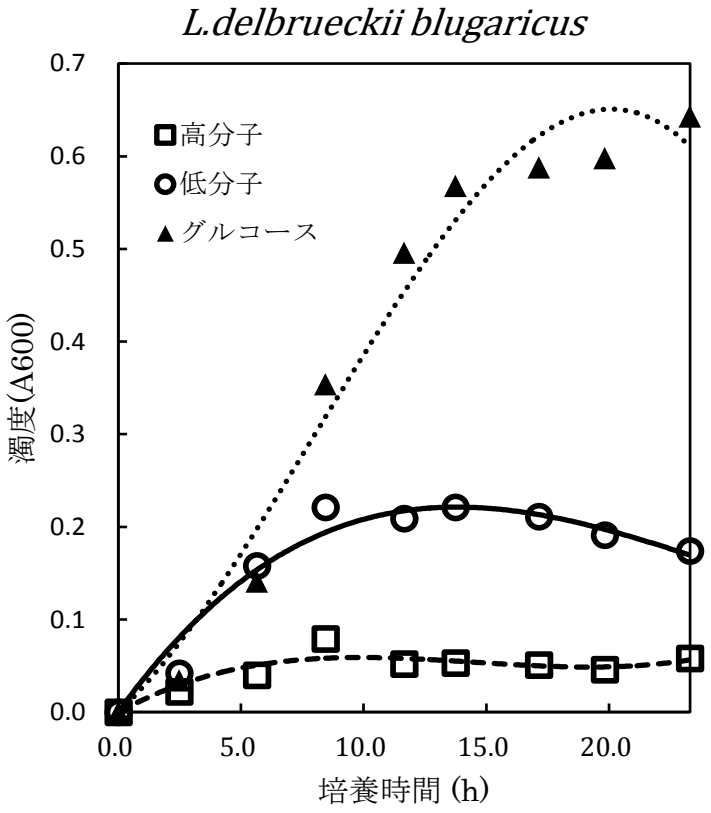


図 2-11　*L.delbrueckii　blugaricus* の高・低分子画分中の増殖

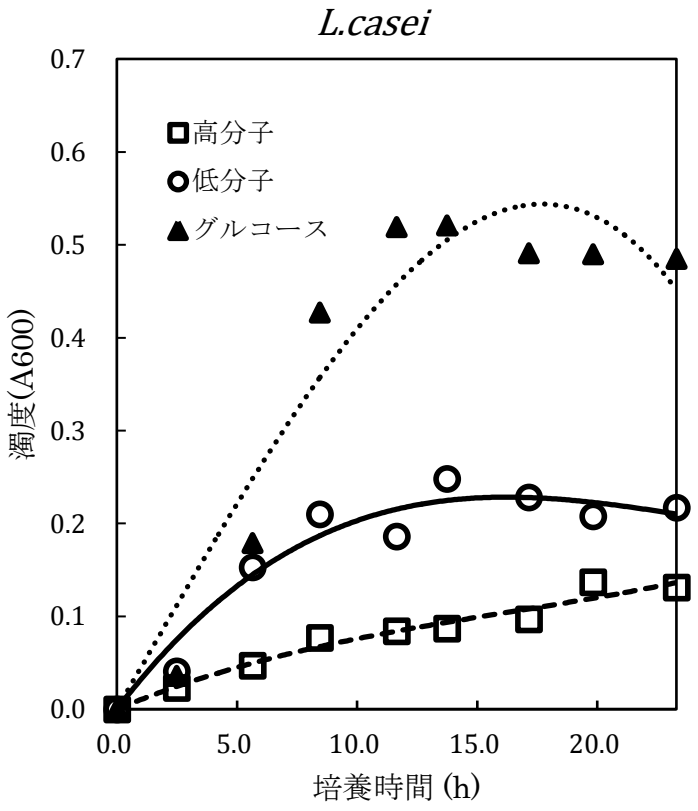


図 2-12　*L.casei* の高・低分子画分中の増殖

2) 収穫直後と20℃貯蔵90日のキクイモ塊茎のイヌリン抽出液に対する増殖

20℃貯蔵のキクイモは，収穫直後や5℃貯蔵のキクイモより鎖長の短いフラクトオリゴ糖を豊富に含むことから，優れたプレバイオティクス効果を持つ素材となる可能性がある。そこでこのことを確かめるために，次に20℃で90日間貯蔵したキクイモと収穫直後のキクイモのイヌリン抽出物を炭素源とした培地でヒトの腸由来の3種の *Bifidobacterium* 属菌を培養し，菌の増殖を比較した。また，同様にして 5 種の *Lactobacillus* 属菌を培養し，菌の増殖を比較した。

その結果，3種の *Bifidobacterium* 属菌では20℃で90日間貯蔵したキクイモのイヌリン抽出物は，3 種の菌全てをグルコースと有意な差がない程度にまで増殖させたが，収穫直後のキクイモのイヌリン抽出物は *B. adolescentis* と *B. infantis* の2種の菌に対し培養22時間でグルコースの半分程度と有意に低い濁度しか示さず，20℃貯蔵のキクイモの方が高いプレバイオティクス効果を持つことが明らかにされた（図2-13，図2-14）。なお，図2-15の *B. longum* は，いずれのイヌリン抽出物に対してもグルコースと有意な差がない良好な生育を示した。イヌリンの高分子画分と低分子画分を含む培地における3種の *Bifidobacterium* 属菌の増殖を調べた図の結果を改めて見ると，高分子画分での菌の増殖が *B. adolescentis* と *B. infantis* の2種の菌と *B. longum* とでは異なっており，*B. adolescentis* と *B. infantis* は培養5時間から急速に増殖し，それぞれ12時間と15時間で頭打ちになっているが，*B. longum* は緩やかではあるが培養22時間後でも増殖し続けていた。Rossi ら（2005）は，*Bifidobacterium* 属の55菌株を鎖長25単位以上の高分子のイヌリンと鎖長3～10単位のフラクトオリゴ糖を炭素源とした培地で培養した結果，フラクトオリゴ糖は全ての菌に資化されたが，高分子のイヌリンは8菌株にしか資化されなかったと報告している[16]。今回調製

した高分子画分は収穫直後のキクイモから調製したため鎖長が 25 単位以上のイヌリンも含まれていると考えられ，培養途中で *B. adolescentis* と *B. infantis* の増殖が頭打ちになった理由は，これらの菌が鎖長 10 単位程度のイヌリンしか資化できず，長鎖のイヌリンを資化する能力を持たなかったためと考えた。一方，*B. longum* は，分解速度は遅いが長鎖のイヌリンを資化する能力を持ち，このことが収穫直後のキクイモのイヌリン抽出物でも良好な増殖を示した理由と推測される。

また、5 種の *Lactobacillus* 属菌について，*Lactococcus lactis* は培養 15 時間までグルコースと同様な濁度を示した(図 2-17)。*Weissella cibaria* も 20℃で 90 日間貯蔵したキクイモのイヌリン抽出物はグルコースと同様な増殖とまでいかなかったが，収穫直後のキクイモのイヌリン抽出物より有意に増殖した(図 2-16)。*Streoptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* ，*Lactobscillus delbrueckii blugaricus* ，*Lactobscillus casei* 3 種については，グルコースは有意に増殖したが，20℃で 90 日間貯蔵したキクイモのイヌリン抽出物は，収穫直後のキクイモのイヌリン抽出物と同様増殖は進まなかった(図 2-18～図 2-20)。前述のイヌリン抽出液の高分子画分と低分子画分について、*Lactobacillus* 属菌 5 種が低分子画分が高分子画分より有意に資化されやすい(図 2-8～図 2-12)ことから考えると，20℃90 日貯蔵のキクイモ塊茎から抽出したイヌリン抽出液にたとえ 1-ケストースを含む 3 程度の鎖長をもつフラクトオリゴ糖が含まれていたとしても，それ以外の鎖長 10 より大きいイヌリンが大半を占めると *Lactobacillus* 属菌の中には，増殖できない菌株もあると示唆される。

イヌリンは重合度に関わらず盲腸内容物中の乳酸産生菌数を有意に増加させるが，低重合度(く 10)では *Lactobscillus* 属菌が，高重合度(> 10)では *Bifidobacteria* 属菌の増加が顕著であったという報告[37,38]に加え, invitro 資化試験の結果, *Bifidobacteria* 属菌は重合度 23 を超えても増殖可能で、あるのに対し，Kaplan らは大半の

Lactobacillus 属菌ででは重合度>10 の イヌリンを資化できず, 鎖長 2～3 程度のイヌリンを直接菌体内に取り込み資化することが可能であると報告[39]している。この報告により，本実験に使用した大半の *Lactobscillus* 属菌は，20℃90 日貯蔵のキクイモ塊茎から抽出したイヌリン抽出液を資化できないか，わずかしか資化しないと推察される。

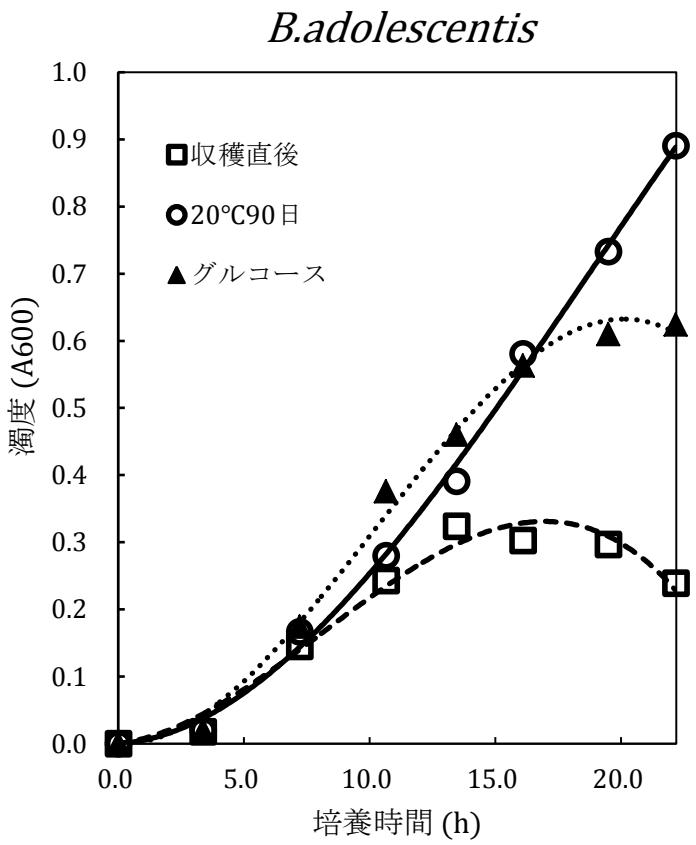


図 2-13　*B.adolescentis* の収穫直後と 20℃90 日の増殖

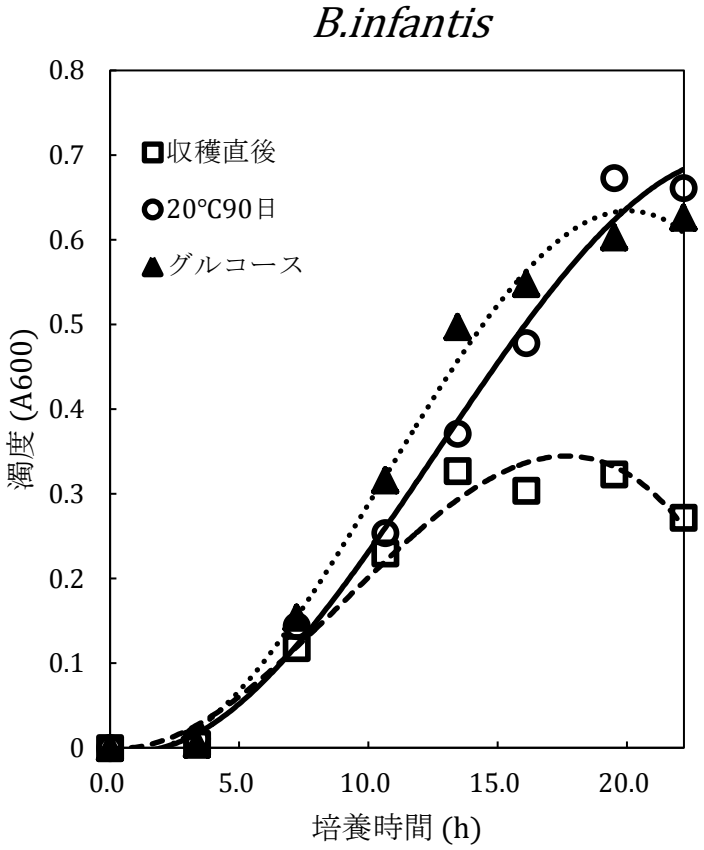


図 2-14　*B.infantis* の収穫直後と 20℃90 日の増殖

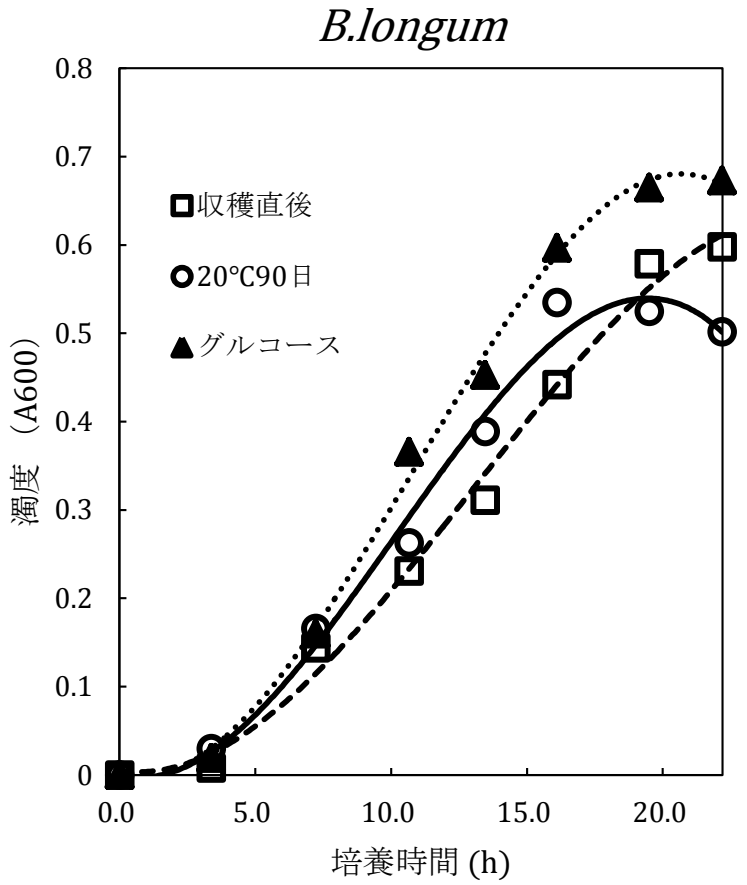


図 2-15　*B.Longum* の収穫直後と 20℃90 日の増殖

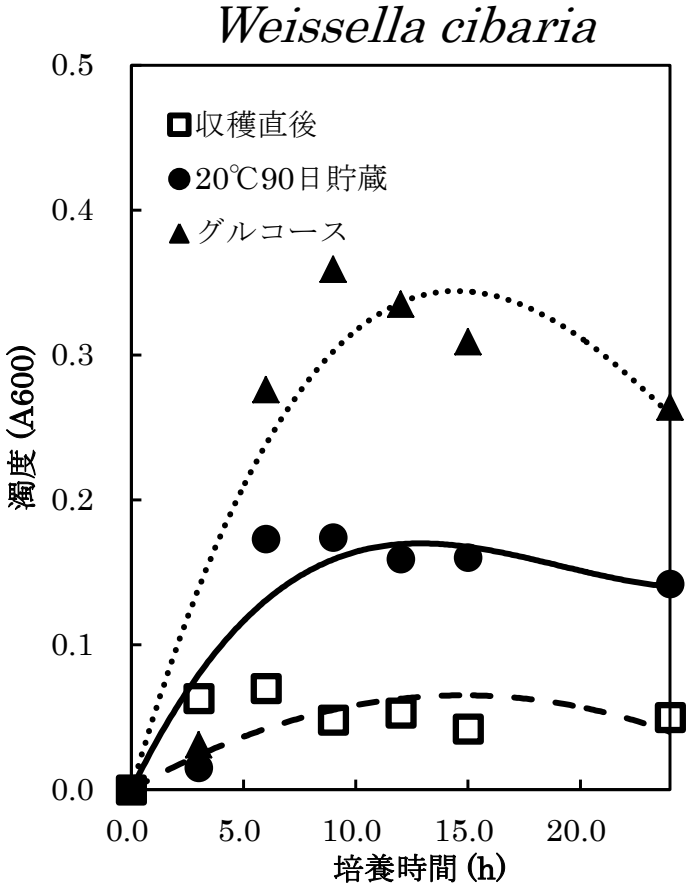


図 2-16　*Weissella　cibaria*

の収穫直後と 20℃90 日の増殖

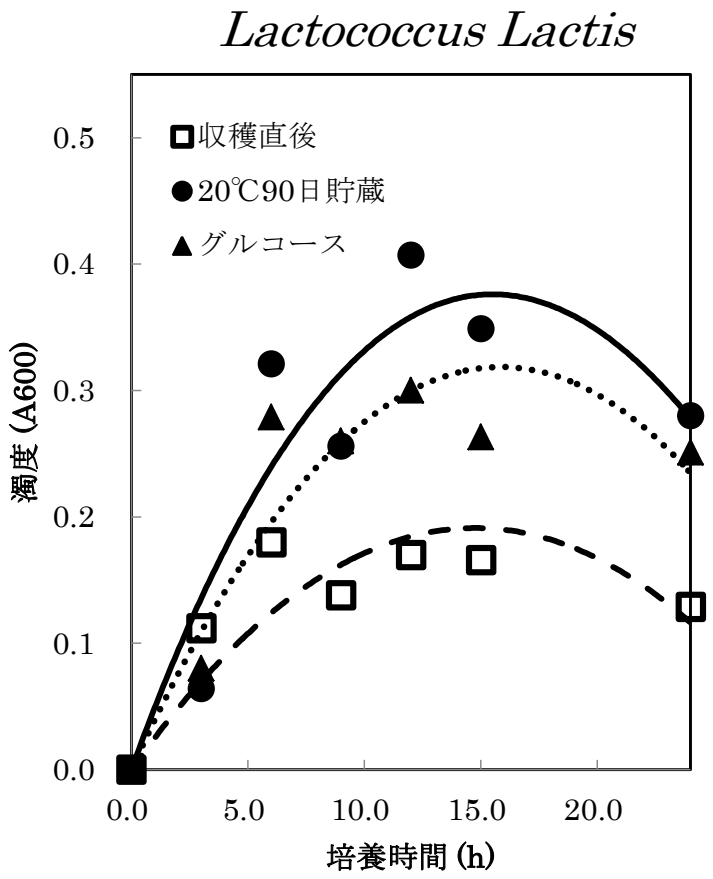


図 2-17　*Lactococcus　lactis*

の収穫直後と 20℃90 日の増殖

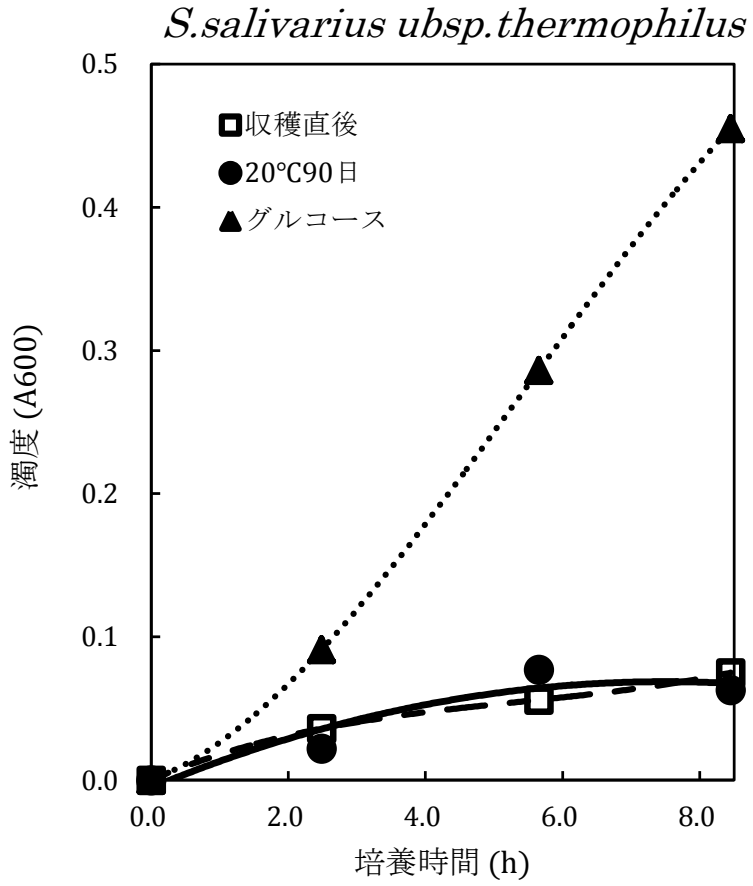


図 2-18　*S.salivarius* subsp.*Thermophilus*

の収穫直後と 20℃90 日の増殖

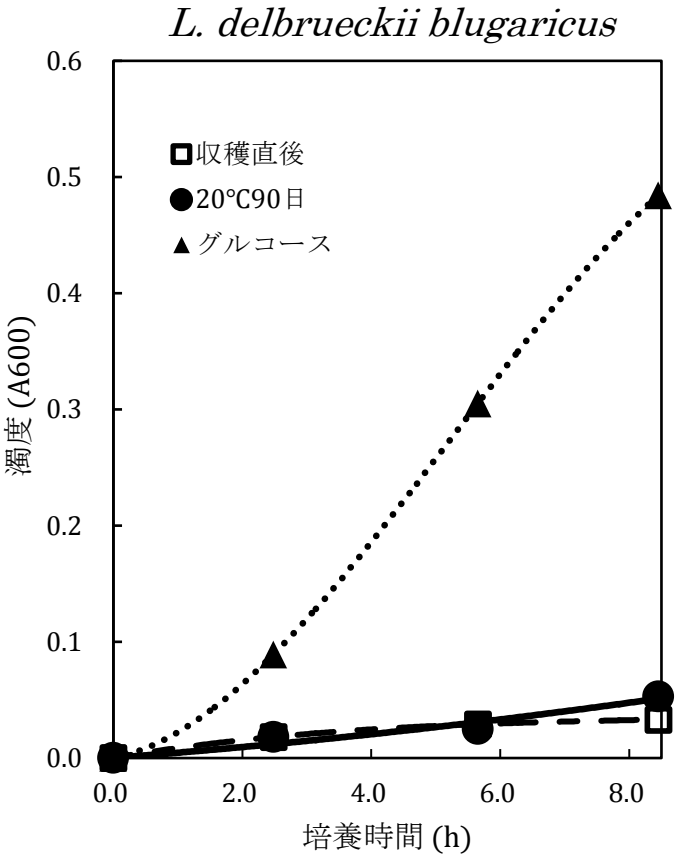


図 2-19　*L.delbrueckii　blugaricus*

の収穫直後と 20℃90 日の増殖

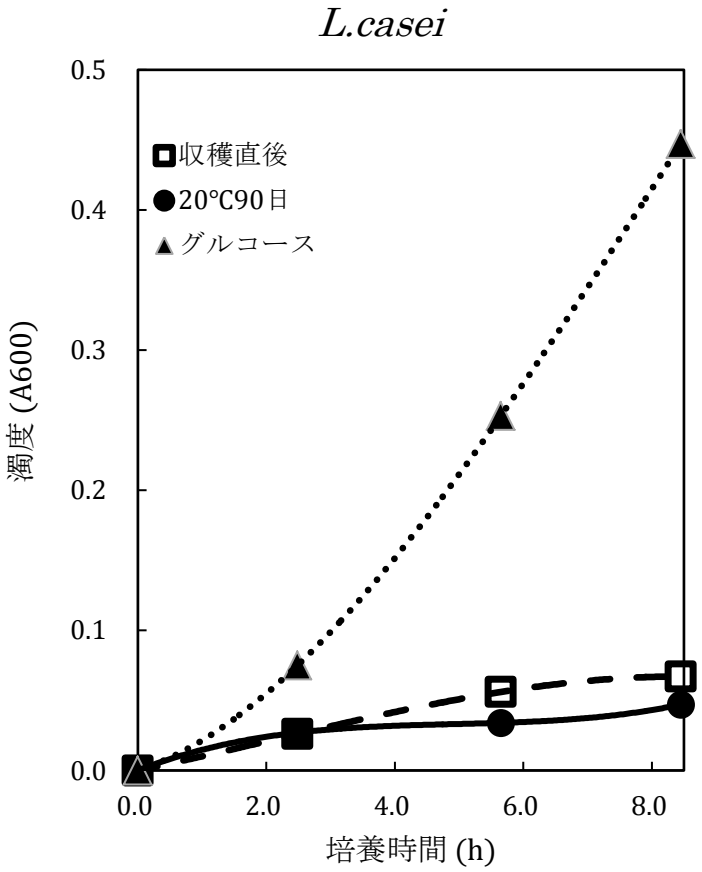


図 2-20　*L.casei*

の収穫直後と 20℃90 日の増殖

第2章　まとめ

以上，キクイモを常温で貯蔵することによりイヌリンの分解を抑制するのではないかと実験を行ってきたが、高分子イヌリンが加水分解酵素により分解され低分子化していった。しかし、20℃で60日及び90日貯蔵した時の分子量分布でイヌリンの低分子画分が 5℃に比べ顕著に大きかったことを見出した。このピークにはスクロース及び鎖長3～4単位程度のフラクトオリゴ糖が含まれると推測される。この20℃貯蔵において低分子の生成物が蓄積する理由として3つのことが考えられた。

1つ目は，20℃貯蔵におけるインベルターゼ活性の低下である。貯蔵温度がキクイモのインベルターゼ活性に及ぼす影響として，20℃における6週間の貯蔵はその活性を70%低下させることから，20℃で長期間貯蔵した結果，インベルターゼ活性が低下し，スクロースが蓄積したと考えられる。

2つ目はスクロースによるイヌリン分解酵素1-FEHの活性阻害である。1-FEHは，イヌリンを加水分解しスクロースを生成するが，スクロースの分解活性は極めて低く，また 1-FEH の一部は，生成物であるスクロースによって阻害され，蓄積したスクロースにより 1-FEH 活性が阻害され，スクロース及び鎖長の短いフラクトオリゴ糖が次第に蓄積したと考えられる。

3 つ目は，インベルターゼがもつフルクタン合成酵素としての働きである。フルクタン合成酵素は，その性質がインベルターゼとオーバーラップすることが古くからの研究で証明されていた。スクロース濃度が高いとフルクトースを付加して1-ケストースを合成する。このため，スクロースの蓄積により，合成反応が生じ，フラクトオリゴ糖（鎖長3単位）が増加したと考えられる。これら3つの理由により，20℃貯蔵のキクイモの塊茎には鎖長の短い生成物が 5℃貯蔵のものより多く含まれると推測される。

低温の 5℃貯蔵に比べ常温の 20℃でキクイモ塊茎を 90 日貯蔵すると，スクロースが蓄積し，インベルターゼが本来の加水分解の逆反応であるフルクタン合成活性をもつようになり徐々に濃度が高くなったスクロースにフルクトースを付加して 1-ケストースを合成した。そのため *Bifidobacterium* 属菌等腸内有用菌の増殖を高める優れたプレバイオティクス効果をもつものとなった。

つまり，貯蔵温度を変えることで腸内有用菌に対する資化性が高い短鎖のフラクトオリゴ糖を増加させ, キクイモの付加価値を高めることができることを明らかにした。

しかし, 本研究で行った 20℃貯蔵温度が必ずしも短鎖フラクトオリゴ糖の蓄積に最適な貯蔵温度というわけではなく，より適した貯蔵条件の検討が今後必要である。

第3章　キクイモ塊茎の減圧貯蔵によるイヌリンの分解への影響

緒論

第2章では、常温貯蔵においてキクイモ塊茎中のイヌリンが分解酵素により低分子化されるのを抑制できると予想したが、分解が進んでしまった。

この結果から，常温のもと低分子化抑制する貯蔵条件が他にあるのか検討した。

収穫後の作物を鮮度よく貯蔵するには，温度，湿度の調整は従来行われてきた。温度は冷蔵庫，湿度調節はプラスチック包装等となって発達してきた。環境ガス調節を行い，作物の鮮度を保つ方法は 1940 年代の青果物の呼吸生理学から始まった。収穫後の青果物を鮮度よく貯蔵するには，貯蔵環境(温度，湿 度，ガス組成)を調節し，またある場合には病虫害の抑制のために化学薬剤を処理することが行われている。このうち温度，湿度の調節は従前から経験的に行われ，それが近代の科学技術の発達とともに，機械冷蔵となり，湿度調節ではプラスチックなど各種資材での包装や，果皮に直接塗布するコーティング処理などとなって発達してきた。環境ガス調節を行い，青果物の鮮度を保つ方法は古い経験から生まれたのではなく, 1940 年代の青果物の呼吸生理学の発展が成した。すなわち 1940 年代初め，イギリスの Kidd and West らが，収穫後の果実が呼吸作用を営み O_2 を吸収し，CO_2 を排出しているのを利用し，O_2 濃度を下げ，CO_2 濃度を上げて呼吸を調節する CA 貯蔵 (controlled atmosphere storage)をリンゴで発達させた。 日本においては 1960 年代に青森，長野県などにおいて大型の CA 貯蔵庫が設置された。また，近来の包装資材の発達につれて，適度の通気性を持ったプラスチック材で密封し，簡易に CA 貯蔵効果をねらうプラスチック密封冷蔵も行われている。 減圧貯蔵は，青果物を気密の庫内に入れ，庫内を減圧にするとともに，一定の換気を行いながら貯蔵するもので，その第一のねらいは庫内の O_2 分圧を下げることである。したがってこの意味から環境ガス調節法の分類に入るが,

さらに換気量が多いという従来にない特徴をそなえている[40~44]。減圧貯蔵は，減圧により青果物の鮮度を保ち，硬度や緑色の保持が期待できるのであるが，その理由は，酸素分圧が低いという CA 貯蔵効果に加えて，エチレンその他の有害ガスを絶えず排除するという減圧貯蔵の特性からきている[45]。

この減圧貯蔵を活用してヤーコン塊根に応用している研究がある。奈良井ら(2013)は、ヤーコンの塊根にはフラクトオリゴ糖が豊富に含まれているが，貯蔵中に内在性酵素によって分解され，その含量が著しく減少することを課題にした。

そこで，細胞の代謝活性を低下できる低温減圧条件にフラクトオリゴ糖の分解・減少を抑制する効果があるか調べた。ヤーコン塊根を 4℃下，常圧(0.1 MPa)もしくは減圧（0.07 MPa）条件にて 1 ヶ月間貯蔵したところ，常圧ではフラクトオリゴ糖が顕著に減少したのに対し，減圧下では フラクトオリゴ糖の減少が抑制されていたことを見出した[46]。

この減圧貯蔵を利用して，キクイモ塊茎を簡易真空容器で温度 20℃と 5℃で 90 日間貯蔵したときのイヌリン含量と分子量分布の変化を調べ，貯蔵によるキクイモ塊茎中のイヌリンの分解が抑制できないか検討した。

第１節　実験方法

1-1　簡易真空容器による減圧貯蔵方法

1)　キクイモ塊茎の収穫と処理

2020 年 11 月 20 日に収穫したキクイモ塊茎を水洗いして土を取り除いた。さらに、柔らかい布及びブラシで細かな土を取り除き、薄めた洗剤で洗い表面を清潔にした。この処理は、キクイモ塊茎の表面上に生存する微生物をできるだけ取り除くためにおこなった。

2)　簡易真空容器での貯蔵法

乾燥防止のためキクイモ塊茎を湿ったキムワイプで包み、簡易真空容器の底にそれぞれの塊茎の間隔を保ち広げた(図 3-1)。

3)　減圧方法

簡易真空容器備え付きのポンプで容器の空気を抜き，真空計でおよそ 0.02MPa まで気圧を下げた(図 3-2)。

4)　減圧貯蔵における気圧の調整

減圧貯蔵は，酸素分圧が低いという CA 貯蔵効果に加えて，エチレンその他の有害ガスを絶えず排除しなければならない特性から①～③の操作を繰り返し 90 日間貯蔵した。容器内の気圧の変化を図 3-3 に示す。

①　容器内の気圧を 0.02MPa まで下げる。

②　7 日間低温暗室に放置すると、キクイモ塊茎から二酸化炭素や水蒸気などガスが発生するので容器内の気圧はおよそ 0.04MPa に上がる。

③　7 日ごとに容器を開け 0.1MPa(1 気圧)に戻し、空気を入れかえる。

④　キクイモ塊茎を水道水で洗い，包んだキムワイプを新しいものに代える。

⑤　再度、 容器内を 0.02MPa に下げ 7 日間放置する。

図 3-1　簡易真空容器の貯蔵法

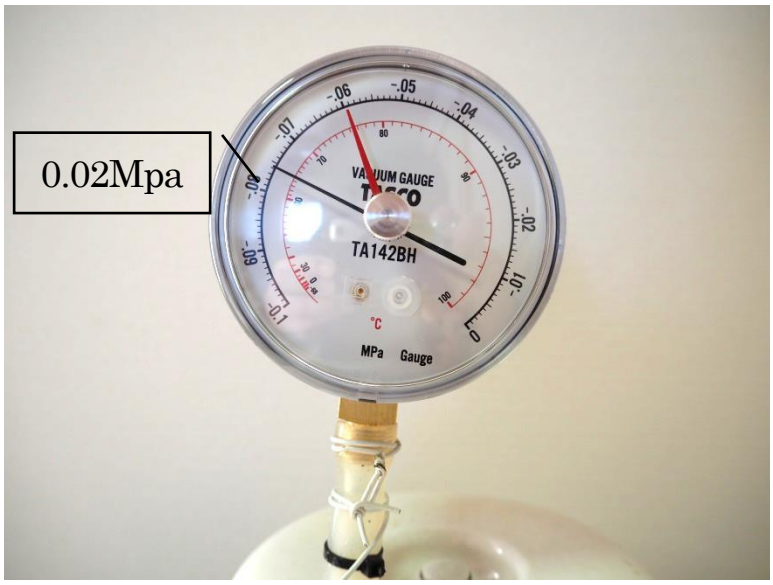


図 3-2　簡易真空容器内の気圧

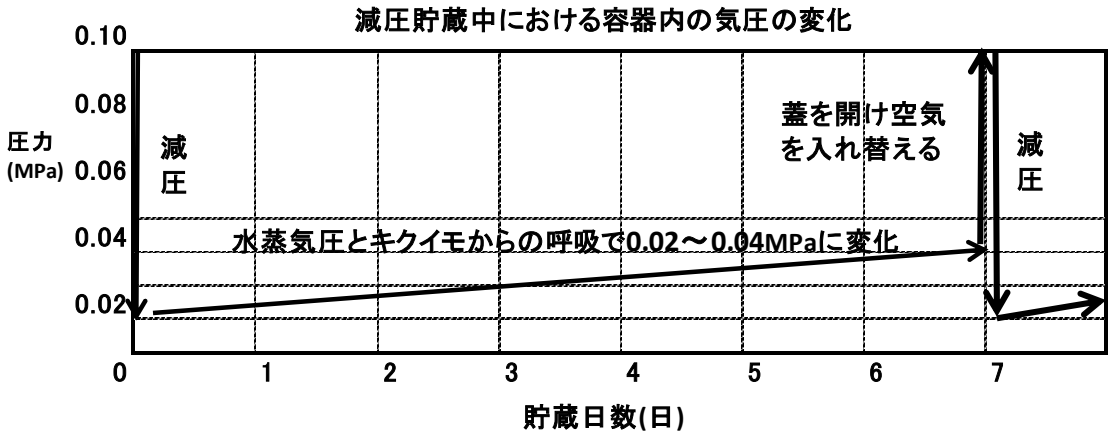


図 3-3　減圧貯蔵中における容器内の気圧の変化

1-2　減圧貯蔵によるイヌリン含量(全糖量)の変化

イヌリンの抽出は，第 1 章で検討して決定した抽出法で行った。この方法ではイヌリンが特異的に抽出されるのではなく，水溶性糖類全てが抽出される。前出の方法で凍結乾燥粉末 3 g に 30 ml の超純水を加え，温度計で 59℃に設定した往復恒温振とう機 PERSONAL-11（タイテック）により 160 rpm で 60 分間振とうした。振とう後，遠心分離機で 10 000×g，40 分間遠心し上清を分取した。この抽出操作を 3 回繰り返し，約 90 ml の上清を得た。上清に液量が増えすぎないよう飽和 Ca(OH)2 水溶液を pH8.0 になるまで加え清浄化した後，シュウ酸により pH を 7.0 に調整し，過剰なカルシウムをシュウ酸カルシウムとして沈澱させ，他の沈殿物やとともに濾紙で濾過した。濾液をロータリーエバポレーター（ビュッヒ）で減圧濃縮し，濃縮液を 50 ml に定容して抽出液として用いた。貯蔵期間ごとのイヌリン抽出液の濃度を改良フェノール硫酸法で測定した。

また，試験は 3 回以上行い，イヌリン含量(全糖量)について Tukey-Kramer の多重検定により各貯蔵温度の貯蔵期間の間で 5%水準で有意な差があるか調べた。

1-3　減圧貯蔵によるイヌリンの分子量分布の変化

抽出液の全糖量を改良フェノール硫酸法[17]により測定した。各試料の全糖濃度が同じになるように希釈後，その 1 ml をゲル濾過クロマトグラフィーに供した。ゲル濾過クロマトグラフィーの担体には，Bio-Gel P-2　Gel (BIO-RAD，分画分子量 100～1 800)を用い，カラムサイズは直径 1.5 cm，長さ 44 cm とし，溶離液は超純水を用い，流速 0.33 ml/分で 1 ml ずつ 60 本分画した。それぞれの画分の全糖量を改良フェノール硫酸法で測定し，分子量分布を作成した。また，ミオグロビン（分子量 17 500），スクロース，グルコースを分析することでそれぞれカラムの排除限界，二糖と単糖の溶出位置を求めた。

第2節　結果と考察

1-1　簡易真空容器による減圧貯蔵方法

簡易真空容器による減圧貯蔵は，20℃では最初の2週間程度はキクイモ塊茎から放出する二酸化炭素やその他のガスのため容器内の気圧が上がりやすくなった。

また，減圧による水蒸気が容器内に充満するため塊茎が腐敗することもあった。

したがって，3 日間ごとに容器内の空気を換え，塊茎を水道水で洗い，包んでいたキムワイプを新しいものに替える必要があった。

3 週間後からは，塊茎の呼吸による二酸化炭素やその他のガスの放出も安定してきて，7 日間ごとの容器内の空気の交換とキムワイプの交換で済んだ。30 日後と 90 日後の 20℃と 5℃貯蔵のキクイモ塊茎の様子を示す(図 3-4～図 3-7)。常温常圧貯蔵の場合と異なり，30 日後の 20℃貯蔵のキクイモ塊茎からは，発芽の様子は見られなかった。

しかし，90 日後の 20℃貯蔵のキクイモ塊茎からの発芽と発根は僅かに見られた。

図 3-4　20℃減圧貯蔵 30 日目のキクイモ塊茎の様子

図 3-5　5℃減圧貯蔵 30 日目のキクイモ塊茎の様子

図 3-6　20℃減圧貯蔵 90 日目のキクイモ塊茎の様子

図 3-7　5℃減圧貯蔵 90 日目のキクイモ塊茎の様子

1-2　減圧貯蔵によるイヌリン含量(全糖量)の変化

キクイモの塊茎を簡易真空容器内で気圧 0.02 MPa～0.04 MPA，20℃と 5℃で 90 日間貯蔵した。20℃と 5℃貯蔵のキクイモは，常圧貯蔵のときと比べ全体の重量の変化も，測定はしていないが，少なく感じられ 90 日間外観に変化もなく，瑞々しい状態を保っていた。20℃減圧貯蔵のキクイモは，発芽発根はなかったが，90 日目で白い小さな発芽と発根が見られた。また，それ以外外観に大きな変化はなかった。今回用いたキクイモは 2021 年 11 月 20 日に収穫した塊茎であり，減圧による低酸素の効果よりも収穫日までの新潟市の気温は 5℃を下回る日がなかったことによって，発芽は抑制されたと考えられる。

貯蔵中のキクイモにおけるイヌリン含量の変化を調べた。ここでは，イヌリン含量は，改良フェノール硫酸法で簡便に測定できる全糖量で評価することとした。キクイモの全糖量は，20℃，5℃減圧貯蔵ともに 90 日間通して減少した（表 3-1)。
30 日間で全糖量は，20℃，5℃減圧貯蔵で各々17.9%，12.8%と減少し，その後も緩やかに減少し続けた. 一方, 第 2 章の結果からわかるように 20℃, 5℃常圧貯蔵で各々 23.4%，21.0%（表 2-3）であることから，減圧貯蔵は常圧貯蔵に比べ全糖量の減少が抑えられたと考えられる。

90 日間通して減圧貯蔵では 20℃で 25.4%，5℃で 21.4%の減少にとどまり，常圧貯蔵 20℃37.4%，5℃貯蔵 31.1%（表 2-3）に比べ全糖の減少を抑制していることが分かった。

20℃減圧貯蔵の減少率（25.4%）の方が 5℃貯蔵（21.4%）よりやや大きくなったのは，貯蔵中の代謝によるためと考えられる。この代謝による全糖の減少の根拠は，後述の分子量分布のグラフを見ると理解できる。

表 3-1　　20℃と 5℃減圧貯蔵中の塊茎における乾燥粉末中の全糖量(g/100g 乾燥物)

貯蔵温度	20℃減圧		5℃減圧	
貯蔵日数 （日）	全糖量 (g/100g乾燥物)	減少率 (%)	全糖量 (g/100g乾燥物)	減少率 (%)
収穫直後	56.5±0.8 a	-	56.5±0.8 a	-
30	46.4±1.0 b	17.9	49.3±0.7 b	12.8
60	43.7±1.2 b	22.7	46.6±0.9 bc	17.6
90	42.2±1.1 b	25.4	44.4±1.2 c	21.4

全糖量は平均値と標準誤差(n=3)，減少率は収穫直後に対する%を示している。
表中の異なる英文字間にはTukey-Kramer の多重検定により5%水準で有意差あり。

1-3　減圧貯蔵によるイヌリンの分子量分布の変化

次に，減圧貯蔵中どのようにイヌリンが分解されていくのか，また 20℃と 5℃貯蔵で分解のされ方に違いがないか，イヌリンの抽出液をゲル濾過クロマトグラフィーで分析することにより調べた。図 3-8 より，20℃減圧貯蔵については高分子部分の分解が抑制され，90 日後の分子量分布においても排除限界近くの高分子部分(No.21～No.30)まで残すことができた。しかし，高分子部分のピークは徐々に右側に移動し，イヌリン分解酵素 1-FEH により少なからず低分子化が進行していると考えられる。

また，スクロースやフラクトオリゴ糖を含む低分子部分(No.48～No.54)は，貯蔵期間が経つにつれてピークが低くなり，90 日後には収穫直後の 1/2 になった。これは，キクイモ塊茎の生命活動のためにグルコースやフルクトースに分解され，すぐに代謝に利用されたと考えられる。20℃常圧貯蔵のときに顕著に増加したスクロースやフラクトオリゴ糖部分の割合が増加しないのは，イヌリン分解酵素 1-FEH の発現が抑えられているのではないかと推測できる。

90 日目のイヌリンの分子量分布の No.35～No.45 の部分と 60 日目の同じ部分を比較すると，かなり減少しているように見える。常温減圧貯蔵ではこの部分のイヌリンが分解しやすいことが示唆される。

図 3-8 より，5℃減圧貯蔵については 30 日目までに高分子部分(No.21～No.31)の割合が減少している。このことは，30 日くらいまでに 5℃という低温のストレスにより植物の細胞の浸透圧調整で 1-FEH が誘導され，イヌリンの分解によりフルクトースが放出される低温馴化が進んだと推測できる。このとき，20℃減圧貯蔵のようにイヌリン分解酵素の抑制より低温馴化の方が優先したものと考えられる。このことの理由は，一旦低温馴化によりイヌリンからのフルクトース放出が十分あるので，30 日～90 日までの分子量分布の形が変わっていない。そして，30 日～90 日までのスクロース

を含むフラクトオリゴ糖部分(No.48～No.54)が変化していないことによる。

また，第 2 章の 5℃常圧貯蔵の分子量分布（図 2-2）に比べると，分布図は高分子部分が残っていることからイヌリン分解酵素 1-FEH は，減圧状態により抑制されていると推測できる。

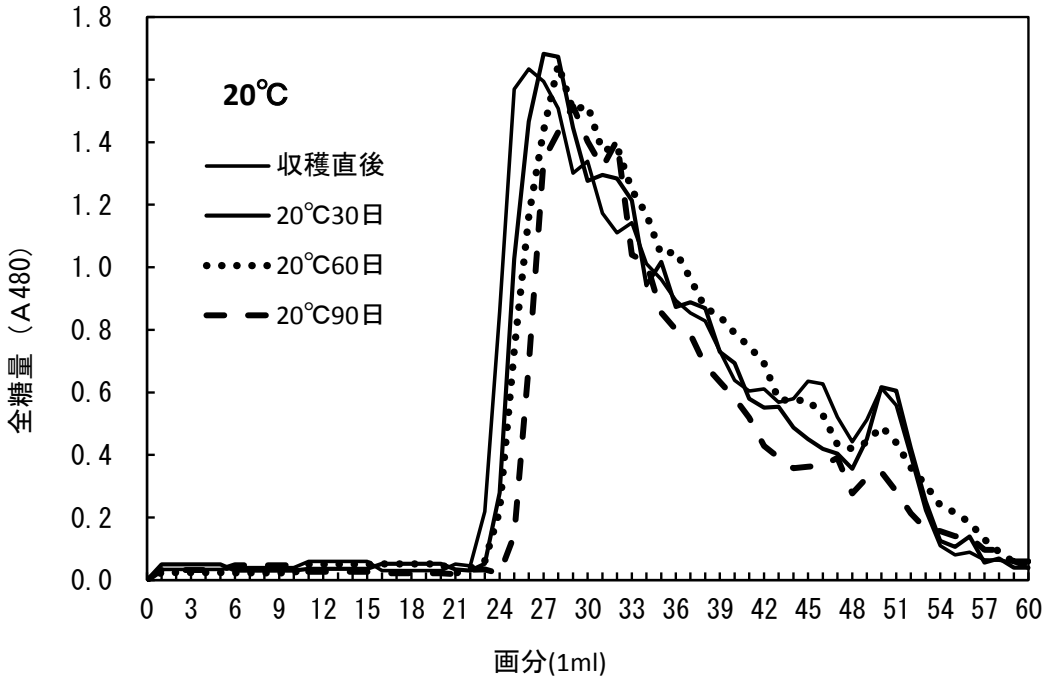


図 3-8　20℃減圧貯蔵中のイヌリンの分子量分布の変化

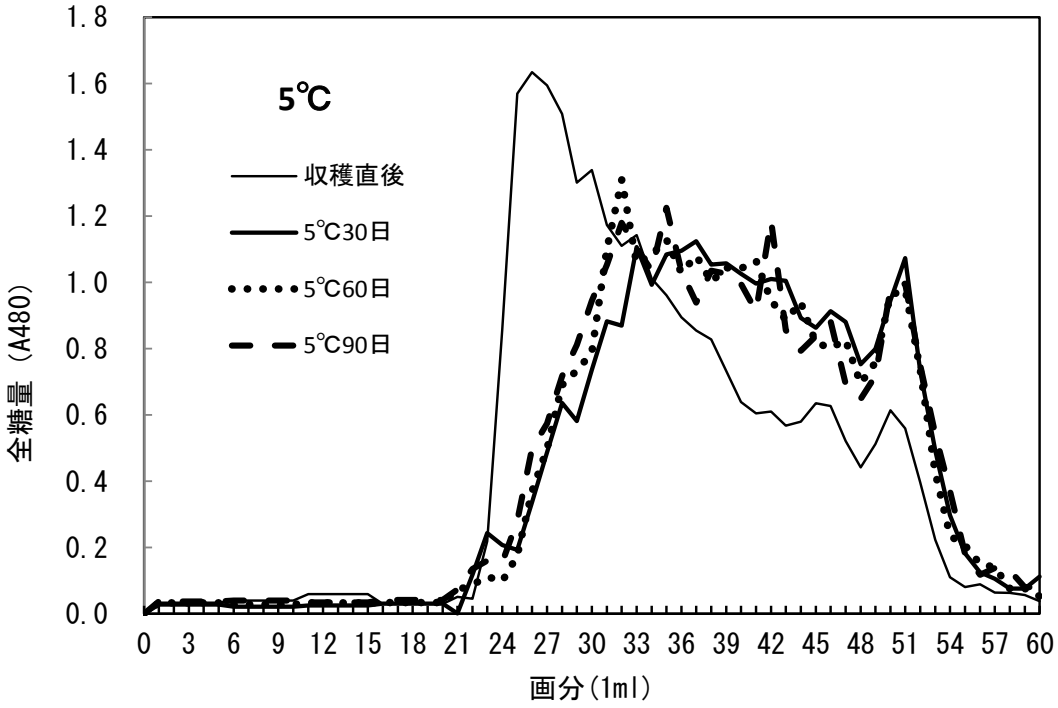


図 3-9　5℃減圧貯蔵中のイヌリンの分子量分布の変化

第 3 章のまとめ

今回，貯蔵温度 20℃と 5℃でキクイモ塊茎を減圧状態に一定期間置き，7 日ごとに簡易真空容器内の空気を入れ替える間歇減圧状態(0.02MPa～0.04Mpa)を 90 日間繰り返した。貯蔵中のキクイモにおけるイヌリン含量の変化を改良フェノール硫酸法で簡便に測定できる全糖量で評価することとした。キクイモの全糖量は，20℃，5℃減圧貯蔵ともに 90 日間通して減少した。

30 日間で全糖量は，20℃，5℃減圧貯蔵で各々17.9%，12.8%と減少し，その後も緩やかに減少し続けた．一方，20℃，5℃常圧貯蔵で各々23.4%，21.0%でることから，減圧貯蔵は常圧貯蔵に比べ全糖量の減少が抑えられたと考えられる（表 3-1)。

90 日間通して減圧貯蔵では 20℃で 25.4%，5℃で 21.4%の減少にとどまり，常圧貯蔵 20℃37.4%，5℃貯蔵 31.1%に比べ全糖の減少を抑制していることがわかった。20℃貯蔵の減少率の方がやや大きくなったのは，貯蔵中の代謝によるためと考えられる。この代謝による全糖の減少の根拠は，分子量分布の低分子画分の減少から理解できる。

各貯蔵期間のイヌリンの分子量分布の変化をゲル濾過クロマトグラフィーで調べた。20℃減圧貯蔵では，高分子部分が保持されることがわかった（図 3-8)。また，5℃貯蔵では、高分子部分の一部は 30 日貯蔵まで低温馴化により高分子部分が低分子化されるが，30 日以後 90 日まで高分子部分が一定の割合で残り，分解抑制された（図 3-9)。

キクイモ塊茎の減圧貯蔵期間中に内在酵素（1-FEH） が応答したかは明らかではないが，ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量分布をみると，イヌリンの分解が抑制されたことはわかる。低酸素で生成量が減少すると予想される植物ホルモンのエチレンは測定しなかったが, エチレン生合成経路の最終反応を担う 1-アミノシクロプ

ロパン-1-カルボン酸酸化酵素は，既知の酵素で 0.07 MPa よりもはるかに低い酸素濃度(本研究の場合 0.008MPa)に Km 値を示すものが多いことから[47) 48)]，　今回調べたキクイモ塊茎ではエチレン量の変化とその影響は小さかったのではないかと推定している。

今後はさらに常温減圧貯蔵の有効性を明らかにし，そして，異なる温度，減圧度による影響や，長・短期間減圧貯蔵した場合の効果とその効果の持続性についても検討が必要と考える。

総括

キクイモ（*Helianthus tuberosus* L.）は，空地や耕作放棄地に見かけ，草丈は 1.5～3 m，9 月上旬頃にヒマワリに似た黄色い花を開花する。日本に江戸末期に伝来し，戦後の食糧難の時代にはその塊茎を食料にした。しかし，食生活が豊かになるにつれ消費は減少し，その強い繁殖力から野生化が問題となり，要注意外来生物に指定されている。一方，キクイモの塊茎には，水溶性食物繊維であるイヌリンが豊富に含まれている。イヌリンは，D–フルクトースが β(2→1)結合で直鎖状に繋がったフルクタンの一種であり，末端のフルクトースに D–グルコースが α(1→2)結合した構造を持つ。

そして，その水溶性食物繊維の機能性により血糖値上昇抑制作用，整腸作用，高脂血症改善作用，免疫力増強作用をもっている。キクイモ塊茎中のイヌリンの糖鎖の長さはキクイモで 2～60 単位程度であり，平均鎖長は 14～19 単位と報告されている。また，キクイモ塊茎中のイヌリン含量は 12～19 %であり，欧州などで好まれて食されるチコリと同様含有量が高い。収穫直後に豊富に含まれる高分子のイヌリンは，貯蔵中に内在性酵素(1-FEH)の働きにより低分子化されていく。

多くの機能性が報告されているイヌリンの貯蔵中の分解による減少は，作物の商品価値や機能の低下を招くため，イヌリンを豊富に含むキクイモやチコリなどでは，イヌリンの減少を防ぐための低温貯蔵法などに関する研究が現在まで行われてきた。

生物活性は，一般に温度に依存する。そこで，キクイモの塊茎を低温貯蔵によりイヌリンの分解を抑制する試みがなされているが，イヌリン含量の低下を抑制できたという報告はなされてない。一方，Van den Ende らは，チコリの根においてイヌリンの分解に関わる 1-FEH の合成が植物体を気温 14℃以上のハウスに移すことで抑制されることを報告している。このことは，低温ではなく常温で貯蔵することでイヌリンの分解を抑制できる可能性を示唆している。

そこで本研究では，常温貯蔵あるいは常温減圧貯蔵でイヌリンの分解を抑制し，常温貯蔵の有効性を明らかにすることであった。

第 1 章では，貯蔵中のキクイモ塊茎からのイヌリンを抽出する方法を検討し，イヌリン含量とゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量分布の変化を把握するための抽出条件を確定した。

抽出条件として次の 1)～4)を決定した。

1) 新潟市ではイヌリン含量と重合度が高いキクイモ塊茎は，月平均最高気温の変化をもとにして 11 月下旬に収穫する。

2) イヌリンを抽出する水の量は，50ml のチューブを使う場合，試料の重量の 10 倍量が適切である。

3) 抽出液の色素等を活性炭に吸着させるため活性炭を使用することは，白いイヌリンの結晶を析出することができるが，一方，抽出液の成分であるスクロースやイヌリンの低分子部分のほぼ全部と高分子部分の一部が失われる。

したがって，活性炭は使用しない。

4) イヌリンの抽出温度は，59℃が最適であり夾雑物や細かい繊維質が混在を極力防ぐ。抽出温度は室温にも影響されるので，振とう機の水槽の温度を的確に測定し抽出する。

第 2 章では，キクイモを 90 日間，常温の 20℃と低温の 5℃で貯蔵し，貯蔵中のイヌリンの含量と分子量の変化を調べた。 20℃で 60 日及び 90 日貯蔵した時のゲル濾過クロマトグラフィーによる画分 No.47～53 のピークが 5℃に比べ顕著に大きいことを見出した。このピークにはスクロース及び鎖長 3～4 単位程度のフラクトオリゴ糖

が含まれると推測される。20℃貯蔵において低分子の生成物が蓄積することがわかった。

また，20℃貯蔵における低分子の生成物の蓄積が大きいことを利用して*Bifidobacterium*属菌など腸内有用細菌や*Lactobacillus*属菌に対するイヌリンの増殖効果を分子量の異なるイヌリン抽出液の培地で調べ，さらに，収穫直後と 20℃90 日貯蔵のキクイモ塊茎からのイヌリン抽出液の培地における *Bifidobacterium* 属菌や*Lactobacillus*属菌に対する増殖効果を調べた。

培養した結果，*Bifidobacterium* 属菌 3 種の菌全てが，低分子画分においてグルコースと有意な差がない良好な増殖を示し，さらに 3 種の *Bifidobacterium* 属菌は 20℃で 90 日間貯蔵したキクイモのイヌリン抽出液中では，収穫直後のキクイモのイヌリン抽出液中より 3 種の菌全てをグルコースと有意な差がない程度にまで増殖させた。

20℃貯蔵のキクイモは，収穫直後や 5℃貯蔵のキクイモより鎖長の短いフラクトオリゴ糖を豊富に含むことから，優れたプレバイオティクス効果を持つ素材であることを明らかにした。

第３章では，本研究の中心課題である貯蔵中のキクイモイヌリン中の分解を抑制させるため，簡易真空容器で減圧貯蔵を試み，キクイモを 90 日間，20℃と 5℃で貯蔵し，貯蔵中のイヌリンの含量と分子量の変化を調べた。間歇減圧状態 0.02MPa～0.04Mpa を続けていくことによって 20℃貯蔵では，高分子部分が保持されることがわかった。

最後に今後の課題としてⅠ，Ⅱで総括した。

Ⅰ　常温常圧貯蔵について

キクイモを常温で貯蔵することによりイヌリンの分解を抑制することはできなかったが，貯蔵温度を変えることで腸内有用菌に対する資化性が高い短鎖のフラクトオリゴ糖を増加させ，キクイモの付加価値を高めることができることを明らかにした 。

20℃貯蔵がフラクトオリゴ糖の蓄積に最適な貯蔵温度というわけではなく，より適した貯蔵条件の検討が必要である。

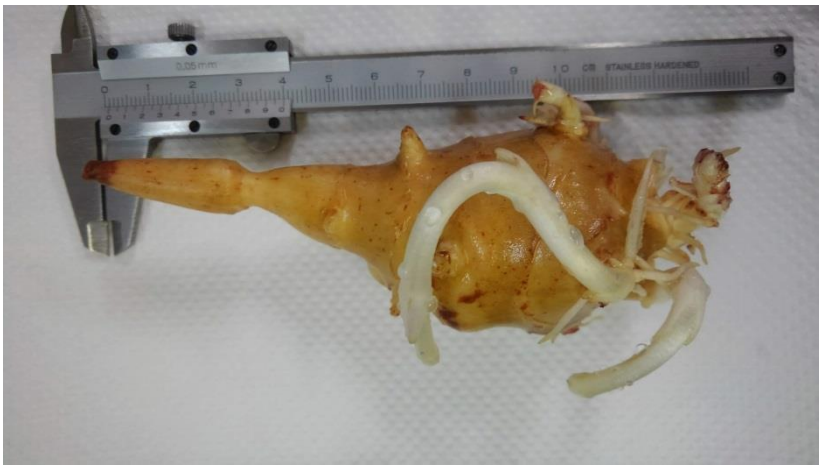
Ⅱ　常温減圧貯蔵について

間歇減圧状態 0.02MPa～0.04Mpa を一定期間貯蔵を続けていくことによって 20℃貯蔵では，高分子部分が保持されることがわかった。

常温常圧貯蔵と同様温度が 20 ℃が必ずしも最適な条件かどうか検討する必要がある。酸素濃度をうまく調整できれば高分子を保ったキクイモが貯蔵可能となり，重合度の高いイヌリンも貯蔵期間中いつでも手に入れることができると考える。

おわりに

下記の写真は，5℃減圧で 180 日貯蔵後，1 気圧に戻し 5℃30 日後のキクイモ塊茎である。芽と根が伸び，塊茎自体は瑞々しさが保たれている。



参考文献

1) 吉田みどり，上野敬司，川上顕，塩見徳夫 (2003). 植物フラクタン研究とその代謝遺伝子利用. 化学と生物, **41**, 787–795.

2) Roberfroid, M. (1993). Dietary fiber inulin and oligofructose: A review comparing their physiological effects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **33**, 103–148.

3) Ito, H., Wada, T., Ohguchi, M., Sugayama, K., Kiriyama, S. and Morita, T. (2008). The degree of polymerization of inulinlike fructans affects cecal mucin and immunoglobulin A in rats. *J. Food Sci.*, **73**, H36-H41.

4) Ishiguro,K. and Yokota,S. (2018). Alterations in polyphenol and inulin contents of roasted Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.). *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* (*Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*), **65**, 7–14. (石黒浩二, 横田聡. 焙煎によるキクイモ中のポリフェノールおよびイヌリンへの影響. 日本食品科学工学会誌).

5) Yasuda, M., Saiki, M. and Kojima, Y. (2017). Effects of cultivar and harvest time on chemical components and antioxidant activity of Jerusalem artichoke. *Journal of Health and Nutrition Science in Nishikyushu University*, **3**, 1–8(安田みどり，斎木まどか，児島百合子. 品種, 収穫時期の違いがキクイモの成分および抗酸化活性に及ぼす影響. 西九州大学健康栄養学部紀要).

6) Wada, T., Sugatani, J., Terada, E., Ohguchi, M. and Miwa, M. (2005). Physicochemical characterization and biological effects of inulin enzymatically synthesized from sucrose. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 1246–1253.

7) Li, W., Zhang, J., Yu, C., Li, Q., Dong, F., Wang,G., Gu, G. and Guo, Z. (2015). Extraction, degree of polymerization determination and prebiotic effect evaluation of inulin from Jerusalem artichoke. *Carbohyd. Polym.*, **121**, 315–319.

8) Johansson, E., Prade, T., Angelidaki, I., Svensson,S-E., Newson, W. R., Gunnarsson, I. B. and Hovmalm, H. P. (2015). Economically viable components from Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.) in a biorefinery concept. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 8997–9016.

9) Van Loo, J., Coussement, P., De Leenheer, L., Hoebregs, H. and Smits, G. (1995). On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **35**, 525–552.

10) Shoaib, M., Shehzad, A., Omar, M., Rakha, A., Raza, H., Sharif, H. R., Shakeel, A., Ansari, A. and Niazi, S. (2016). Inulin：Properties, health benefits and food applications. *Carbohyd. Polym.*, **147**, 444–454.

11) Matsumoto, Y., Maruta, S., Komaba, A., Tsuge, K.and Watanabe, K. (2021). Effect of harvest time and storage at low temperature on inulin and potassium

content in tubers of Jerusalem artichoke. *Horticultural research* (Japan) (*Hort. Res.* (Japan)), **20**, 217–223 (松本雄一, 丸田沙織, 駒場あすか, 柘植圭介, 渡邉啓一. 収穫時期の違いおよび低温貯蔵がキクイモ塊茎中のイヌリンおよびカリウム含量に及ぼす影響. 園芸学研究).

12) Edelman, J. and Jeeord, T. G. (1968). The mechanism of fructan metabolism in higher plants as exemplified in Helianthus tuberosus. *New Phytol.*, **67**, 517–531.

13) Gupta, A. K. and Kaur, N. (2000). Fructan metabolism in Jerusalem artichoke and chicory. *Dev. Crop Sci.*, **26**, 223–248

14) Saengthongpinit, W. and Sajjaanantakul, T. (2005). Influence of harvest time and storage temperature on characteristics of inulin from Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.) tubers. *Postharvest Biol. Technol.*, **37**, 93–100.

15) Van den Ende, W. and Van Laere, A. (2002). Induction of 1-FEH in mature chicory roots appears to be related to low temperarures rather than to leaf damage. *Sci. World J.*, **2**, 1750-1761.

16) Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S. and Matteuzzi, D. (2005). Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 6150–6158.

17) 江上不二夫監修, 鈴木旺, 松村剛, 山科郁男編 (1969).「多糖生化学 化学編 1」, 共立出版, 東京.

18) Yamazaki, H., and Matsumoto, K.(1994). Purification of Jerusalem Artichoke fuructans and their utilization by Bifidobacteria, *J Sci. Food Agri*, **64** ,461–465

19) Takeuchi, K., Iguma, K., Takahashi, Y., Sagisaka, K. and Takasawa, T. (2001). High sensitive phenol-sulfuric acid colorimetric method. *Research Bulletin of Obihiro University Natural Science*, **22**, 103–107 (竹内 宏治, 井熊 武志, 高橋 裕司, 匂坂 慶子, 高澤 俊英, 高感度フェノール硫酸法. 帯広畜産大学学術研究報告自然科学).

20) 戸松誠(2016). キクイモ熱水抽出液のフルクトース含有糖質, 秋田県総合食品研究センター報告, **18**, 17–20.

21) 加藤 陽治, 藤田 美香, 浅利宇多子(1993). 貯蔵および加熱処理に伴うゴボウのイヌリンの変化, 弘前大学教育学部紀要,**69**,131–135

22) 安田みどり, 扇 萌華, 斎木まど香(2019).キクイモに含まれるイヌリンの安定性に及ぼす加熱および pH の影響, 西九州大学健康福祉学部紀要,**5**,1-7.

23) Dehghan, P., B. P. Gargari, M. A. Jafar-Abadi and A. Aliasgharzadeh(2014). Inulin controls inflammation and metabolic endotoxemia in women with type 2 diabetes mellitus: a randomized-controlled clinical trial,*Int. J. Food Sci. Nutr*,**65**,117–123.

24) Jackson, K. G., G. R. J. Taylor, A. M. Clohessy and C. M. Williams(1999). The effect of the daily intake of inulin on fasting lipid, insulin and glucose concentrations in middleaged men and women. *British J. Nutr.*, **82**, 23–30.

25) Poulsen, M., A. M. Mølck and B. L. Jacobsen(2002). Different effects of short- and long-chained fructans on large intestinal physiology and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats,*Nutr. Cancer.*, **42**, 194–205.

26) 本堂正明，橋渡携，奥村幸広(2005)．キクイモの食品への利用―キクイモ酢の調製―，北海道食加研セ研報,**6**,37–41.

27) 小枝貴弘，原健二郎，和田正，森田達也，新井映子(2015)．イヌリン添加米粉食パンの排便習慣改善効果，薬理と治療,**43**,1731–1737.

28) Saengthongpinit, W. and Sajjaanantakul, T. (2005). Influence of harvest time and storage temperature on characteristics of inulin from Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.) tubers. *Postharvest Biol. Technol.*, **37**, 93–100.

29) Bradshaw, M. J., Chapman, J. M., Edelman, J. and Moore, P. L. (1968). A storage temperature effect and its subsequent reversal by gibberellic Acid. *J. Exp. Bot.*, **20**, 84–86.

30) Marx, S.P., Nösberger, J. and Frehner, M. (1997). Seasonal variation of fructan-β-fructosidase (FEH) activity and characterization of a β-(2-1)-linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus). *New Physiol.*, **135**, 267–277.

31) De Roover, J., De Winter, M., Van Laere, A., Timmermans, J.W. and Van den Ende, W. (1999). Purification and properties of a second fructan exohydrolase from the roots of Cichorium intybus. *Physiol. Plant.*, **106**, 28–34.

32) Asega, A.F., Nascimento, J.R., Schroeven, L., Van den Ende, W. and Carvalho, M.A. (2008). Cloning characterization and functional analysis of a 1–FEH cDNA from Vernonia herbacea (Vell.) Rusby. *Plant Cell Physiol.*, **49**, 1185–1195.

33) Meyer, D. and Stasse-Wolthuis, M. (2009). The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **63**, 1277–1289.

34) Endo, A., Nakamura, S., Konishi, K., Nakagawa, J. and Tochio, T. (2016). Variations in prebiotic oligosaccharide fermentation by intestinal lactic acid bacteria. *Int. J. food Sci. Nutr.*, **67**, 125–132.

35) Ose, R., Hirano, K., Maeno, S., Nakagawa, J., Salminen, S., Tochio, T., Endo, A. (2018). The ability of human intestinal anaerobes to metabolize different oligosaccharides: Novel means microbiota modulation?,*Anaerobe*, **51**, 110–119.

36) 門田吉弘, 北浦靖之, 遠藤明仁,栃尾巧 (2020). ケストースが持つ多様な生理機能の解明と実用化に向けた取り組み. 日本栄養・食糧学会誌, **73**, 123–131

37) L. Makras,G.V. Acker and L.D. Vuyst(2005). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fuctansexhibiting different degrees of polymerization, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 6531-6537.

38) M. Rossi, C. Corradini, A. Amaretti, M. Nicolini, A. Pompei, S. Zanoni and D. Matteuzzi(2005). Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 6150-6188.

39) H. Kaplan and R.W. Hutkins(2003).Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195. *Appl. Environ. Micro biol.*,**69**,2217-2222.

40) Salunkhe, D. K., and Wu, M. T., and Burg, S. P.(1975).Post Harvest Biology and Handling of Fruits and Vegetables, ed by Haard, N.E. and Salunkhe, D.K., *the AVI Pub. Co.*, **153**, 172.

41) Lougheed, E. C., Franklin, E. W., Papple, D. J., Pattie, D. R., Malinowski, H. K. and Wenneker, A (1975). A feasibility study of low pressue storage, *Hort. Sci. Dept. and School of Engineering, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada,* (Processed Rpt).

42) Burg, S. P.(1976). Low Temperature Hypobaric Storage of Metabolically Active Matter, *U. S. Patent,* **3**,958.

43) Lougheed, E. C., Murr, D. P. and Berard, L. (1978). *Hort Science* ,**13**,21.

44) Jamieson, W. (1979). *Food Technol.*, **33**, 32.

45)上田悦範(1981).青果物の減圧貯蔵.日本コールドチェーン研究会誌「食品と低温」,**7**,124-130.

46) 奈良井（金山）朝子,時田昇臣,船山敦子,麻生慶一(2013). 日本食品科学工学会誌, ヤーコン塊根のフラクトオリゴ糖含量と フルクタン分解酵素に対する低温減圧貯蔵の影響,**60**,148–152.

47) Kuai, J. and Dilley, D.R.(1992). Extraction, partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase from apple fruit. *Postharvest Biol. Tec.*, **1**, 203-211.

48) Geisler-Lee, J., Caldwell, C. and Gallie, D.R. (2010). Expression of the ethylene biosynthetic machinery in maize roots is regulated in response to hypoxia. *J. Exp. Bot.*, **61**, 857-871.

引用 URL

ⅰ) http://www.naro.affrc.go.jp/archive/nics/mihonen/crops/kagyou/015016.html (2021.11.23)

ⅱ) https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/foods_with_function_claims/pdf/food_with_function_clains_171227_0001.pdf/(消費者庁. 2015. 機能性表示食品の届出等に関するガイドライン).

謝辞

本研究に取り組むにあたり，主指導教官をしていただきました城斗志夫教授，指導教官をしていただきました原崇准教授に対しまして厚く御礼申し上げます。

食品化学は，初めての分野であり，キクイモからのイヌリン抽出法や微生物の取り扱い方などサポートをいただきました。2015～2016 年度の大学院生の皆さんからも応援していただき，研究を進めることができました。

本研究室において，実験データの見方考え方はもちろん実験データへの真摯な態度，科学の根本について深く考えることができました。

ここに関係諸氏に感謝申し上げます。