

東海大学大学院令和2年度博士論文

ヤーコン葉のポリフェノール含量
と抗酸化作用に関する研究

指導 安田 伸 教授

東海大学大学院生物科学研究科
生物科学専攻

上田 裕人

ヤーコン葉のポリフェノール含量
と抗酸化作用に関する研究

2020 年

上田 裕人

目次

用語一覽	...1
要旨	...3
緒論	...6
本論	...10
第 1 章 ヤーコン葉のポリフェノール含量と抗酸化作用 に及ぼす加熱処理の影響	...10
第 1 節 緒言	
第 2 節 材料および方法	
第 1 項 材料および試薬類	
第 2 項 サンプル調製	
第 3 項 ポリフェノール含量の測定	
第 4 項 総フラボノイド含量の測定	
第 5 項 タンニン含量の測定	
第 6 項 プロアントシアニン含量の測定	
第 7 項 ABTS ⁺ ラジカル消去活性の測定	
第 8 項 DPPH ラジカル消去活性の測定	
第 9 項 O ₂ ⁻ ラジカル消去活性の測定	
第 10 項 細胞より産生される O ₂ ⁻ ラジカルの測定	
第 11 項 HPLC によるクロロゲン酸およびカフェ酸の分析	
第 12 項 統計解析	
第 3 節 結果および考察	
第 1 項 ヤーコン非加熱葉および加熱葉のポリフェノール 含量	
第 2 項 ヤーコン非加熱葉および加熱葉のラジカル消去 活性	
第 3 項 ヤーコン非加熱葉および加熱葉が細胞の O ₂ ⁻ ラジカル産生に及ぼす抑制作用	
第 4 項 ヤーコン非加熱葉および加熱葉の HPLC 分析	
第 5 項 5 年にわたり採取したヤーコン非加熱葉および 加熱葉のポリフェノール含量	
第 4 節 小括	
第 5 節 添付図表等	

第 2 章 日本における 4 つの栽培品種とペルー系統の
ヤーコン葉を用いたポリフェノール含量、
抗酸化作用および糖類分解酵素阻害作用の
4 年にわたる調査

...28

第 1 節 緒言

第 2 節 材料および方法

- 第 1 項 材料および試薬類
- 第 2 項 サンプル調製
- 第 3 項 ポリフェノール含量の測定
- 第 4 項 抗酸化作用の測定
- 第 5 項 糖類分解酵素阻害作用の測定
- 第 6 項 ヤーコン地上部と塊根の収量の測定
- 第 7 項 統計解析

第 3 節 結果および考察

- 第 1 項 日本における 4 つの栽培品種と SY11 のヤーコン葉のポリフェノール含量
- 第 2 項 日本における 4 つの栽培品種と SY11 のヤーコン葉の抗酸化作用
- 第 3 項 日本における 4 つの栽培品種と SY11 のヤーコン葉の糖類分解酵素阻害作用
- 第 4 項 日本における 4 つの栽培品種と SY11 のヤーコン葉の機能性データを用いた多変量解析

第 4 節 小括

第 5 節 添付図表等

第 3 章 ヤーコン茶飲用時における中心複合計画法に
基づく応答曲面計画法を用いた熱水抽出条件の
最適化 ...50

第 1 節 緒言

第 2 節 材料および方法

第 1 項 材料および試薬類

第 2 項 サンプル調製

第 3 項 DPPH ラジカル消去活性の測定

第 4 項 ABTS⁺ラジカル消去活性の測定

第 5 項 O₂⁻ラジカル消去活性(SOD 様活性)の測定

第 6 項 FRAP 活性の測定

第 7 項 ポリフェノール含量の測定

第 8 項 実験計画と統計解析

第 3 節 結果および考察

第 1 項 応答変数の最適レベルの決定

第 2 項 抽出温度と時間の最適化

第 4 節 小括

第 5 節 添付図表等

総括 ...66

参考文献 ...69

本論文に関わる報告 ...77

謝辞 ...78

用語一覧

ABTS⁺: 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation

AE: Acarbose equivalent

AEIC: Acarbose equivalent inhibition capacity

ANOVA: One-way analysis of variance

Ave.: Average

CAE: Chlorogenic acid equivalent

CCD: Central composite design

CE: (+)-Catechin equivalent

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DPPH: 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl

D.W.: Dried weight

EC₅₀: The calculated half-maximal effective concentration

EGE: Ethyl gallate equivalent

Eq: Equation

EtOH: Ethanol

FBS: Fetal bovine serum

FRAP: Ferric reducing antioxidant capacity

F.W.: Fresh weight

GAE: Gallic acid equivalent

HBSS: Hank's balanced salt solution

HCA: Hierarchical cluster analysis

HPLC: High-performance liquid chromatography

IC₅₀: The calculated half-maximal inhibitory concentration

Max: Maximum

MeOH: Methanol

Min: Minimum

NADH: β -Nicotinamide adenine dinucleotide disodium salt

NBT: Nitroblue tetrazolium

O₂⁻: Superoxide anion

PCA: Principal component analysis

PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate

PMS: Phenazine methosulfate

RSM: Response surface methodology

SOD: Superoxide dismutase

SY11: a Peru A line of yacon introduced into Japan

SY201: '*Sarada otome*', a domestic cultivar of yacon

SY206: '*Andesu no yuki*', a domestic cultivar of yacon

SY217: '*Sarada okame*', a domestic cultivar of yacon

SY237: '*Andesu no otome*', a domestic cultivar of yacon

TC: Tannin content

TE: Trolox equivalent

TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity

TFC: Total flavonoid content

TPC: Total polyphenol content

TPTZ: Tripyridyltriazine

Trolox: 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

WST-1: Water-soluble tetrazolium salt-1; 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2*H*-tetrazolium monosodium salt

要旨

キーワード: ヤーコン(*Smallanthus sonchifolius*)、ポリフェノール、
抗酸化作用、加熱処理、栽培品種

ヤーコン(*Smallanthus sonchifolius*)はキク科スマランサス属の一種で、南米アンデス山脈地方原産の植物である。過去数十年にわたり日本を含むアジア、オセアニアおよびヨーロッパ等に導入された。主に塊根が食用とされるのみならず、伝統薬としても一部で利用される。ペルー由来のペルーA 群系統(SY11 を含む)が 1984 年にニュージーランドを経由して我が国に導入されて以来、現在までに「サラダオトメ」(SY201)、「アンデスの雪」(SY206)、「サラダオカメ」(SY217)および「アンデスの乙女」(SY237)が日本において品種登録されている。ヤーコンの塊根に豊富に含まれるフラクトオリゴ糖に注目した研究が推進されてきたものの、葉にもまた抗酸化作用、血糖降下作用、抗真菌活性および抗癌活性などの機能特性を有する成分やポリフェノール等の存在が報告されており、葉の有効利用が期待される。大部分の茎葉部が塊根収穫後の未利用資源となるなか、地域によっては葉を加工利用したヤーコン茶が製品化ならびに消費されている。国内への導入歴が浅いことに加えて、我が国のヤーコン登録品種の葉に注目した機能性や機能性成分、さらには加工処理時の詳細な研究や解析は未だ途上にある。健康志向食品に利用されるヤーコン葉に注目し、抗酸化特性と加熱処理による影響、品種と導入系統間での抗酸化作用等の比較、熱水抽出条件について検証や解析を行うことは、食品科学的な見地からも重要である。本研究では国産ヤーコンの葉を有望な機能性食品素材として確立することを目指し、葉のポリフェノール含量と抗酸化作用に及ぼす加熱処理の影響を調べた。次に 4 年にわたり同一環境下で栽培され、採取されたヤーコン葉を用いて、登録品種ならびに導入時の SY11 との間で抗酸化作用の比較と多変量解析を試みた。さらにヤーコン茶飲用時を想定して、中心複合計画法に基づく応答曲面計画法を用いた熱水抽出条件の最適化について調べた。

1) ヤーコン葉のポリフェノール含量と抗酸化作用に及ぼす加熱処理の影響

熊本県阿蘇郡南阿蘇村に位置する本学圃場で栽培されたヤーコン品種のうち SY206 の葉を加熱し、ポリフェノール含量および抗酸化作用を調べた。採取時期の異なる 2 種類の凍結乾燥葉を 160℃で 20 分間の加熱後に更に 100℃で 60 分間余熱処理した結果、ポリフェノール含量が加熱前よりも 1.96-9.69 倍の高い値を示した。試験管レベルでフリーラジカル消去活性を測定した結果、加熱後の葉は 1.98-4.07 倍の高い抗酸化作用を示した。活性型ヒト顆粒球好中球様細胞のスーパーオキシドアニオンラジカル産生モデルにおいて、加熱後の葉はこれを効果的に減少させた。高速液体クロマトグラフィーによる分析では、加熱後

の葉のカフェ酸含量は加熱前よりも 2.13-3.64 倍ほど高い値を示したものの、クロロゲン酸含量はやや低い値を示した。

2) 日本における 4 つの栽培品種とペルー系統のヤーコン葉を用いたポリフェノール含量、抗酸化作用および糖類分解酵素阻害作用の 4 年にわたる調査

本学圃場で 2013 年、2015 年、2016 年および 2017 年の 4 年にわたり試験栽培された 4 品種と国内における標準系統として用いられる SY11 のヤーコン葉に機能的な差異が認められるか、それぞれの年の 11 月の同時期に採葉して調査を行った。SY11 は国内で育種および栽培研究のために選別され普及した導入時の系統の 1 つである。その結果、葉のポリフェノール含量と抗酸化作用は、SY11 よりも SY237 で高かったものの、それぞれの栽培品種で得られた測定値は試験期間を通して一貫性があるものではなかった。次に、糖類分解酵素阻害作用を調べた結果、試験期間を通して変動が大きかったものの、少なくとも SY237 を含む 3 つの栽培品種が SY11 と同等かそれ以上の α -グルコシダーゼ阻害を示した。さらに、ポリフェノール含量、抗酸化作用および糖類分解酵素阻害作用について得られた 4 年分の測定データを用いて、主成分分析ならびに階層クラスター分析から成る多変量解析を行った。その結果、年次変動の影響が大きいものの、これらヤーコンの栽培品種と SY11 の特徴的な位置付けについて体系的に視覚化することができた。そこでは SY237 が SY11 よりも優れた品種となりうることを示された。

3) ヤーコン茶飲用時における中心複合計画法に基づく応答曲面計画法を用いた熱水抽出条件の最適化

通常の飲用時を想定して市販のヤーコン茶の熱水抽出条件を設定し、高い抗酸化作用とポリフェノールを提供しうる最適抽出条件について調べた。抽出温度を 75.0-96.0°C、抽出時間を 2.00-5.50 分と定め、これら 2 つを独立変数とし、各々の条件下の抽出液を調製後、実測値を得た。中心複合計画法に基づく応答曲面計画法による解析を行い、89.3°C および 2.50 分間の条件下でヤーコン茶を熱水抽出した場合には、0.863 の「望ましき」値とともに、高い抗酸化作用とポリフェノールを提供できる最適条件となり得た。本解析法を用いることで、ヤーコン茶の飲用時を例に、食材の身近な熱水抽出時の最適化を図ることができた。

以上より、ヤーコン葉のポリフェノール含量と抗酸化作用に着目し、加熱処理がポリフェノール含量の上昇を伴って抗酸化作用を上昇させること、そこでは少なくともカフェ酸を例にフェノール酸の一部が上昇することを明らかにした。次に 4 年にわたる調査で、4 つの栽培品種のうち SY237 が SY11 よりも抗酸化作用などの機能面で優れた品種となり得ることを見出した。さらに、ヤー

コン茶飲用時に高い抗酸化作用とポリフェノールが効率良く得られる最適抽出条件を明らかにした。ポリフェノール含量や抗酸化作用などに及ぼす加熱処理の影響や品種と導入系統間での差異と熱水抽出における最適条件を見出した本研究は、保健機能に優れた国産ヤーコン品種の選抜と改良を進めるための先駆的な成果であり、また、葉部分の種々の活性成分や機能性を効率よく上昇できる加工処理法のさらなる開発を行う上で重要な知見を提供するものである。これらの研究成果により、特色ある農林資源ヤーコンの機能性食品素材への開発と活用が期待される。

緒論

本論文は、試験管レベルでの初期評価アッセイ技術と多変量解析ならびに中心複合計画(central composite design: CCD)法に基づく応答曲面計画(response surface methodology: RSM)法を用いて、熊本県内で栽培されるヤーコンの特に未利用資源となりうる葉の加熱時のポリフェノール含量や抗酸化作用に及ぼす加熱の影響、品種と導入系統間での比較、ヤーコン茶の飲用時を想定した実用的な熱水抽出条件について調査したものである。

ヤーコン(*Smilax chinensis*)はキク科スマランサス属の一種、南米アンデス山脈地方原産の植物である。過去数十年にわたりアジア(日本、韓国、台湾、海南およびフィリピン)、オセアニア(ニュージーランド)およびヨーロッパ(チェコ共和国)の各地域に導入されてきた(Ojansivu et al., 2011; Gurung et al., 2018)。日本国内には、1984年にペルーA群系統がニュージーランドを経由して導入されて以来(Sugiura et al., 2014)、現在までに「サラダオトメ」(SY201)、「アンデスの雪」(SY206)、「サラダオカメ」(SY217)および「アンデスの乙女」(SY237)が農林水産省に正式な栽培品種として登録されている。

近年、地域の特性に応じた様々な農業が展開されている。標高 500 m 程度を含む中山間地域は、食料の安定供給機能や多面的機能の発揮の面でも重要な役割を果たしており、生育に適した作物の栽培が望まれている(農林水産省 HP)。ヤーコンは冷涼な生育環境を好むため、九州地方では 500 m 程度の中山間地域が適地とされている。国内では特産農産物としてヤーコンが北海道、茨城、長野、新潟、石川、愛知、島根、福岡、熊本および鹿児島等の一部の地域で栽培されており、そのうち統計のある愛知、島根、福岡、熊本および鹿児島だけでも年間 79,274 kg の生産量が報告されている(公財日本特産農産物協会調査報告書、2012 年)。熊本県内の菊池市ではヤーコン栽培を通じた地域振興活動に取り組んでいる。そこでは、ヤーコンを利用した商品開発や販売にも注力しており、観光物産館などで特産品として提供している。また、本学東海大学農学部圃場(阿蘇実習フィールド; 熊本県阿蘇郡南阿蘇村)でも上記の栽培品種と導入系統ごとの栽培試験を実施している(Kabata et al., 2006; Fujino et al., 2008)。

本植物の形態は地上部と地下部に分けられ、地下部では繁殖器官である塊茎と食用とする塊根がつくられる。サツマイモのような形状をした塊根は甘味が特徴的であり、地域の特産品として生鮮野菜だけでなく加工されたシロップやジュース等も販売されている。その一方で、一部の地域では茎葉部を利用したヤーコン茶が健康志向食品としても製品化され消費されている。本植物 1 株当たりの塊根および茎葉部の新鮮重量はそれぞれ 2-4 kg と同程度である(Sugiura et al., 2007, 2014; Fujino et al., 2008)。茎葉部の大部分が収穫残渣として未利用資源のままであることから(Kabata et al., 2006)、葉の有効利用が期待される。なお、本植物の茎葉部については一枚当たりの葉の新鮮重量が約 30 g 前後であること

から、一株当たりでは約 3:7(葉:茎)、もしくは 4:6 の重量比に相当する。茎は葉と比べて繊維質で固く食材としては加工しづらいという欠点を持つものの、本学ではヤーコン茎葉を用いてサイレージ調製を行い豚の補助飼料とした利用例が報告されている(Kabata et al., 2006)。サツマイモの葉の利用を図った事例では、農研機構九州沖縄農業研究センターで育成された栽培品種「すいおう」が葉を食用とするために開発されており(Sugawara et al., 2011; Sasaki et al., 2015)、茶、パンおよびパスタ等の食品素材としても利用されている(農林水産省 HP)。

これまでヤーコンの塊根に含まれるフラクトオリゴ糖に注目した研究が推進されてきたものの、葉もまた抗酸化作用(Valentova et al., 2005; 2006)、ラットモデルでの血糖降下作用(Aybar et al., 2001; Baroni et al., 2016)、抗真菌活性(Lin et al., 2003)および抗癌活性(Bai et al., 2017; Mendoza et al., 2017)などの機能性を有することが報告されている。葉の主な既知のポリフェノールには、クロロゲン酸、カフェ酸およびフェルラ酸(Valentova et al., 2005; 2006)、没食子酸、*p*-クマル酸(Andrade et al., 2014)などの有機酸、ルチン、ミリセチン、ケルセチン、アピゲニン、ルテオリン (Andrade et al., 2014; Russo et al., 2015)などのフラボノイド類、およびジカフェオイルキナ酸やトリカフェオイルアルトラル酸(Takenaka et al., 2006; Terada et al., 2006)などのカフェオイル誘導体が報告されている。従って、国産ヤーコンの特に未利用資源となる葉に注目し、有望な機能性食品素材として確立していくことも重要である。我々はこれまでに市販の熊本県産ヤーコン茶の抗酸化作用(Sugahara et al., 2015)、抗炎症作用(Ueda et al., 2017a)、糖類分解を担う消化酵素 α -グルコシダーゼおよび α -アミラーゼに及ぼす阻害作用(Ueda et al., 2017b)を報告してきた。

食品科学の分野では、油脂などの酸化防止を目的に抗酸化成分やその役割について長年研究が続けられてきた。一般的に、生体内で産生されるスーパーオキシドアニオン(O_2^-)ラジカル、ヒドロキシルラジカル、ペルヒドロキシルラジカル、過酸化水素、および一重項酸素などの活性酸素種は、体内に侵入してきた病原菌や微生物に対して殺菌作用といった免疫機能として働く一面がある(今田ら、1999)。近年では、急激に上昇した活性酸素種のレベルや酸化ストレスが正常な組織や細胞機能に有害な影響を及ぼすことが提唱されている(Gutowski and Kowalczyk, 2013)。 O_2^- ラジカルは、糖尿病、虚血再灌流障害および慢性心不全などの様々な病因や進行に関連していることが報告されている(Pacher et al., 2006)。スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)は、体内の O_2^- レベルを低下させる役割を担うため、天然物や食材由来の SOD 様活性を示す生理活性成分のスクリーニングが行われてきた。そのため、過剰な O_2^- を抑制することは、様々な疾病の発症や進展のリスクを軽減させるのに役立つ可能性もある。しかし、生体内のフリーラジカルは反応性が高く寿命が短いため、その検出は困難である(佐野と内海、1999)。鉄還元力は試験試料ならびに血漿などの生体試料の抗酸化作用を測定する際の指標となる(Benzie and Strain, 1996; 1999)。鉄還元性

抗酸化力(FRAP)試験(Benzie and Strain, 1999)に加えて、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)ラジカル(Blois, 1958)および 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation (ABTS⁺)ラジカル(Thaipong et al., 2006)に対するフリーラジカル消去活性試験は、サンプルの抗酸化作用を定量的に評価し、スクリーニングを行ううえでよく利用されている。Trolox は代表的な標準抗酸化剤として使用されており、様々な抗酸化作用の測定においては試験試料の Trolox 相当量(TE)あるいは Trolox 等価抗酸化能(TEAC)が調査されている。我々はこれまでに熊本県産の市販ヤーコン茶の抗酸化作用に注目し、フリーラジカルに及ぼす抑制作用を調べてきた(Sugahara et al., 2015)。しかし、国内への導入歴が浅いことに加えて、我が国のヤーコン登録品種の葉について注目した機能性や機能性成分、さらには加工処理時の詳細な研究や解析はいまだ途上にある。健康志向食品に利用されるヤーコン葉に注目し、例えば抗酸化作用と加熱処理による影響、品種と導入系統間での抗酸化作用等の比較、熱水抽出条件について検証や解析を行うことは、食品科学的な見地からも重要である。

本研究では国産ヤーコンの葉を有望な機能性食品素材として確立することを目標とした。すなわち、ヤーコンの葉は茶葉として加工利用されることから、第1章では、国産ヤーコン葉のポリフェノールの安定性および抗酸化作用に及ぼす加熱処理の影響について調べるため、熊本県阿蘇郡南阿蘇村に位置する本学圃場で栽培されたヤーコン品種「アンデスの雪」(SY206)の葉を加熱し、抽出物を調製してヤーコン葉乾燥重量(D.W.)あたりのポリフェノール含量および抗酸化作用を測定した。本研究では2010年9月と11月で採取時期の異なる2種類の凍結乾燥葉を用いて160℃で20分間加熱後に、更に100℃で60分間余熱処理を行った。抽出物を調製後、ポリフェノール、総フラボノイド、タンニンおよびプロアントシアニジン含量を測定した。抗酸化作用には、ABTS⁺、DPPH および O₂ラジカルに対する消去活性を測定した。更に、ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート(PMA)刺激による活性型ヒト顆粒球好中球様細胞の O₂ラジカル産生モデルにおいて加熱葉による抑制効果を調べた。加熱処理がヤーコン葉のポリフェノールに及ぼす影響を調べるため、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析を行うこととした。また、5年にわたり同条件で栽培され採取された同品種の葉を加熱してポリフェノール含量の比較を行った。

第2章では、本学圃場において2013年、2015年、2016年および2017年にわたり試験栽培された4つの異なる栽培品種(SY201、SY206、SY217およびSY237)に加えて、国内における標準系統として用いられるペルーA群系統(SY11)のヤーコン葉の間で機能的な差異が認められるかを明らかにするため、それぞれの年の11月の同時期に採葉して調査を行った。機能性の評価には、ヤーコン葉のポリフェノール含量、ABTS⁺および DPPH ラジカル消去活性を指標とした抗酸化作用、 α -グルコシダーゼおよび α -アミラーゼを標的とする糖類分解酵素阻害作用について調べた。更に、得られた4年分の測定データを用いて、主成分分

析ならびに階層クラスター分析から成る多変量解析を行い、これらのヤーコン栽培品種と導入系統 SY11 の特徴的な位置付けを行うことで体系的に視覚化することとした。

第3章では、通常の飲用時を想定して市販の熊本県産ヤーコン茶の実用的な熱水抽出条件を設定し、高い抗酸化作用およびポリフェノールを提供しうる最適抽出条件について調べることにした。応答値として定義される抗酸化作用には、DPPH ラジカル消去活性、ABTS⁺ラジカル消去活性、SOD 様活性、FRAP 活性を測定した。抽出条件の最適化を目的に、ここでは実測値をもとに中心複合計画(CCD)法に基づく応答曲面計画(RSM)法を用いてモデル等式を導き出し、解析を行うことにした。本計画法は、個々または複数の独立変数による複数の応答因子への影響を二次多項式モデルとして決定付け、設定された条件内で応答値の最適化を図るために利用される(Jambrak, 2011)。本研究では抽出温度を75.0-96.0°C、抽出時間を2.00-5.50分に設定し、これら2つを独立変数とした。RSMによる二次応答曲面モデルに基づき、最適な応答値を得るための「望ましき」値(Derringer and Suich, 1980)を決定し、判断することとした。

本論

第1章 ヤーコン葉のポリフェノール含量と抗酸化作用に及ぼす加熱処理の影響

第1節 緒言

ヤーコン葉の主要成分には種々のポリフェノールが報告されており、クロロゲン酸、カフェ酸およびフェルラ酸(Valentova et al., 2005; 2006)、没食子酸、*p*-クマル酸(Andrade et al., 2014)、ルチン、ミリセチン、ケルセチン、アピゲニン、ルテオリン(Andrade et al., 2014; Russo et al., 2015)、および特徴的なカフェオイル誘導体などが含まれる(Chagas-Paula et al., 2015)。従って、国産ヤーコンの特に未利用資源となる葉に注目し、有望な機能性食品素材として確立していくことは重要である。我々はこれまでに市販の熊本県産ヤーコン茶の抗酸化作用(Sugahara et al., 2015)、抗炎症作用(Ueda et al., 2017a)、糖類分解を担う消化酵素 α -グルコシダーゼと α -アミラーゼに及ぼす阻害作用を報告してきた(Ueda et al., 2017b)。

植物中のポリフェノール含量は、品種、収穫時期、および加工処理により変動する(Lee and Choi, 2012)。とくに、食品製造時には一般的に加熱処理が行われるものの、熱に不安定な成分を劣化させる可能性もある。そのため、様々な野菜類の抗酸化作用とポリフェノール含量に及ぼす加熱処理や調理の影響に焦点を当てた研究も散見される(Ramirez-Anaya et al., 2015; Juaniz et al., 2016)。また、茶葉の商業生産の過程で成分変化が生じ、茶製造工程中に総カテキン含量が14%も減少することが報告されている(Friedman et al., 2009)。しかしながら、ヤーコン葉のポリフェノールの安定性および種々の機能性や抗酸化作用に及ぼす加工処理時の影響や詳細な研究は未だ途上にある。

本章では、国産ヤーコン葉のポリフェノールの安定性および抗酸化作用に及ぼす加熱処理の影響について調べるため、熊本県阿蘇郡南阿蘇村に位置する本学圃場で栽培されたヤーコン品種「アンデスの雪」の葉を加熱し、抽出物を調製してヤーコン葉乾燥重量(D.W.)あたりのポリフェノール含量および抗酸化作用を測定した。本研究では2010年9月と11月で採取時期の異なる2種類の凍結乾燥葉を用いて160°Cで20分間加熱後に、更に100°Cで60分間余熱処理を行った。抽出物を調製後、ポリフェノール、総フラボノイド、タンニンおよびプロアントシアニジン含量を測定した。抗酸化作用には、ABTS⁺、DPPHおよびO₂ラジカルに対する消去活性を測定した。更に、ホルボール12-ミリステート13-アセテート(PMA)刺激による活性型ヒト顆粒球好中球様細胞のO₂ラジカル産生モデルにおいて加熱葉による抑制効果を調べた。加熱処理がヤーコン葉の

ポリフェノールに及ぼす影響を調べるため、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析を行うこととした。また、複数年にわたり同条件で栽培され採取された同品種の葉を加熱してポリフェノール含量の比較を行った。

第2節 材料および方法

第1項 材料および試薬類

「アンデスの雪」(SY206)は日本で登録されているヤーコンの栽培品種である(Fujino et al., 2008)。熊本県阿蘇郡南阿蘇村に位置する東海大学農学部保有の圃場で栽培された同品種の葉を実験に使用した。ヤーコンは3月中旬から4月の間に15-20 gの種イモとなる新鮮な塊茎を50 cm間隔で定植し、100 cm幅の農業用マルチを張った畝で栽培した。肥料には10 a (1,000 m²)あたりN 10 kgとP₂O₅ 20 kgおよびK 20 kgを用いた。本研究では2010年の9月(No. 1)と11月(No. 2)に採取した2種類のヤーコン葉を実験に用いた。最低でも5株の植物体において、上から2番目に位置する葉、即ち第二展開葉を採取した。同様に2013年、2015年、2016年および2017年の11月の同時期にも採葉を行い、これらはポリフェノール含量の比較の際に使用した。ヤーコン葉は-20℃で保存し、凍結乾燥を行った。

ジメチルスルホキシド(DMSO)、ABTS、カフェ酸、クロロゲン酸、DPPH、フォーリンチオカルトフェノール試薬、HPLC用の酢酸、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)、β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド二ナトリウム塩(還元型)(NADH)およびフェナジンメトサルフェート(PMS)、ペルオキシニ硫酸カリウムはナカライテスク(京都、日本)から購入した。RPMI-1640培地、ハンクス液(HBSS)、ホルボール12-ミリスチレート13-アセテート(PMA)、およびHPLC用のメタノール(MeOH)は、和光純薬工業(現 富士フイルム和光純薬、大阪、日本)から購入した。2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウムモノナトリウム塩(WST-1)は同仁化学研究所(熊本、日本)より購入した。HL-60ヒト前骨髄性白血病細胞株(JCRB00085)は、Japan Collection of Research Bioresources (JCRB)細胞バンク(国立研究開発法人医薬基盤・健康栄養研究所、東京、日本)より入手した。ウシ胎児血清(FBS)はバイオウエスト(Nuaille, France)から購入した。他の薬品類については、市販されているもののうち、特級グレードのものを使用した。

第2項 サンプル調製

緑茶の製造手順の一部を参考にし(Yoshida, 2003)、ここではヤーコン葉を凍結

乾燥後に加熱処理した。即ち、凍結乾燥後に粉碎したヤーコン葉 2.50 g をオーブンにて 160°C で 20 分間加熱し、更に 100°C で 60 分間余熱処理した。加熱による葉の重量減の影響を取り除くために、この 2.50 g の初期重量をもとに続く抽出を行った。

非加熱葉と加熱葉の抽出物は 50% メタノール(MeOH)を使用して調製した。凍結乾燥後に粉碎した葉 2.50 g を、MeOH 32 mL とともに 4°C で一晩浸漬した。加熱葉の抽出物を調製する際には、上述の如く凍結乾燥後に粉碎した葉 2.50 g を加熱し、これを直接 MeOH に浸漬した。MeOH 中のこれら加熱葉と非加熱葉に MilliQ 水 32 mL を加えてさらに 4°C で一晩浸漬した。懸濁液を濾過し、濃縮ならびに凍結乾燥により抽出物を得た。続く分析のために抽出物は 20 mg/mL となるよう 50% エタノール(EtOH)中に再溶解した。

第 3 項 ポリフェノール含量の測定

ポリフェノール含量の測定は既報に基づき (Singleton and Rossi, 1965)、一部を改変して行った (Sugahara et al., 2015)。ポリフェノールの定量にはフォーリンチオカルト法を用いており、原理としてはフェノール性水酸基とフォーリン試薬 (フェノール試薬) との還元反応を利用して発色させ吸光度により総ポリフェノール量を測定している (Singleton and Rossi, 1965)。抽出物 (25 μ L) と 10 倍に希釈したフォーリンチオカルトフェノール試薬 (125 μ L) を含む混合液に、10% 炭酸ナトリウム水溶液 (125 μ L) を添加し、室温 (20-25°C) で 10 分間インキュベートした。マイクロプレートリーダー (SH-1000Lab、コロナ電気、茨城、日本) を用いて 600 nm における混合液の吸光度を測定した。検量線作成には標準物質としてクロロゲン酸を使用した。ポリフェノール含量は、サンプル 1 g 乾燥重量 (D.W.) 当たりのクロロゲン酸相当量 (CAE) mg として表した。バックグラウンドとなる吸光度を測定するためにサンプルまたは試薬のみを含む反応液も用意した。

第 4 項 総フラボノイド含量の測定

総フラボノイド含量は既報に基づいて測定した (Chang et al., 2006)。原理としては、フラボノイド骨格、とくに B 環のフェノール性水酸基が亜硝酸ナトリウムによりニトロ基に置換され、塩化アルミニウムにより金属錯体を生成させ、さらに水酸化ナトリウムを加えることで発色させて測定している (Ivanova et al., 2010; Pekal and Pyrzynska, 2014)。そこでは、主にルチンやルテオリン、フラバン-3-オール構造を持つカテキンを特徴的に検出している (Pekal and Pyrzynska, 2014)。抽出物 (25 μ L) と MilliQ 水 (125 μ L) を含む混合液に 5% 亜硝酸ナトリウム水溶液 (7.5 μ L) を添加し、室温で 6 分間インキュベートした。次に、10% 塩化アルミニウム水溶液 (7.5 μ L) を混合液に加えて 5 分間インキュベートした。更

に、1 M 水酸化ナトリウム溶液(50 μ L)と MilliQ 水(27.5 μ L)を添加し、振とうしながら 5-10 分間インキュベートした。マイクロプレートリーダーを用いて 510 nm における混合液の吸光度を測定した。検量線作成のための標準物質として (+)-カテキンを使用した。総フラボノイド含量は、サンプル 1 g D.W.当たりの (+)-カテキン相当量(CE) mg として表した。

第 5 項 タンニン含量の測定

タンニン含量は既報に基づいて測定した(Sriwilaijaroen et al., 2012)。酒石酸鉄法によるタンニン定量法の原理としては、フェノール性水酸基に塩化鉄水溶液を添加することにより、鉄フェノール錯体が形成され、紫色を呈する反応を測定している。従来、緑茶中の特にガロイル基を有するカテキン類や没食子酸の総量を測定するために使用しているため、縮合型および加水分解型を区別せずに定量している(Iwasa et al., 1970; Sriwilaijaroen et al., 2012)。抽出物(12.5 μ L)と 66.7 mM リン酸カリウムナトリウム緩衝液(pH 7.5) (187.5 μ L)を含む混合液に、0.1% 硫酸第一鉄七水和物と 0.5% 酒石酸カリウムナトリウムを含む酒石酸第一鉄水溶液(50 μ L)を添加した。マイクロプレートリーダーを用いて 540 nm における混合液の吸光度を測定した。検量線作成のための標準物質として没食子酸エチルを使用した。タンニン含量は、サンプル 1 g D.W.当たりの没食子酸エチル当量(EGE) mg として表した。

第 6 項 プロアントシアニジン含量の測定

プロアントシアニジン含量は既報に基づいて測定した(Suda et al., 2005)。原理としては、バニリン法を使用しており、バニリンとカテキン等のフラバン-3-オール化合物との反応を測定している(Suda et al., 2005; Oki et al., 2013)。抽出物(10 μ L)、MeOH (30 μ L)、25% 硫酸-MeOH 溶液(100 μ L)および 1% バニリン-MeOH 溶液(100 μ L)を含む混合液を 30°C で 15 分間インキュベートした。マイクロプレートリーダーを用いて 500 nm における混合液の吸光度を測定した。検量線作成のための標準物質として(+)-カテキンを使用した。プロアントシアニジン含量は、サンプル 1 g D.W.当たりの CE mg として表した。

第 7 項 ABTS⁺ラジカル消去活性の測定

ABTS⁺ラジカル消去活性は既報に基づいて測定した(Thaipong et al., 2006)。ABTS⁺混合溶液は、予め同量の 7.4 mM ABTS 水溶液と 2.6 mM ペルオキシ二硫酸カリウム水溶液を遮光しながら室温で 15 時間ローテーターを用いて混合して調製した。使用直前に ABTS⁺混合溶液(150 μ L)を MeOH (2.9 mL)で希釈し、

ABTS⁺反応溶液を調製した。この ABTS⁺反応溶液(190 μ L)を抽出物(10 μ L)に加えて遮光のもと室温で 2 時間の反応を開始した。反応液の吸光度を 734 nm で測定した。Trolox は標準物質として使用した。ラジカル消去活性は、サンプル 1 g D.W.当たりの Trolox 相当量(μ mol TE)として表した。

第 8 項 DPPH ラジカル消去活性の測定

DPPH ラジカル消去活性は既報に基づいて測定した(Blois, 1958)。抽出物(10 μ L)、70% EtOH (90 μ L)および 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5, 100 μ L)を含む混合液(200 μ L)に、0.5 mM DPPH-EtOH 溶液(50 μ L)を加えることで、室温で 30 分間の反応を開始した。反応液の吸光度を 517 nm で測定した。Trolox は標準物質として使用した。ラジカル消去活性は、サンプル 1 g D.W.当たりの μ mol TE として表した。

第 9 項 O₂ラジカル消去活性の測定

O₂ラジカル消去活性は、既報に基づいて PMS-NADH-NBT 法を用いて測定した(Gulcin, 2006; Wang et al., 2008a)。抽出物(10 μ L)、1 mM NBT 水溶液(20 μ L)、0.1 mM PMS 水溶液(20 μ L)、250 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4, 40 μ L)および MilliQ 水(90 μ L)を含む混合液(180 μ L)に 2 mM NADH 水溶液(20 μ L)を加えて室温で 10 分間の反応を開始した。反応液の吸光度を 570 nm で測定した。Trolox は標準物質として使用した。ラジカル消去活性は、サンプル 1 g D.W.当たりの μ mol TE として表した。

第 10 項 細胞より産生される O₂ラジカルの測定

HL-60 ヒト前骨髄性白血病細胞を、5% FBS、100 U/mL ペニシリン G および 100 μ g/mL 硫酸ストレプトマイシンを添加した RPMI-1640 培地中、37°C、5% CO₂ 環境下で培養した。細胞が産生する O₂ラジカルを測定するために、予め 1.25% DMSO の存在下で 6 日間細胞をインキュベートして分化誘導させた HL-60 ヒト顆粒球好中球様細胞を用意した(Nakamura et al., 1998; Kim et al., 2002)。HBSS 中に 1×10^6 cells/mL となるように調整した細胞懸濁液(250 μ L)を、1.5 mL マイクロチューブ内で抽出物(1.25 μ L)とともに 37°C で 15 分間プレインキュベートした。細胞の O₂ラジカル産生を誘導するため、20 μ M PMA-DMSO 溶液(1.25 μ L)とリン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH 7.4)中に調製した 20 mg/mL チトクロム *c* 溶液(12.5 μ L)を含む混合液(13.75 μ L)を細胞懸濁液に添加し、37°C で 15 分間インキュベートした。細胞を直ちに氷冷水中に 5 分間置くことで O₂ラジカル産生を停止した。PMA 刺激により活性化した細胞を遠心分離して上清を回収

した。上清中のチトクロム *c* の吸光度の変化を 550 nm で測定し、間接的に O₂⁻ ラジカル量を測定した。Trolox は標準物質として使用した。

第 11 項 HPLC によるクロロゲン酸およびカフェ酸の分析

ヤーコン葉抽出物の HPLC 分析は、ヤーコン葉中に存在する主な既知ポリフェノールであるクロロゲン酸とカフェ酸について、既報に基づいて測定した (Liu et al., 2011; Sugahara et al., 2018)。HPLC-UV 分析は、グラジエントポンプ、カラムオープン、マニュアルインジェクターおよび UV-VIS 検出器 (JASCO Co., 東京、日本) を備えた LC-2000 PLUS シリーズとともに 3 μm YMC-Pack ODS カラム (4.6 mm × 150 mm) (YMC Co., Ltd., 京都、日本) を用いて行った。流速を 1.0 mL/min に設定し、カラムを 30°C に維持した。検出波長は 350 nm に設定した。グラジエント溶出には移動相 A (0.25% 酢酸水溶液, v/v) および移動相 B (MeOH) の 2 つの溶液を用いた。初期条件として 85% A と 15% B の比率で溶出を開始し、次に 15 分間で 65% A と 35% B となるように徐々に移動相の比率を変更して濃度勾配を持たせ、さらに 5 分間これを維持した。その後、35% B をさらに 30 分間かけて 100% B となるように上昇させ、これをさらに 10 分間維持した。設定上 60.01 分で 10 分間、初期条件の 85% A と 15% B に戻しリカバリを行った。クロマトグラムデータの記録および分析には Chromato-REC レコーダーと Chromato-Pro ソフトウェア (ランタイムインスツルメンツ、東京、日本) を使用した。ヤーコン葉抽出物 (40 μg) または様々な濃度の標準物質 (クロロゲン酸およびカフェ酸) は初期移動相から成る溶液 (85% A および 15% B) に溶解して HPLC に供した。抽出物中に認められた溶出ピークの真正性は、標準物質とのコクロマトグラフィーによって確認した。検量線を作成するために用いたクロロゲン酸およびカフェ酸の濃度範囲は、それぞれ 1.56-12.5 μg/mL および 1.56-25.0 μg/mL とした。

第 12 項 統計解析

データは、4 回の実験から得られた平均値 ± 標準偏差として表した。データは、統計アドオンソフトウェアプログラム (Statcel 4, OMS 出版、埼玉、日本) を使用して解析した。一部のデータは Dunnett の検定を行い、 $P < 0.01$ での差異は統計的に有意であると見なした。多重比較の際には一元配置分散分析 (ANOVA) と続く Tukey-Kramer 検定を行い、 $P < 0.05$ での差異は統計的に有意であると見なした。

第3節 結果および考察

塊根収穫後の未利用資源となるヤーコンの葉に注目し、有望な機能性食品素材として確立することを目標に、本章では本学圃場で栽培されたヤーコン栽培品種「アンデスの雪」(SY206)の葉のポリフェノールの安定性と抗酸化作用に及ぼす加熱処理の影響を調べた。

第1項 ヤーコン非加熱葉および加熱葉のポリフェノール含量

採取時期の異なる2種類の葉(2010年9月(No.1)および11月(No.2))より抽出物を調製し、加熱および非加熱葉1g(D.W.)中のポリフェノール含量を測定した。本研究では、ポリフェノール成分における加熱前後による影響を広くスクリーニングすることを目的に、既報の測定原理に基づいて各々のフェノール性パラメーターについて測定を行った。ポリフェノール、総フラボノイド、タンニンおよびプロアントシアニジン含量は、それぞれクロロゲン酸、(+)-カテキン、没食子酸エチルおよび(+)-カテキン相当量として表した。その結果、加熱葉1g中のポリフェノール含量は、両サンプルで3.06-4.25倍ほど非加熱葉よりも高かった(**Figure 1-1A**)。加熱葉1g中の総フラボノイド含量は両サンプルで4.32-4.50倍ほど非加熱葉よりも高かった(**Figure 1-1B**)。加熱葉1g中のタンニン含量は、非加熱葉よりも1.96-2.01倍高かった(**Figure 1-1C**)。タンニン含量の測定は、緑茶中のカテキンおよび没食子酸を検出するために使用される手法を用いた(Iwasa et al., 1970)。次に、ヤーコン葉の縮合タンニンであるプロアントシアニジン含量を測定した。その結果、加熱葉1g中のプロアントシアニジン含量は、非加熱葉よりも2.57-9.69倍高かった(**Figure 1-1D**)。これら4種類のポリフェノール含量すべてにおいて、加熱葉のほうが非加熱葉よりも有意に高い値を示し、採取時期の異なる2種類のヤーコン葉の両方で同様の傾向を認めた。更に9月に採取(No.1)した葉は、11月に採取(No.2)した葉よりもすべてのパラメーターで高い値を示す傾向にあった。ここでは葉の乾燥重量当たりで比較しているものの、抽出物1mg当たりで見ただけでも、これらのポリフェノール含量は加熱後の葉で高い値を示していた(data not shown)。加熱葉の抽出時の収量は非加熱葉より1.55-1.64倍と高かったため、50% MeOHに対する溶解度と抽出効率の違いも上記のポリフェノール含量が異なる理由の1つとなる可能性もある。フライやグリルなど様々な加熱処理をすると、野菜中のポリフェノールの濃度が増加する傾向が報告されており(Juaniz et al., 2016)、加熱調理が食材となる植物原料の細胞壁および細胞内部の熱破壊をもたらす可能性がある。クワの葉を200℃で1-5分間の短時間で焙煎処理すると、クロロゲン酸といくつかのフラボノイドの含量が増加する(Lee and Choi, 2012)。一方、クロロゲン酸が熱分解されやすいとの報告もある(de Maria et al., 1998)。ヤーコン葉に存在するポリフェノール

には、クロロゲン酸およびカフェ酸のほか、フェルラ酸、さらにはカフェオイルアルトラル酸やカフェオイルキナ酸などのカフェオイル誘導体が報告されている(Valentova et al., 2005; 2006; Chagas-Paula et al., 2015)。リグナン類もまたヤーコン葉中に含まれる高い抗酸化作用を有する成分として報告されている(Xue et al., 2011)。したがって、ヤーコン葉のこれらクロロゲン酸やカフェ酸、さらにはカフェオイルキナ酸誘導体に加えて、ポリフェノール以外にもリグナン類の含量の詳細を調べたり、それらの生物学的機能に及ぼす加熱処理の影響を調査することは重要であると考えられる。

第2項 ヤーコン非加熱葉および加熱葉のラジカル消去活性

次にラジカル消去活性を測定し、Trolox 相当の抗酸化能を表す TEAC 値として、加熱および非加熱ヤーコン葉の抗酸化作用を調べた。採取時期の異なる 2 種類の葉を用いて ABTS⁺ラジカル消去活性を測定した結果、加熱葉 1 g 当たりの TEAC 値は、両サンプルで非加熱葉よりも 3.12-4.07 倍ほど高かった (Figure 1-2A)。DPPH ラジカル消去活性を測定した結果、加熱葉 1 g 当たりの TEAC 値は、非加熱葉よりも 3.02-3.13 倍ほど高かった(Figure 1-2B)。活性酸素種の 1 つ O₂⁻ラジカルに対する消去活性を測定した結果、加熱葉 1 g 当たりの TEAC 値は、非加熱葉よりも 1.98-2.12 倍ほど高かった(Figure 1-2C)。これらの活性測定では、とくに加熱葉の抗酸化作用が非加熱葉よりも有意に高かった。更に Figure 1-1 で得られた結果と同様に、No. 1 の葉は、No. 2 の葉よりも高い値を示す傾向が認められた。上記の TEAC 値を算出する際にそれぞれの試料の抽出物の濃度を変えて抗酸化作用を調べた結果、加熱葉の 50%効果濃度を表す EC₅₀ 値は非加熱葉よりも低い値を示し、低濃度でも強い抗酸化作用を示していた(data not shown)。また、O₂⁻ラジカル消去活性で得られたヤーコン葉の高い TEAC 値は、以前の我々のヤーコン茶における研究結果を支持するものであった(Sugahara et al., 2015)。これまでも様々な野菜の抗酸化作用とポリフェノール含量に及ぼす熱処理の影響に焦点を当てた研究が報告されている(Ramirez-Anaya et al., 2015)。また、ニガウリを焙煎処理すると、ポリフェノールの増加とともに、DPPH および ABTS⁺ラジカル消去活性と第二鉄還元抗酸化力(FRAP)で抗酸化作用の向上が認められている(Choi et al., 2012)。

第3項 ヤーコン非加熱葉および加熱葉が細胞の O₂⁻ラジカル産生に及ぼす抑制作用

近年、我々はヒト細胞を用いたアッセイ系を用いて、健康志向食品として市販されているハーブティーが抗酸化作用を有していることを報告してきた(Sugahara et al., 2015; 2018)。本研究でも同実験モデルで PMA 刺激による活性型

ヒト顆粒球好中球様細胞の O_2 -ラジカル産生に及ぼす加熱前後のヤーコン葉抽出物の影響を調べた。その結果、毒性を示さない 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲において(data not shown)、9月に採取した No. 1 の葉 (**Figure 1-3A**)と11月に採取した No. 2 の葉 (**Figure 1-3B**)の両方で細胞の O_2 -ラジカル産生に及ぼす濃度依存的な抑制作用を認めた。No. 1 の加熱葉抽出物の 50%阻害濃度を表す IC_{50} 値は非加熱葉抽出物よりも低い値を示し、低濃度でも 2.71 倍の強い効果を示していた(**Figure 1-3A**)。No. 2 の葉でも加熱処理後に同様の傾向が認められ、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの濃度範囲では加熱葉抽出物ではっきりとした IC_{50} 値が得られたものの、非加熱葉抽出物では IC_{50} 値が得られなかった(**Figure 1-3B**)。活性化した細胞の O_2 -ラジカル産生に及ぼすヤーコン加熱葉のこれら抑制作用は、ポジティブコントロールの Trolox よりも強いものであった。農産物やその加工品の抗酸化作用を細胞アッセイ系で調べることは重要である。これまでに、酸化指標となるジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート(DCFH-DA)を用いて、各種のポリフェノールや果物と野菜による細胞レベルでの抗酸化作用が実証されている(Wolfe and Liu, 2007; Girard-Lalancette et al., 2009)。一方、ブロッコリーをスチーム処理すると、化学反応系および細胞アッセイ系において高い抗酸化作用を有するようになると報告されている(Roy et al., 2009)。

第4項 ヤーコン非加熱葉および加熱葉の HPLC 分析

ヤーコン葉中のポリフェノールに及ぼす加熱処理の影響を詳しく調べるため、既報に基づき(Liu et al., 2011; Sugahara et al., 2018)、加熱および非加熱のヤーコン葉抽出物中のクロロゲン酸とカフェ酸について HPLC による検出を試みた。No. 1 の非加熱および加熱葉抽出物(40 μg)の HPLC クロマトグラムをそれぞれ **Figures 1-4A** および **1-4B** に示した。同様に No. 2 の非加熱および加熱葉抽出物(40 μg)の HPLC クロマトグラムをそれぞれ **Figures 1-4C** および **1-4D** に示した。その結果、No. 1 の非加熱葉抽出物で 5-10 分および 15-40 分に観察されたいくつかの溶出ピーク(**Figure 1-4A**)は、加熱後には小さな溶出ピークとして検出された(**Figure 1-4B**)。一方、No. 1 の加熱葉抽出物のカフェ酸に対応するピーク強度(**Figure 1-4B** 内ピーク番号 2)は、非加熱葉抽出物のピーク強度(**Figure 1-4A** 内同番号)よりも高かった。No. 2 の非加熱葉(**Figure 1-4C**)と加熱葉(**Figure 1-4D**)の間でも同様の傾向が観察された。加熱葉と非加熱葉の間では、クロロゲン酸に対応するピーク強度(図内ピーク番号 1)にも小さな変化を認めた。現時点ではヤーコン葉のこれら以外の成分に及ぼす熱処理の影響は明らかになっておらず、より包括的に活性成分の変動を調査する必要がある。

歴史的にニュージーランドからチェコに導入された 4 つの異なるタイプのヤーコンを調べた海外の研究では、葉 1 g 当たりのクロロゲン酸とカフェ酸の含量がそれぞれ 0.037-0.160 mg および 0.044-0.097 mg の範囲にあると報告してい

る(Valentova et al., 2006)。本研究で用いた No.1 および No.2 の両サンプルの非加熱葉 1 g 中のクロロゲン酸含量は、それぞれ 0.123 mg および 0.524 mg であり、採取時期の違いによる差があった(**Figure 1-5A**)。その値は、加熱後にはそれぞれ 0.0970 mg および 0.440 mg が得られ、加熱前の 78.9-84.0%程度とやや低い値を示す傾向にあった。一方、No.1 および No.2 の両サンプルの非加熱葉 1 g 中のカフェ酸含量は、それぞれ 0.625 mg および 0.445 mg であり、加熱後にはそれぞれ 1.33 mg および 1.62 mg と、非加熱葉よりも 2.13-3.64 倍の有意に高い値が得られた(**Figure 1-5B**)。本研究で得られた加熱前のヤーコン葉のクロロゲン酸含量は、他の報告例と同等であるものの(Valentova et al., 2006)、カフェ酸含量は以前報告された値よりも高かった。ヤーコン葉を加熱処理することでフェノール酸であるカフェ酸が顕在化し、これが抗酸化作用の上昇に部分的にも貢献している可能性がある(Sugahara et al., 2018)。クロロゲン酸はキナ酸とカフェ酸がエステル結合したものであり(de Maria et al., 1998)、熱分解を受けやすい (de Maria et al., 1998)。ヤーコンに存在する特徴的な化学成分として、カフェ酸部分を官能基として有するカフェオイルアルトラル酸やカフェオイルキナ酸等のカフェオイル誘導体が挙げられる(Valentova et al., 2005; 2006; Chagas-Paula et al., 2015)。キクイモ中に含まれる 3,4-ジ-*o*-カフェオイルキナ酸、3,5-ジ-*o*-カフェオイルキナ酸、および 4,5-ジ-*o*-カフェオイルキナ酸といったカフェオイル誘導体は、焙煎により消失することが報告されている(Ishiguro and Yokota, 2018)。これらのカフェオイル誘導体は、ヤーコン葉中にも含まれることが報告されている(Valentova et al., 2005; 2006; Chagas-Paula et al., 2015)。そのため、本研究で認められた加熱後のカフェ酸含量の増加は、カフェオイル誘導体の分解が原因である可能性も考えられる。先行実験として、クロロゲン酸とカフェ酸の単独の抗酸化作用を測定した。ABTS⁺ラジカル消去活性測定において、クロロゲン酸とカフェ酸はそれぞれ 3.06 mmol TE/g および 7.08 mmol TE/g の活性を有していた。同様に DPPH ラジカル消去活性測定においてはそれぞれ 3.41 mmol TE/g および 7.62 mmol TE/g、O₂⁻ラジカル消去活性測定においてはそれぞれ 20.2 mmol TE/g および 29.3 mmol TE/g の活性を有していた。これらの値を用いて、ヤーコン葉の抗酸化作用に占めるクロロゲン酸とカフェ酸の寄与率を試行的に算出してみた結果、最大でもクロロゲン酸で 0.0526%、カフェ酸で 0.162%を示すのみであった。そのため、ヤーコン葉の活性成分に及ぼす加熱処理の影響を継続して調べていく必要があると考察する。

先の実験では、ヤーコン葉を加熱するとポリフェノール、総フラボノイド、タンニンおよびプロアントシアニジン等で高い値が得られている(**Figures 1-1A to 1-1D**)。また、没食子酸、(+)-カテキン、(-)-エピカテキンおよびルチンがヤーコン葉に存在することが報告されており(Russo et al., 2015; Andrade et al., 2014; Marchyshyn et al., 2017)、試行的にヤーコン葉のこれら成分に及ぼす加熱処理の影響を調べた。その結果、HPLC による分析により、加熱葉抽出物では 3.5 分で

没食子酸様ピークの強度が増加し、12.5 分で(-)-エピカテキン様ピークの強度がやや増加した(data not shown)。更に、25 分でのルチン様ピークの強度は、加熱前後でほぼ同等であったものの、本条件では(+)-カテキン様ピークは検出されなかった。ヤーコン葉のポリフェノールや生理活性成分に及ぼす熱処理の影響は未だ完全には明らかにされていないものの、ヤーコン加熱葉の総タンニンとプロアントシアニジン含量が非加熱葉よりも高かった点 (Figures 1-1C, 1-1D) もまた注目に値する。本研究で用いたプロアントシアニジン定量法は、カテキン等のフラバン-3-オール化合物の検出に基づいている(Oki et al., 2013)。没食子酸部分のガロイル基を含むカテキン類が、熱処理の影響を受けやすいかどうかも今後明らかにする必要がある。例えば、125°Cで30 分間の加熱処理を行うとカテキンの重合化が起こり、カテキン単量体の約 10-30%が重合することが報告されているものの(Yoshino et al., 2018)、溶解性についても検証を行う必要があると考えられる。また、メロンの皮を用いた加熱処理の研究では、フェノール化合物の 33%が低分子の単一ポリフェノールであり、67%は抽出が容易ではない高分子結合型のポリフェノールであることから(Jara and Fulgencio, 2018)、加熱後にこれら高分子結合型ポリフェノールの解離と抽出効率が上昇した可能性も考えられる。そのため、ヤーコン葉に存在することが報告されている他のフェノール酸類(*p*-クマル酸)、フラボノイド類(ミリセチン、ケルセチン、アピゲニンおよびルテオリン)、およびタンニン類(没食子酸やその誘導体、たとえばガロイルカテキン等)(Russo et al., 2015; Andrade et al., 2014; Marchyshyn et al., 2017) もまた加熱処理により変動するかどうか、詳細に調べる必要がある。

第 5 項 5 年にわたり採取したヤーコン非加熱葉および加熱葉のポリフェノール含量

前項までに、採取時期の異なる 2 種類のヤーコン栽培品種「アンデスの雪」の葉を用いて実験を行い、2010 年 9 月に採取した No. 1 の葉のほうに同 11 月に採取した No. 2 よりもポリフェノール含量と抗酸化作用の両方で高い値を認められた(Figures 1-1 to 1-3)。加熱葉においても同様に、No. 1 のほうが No. 2 よりも高い値を示した。そのため、ヤーコン葉のポリフェノール含量と活性は、季節や生育時期の違いにより影響を受けるものと推察される。次に 2010 年、2013 年、2015 年、2016 年および 2017 年の 5 年にわたり 11 月に採取された同品種の葉を加熱処理してポリフェノール含量に及ぼす影響を調べた。試験圃場を含む地域(熊本県阿蘇郡南阿蘇村)では塊根を通常 11 月に収穫するため、収穫後の地上部の利用を想定してこの時期に葉の採取を行った。その結果、非加熱葉 1 g 中のポリフェノール含量は 13.4-45.5 mg、加熱葉では 36.5-66.8 mg であった(Figure 1-6)。葉 1 g 中のポリフェノール含量に及ぼす加熱処理の影響を調べた結果、2010 年、2013 年、2015 年、2016 年および 2017 年で採取された葉ではそれぞれ

4.25 倍、1.51 倍、1.17 倍、1.54 倍および 1.52 倍とすべての年で有意に高い値を示した。2010 年、2013 年および 2016 年に採取されたヤーコン葉でポリフェノール含量が低い理由は、夏季を中心とする猛暑による生育不良が原因である可能性もあり、これら 3 ヶ年において本植物は草丈も低く、塊根収量が少なかった(data not shown)。これらの結果は、ヤーコン葉のポリフェノール含量が季節や栽培年によって異なることを含意している。強調すべきこととして、加熱前と比べて加熱後のヤーコン葉が抗酸化成分のより良い供給源となる可能性が挙げられる。今後は、他のヤーコン栽培品種の葉や異なる月に採取された葉を用いて、抗酸化作用や生物活性をさらに比較評価し、各種の活性に及ぼす加熱処理条件の影響を精査していく必要がある。

第 4 節 小括

熊本県阿蘇郡南阿蘇村に位置する本学圃場で栽培されたヤーコン栽培品種「アンデスの雪」の葉を加熱すると、非加熱時の葉と比べてポリフェノール含量およびフリーラジカルを消去する抗酸化作用が高まることを明らかにした。HPLC による分析を行い、加熱後の葉のカフェ酸含量が加熱前の葉よりも高いことを実証し、その際にクロロゲン酸含量がやや低い値を示す傾向を認めた。5 年にわたり同時期に採取された同品種のヤーコン葉を用いてポリフェノール含量に及ぼす加熱処理の影響を検証し、すべての年で加熱後に有意に高い値を得ることができた。従って、加熱処理がヤーコン葉の活性成分や含量に影響を及ぼし、抗酸化作用を上昇できる可能性があることを見出した。今後は加熱処理条件を変えてヤーコン葉の生理活性成分の含量と生物活性に及ぼす影響を詳細に調べていく必要がある。また、未利用資源となるヤーコン葉を有望な機能性食品素材として確立するためにも、他のヤーコン栽培品種や異なる月に採取された葉を用いて生物活性の比較や加熱処理による影響を明らかにしていくことが重要である。

第 5 節 添付図表等

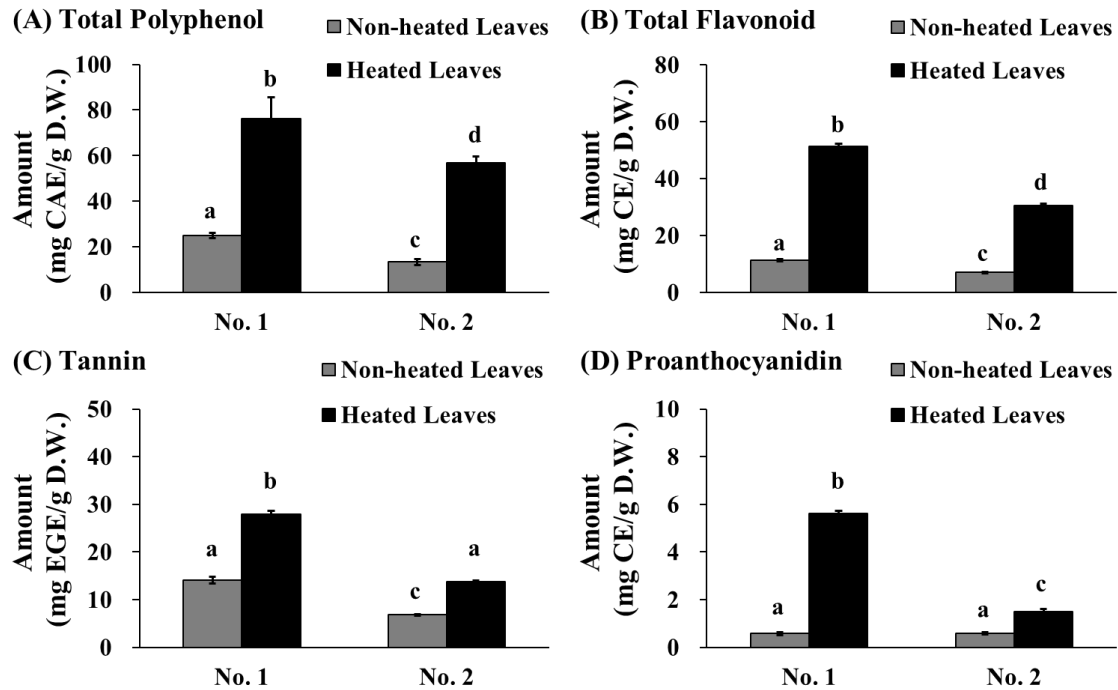


Figure 1-1. Total polyphenol (A), total flavonoid (B), tannin (C) and proanthocyanidin contents (D) in yacon non-heated and heated leaves. Data shown represent mean \pm standard deviation (S.D.) from four independent experiments. Two batches of extracts prepared from yacon leaves collected in September 2010 (No. 1) or November 2010 (No. 2) were used in this study. Values not sharing a common superscript letter are considered significantly different ($P < 0.05$, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer test). CAE; chlorogenic acid equivalent, CE; (+)-catechin equivalent, EGE; ethyl gallate equivalent, D.W.; dry weight of sample.

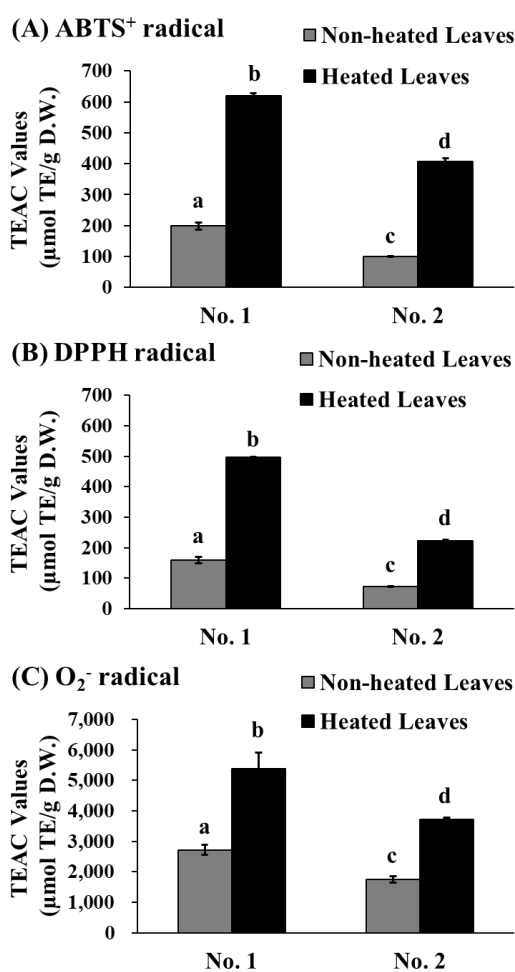


Figure 1-2. TEAC values of yacon non-heated and heated leaves in ABTS⁺ radical (A), DPPH radical (B), and O₂⁻ radical scavenging assays (C). Two batches of extracts prepared from yacon leaves collected in September 2010 (No. 1) or November 2010 (No. 2) were used in this study. Data shown represent mean \pm standard deviation (S.D.) from four independent experiments. Values not sharing a common superscript letter are considered significantly different ($P < 0.05$, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer test). TEAC; Trolox equivalent antioxidant capacity, TE; Trolox equivalent, D.W.; dry weight of sample, O₂⁻; superoxide anion.

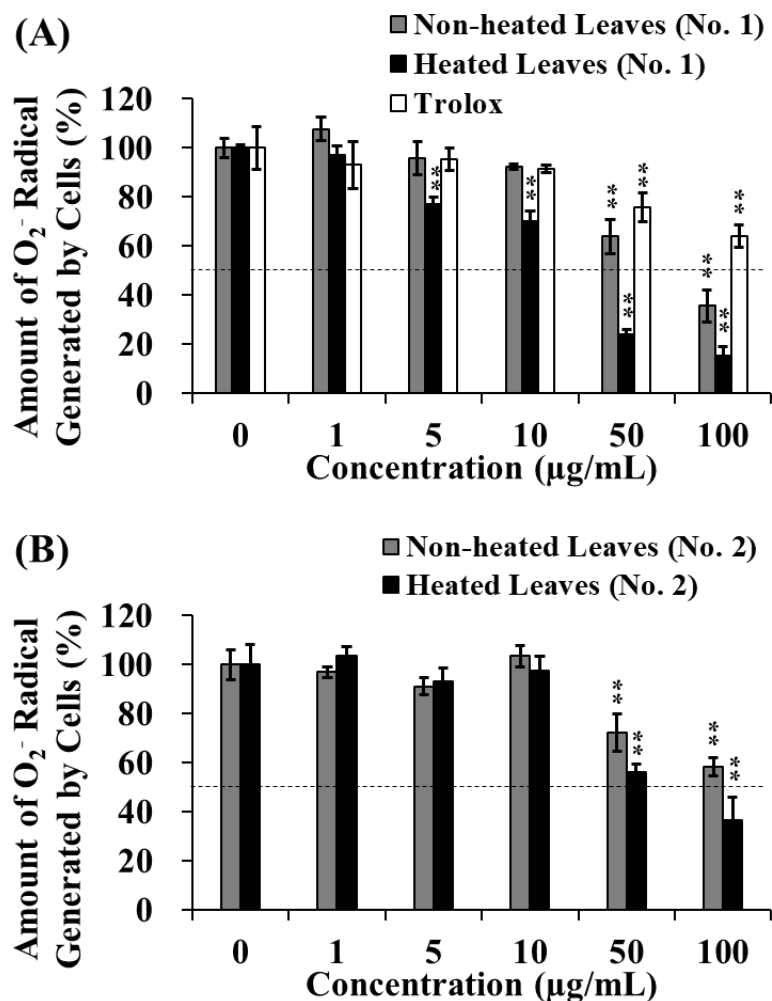


Figure 1-3. Effect of the extracts prepared from yacon non-heated and heated leaves and Trolox on cellular O_2^- radical generation in PMA-stimulated human granulocytic neutrophil cells. Two batches of extracts prepared from yacon leaves collected in September 2010 (A) or November 2010 (B) were used in this study. Data shown represent mean \pm standard deviation (S.D.) from four independent experiments. The statistical significance between treated and untreated cells was evaluated using Dunnett test (** $P < 0.01$). PMA; phorbol 12-myristate 13-acetate.

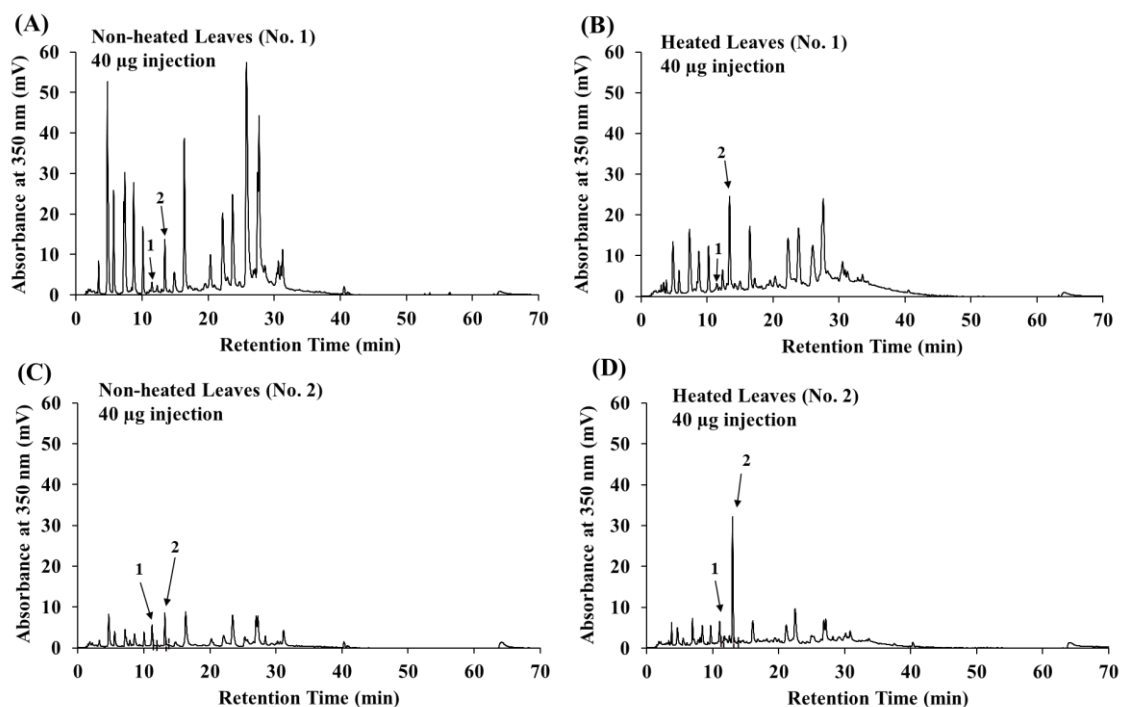


Figure 1-4. High-performance liquid chromatography (HPLC) chromatogram of the extracts prepared from yacon non-heated and heated leaves. Extracts of non-heated leaves (A) and heated leaves (B) prepared from yacon collected in September 2010 (No. 1), and those prepared from non-heated leaves (C) and heated leaves (D) collected in November 2010 (No. 2) were analyzed using HPLC. The phytochemicals from 40 µg of the extract were detected at 350 nm. The retention time of chlorogenic acid (peak 1) and caffeic acid (peak 2), indicated by arrows, was approximately 11.4 min and 13.4 min, respectively. Individual figures represent data from three repetitions.

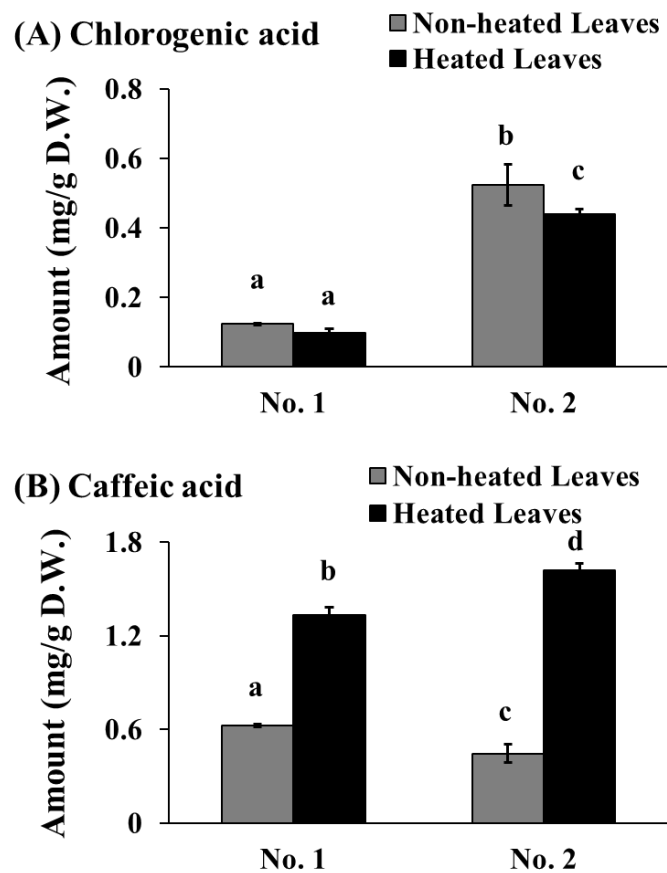


Figure 1-5. Chlorogenic acid (A) and caffeic acid (B) contents in the yacon non-heated and heated leaves. Data shown represent the mean \pm standard deviation (S.D.) from three independent high-performance liquid chromatography (HPLC) runs (*see* **Figure 1-4**; chlorogenic acid (peak 1), caffeic acid (peak 2)). Two batches of extracts prepared from yacon leaves collected in September 2010 (No. 1) or November 2010 (No. 2) were used in this study. Values not sharing a common superscript letter are considered significantly different ($P < 0.05$, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer test). D.W.; dry weight of sample.

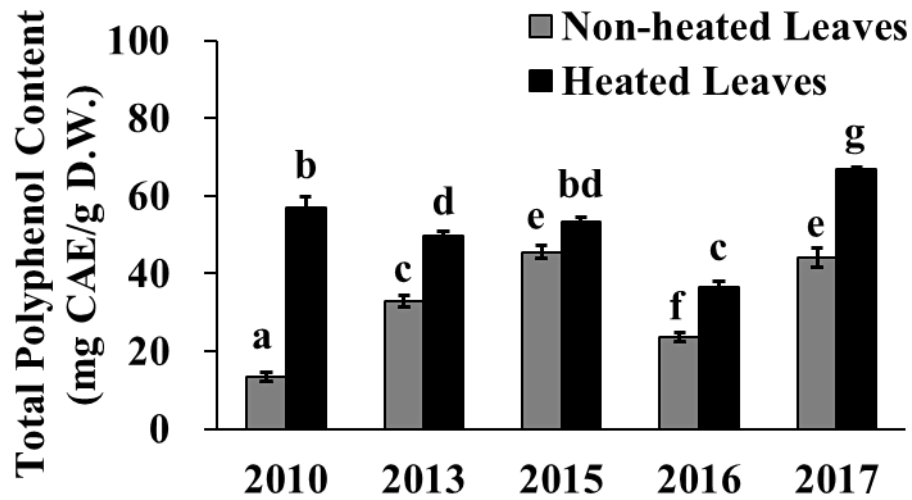


Figure 1-6. Total polyphenol content in the yacon non-heated and heated leaves among five different cultivation years. Yacon leaves collected in November 2010, 2013, 2015, 2016, and 2017 were used in this study. Data shown represent mean \pm standard deviation (S.D.) from four independent experiments. Values not sharing a common superscript letter are considered significantly different ($P < 0.05$, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer test). CAE; chlorogenic acid equivalent, D.W.; dry weight of sample.

第2章 日本における4つの栽培品種とペルー系統のヤーコン葉を用いたポリフェノール含量、抗酸化作用および糖類分解酵素阻害作用の4年にわたる調査

第1節 緒言

ヤーコンは、歴史的にオセアニア、ヨーロッパおよび日本を含むアジアのいくつかの国に導入されたアンデス原産の植物である(Ojansivu et al., 2011; Gurung et al., 2018)。現在、4つの異なるヤーコン品種、即ち「サラダオトメ」(SY201) (Sugiura et al., 2007)、「アンデスの雪」(SY206) (Fujino et al., 2008)、「サラダオカメ」(SY217) (Fujino et al., 2008)および「アンデスの乙女」(SY237) (Sugiura et al., 2014)が、我が国の公式な栽培品種として農林水産省に登録されている。とくに他の品種と比べて、新しい品種であるSY237は比較的、塊根および茎葉部は安定した収穫収量を有することが示されている(Sugiura et al., 2014)。ペルーA群系統(導入系統)のSY11は、ペルーからニュージーランドを経由して最初に日本に導入され、育種および栽培研究のために選別され普及した系統の1つである(Sugiura, 2016; Sugiura and Yano, 2016)。例えば、SY11は新品種SY237の交配時の親系統としても使用され、国内では栽培研究の標準系統として用いられる(Sugiura and Yano, 2016)。

第1章では、本学圃場で栽培した品種SY206のヤーコン葉を加熱処理するとカフェ酸を含むポリフェノールや抗酸化作用を上昇できることを明らかにした。健康志向食品に利用されるヤーコン葉に注目し、国産ヤーコン葉を有望な機能性食品素材や原料として確立することは重要である。しかしながら、国内のヤーコン栽培品種と導入系統間での抗酸化作用などの機能性の比較検証や解析に関する研究は未だ途上にある。茨城県内で2年間(2008年および2009年11月)にわたり栽培ならびに収穫されたヤーコン栽培品種の塊根に関する研究では、SY206よりも、SY201とSY217が高いポリフェノール含量を有する可能性を報告している(Takenaka et al., 2011)。我々はヤーコン葉に注目し、2つの栽培品種SY201 (Sugahara et al., 2015)とSY206 (第1章 参照)の葉のポリフェノール含量と抗酸化作用について報告してきた。しかしながら、数年にわたり国内で栽培されたさまざまなヤーコン栽培品種と導入系統間でとくに葉に機能的な差異が認められるかに関しては未だ体系的に評価されていない。

多変量解析は、複数の解析や分析データ変数に基づいて、これらの変数間の相互作用や類似性を解析する統計学的技法である。複雑なデータセットを比較的単純化および視覚化することを可能とする。これまでに海外でもさまざまなヤーコンの在来種や各系統間における検証が行われている(Lachman et al., 2007; Russo et al., 2015b)。また、果実や野菜中の抗酸化作用や色性などの品質データ

内の特徴を分類した報告や(Patras et al., 2011)、果実中の活性成分とフリーラジカル消去活性との包括的な関連付けにおいても (Gisela et al., 2009)、多変量解析が利用されている。

本章では、熊本県阿蘇郡南阿蘇村に位置する本学圃場において 2013 年、2015 年、2016 年および 2017 年にわたり試験栽培された 4 つの異なる栽培品種(SY201、SY206、SY217 および SY237)に加えて、国内における標準系統として用いられる SY11 のヤーコン葉の間で機能的な差異が認められるかを明らかにするため、それぞれの年の 11 月の同時期に採葉して調査を行った。機能性の評価には、ヤーコン葉のポリフェノール含量、ABTS⁺および DPPH ラジカル消去活性を指標とした抗酸化作用、および α -グルコシダーゼおよび α -アミラーゼを標的とする糖類分解酵素阻害作用について調べた。更に、得られた 4 年分の測定データを用いて、主成分分析ならびに階層クラスター分析から成る多変量解析を行い、これらのヤーコン品種と導入系統 SY11 の特徴的な位置付けを行うことで体系的に視覚化することとした。

第 2 節 材料および方法

第 1 項 材料および試薬類

ヤーコン 4 栽培品種(「サラダオトメ」(SY201)、「アンデスの雪」(SY206)、「サラダオカメ」(SY217)および「アンデスの乙女」(SY237))と導入時のペルー A 群系統(SY11)は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構(農研機構)西日本農業研究センター(旧四国農業試験場)から試験栽培のために分譲されたもので、東海大学農学部が所有する熊本県阿蘇郡南阿蘇村内の圃場(32°53'29.1"N、130°59'43.5"E、標高 486 m)において維持管理している。ヤーコンの種イモとなる新鮮な塊茎(15-20 g)を 3 月中旬に 50 cm 間隔で定植し、100 cm 幅の農業用マルチを張った畝で栽培を行った。10 a (1,000 m²)あたり N 10 kg と P₂O₅ 20 kg および K 20 kg となるよう施肥を行った。4 つのヤーコン栽培品種と SY11 は少なくとも 80 植物個体を 10 a の圃場内で乱塊法(random block design)により繰返し植栽した。このとき他の系統を含む合計 910 植物体を栽培していた。本研究では、2013 年(11 月 11 日)、2015 年(11 月 6 日)、2016 年(11 月 7 日)および 2017 年(11 月 10 日)の 11 月上旬から中旬にかけて、SY201、SY206、SY217、SY237 および SY11 の少なくとも 5 つの別々の植物個体の上部から 2 番目の位置(第二展開葉)より 1、2 枚の葉をランダムに採取した。このとき、2014 年の葉サンプルは予定していた収穫または採取時期において早霜のため枯れ込みが早めに進行したため、本研究では用いることができなかった。2013 年、2015 年、2016 年および 2017 年の葉は霜の影響を受ける前に採取され、このとき

SY206 と SY237 は開花していた。栽培試験を行った地域では 11 月に塊根を収穫するため、この時期に葉を採取した。回収した葉を -20°C で保存し、その後凍結乾燥を行った。種子繁殖性の作物と比べて、ヤーコンのような種イモから栽培するイモ類は個体差が大きく、品種や系統間での比較が難しいことが知られている。そのため、生育や収量が安定している標準系統が多く用いられ、それらを指標に育種および栽培研究が実施されている。本研究では、ヤーコンの育種研究によく使用される導入系統 SY11 を基準として用いており、これを比較対象とした(Sugiura et al., 2007; Fujino et al., 2008; Sugiura et al., 2014)。

ABTS、DPPH およびフォーリンチオカルトフェノール試薬はナカライテスク株式会社(京都、日本)から購入した。*p*-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside は富士フィルム和光純薬株式会社(大阪、日本)から入手した。ブタ膵臓由来 α -アミラーゼ Type VI-B、*p*-nitrophenyl α -D-maltoside および Trolox はシグマアルドリッチ株式会社(St. Louis, MO, USA)から入手した。酵母由来 α -グルコシダーゼはオリエンタル酵母株式会社(東京、日本)から購入した。アカルボースは LKT Laboratories 株式会社(St. Paul, MN, USA)から入手した。他の薬品類については、市販されているもののうち、特級グレードのものを使用した。

第 2 項 サンプル調製

サンプルは、第 1 章第 2 節第 2 項と同様の方法で調製した。

第 3 項 ポリフェノール含量の測定

ポリフェノール含量は、第 1 章第 2 節第 3 項と同様の方法で測定した。

第 4 項 抗酸化作用の測定

抗酸化作用は、ABTS⁺ラジカル消去活性および DPPH ラジカル消去活性測定法を使用し、それぞれ第 1 章第 2 節第 7 項および同第 8 項と同様の方法で評価した。

第 5 項 糖類分解酵素阻害作用の測定

α -アミラーゼ阻害活性は既報に基づき(Sama et al., 2012)、一部を改変して測定した(Ueda et al., 2017b)。酵素反応は、ヤーコン葉由来の抽出物(10 μL 、最終濃度 1.00 mg/mL)、1%塩化ナトリウム水溶液(27.8 μL)、0.1 M リン酸緩衝液(pH 6.7, 12.2 μL)、MilliQ 水(14 μL)、および 6.5 mM *p*-ニトロフェニル α -D-マルトシド(69.5 μL)を含むアッセイ混合液(133.5 μL)に 130 U/mL α -アミラーゼ(55.5 μL)

を添加して開始した。混合液を 37°C で 0 分と 180 分間インキュベートし、マイクロプレートリーダー(SH-1000Lab、コロナ電気、茨城、日本)を用いて 400 nm における吸光度を測定した。検量線作成のために標準阻害剤としてさまざまな濃度のアカルボースを使用した。このとき算出された半数阻害濃度(IC₅₀)は 0.0213±0.0025 mg/mL であった。葉抽出物の濃度 1.00 mg/mL での阻害活性(32.6-56.8%)および葉の乾燥重量(D.W.)からの抽出収量を最初に決定し、その後、阻害活性は μmol アカルボース相当量(AE) / g D.W.として表した。

α -グルコシダーゼ阻害は既報に基づき(Matsui et al., 1996)、一部を改変して測定した(Ueda et al., 2017b)。酵素反応は、抽出物(10 μL 、最終濃度 1.00, 2.00, 3.00 mg/mL)と 0.08 U/mL α -グルコシダーゼ(40 μL)を含むアッセイ混合液(50 μL)に 0.887 mM *p*-ニトロフェニル α -D-グルコピラノシド(150 μL)を添加して開始した。混合液を 37°C で 15 分間インキュベートし、マイクロプレートリーダーを用いて 400 nm における吸光度を測定した。アカルボースを標準阻害剤として使用した際の IC₅₀ 値は 0.496±0.032 mg/mL であった。葉抽出物の IC₅₀ 値(mg/mL)または試験した最大濃度 3.00 mg/mL での阻害活性(35.5-51.2%)および D.W.からの抽出収量を最初に決定し、その後、阻害活性は上記と同様に μmol AE / g D.W.として表した。

第 6 項 ヤーコン地上部と塊根の収量の測定

収穫時に 10 株のヤーコン植物の地上部を根との境界で切断後、直ちにデジタルスケールを使用して地上部の新鮮重量を測定した。その後、塊根については土壌を取り除いたうえで新鮮重量を測定した。個々の塊根は 50 g 以上の基準で収量を決定し、50 g 未満のものを規格外とした。データは 10 株の植物体からの平均値として表した。

第 7 項 統計解析

データは 3 回または 4 回の実験から得られた平均値±標準偏差として表した。データの一部は、Excel 2016 (Microsoft Co., Redmond, WA, USA)用の統計アドオンソフトウェアプログラム(Statcel 4、OMS 出版、埼玉、日本)を使用して分析した。多重比較の際には Post-hoc Tukey-Kramer 検定を行い、 $P < 0.05$ での差異は統計的に有意であると見なした。多変量解析には、Excel-Solver アドオンプログラムを用いて主成分分析(PCA)と階層クラスター分析(HCA)を行い、このときデータを平均 0 および変量 1 に標準化した。HCA はユークリッド距離法により決定付けた。

第3節 結果および考察

本章では本学圃場において2013年、2015年、2016年および2017年にわたり試験栽培された4つの異なる栽培品種と導入時のペルーA群系統(SY11)のヤーコン葉に機能的な差異が認められるか、それぞれの年の11月の同時期に採葉してポリフェノール含量、抗酸化作用および糖類分解酵素阻害作用について調べた。得られた測定データを用いて多変量解析を行い、これらのヤーコン栽培品種と導入系統SY11の特徴的な位置付けを体系的に視覚化した。

第1項 日本における4つの栽培品種とSY11のヤーコン葉のポリフェノール含量

最初に、4つの異なる栽培品種(SY201、SY206、SY217およびSY237)とペルーA群の導入系統(SY11)からヤーコン葉抽出物を調製し、ヤーコン葉のポリフェノール含量を調べた。乾燥葉1g中のポリフェノール含量をクロロゲン酸相当量(CAE)として表した。その結果、2013年に採取された4品種とSY11のうち、SY237(57.0mg)の乾燥葉1g中のポリフェノール含量は、SY201(45.9mg)、SY206(33.8mg)、SY217(47.6mg)よりも有意に高く、SY11(44.9mg)とは1.27倍の差を認めた(**Table 2-1**)。2015年、2016年および2017年に採取された葉では、それぞれの年でSY201(58.2mg)、SY217(43.8mg)およびSY237(73.4mg)において高い値を認めた。それぞれの品種で得られた値は試験期間を通じて変動が大きかったものの、4年の試験期間を通して特にSY237のみがSY11よりも有意に高いポリフェノール含量を示した。ヤーコン葉には、主な既知のポリフェノールとしてクロロゲン酸、カフェ酸およびフェルラ酸などが存在している(Valentova et al., 2005; 2006)。前章では、クロロゲン酸およびカフェ酸が栽培品種SY206の葉に存在するポリフェノールであることを明らかにした。先行実験ではHPLCによる分析により、SY206の葉に没食子酸、(-)-エピカテキンおよびルチン様の溶出ピークを認めており(data not shown)、これらはヤーコン葉に存在することがすでに報告されている(de Andrade et al., 2014; Russo et al., 2015a; Marchyshyn et al., 2017)。国産ヤーコン栽培品種間ではセスキテルペンラクトン含量についても報告されているものの(Kitai et al., 2015)、ポリフェノール含量における品種と導入系統間での差異については明らかになっていない部分も多い。そのため、我が国のヤーコン栽培品種と導入系統間での機能性成分や保健機能についての研究は未だ途上にあり、さらなる調査を必要としている。

第2項 日本における4つの栽培品種とSY11のヤーコン葉の抗酸化作用

次に、ヤーコン葉抽出物を用いて様々な濃度でABTS⁺ラジカル消去活性測定を行い、最初に半数効果濃度(EC₅₀)値(μg/mL)を決定した(Table 2-2 参照)。その結果、葉の抽出物は濃度依存的な抗酸化作用を示し(data not shown)、20.6-82.4 μg/mLの範囲でEC₅₀値を得た。2013年、2015年、2016年および2017年において、ヤーコン栽培品種とSY11で比較的強い活性を示した葉抽出物のEC₅₀値は、それぞれの試験年で20.7 μg/mL (SY237)、20.6 μg/mL (SY201)、29.4 μg/mL (SY237)および21.2 μg/mL (SY237)であった。対照的に活性が低いことを表すEC₅₀の最高値82.4 μg/mLが2017年のSY201で認められた。このとき、陽性対照の抗酸化物質TroloxのEC₅₀値は8.59 μg/mLであった。葉抽出物の活性データと乾燥葉からの抽出収量をもとに、ヤーコン乾燥葉1g(D.W.)当たりのTrolox等価抗酸化能(TEAC)値を算出した。2013年のサンプルを用いたABTS⁺ラジカル消去活性測定では、SY201(268 μmol)およびSY237(280 μmol)で認めた乾燥葉1g当たりのTEAC値が、いずれもSY11で得た値(253 μmol)と同等かそれ以上であり、SY206(191 μmol)およびSY217(240 μmol)で得た値よりも有意に高い値を示した(Table 2-3)。2015年、2016年および2017年に採取された葉サンプルでは、それぞれの試験年でSY201(322 μmol)、SY217(264 μmol)およびSY237(358 μmol)で最高値が得られた。

同様に、ヤーコン葉抽出物を用いて様々な濃度でDPPHラジカル消去活性測定を行い、まずEC₅₀値(μg/mL)を決定した(Table 2-2 参照)。その結果、葉の抽出物はここでも濃度依存的な抗酸化作用を示し(data not shown)、25.6-128 μg/mLの範囲でEC₅₀値を得た。2013年、2015年、2016年および2017年において、ヤーコン栽培品種とSY11間で比較的強い活性を示した葉抽出物のEC₅₀値は、それぞれの試験年で25.6 μg/mL (SY237)、30.2 μg/mL (SY201)と同値(SY237)、52.0 μg/mL (SY217)および45.4 μg/mL (SY237)であった。対照的に、ここでも低活性を示すEC₅₀の高い値128 μg/mLが2017年のSY201で認められた。このとき、TroloxのEC₅₀値は7.32 μg/mLであった。上記と同様に、葉抽出物の活性データと乾燥葉からの抽出収量をもとに、乾燥葉1g(D.W.)当たりのTEAC値として算出した。2013年、2015年、2016年、および2017年のサンプルを用いたDPPHラジカル消去活性測定では、それぞれの試験年でSY237(193 μmol)、SY201(187 μmol)、SY217(139 μmol)およびSY237(142 μmol)においてTEAC値で高い値が得られた。

両ラジカル消去活性の測定結果に認められる特徴的な活性の強さや程度は、前項のポリフェノール含量測定で得られた結果と類似していた。本研究では、凍結乾燥後に粉砕し均質化した葉サンプルを、続くポリフェノールの定量および活性測定に用いた。そのため、おそらく様々な採取年で認めたヤーコン葉のポリフェノール含量の違いに依存して(Table 2-1 参照)、抗酸化作用の測定にお

いても類似した活性の強弱を認めたと考えられる(**Table 2-3** 参照)。また、異なる4年の試験年においてSY237のみがSY11よりも有意に高いTEAC値を示したものの、各々の品種で得られた値は変動が大きく、各試験年を通じて一貫した傾向を示すことはなかった。親株SY11より作出されたSY237は、塊根の表皮および地上の茎葉部が従来品種より濃い赤みがかった紫色になるという特徴を持っている(Sugiura et al., 2014; Sugiura and Yano, 2016)。SY11と比較して、SY237に特異的なアントシアニンなどの植物性色素が本研究で認めたような抗酸化作用の向上に寄与しているかを明らかにすることも興味深いテーマの一つである。これまでに我々はSY201 (Sugahara et al., 2015)およびSY206(第1章参照)のヤーコン葉を用いて、フリーラジカルアッセイ系および顆粒球細胞アッセイ系での抗酸化作用を報告してきた。栽培品種と導入系統間での機能的な違いをより明らかにするために、本研究で測定した以外の実験系で機能性評価を行うこともまた重要である。

第3項 日本における4つの栽培品種とSY11のヤーコン葉の糖類分解酵素阻害作用

ヤーコン葉抽出物を用いて単一濃度 1.00 mg/mL で α -アミラーゼ阻害活性を測定した(**Table 2-4** 参照)。その結果、葉の抽出物は 32.6-56.8%の範囲で阻害活性を示した。これらの活性値が 50%付近にあったため、高濃度での実験を実施しなかった。このとき、陽性対照として使用したアカルボースの IC_{50} 値は 0.0213 mg/mL であった。アカルボースは2型糖尿病の管理のための代表的な阻害剤あるいは薬剤として使用される(Chiasson et al., 2002)。葉抽出物の活性データと乾燥葉 1 g からの抽出収量をもとに、ヤーコン乾燥葉 1 g (D.W.) 当たりのアカルボース換算阻害能(AEIC)の値を算出した。2013年のサンプルを用いた α -アミラーゼ阻害活性測定では、SY201の AEIC 値(5.82 μ mol)は他の栽培品種よりもわずかに高かったものの、2015年のヤーコン葉より得た各々の値では大きな差が認められなかった(**Table 2-5**)。2016年および2017年に採取されたサンプルを用いた際には、それぞれの試験年でSY217(10.5 μ mol)およびSY206(9.89 μ mol)で高い値が認められた。

次に、ヤーコン葉抽出物を用いて様々な濃度で α -グルコシダーゼ阻害活性を測定し、 IC_{50} 値(mg/mL)または最大試験濃度における阻害活性(%)を決定した(**Table 2-4** 参照)。その結果、葉の抽出物は 1.72-2.80 mg/mL の範囲で IC_{50} 値、または 3.00 mg/mL の最大濃度で 35.5-51.2%の阻害活性を得ることができた。2016年および2017年においては、SY237の葉抽出物が他の栽培品種とSY11に比べて強い活性を表す低い IC_{50} 値を示し、それぞれの試験年で 1.72 mg/mL および 2.14 mg/mL が得られた。このとき、陽性対照として使用したアカルボースの IC_{50} 値は 0.496 mg/mL であった。上記と同様に、葉抽出物の活性データと乾

燥葉からの抽出収量をもとに、ヤーコン乾燥葉 1 g (D.W.) 当たりの AEIC 値を算出した。2013 年のサンプルを用いた α -グルコシダーゼ阻害活性測定では、SY206 の AEIC 値(56.1 μmol)が他の栽培品種よりもやや高い値を示した。2015 年、2016 年および 2017 年に採取された葉サンプルを用いた際には、それぞれの試験年で SY201 (65.0 μmol)、SY237 (76.6 μmol)および同 SY237 (79.9 μmol)で高い値を認めた。これらの 4 つの栽培品種は、それぞれの試験年において様々なレベルで酵素阻害作用を示し、2017 年の SY201 を除いては、比較対照として用いた SY11 の酵素阻害と同等以上であった。本研究では、栽培品種と導入系統間における酵素阻害成分やその比較については未だ明らかにしておらず、さらなる分析を必要とする。過去の報告によると、ヤーコン葉に存在する特定のカフェオイルキナ酸誘導体などの成分が、 α -アミラーゼ(Narita and Inouye, 2009; Oboh et al., 2015)および α -グルコシダーゼに対する阻害活性に寄与している可能性がある(Terada et al., 2003; 2006)。ヤーコン葉のセスキテルペンラクトンエンヒドリンおよびスマランサジテルペン酸もまた酵素阻害活性に貢献しうる成分である(Honoré et al., 2015)。興味深いことに、本研究で得られたヤーコン葉の α -グルコシダーゼ阻害活性の AEIC 値(45.2-79.9 mol)は、以前報告された 27 種類の伝統的な薬用植物による調査結果(0.5-31.6 μmol) (Feng et al., 2013)よりも高く、強い阻害作用を示していた。

第 4 項 日本における 4 つの栽培品種と SY11 のヤーコン葉の機能性データを用いた多変量解析

本学で栽培された 4 つのヤーコン栽培品種と SY11 の葉を用いて 4 年にわたる調査で得られた上述の測定データを用いて多変量解析を行い、個々の値を包括的に捉えるべく、特徴的な位置付けと可視化を試みた。最初に相関行列に基づいて測定データを標準化し、主成分分析(PCA)を実施した。まず個々の栽培品種および SY11 の 4 年分の平均データを用意し、PCA による解析を行った。その結果、最初の 2 つの主成分(PCs)は、それぞれ横 x 軸に相当する PC1 が 75.6% と縦 y 軸に相当する PC2 が 22.1% から成る合計 97.7% の初期データ変動率を表すことが推定された(Figure 2-1A)。x 軸を表す PC1 の負荷量は恐らくポリフェノール含量、抗酸化作用および α -グルコシダーゼ阻害活性との強い正の相関が要因となりえたものの、y 軸を表す PC2 の負荷量は α -アミラーゼ阻害と関連づけられる(Figure 2-2)。階層クラスター分析(HCA)を行った結果、得られた樹形図上で強い相関性と高い類似性(近距離として定義)に起因する 3 つの独立したクラスターの存在を認めた(Figure 2-1B)。PCA における位置付けを可視化するべく、樹形図に従って(Figure 2-1B 参照)、SY201 と SY11、SY217 と SY206、そして SY237 のみを単独とする独立したクラスターに分類した(Figure 2-1A 参照)。比較的低いポリフェノール含量、低い抗酸化作用および低い α -グルコシダ

一ゼ阻害活性を有する SY11 と SY201 が PC1 軸の負の位置にプロットされ、すべてのパラメーターに対して比較的高い値を持つ SY237 が正の位置にプロットされた。これまでの海外の報告では、各種のヤーコン在来種におけるポリフェノール含量の測定値と *in vitro* 生物活性との間に(Russo et al., 2015b)、あるいは起源を異とするヤーコンとそのポリフェノールや活性との間に幾分かの正の相関性が認められている(Lachman et al., 2007)。前章において、SY206 のヤーコン葉のポリフェノール含量は、採取した時期や年の違いにより変動する可能性があることを示したため、ヤーコン栽培品種の特徴的な位置付けが年次変動によりどの程度影響を受けているのかを調べることも重要である。次に、個々の品種または SY11 の採取年ごとの全データを用いて新たに PCA 分析を行い、散布図を作成した(Figure 2-1C)。ここで x 軸を表す PC1 の負荷量はポリフェノール含量および抗酸化作用との強い正の相関が要因となりえたものの、y 軸を表す PC2 の負荷量は α -アミラーゼ阻害および α -グルコシダーゼ阻害活性と関連づけられる(Figure 2-3)。その結果、特に SY11 は、x 軸と y 軸の交わる中心に近い小さな狭い円内に配置され、他の栽培品種はより大きな円内に配置された。このことは SY11 が機能性データにおいて年次変動幅が小さいことを含意している。その後、それらのデータプロットについて、採取年ごとに円内に配置し視覚化を試みた(Figure 2-1D)。興味深いことに、2013 年と 2015 年のデータは y 軸のより低い場所に位置し、2016 年と 2017 年のデータはより高い場所に位置していた。また、2015 年と 2017 年では栽培品種間での機能性データにおける大きな差が広い楕円として観察された。

上記で得られた結果と、個々のヤーコン栽培品種の遺伝的な背景や繁殖特性との間における関連性の有無を考察することも重要である。SY11 は生産性が安定していることから、日本で最初に導入され普及したペルー A 群系統の 1 つである(Sugiura, 2016)。そのため、SY11 は国内で新品種を作出する際の親系統として使用されている。SY11 の塊根では表皮の裂開が頻繁に発生するため、SY11 に近い別のペルー A 群系統とボリビア系統から、表皮の裂開が少ない特性を持つ SY201 が育種ならびに選抜された(Sugiura et al., 2007)。SY206 と SY217 は、国際バレイショセンターに由来し表現形質が近い系統から育種選抜されており、なかでも SY206 は安定多収、良好な貯蔵性、および塊根内部が白色である特性、一方で SY217 も安定多収、高糖度、および塊根内部が透明がかったオレンジ色である特性を有する(Fujino et al., 2008)。SY237 は、SY201 と SY11 の遺伝的背景を持ち、塊根表皮の裂開が少なく、表皮の色が濃く赤みがかった紫色であること、収量性も高く地上部の生育も良好であるなどの特徴を有している(Sugiura et al., 2014; Sugiura and Yano, 2016)。本研究では、各々の栽培品種の機能面での類似性や差異について未だはっきりとした結果が得られていない。しかしながら、異なる 4 調査年からの機能性データの平均値を用いた多変量解析により、Figure 2-1A および 1B に示すように、ヤーコンの遺伝的背景による各品種や導

入系統の栽培特性などの差異や類似性が今回の葉の機能性データの特徴とも関連付けられる部分が見受けられたため、端的に示されている可能性がある。海外での報告例にもあるように(Lachman et al., 2007)、各々のヤーコン品種および系統の遺伝子型の相同性を解析することにより、遺伝的背景や機能性との関連性を検証することも重要であると考えられる(Svobodova et al., 2013; Ziarovska et al., 2019)。

ヤーコン地上部と塊根の収量を新鮮重量(F.W.)として **Table 2-6** にまとめた。SY206 と SY237 は他よりも比較的塊根重量が高く、試験年を通じて塊根の肥大も良く高い収穫量を示している。その際、2015年と2017年の各品種およびSY11の塊根収量は、2017年のSY201のみを除き、他の年よりも高い傾向にあった。このことは、ヤーコンの塊根の成長にとって栽培環境が良好であったことを意味している。おそらく、2015年と2017年の栽培試験を行った地区で観測された夏から秋にかけての気温などの環境要因が(気象庁 HP、2020年)、品種と導入系統間の機能性の測定データに見られる差異を生じたり、良好な生育を促した可能性が考えられる。一方、2013年と2016年の夏から秋にかけては高温環境下にあり(**Table 2-7**)、品種と導入系統間での機能性の違いも小さく、生育不良が生じたと考えられる。試験地区における2013年の7月と8月の月別平均気温はそれぞれ24.7°Cと24.9°Cであり、2016年の平均気温は24.5°Cと24.7°Cであった。これらは、基準温度として用いられる1981年から2010年の平年値にあたる7月の23.6°Cと8月の23.9°Cをやや上回る高温環境にあった。両年の9月(2013年の20.7°Cと2016年の22.1°C)および10月(2013年の16.1°Cと2016年17.9°C)の平均気温もまた、平年値(9月の20.5°Cと10月の14.6°C)よりも比較的高い傾向にあった。対照的に2015年では、品種と導入系統間で機能性データの差異も大きく塊根の生育肥大も良好であり、7月から10月にかけて観測された月平均気温(それぞれ23.0°C、23.6°C、19.6°Cおよび13.8°C)は平年値(それぞれ23.6°C、23.9°C、20.5°Cおよび14.6°C)よりも低温環境にあった。2017年の場合には、夏季7月の25.0°Cと8月の24.9°Cが平年値よりも高かったにも関わらず、秋季9月の19.6°Cと10月の13.8°Cは、順当に温度が平年値にまで下がっていた。

SY206 および SY237 は比較的塊根の形状も良好で、より多収性である特徴を持っている(Fujino et al., 2008; Sugiura et al., 2014; Sugiura and Yano, 2016)。日本の九州阿蘇地域で得られた我々の結果もまたこれを支持するものであった。SY206 と SY237 の塊根は肥大時期が遅い可能性があり、これらの品種は夏から秋にかけての高温ストレスに対する耐暑性が高いことが考えられる。これまでに、サツマイモの葉のポリフェノール含量の変動が、栽培環境のうち日照時間よりも特に外気温の影響を受ける可能性が報告されている(Kobayashi et al., 2019)。そこでは低温度もまたストレスとして働き、葉のポリフェノール含量を高い値へと導く可能性が指摘されている。一方、本研究において、2017年

の SY201 の葉においてのみポリフェノール含量や抗酸化作用などの機能性パラメーターが他の品種と導入系統よりも低かった理由は未だ不明のままである。SY201 の塊根収量が少なかったため、当該年の生殖成長が遅かったことが遠因であると思われる。2007 年から 2009 年の期間に国内の複数の地区で試験栽培を行った過去の報告では、SY201 が SY11 よりも生育が良好で安定して高い塊根収量を得ている(Sugiura et al., 2007)。逆に我々の結果では、SY201 が SY11 よりも生育が不調で塊根収量も低い傾向にあった。そのため、本研究で得られたデータを使用した多変量解析の結果が、この試験地域に特有である可能性についても議論の余地があるかもしれない。

多変量解析は標的とする変数により類似性や距離をもとに関係性を決定づけるための有益な評価ツールであり、海外でもさまざまなヤーコンの在来種や各系統間における検証が行われている(Lachman et al., 2007; Russo et al., 2015b)。複数年にわたり試験調査を行って得られるデータは、単一年で得た比較データよりも、多変量解析を介してより頑強な位置関係を描写できる可能性がある。様々なヤーコン栽培品種と SY11 の特性評価を継続し長期的な調査を行うこと、さらに栽培の地域差を比較していくことも重要であると考えられる。環境要因が植物体の生育に影響を及ぼすことを考慮すると、気温だけでなく日照や降水量などの各種の気象条件もまた個々の品種と導入系統中の有効成分の含量や機能性に影響を及ぼす可能性がある。

第4節 小括

本学圃場において 2013 年、2015 年、2016 年および 2017 年にわたり試験栽培された 4 品種と国内における標準系統として用いられる導入時の SY11 のヤーコン葉に機能的な差異が認められるかについて検証を行い、葉のポリフェノール含量と抗酸化作用は、SY11 よりも「アンデスの乙女」(SY237)で高いこと、しかしながらそれぞれの栽培品種で得られた測定値は試験期間を通して変動が大きく一貫性が得られにくいことを明らかにした。次に、糖類分解酵素阻害作用を調べた際には、試験期間を通して変動が大きかったものの、少なくとも SY237 を含む 3 つの栽培品種が SY11 と同等かそれ以上の α -グルコシダーゼ阻害を示した。さらに、得られた 4 年分の機能性の測定データを用いて多変量解析を行い、これらヤーコン栽培品種と SY11 の特徴的な位置付けを体系的に視覚化することができた。そこでは SY237 が SY11 よりも優れた品種となりうることを示された。しかしながら本結果は、限定的な試験区や測定データによるため部分的な解釈となる可能性があり、年次変動の影響が大きいことにも留意する必要がある。本研究で得られた機能性データは圃場での栽培によるばらつきが大きかったため、今後は環境要因が制御された人工気象器やポットでのハ

ウス栽培などを行い、明瞭な機能性や生理学的な差異を品種および導入系統間で明らかにしていくことが重要である。機能性食品素材として有望な我が国のヤーコン栽培品種を擁立していくためにも、今後は葉に含まれるポリフェノールの組成分析、細胞レベルでの抗酸化作用、*in vivo*での血糖上昇抑制作用などについて、SY237を含むヤーコン栽培品種およびSY11間で引き続き比較検証を行っていく必要がある。

第5節 添付図表等

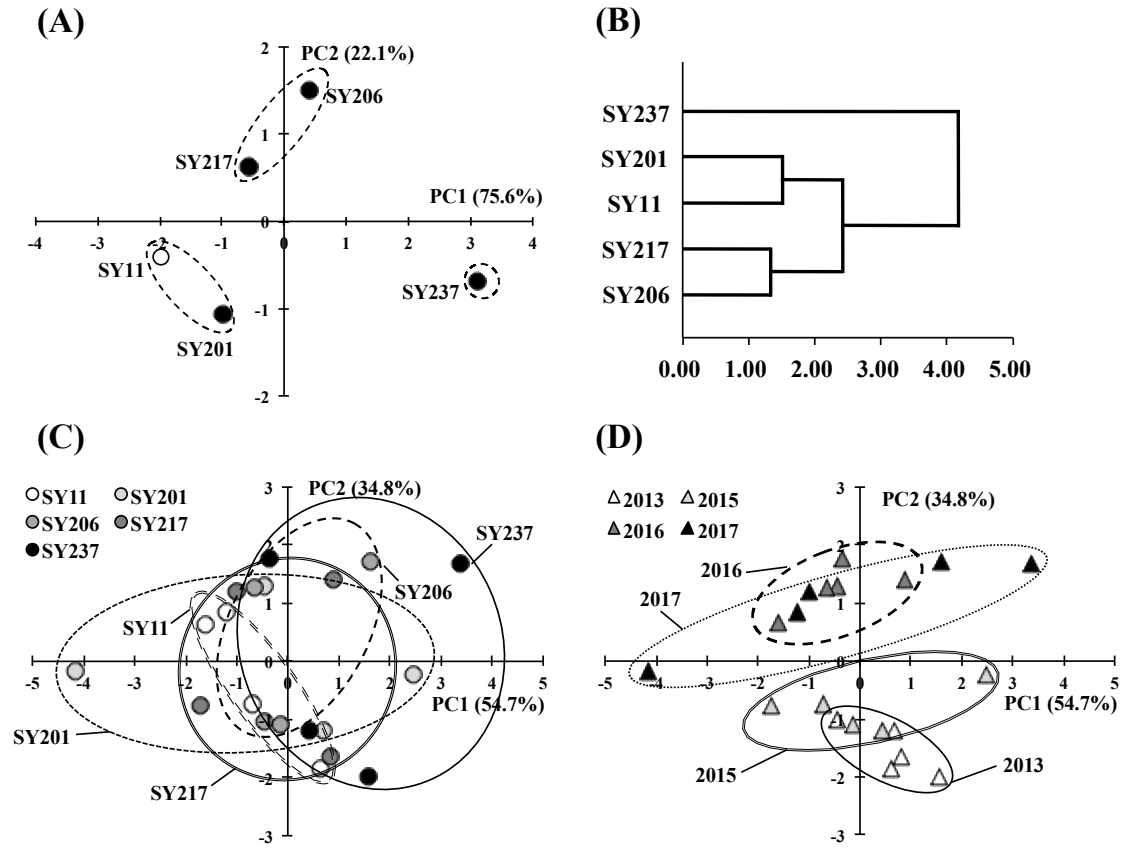


Figure 2-1. Multivariate analysis of the data obtained for total polyphenol content, antioxidant activity, and carbohydrate-hydrolyzing enzyme inhibition of yacon leaves among four different cultivars and a Peru A line collected in four different years.

Yacon leaves from four different cultivars (*'Sarada otome'* (SY201), *'Andesu no yuki'* (SY206), *'Sarada okame'* (SY217), and *'Andesu no otome'* (SY237) and a Peru A line (SY11) collected in November of four different years (2013, 2015, 2016, and 2017) were used in this study. PCA (A) and HCA (B) were conducted to visualize the data obtained from the different cultivars plus SY11. Additional PCAs were performed to visualize the scattered plots at different cultivars plus SY11 including four different years (C) and at four different years including four cultivars plus SY11 (D). Circles (or dot circles) in the figures indicate clusters. PCA; principal component analysis, HCA; hierarchical cluster analysis.

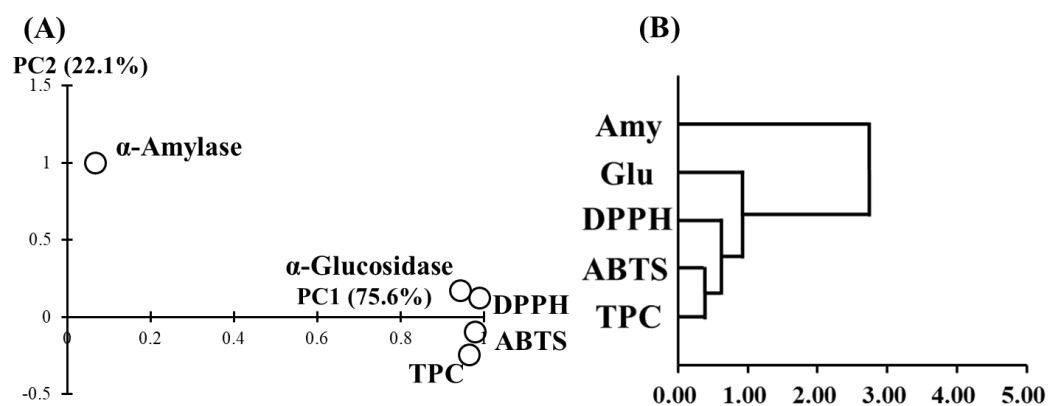


Figure 2-2. Multivariate analysis of the averaged data obtained for a PCA loading plot with total polyphenol content, antioxidant activity, and carbohydrate-hydrolyzing enzyme inhibition of yacon leaves among four different cultivars and a Peru A line.

Yacon leaves from four different cultivars (*'Sarada otome'* (SY201), *'Andesu no yuki'* (SY206), *'Sarada okame'* (SY217), and *'Andesu no otome'* (SY237) and a Peru A line (SY11) collected in November of four different years (2013, 2015, 2016, and 2017) were used in this study. Data from yacon leaves collected in four different years were averaged for following analysis. PCA (A) were first conducted to visualize the PCA loading plots to estimate their PCA scores in PC1 and PC2 axes, also shown as PC1 and PC2 in **Figures 2-1A**. HCA (B) for the PCA loading parameters was next performed. PCA; principal component analysis, HCA; hierarchical cluster analysis.

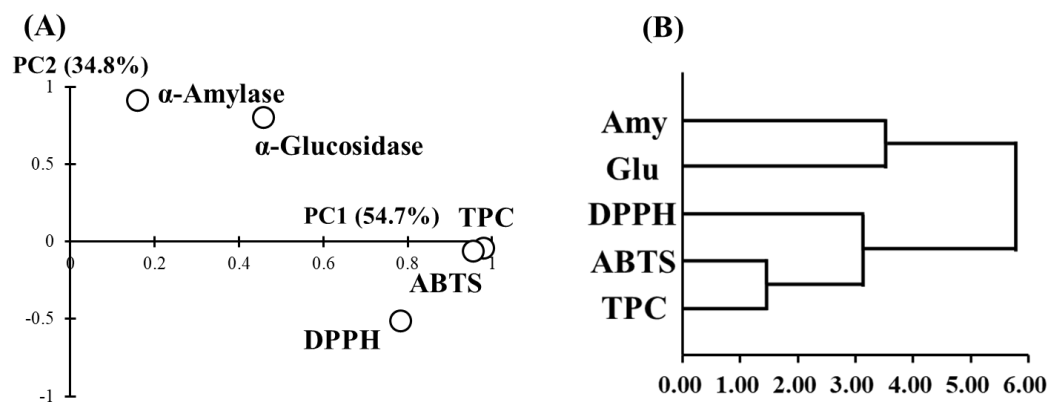


Figure 2-3. Multivariate analysis of whole data obtained for a PCA loading plot with total polyphenol content, antioxidant activity, and carbohydrate-hydrolyzing enzyme inhibition of yacon leaves among four different cultivars and a Peru A line.

Yacon leaves from four different cultivars (*'Sarada otome'* (SY201), *'Andesu no yuki'* (SY206), *'Sarada okame'* (SY217), and *'Andesu no otome'* (SY237) and a Peru A line (SY11) collected in November of four different years (2013, 2015, 2016, and 2017) were used in this study. Whole data from yacon leaves collected in four different years were used for following analysis. PCA (A) were first conducted to visualize the PCA loading plots to estimate their PCA scores in PC1 and PC2 axes, also shown as PC1 and PC2 axes in **Figures 2-1C** and **2-1D**. HCA (B) for the PCA loading parameters was next performed. PCA; principal component analysis, HCA; hierarchical cluster analysis.

Table 2-1. Total polyphenol content in yacon leaves among four different domestic cultivars and a Peru A line collected in four different years*

Years	SY201	SY206	SY217	SY237	SY11
	TPC (mg CAE / g D.W.)**				
2013	45.9±2.6 ^{a,A} (1.02)	33.8±1.8 ^{b,A} (0.75)	47.6±1.7 ^{a,A} (1.06)	57.0±1.3 ^{c,A} (1.27)	44.9±3.4 ^{a,A} (1.00)
2015	58.2±3.1 ^{a,B} (1.74)	36.9±1.3 ^{bc,A} (1.10)	24.5±1.6 ^{d,B} (0.73)	40.7±1.6 ^{b,B} (1.22)	33.4±1.5 ^{c,B} (1.00)
2016	34.0±1.8 ^{a,C} (1.39)	28.4±2.2 ^{b,B} (1.16)	43.8±0.8 ^{c,C} (1.80)	34.4±0.8 ^{a,C} (1.41)	24.4±1.0 ^{d,C} (1.00)
2017	9.68±0.33 ^{a,D} (0.32)	52.1±2.1 ^{b,C} (1.74)	29.8±1.0 ^{c,D} (0.99)	73.4±1.9 ^{d,D} (2.45)	30.0±0.7 ^{c,B} (1.00)

* Yacon leaves from four different cultivars, ‘*Sarada otome*’ (SY201), ‘*Andesu no yuki*’ (SY206), ‘*Sarada okame*’ (SY217), and ‘*Andesu no otome*’ (SY237), and a Peru A line (SY11) collected in November of four different years (2013, 2015, 2016, and 2017) were used in this study. Several leaves from different plants were sampled at the second position from the top of plants, and then lyophilized, crushed, and pooled for investigation (*see* the Materials and Methods section).

** Data shown represent mean ± SD from four independent experiments. Tukey–Kramer’s test was conducted for the multiple comparison; values not sharing a common superscript letter in small capital (or large capital) are considered significantly different at $P < 0.05$ among individual cultivars (or individual years, respectively). Data in parentheses indicate the relative amounts of TPC in individual cultivars vs. SY11 (1.00) at the same year. TPC; total polyphenol content, CAE; chlorogenic acid equivalent, D.W.; dry weight of sample.

Table 2-2. Antioxidant activity of the extracts prepared from yacon leaves among four different domestic cultivars and a Peru A line collected in four different years*

	SY201	SY206	SY217	SY237	SY11	Trolox
	EC ₅₀ value (µg extract / mL) in ABTS ⁺ radical scavenging assay**					EC ₅₀ (µg / mL)
2013	22.2±1.3	30.9±0.2	26.2±0.5	20.7±0.4	22.2±0.5	8.59±0.15
2015	20.6±0.3	27.2±0.4	42.9±0.7	24.2±0.5	34.7±1.0	
2016	38.9±1.0	42.0±0.6	32.2±0.2	29.4±0.2	37.5±0.2	
2017	82.4±0.8	26.7±0.6	41.7±0.6	21.2±0.4	41.5±0.3	
	EC ₅₀ value (µg extract / mL) in DPPH radical scavenging assay**					EC ₅₀ (µg / mL)
2013	31.8±0.7	32.7±0.2	29.1±0.3	25.6±0.2	26.8±0.2	7.32±0.08
2015	30.2±0.8	39.7±0.3	78.4±1.1	30.2±0.7	61.8±1.0	
2016	55.1±0.3	53.4±0.3	52.0±1.8	52.6±0.8	68.6±0.6	
2017	128±5	54.0±1.2	58.6±0.7	45.4±1.3	54.3±0.3	

* Yacon leaves from four different cultivars, ‘*Sarada otome*’ (SY201), ‘*Andesu no yuki*’ (SY206), ‘*Sarada okame*’ (SY217), and ‘*Andesu no otome*’ (SY237), and a Peru A line (SY11) collected in November of four different years (2013, 2015, 2016, and 2017) were used in this study. Several leaves from different plants were sampled at the second position from the top of plants, and then lyophilized, crushed, and pooled. The leaves were extracted with 50% methanol, then the supernatant was lyophilized, reconstituted in 50% ethanol for investigation (*see the Materials and Methods section*).

** Data shown represent mean ± SD from four independent experiments. D.W.; dry weight of sample, ABTS⁺; 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation, DPPH; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, EC₅₀; half maximal effective concentration.

Table 2-3. Antioxidant activity of yacon leaves among four different domestic cultivars and a Peru A line collected in four different years*

	SY201	SY206	SY217	SY237	SY11
	TEAC value ($\mu\text{mol TE} / \text{g D.W.}$) in ABTS ⁺ radical scavenging assay**				
2013	268 \pm 17 ^{ab,A} (1.06)	191 \pm 1 ^{c,A} (0.75)	240 \pm 5 ^{d,A} (0.95)	280 \pm 5 ^{a,A} (1.11)	253 \pm 5 ^{bd,A} (1.00)
2015	322 \pm 5 ^{a,B} (1.35)	245 \pm 4 ^{bc,B} (1.03)	199 \pm 3 ^{d,B} (0.84)	250 \pm 5 ^{b,B} (1.05)	238 \pm 7 ^{c,B} (1.00)
2016	196 \pm 5 ^{ab,C} (1.03)	185 \pm 3 ^{c,A} (0.97)	264 \pm 1 ^{d,C} (1.38)	200 \pm 1 ^{a,C} (1.05)	191 \pm 1 ^{bc,C} (1.00)
2017	68.7 \pm 0.7 ^{a,D} (0.42)	301 \pm 7 ^{b,C} (1.86)	171 \pm 3 ^{c,D} (1.06)	358 \pm 7 ^{d,D} (2.21)	162 \pm 1 ^{c,D} (1.00)
	TEAC value ($\mu\text{mol TE} / \text{g D.W.}$) in DPPH radical scavenging assay**				
2013	159 \pm 3 ^{a,A} (0.89)	154 \pm 1 ^{b,A} (0.86)	184 \pm 2 ^{c,A} (1.03)	193 \pm 2 ^{d,A} (1.08)	179 \pm 1 ^{e,A} (1.00)
2015	187 \pm 5 ^{a,B} (1.65)	143 \pm 1 ^{b,B} (1.27)	92.9 \pm 1.3 ^{c,B} (0.82)	171 \pm 4 ^{d,B} (1.51)	113 \pm 2 ^{e,B} (1.00)
2016	118 \pm 1 ^{a,C} (1.33)	124 \pm 1 ^{b,C} (1.40)	139 \pm 5 ^{c,C} (1.57)	95.1 \pm 1.4 ^{d,C} (1.07)	88.7 \pm 0.8 ^{e,C} (1.00)
2017	37.9 \pm 1.4 ^{a,D} (0.36)	127 \pm 3 ^{b,C} (1.21)	104 \pm 1 ^{c,D} (0.99)	142 \pm 4 ^{d,D} (1.35)	105 \pm 1 ^{c,D} (1.00)

* Yacon leaves from four different cultivars, ‘*Sarada otome*’ (SY201), ‘*Andesu no yuki*’ (SY206), ‘*Sarada okame*’ (SY217), and ‘*Andesu no otome*’ (SY237), and a Peru A line (SY11) collected in November of four different years (2013, 2015, 2016, and 2017) were used in this study. Several leaves from different plants were sampled at the second position from the top of plants, and then lyophilized, crushed, and pooled for investigation (*see* the Materials and Methods section).

** Data shown represent mean \pm SD from four independent experiments. Tukey–Kramer’s test was conducted for the multiple comparison; values not sharing a common superscript letter in small capital (or large capital) are considered significantly different at $P < 0.05$ among individual cultivars (or individual years, respectively). Data in parentheses indicate the relative TEAC values for individual cultivars vs. SY11 (1.00) at the same year. TEAC; trolox equivalent antioxidant capacity, TE; trolox equivalent, D.W.; dry weight of sample, ABTS⁺; 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation, DPPH; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.

Table 2-4. Carbohydrate-hydrolyzing enzyme inhibition of the extracts prepared from yacon leaves among four different domestic cultivars and a Peru A line collected in four different years*

	SY201	SY206	SY217	SY237	SY11	Acarbose
	Activity (%) at 1.00 mg leaf extract / mL in α -amylase inhibition assay**					IC ₅₀ (mg / mL)
2013	45.3±1.3	39.5±1.2	37.0±1.8	40.3±3.0	42.2±0.5	21.3±2.5
2015	48.3±2.6	42.1±0.4	32.6±4.1	48.6±1.4	36.4±2.4	
2016	53.4±4.0	50.7±2.3	52.5±1.5	56.8±1.8	53.0±2.8	
2017	40.6±2.5	52.4±1.9	50.2±2.4	50.5±3.1	52.3±2.0	
	IC ₅₀ value (mg leaf extract / mL) in α -glucosidase inhibition assay**					IC ₅₀ (mg / mL)
2013	2.69±0.08	> 3.00 (Max 49.8±2.0%)	2.69±0.07	2.73±0.13	2.75±0.06	0.496±0.032
2015	> 3.00 (Max 51.2±1.0%)	> 3.00 (Max 39.5±1.4%)	> 3.00 (Max 35.5±0.4%)	> 3.00 (Max 43.0±2.1%)	> 3.00 (Max 35.7±2.0%)	
2016	2.80±0.04	2.74±0.05	> 3.00 (Max 45.4±1.1%)	1.72±0.06	> 3.00 (Max 42.9±1.1%)	
2017	2.77±0.02	> 3.00 (Max 48.2±1.0%)	2.49±0.04	2.14±0.17	> 3.00 (Max 46.7±1.0%)	

* Yacon leaves from four different cultivars, ‘*Sarada otome*’ (SY201), ‘*Andesu no yuki*’ (SY206), ‘*Sarada okame*’ (SY217), and ‘*Andesu no otome*’ (SY237), and a Peru A line (SY11) collected in November of four different years (2013, 2015, 2016, and 2017) were used in this study. Several leaves from different plants were sampled at the second position from the top of plants, and then lyophilized, crushed, and pooled. The leaves were extracted with 50% methanol, then the supernatant was lyophilized, reconstituted in 50% ethanol for investigation (*see* the Materials and Methods section).

** Data shown represent mean ± SD from three (in α -amylase assay) or four independent experiments (in α -glucosidase assay). Data in parentheses indicate activity (%) obtained at 3.00 mg/mL of the maximum concentration. AEIC; acarbose equivalent inhibition capacity, AE; acarbose equivalent, D.W.; dry weight of sample, IC₅₀; half maximal inhibitory concentration.

Table 2-5. Carbohydrate-hydrolyzing enzyme inhibition of yacon leaves among four different domestic cultivars and a Peru A line collected in four different years*

	SY201	SY206	SY217	SY237	SY11
AEIC value ($\mu\text{mol AE} / \text{g D.W.}$) in α -amylase inhibition assay**					
2013	5.82 \pm 0.19 ^{a,AC} (1.15)	4.89 \pm 0.19 ^{b,A} (0.97)	4.79 \pm 0.30 ^{b,A} (0.95)	4.93 \pm 0.46 ^{b,A} (0.97)	5.06 \pm 0.08 ^{b,A} (1.00)
2015	7.04 \pm 0.45 ^{a,A} (1.14)	6.00 \pm 0.06 ^{ab,B} (0.97)	5.55 \pm 0.93 ^{b,A} (0.90)	6.48 \pm 0.22 ^{ab,B} (1.05)	6.17 \pm 0.53 ^{ab,B} (1.00)
2016	9.58 \pm 0.79 ^{ab,B} (1.08)	9.23 \pm 0.46 ^{abc,C} (1.04)	10.5 \pm 0.3 ^{b,B} (1.18)	7.90 \pm 0.26 ^{cd,C} (0.89)	8.90 \pm 0.52 ^{ad,C} (1.00)
2017	5.27 \pm 0.36 ^{a,C} (0.64)	9.89 \pm 0.38 ^{b,C} (1.20)	8.39 \pm 0.44 ^{c,C} (1.01)	8.98 \pm 0.59 ^{bc,C} (1.09)	8.27 \pm 0.35 ^{c,C} (1.00)
AEIC value ($\mu\text{mol AE} / \text{g D.W.}$) in α -glucosidase inhibition assay**					
2013	49.5 \pm 1.4 ^{a,A} (1.08)	56.1 \pm 2.8 ^{b,A} (1.22)	52.3 \pm 1.4 ^{ab,A} (1.14)	47.7 \pm 2.2 ^{a,A} (1.04)	45.9 \pm 0.9 ^{a,A} (1.00)
2015	65.0 \pm 1.6 ^{a,B} (1.40)	46.6 \pm 2.2 ^{b,B} (1.00)	45.2 \pm 1.5 ^{b,B} (0.97)	47.1 \pm 2.3 ^{b,A} (1.01)	46.5 \pm 3.6 ^{b,A} (1.00)
2016	61.1 \pm 0.9 ^{a,C} (1.27)	63.5 \pm 1.0 ^{a,C} (1.31)	62.2 \pm 1.4 ^{a,C} (1.29)	76.6 \pm 2.8 ^{b,B} (1.59)	48.3 \pm 4.4 ^{c,A} (1.00)
2017	45.8 \pm 0.2 ^{a,D} (0.78)	70.1 \pm 3.0 ^{b,D} (1.20)	64.2 \pm 1.0 ^{bc,D} (1.10)	79.9 \pm 6.7 ^{d,B} (1.37)	58.4 \pm 3.8 ^{c,B} (1.00)

* Yacon leaves from four different cultivars, ‘*Sarada otome*’ (SY201), ‘*Andesu no yuki*’ (SY206), ‘*Sarada okame*’ (SY217), and ‘*Andesu no otome*’ (SY237), and a Peru A line (SY11) collected in November of four different years (2013, 2015, 2016, and 2017) were used in this study. Several leaves from different plants were sampled at the second position from the top of plants, and then lyophilized, crushed, and pooled for investigation (*see* the Materials and Methods section).

** Data shown represent mean \pm SD from three (in α -amylase assay) or four independent experiments (in α -glucosidase assay). Tukey–Kramer’s test was conducted for the multiple comparison; values not sharing a common superscript letter in small capital (or large capital) are considered significantly different at $P < 0.05$ among individual cultivars (or individual years, respectively). Data in parentheses indicate the relative AEIC values for individual cultivars vs. SY11 (1.00) at the same year. AEIC; acarbose equivalent inhibition capacity, AE; acarbose equivalent, D.W.; dry weight of sample.

Table 2-6. Yielded weight of the aerial part and tuberous roots of yacon among four different domestic cultivars and a Peru A line cultivated in four different years*

	SY201	SY206	SY217	SY237	SY11
	Aerial part (g F.W. / plant)**				
2013	981 (0.90)	761 (0.70)	938 (0.86)	1,098 (1.01)	1,087 (1.00)
2015	819 (0.85)	1,194 (1.24)	904 (0.94)	1,296 (1.34)	965 (1.00)
2016	958 (0.68)	1,252 (0.89)	947 (0.67)	1,720 (1.22)	1,410 (1.00)
2017	1,076 (0.59)	1,217 (0.67)	1,517 (0.83)	1,634 (0.89)	1,826 (1.00)
	Tuberous roots (g F.W. / plant)**				
2013	486 (1.14)	1,300 (3.06)	476 (1.12)	1,582 (3.73)	425 (1.00)
2015	776 (0.53)	2,254 (1.54)	1,477 (1.01)	1,795 (1.23)	1,460 (1.00)
2016	432 (0.61)	1,439 (2.04)	489 (0.69)	2,079 (2.95)	705 (1.00)
2017	342 (0.31)	2,537 (2.31)	1,134 (1.03)	2,435 (2.22)	1,099 (1.00)

* Yacon from four different cultivars, ‘*Sarada otome*’ (SY201), ‘*Andesu no yuki*’ (SY206), ‘*Sarada okame*’ (SY217), and ‘*Andesu no otome*’ (SY237), and a Peru A line (SY11); yield in November of four different years (2013, 2015, 2016, and 2017) were used in this study. F.W.; fresh weight.

** Data shown represent mean value from ten plants. Data in parentheses indicate the relative values for individual cultivars vs. SY11 (1.00) in the same year.

Table 2-7. Monthly temperature during experiments 2013, 2015, 2016 and 2017 in Aso-Otohome in Kumamoto, Japan.

	Temperature (°C)								
	Mar.	Apr.	May	June	<u>July</u>	<u>Aug.</u>	<u>Sept.</u>	<u>Oct.</u>	Nov.
2013	8.40	10.8	16.9	20.3	<u>24.7</u>	<u>24.9</u>	<u>20.7</u>	<u>16.1</u>	7.90
2015	7.10	13.4	17.3	19.3	<u>23.0</u>	<u>23.6</u>	<u>19.6</u>	<u>13.8</u>	12.0
2016	7.50	14.0	17.8	20.3	<u>24.5</u>	<u>24.7</u>	<u>22.1</u>	<u>17.9</u>	9.80
2017	5.40	12.8	17.0	19.5	<u>25.0</u>	<u>24.9</u>	<u>19.8</u>	<u>15.7</u>	8.10
1981-2010	6.50	11.7	16.3	20.0	23.6	23.9	20.5	14.6	8.90

Temperatures in 1981-2010 indicate the reference as their averaged data. These data were obtained from the Japan Meteorological Agency (<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>).

第3章 ヤーコン茶飲用時における中心複合計画法に基づく 応答曲面計画法を用いた熱水抽出条件の最適化

第1節 緒言

ヤーコンは南米アンデス地方原産の植物であり、過去数十年にわたり、日本を含むアジア、オセアニアおよびヨーロッパ等の各国に導入された(Ojansivu et al., 2011; Gurung et al., 2018)。ヤーコンの塊根はサツマイモのような形状をしており、甘味性の野菜として歴史的にも食されてきた。現在では国内でも地域によってはシロップ、ジュース、アイスクリーム、キャンディーおよび漬物などの加工食品として販売されている。一方、葉の一部が健康志向食品のヤーコン茶として国内でも消費されているものの、地上部の大部分は塊根収穫後の残渣となり、未利用資源のままである。ヤーコン葉は抗真菌活性(Lin et al., 2003)および抗酸化作用を有しており(Valentova et al., 2005; 2006)、ラットモデルでは血糖降下作用を示す(Aybar et al., 2001)。熊本県内で栽培および加工された国産ヤーコン葉の有益性を明らかにするために、これまでに我々は市販の熊本県産ヤーコン茶を用いて機能性評価のため一次スクリーニングを行い、マクロファージ細胞における抗炎症作用(Ueda et al., 2017a)、 α -グルコシダーゼおよび α -アミラーゼを含む消化酵素に及ぼす阻害作用(Ueda et al., 2017b)を報告してきた。さらに、同ヤーコン茶がフリーラジカルのとくに O_2 ラジカルに及ぼす抗酸化作用を明らかにしてきた(Sugahara et al., 2015)。その際には、ヤーコン茶を 90-100°C で 45 分間熱水抽出を行ったり、ヤーコン葉を 4°C で 3 日間 50% MeOH による浸漬を経て抽出物を調製して活性試験を実施してきた。そのため、通常の飲用時を想定した実用的な熱水抽出を行うことや、高い抗酸化作用およびポリフェノール含量を供給しうる最適抽出条件を調べることに関心が寄せられる。

応答曲面計画(response surface methodology; RSM)法や中心複合計画(central composite design; CCD)法は、求めたい設定条件の最適な条件を算出するための実験計画法である。RSM 法により示された実験計画を実施することにより、実測値からモデル等式が導き出される。同式を用いて測定値を予測することで連続的なデータが得られ、そこから設定条件の最適値を算出することが可能となる。近年、応答曲面計画法は食品の製造プロセスの最適化を目的に利用されている(柴田, 2013)。ラボスケールでの研究事例は、緑茶中の抗酸化作用およびエピガロカテキンガレートを効率良く抽出するために、CCD 法による RSM 法を用いてエタノール濃度 0-100%、抽出時間 3-15 分および温度 10-70°C の範囲内で条件が設定され、そのなかで最適抽出条件の推定が行われている(Kim et al., 2016)。また本手法は、再試行が容易ではないラージスケールでの工業的生産現場での条件最適化を導き出すために利用される。

本章では、通常の飲用時を想定した市販の熊本県産ヤーコン茶の実用的な熱水抽出条件を設定し、高い抗酸化作用およびポリフェノール含量を提供しうる最適抽出条件について調べることにした。抗酸化作用の測定には、DPPH ラジカル消去活性、ABTS⁺ラジカル消去活性、SOD 様活性、FRAP 活性を測定し、これらの値を応答値と定義した。抽出条件の最適化を目的に、ここでは応答値とともに CCD 法に基づく RSM 法による解析を行うことにした。本計画法は、個々または複数の独立変数によって複数要因の影響を決定付けるために利用される(Jambrak, 2011)。本研究では抽出温度を 75.0-96.0°C、抽出時間を 2.00-5.50 分に設定し、これら 2 つを独立変数とした。RSM 法による二次応答曲面モデルに基づき、最適な応答値を得るための「望ましき」値を決定した(Derringer and Suich, 1980)。

第 2 節 材料および方法

第 1 項 材料および試薬類

熊本県菊地市(日本)で栽培、加工および販売されたヤーコン茶を 2018 年 1 月に購入した。DPPH、ABTS、フェナジンメトサルフェート(PMS)、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)、NADH、トリピリジルトリアジン(TPTZ)および Trolox は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)から購入した。DMSO は Merck KGaA (Darmstadt, Germany)から購入した。フォーリンチオカルトフェノール試薬は Carlo Erba Reagents srl (Cornaredo MI, Italy)から購入した。没食子酸は Fujifilm Wako Chemicals USA, Inc. (Richmond, VA, USA)から購入した。他の薬品類については、市販されているもののうち、特級グレードのものを使用した。

第 2 項 サンプル調製

ヤーコン茶の熱水抽出液は、以下のように振とうウォーターバス中で調製した。粉碎したヤーコン茶(乾燥重量)約 1 g を 2.00-5.50 分、75.0-96.0°Cの条件のもと、コニカルビーカー内で MilliQ 水 50 mL とともに浸漬した。デジタル温度計により直接温度を計測した。Design-Expert 7.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA)の CCD 実験計画モデルにより、抽出温度 X_1 および時間 X_2 と符号付けした 13 回分の条件を **Table 3-1** に示すように計画し、それぞれの条件下で抽出を行った。得られた抽出液を 4°C で保管し、次の実験に使用した。

第3項 DPPH ラジカル消去活性の測定

DPPH ラジカル消去活性は、第1章第2節第8項の方法に基づき測定した。本章における吸光度を測定する際には、マイクロプレートリーダー(EZ Read 2000, Biochrom Ltd., Cambridge, UK)を用いた。Trolox を標準物質として使用し、得られたラジカル消去活性は、サンプル 1 mL (抽出液)当たりの Trolox 相当量 ($\mu\text{g TE}$)として表した。

第4項 ABTS⁺ラジカル消去活性の測定

ABTS⁺ラジカル消去活性は、第1章第2節第7項と同様の方法で測定した。得られたラジカル消去活性は、サンプル 1 mL (抽出液)当たりの $\mu\text{g TE}$ として表した。

第5項 O₂ラジカル消去活性(SOD 様活性)の測定

SOD 様活性は、第1章第2節第9項と同様の方法で測定した。得られた SOD 様活性は、サンプル 1 mL (抽出液)当たりの $\mu\text{g TE}$ として表した。

第6項 FRAP 活性の測定

FRAP 活性は既報に基づいて TPTZ を用いて測定した(Benzie and Strain, 1996; 1999)。希釈した抽出液(12.6 μL)に、0.3 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 3.6, 200 μL)、0.04 M HCl に溶解した 10 mM TPTZ (20 μL)および MilliQ 水に溶解した 20 mM FeCl₃ (20 μL)を含む FRAP 試薬(240 μL)を添加した。混合液(252.6 μL)は室温で 4 分間反応させた。反応液の吸光度を 593 nm で測定した。Trolox を標準物質として使用し、得られた FRAP 値はサンプル 1 mL (抽出液)当たりの $\mu\text{g TE}$ として表した。

第7項 ポリフェノール含量の測定

ポリフェノール含量は、第1章第2節第3項の方法に基づき測定した。本章では検量線作成に標準物質として没食子酸を使用した。ポリフェノール含量は、サンプル 1 mL (抽出液)当たりの μg 没食子酸相当量(GAE)として表した。図表中では TPC (total polyphenol content)を同義語として使用することとする。

第 8 項 実験計画と統計解析

実用的な熱水抽出における温度(75.0-96.0°C)と時間(2.50-5.00 分)の組み合わせについて最適化を推し量るために、ここでは CCD 法を用いた RSM 法を利用して実験計画を設定した。即ち、Table 3-1 に示すように、5 つの符号化した設定値、温度-1.41 (75.0°C)、-1 (78.0°C)、0 (86.0°C)、1 (93.0°C)、1.41 (96.0°C)、ならびに時間-1.41 (2.00 分)、-1 (2.50 分)、0 (3.75 分)、1 (5.00 分)、1.41 (5.50 分)の条件を実験計画に組み込んだ。実験計画法で定義される正方形の中心点(0,0)における抽出を 5 回繰り返した。全体で 13 回分の抽出条件を表す本実験計画では、正方形の 4 頂点およびこれらを内包する円と交差する他の 4 つの軸点を含むよう設定した。4 つの異なる抗酸化作用およびポリフェノール含量に及ぼす温度と時間を表す 2 つの独立変数の影響を、二次多項式モデルを用いて調べた。実測値と適合させ、さらなる解析に利用するための二次多項式モデルは、以前の報告に従って(Puttongsiri and Haruenkit, 2010)、次式を用いた。

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad \text{.....Eq. 1}$$

ここで、Y は予測される応答値(DPPH、FRAP、SOD、ABTS⁺、ポリフェノール)、X₁ は温度、X₂ は時間、β₀ は定数項、β₁ と β₂ は線形項、β₁₁ と β₂₂ は二次項、β₁₂ は交互作用項である。

モデルに適合させるために Design-Expert (バージョン 7.0、Stat-Ease Inc.) を使用し、RSM 法による応答曲面図を描き、「望ましさ」値を決定した。また、統計アドオンソフトウェアプログラム(Statcel 4, OMS 出版、埼玉、日本)の Pearson の相関検定を用いて、個々のパラメーター間での相関性の評価を行った。データは、単回抽出後に 3 回の測定実験から得られた平均値 ± 標準偏差として表した。

第 3 節 結果および考察

通常の飲用時を想定した市販のヤーコン茶の実用的な熱水抽出条件を設定し、高い抗酸化作用とポリフェノールを提供しうる最適抽出条件について調べるため、実測値とともに CCD 法による RSM 法を用いて解析を行った。Design-Expert ソフトウェアを使用し、「望ましさ」値を決定することで、最適条件の予測を行った。

第1項 応答変数の最適レベルの決定

実用的な抽出温度および時間の2つの独立変数について13通りの実験を行い、CCD法に基づくRSM法を実施した。各実験条件における温度(X_1)と時間(X_2)の組み合わせと、DPPH、ABTS⁺、SOD、FRAPを含む4つの異なる抗酸化作用とポリフェノール含量の実測値をTable 3-1にまとめた。通常の飲用時を想定し、75.0-96.0°Cの範囲で抽出温度と2.00-5.50分の範囲で抽出時間を設定した。その結果、特に高い温度範囲(86.0-96.0°C)で抽出を行った際には高い抗酸化作用とポリフェノール含量が得られる傾向にあり、低い温度範囲(75.0-78.0°C)ではこれらに低い値が認められた。DPPHラジカル消去活性において得られた最大値および最小値の間には1.80倍の差異を認めた。ABTS⁺ラジカル消去活性、SOD様活性、FRAP活性およびポリフェノール含量では、それぞれ最大で1.71倍、3.36倍、2.11倍および1.88倍の差異を認めた。本熱水抽出条件下で効率良く抽出できる個々のポリフェノール成分については未だ詳細な検証を行っていない。しかしながら、別ロットのヤーコン葉を用いたHPLCによる予備試験では、熱水抽出物中にカフェ酸およびクロロゲン酸様ピークの存在を確認している(data not shown)。次に、2変数間での相関性を評価するために、各々の測定値を用いて回帰分析を行った。その結果、Pearsonの相関検定により、DPPH ($r = 0.888$)、ABTS⁺ ($r = 0.628$)、SOD ($r = 0.635$)、FRAP ($r = 0.806$)、およびポリフェノール含量($r = 0.810$)の各測定値は、とくに抽出温度との間に有意な正の相関関係を示していた(Table 3-2)。また、4つの異なる抗酸化作用およびポリフェノール含量間において有意な相関性を確認できた。

中国茶の一つ白茶を用いた報告においても、抽出温度および時間がABTS⁺ラジカル消去活性、FRAP活性およびポリフェノール含量に影響を及ぼす重要な因子である(Burillo et al., 2018)。そこでは、抽出温度(70°C、80°Cおよび90°C)および抽出時間(3分および5分)が増加すると、抗酸化作用およびフェノール含量が増加する傾向を報告しているものの、80-90°Cでの抽出温度ではほとんど変化が認められていない。緑茶を用いた報告では、FRAP活性が70-90°Cの抽出から増加し、抽出時の最初の15秒間が活性の上昇に大きく寄与している(Langley, 2000)。これらの茶葉や緑茶中のポリフェノールは、抗酸化作用において重要な役割を果たすものの、活性成分の抽出は条件に大きく依存する可能性がある。RSM法を用いた実験計画により、果実からの最適なポリフェノールと抗酸化作用を提供するのに短期抽出が有効であることもまた報告されている(Belwal et al., 2016)。一方、長期抽出はポリフェノールの酸化を誘導するために好ましくないとの報告例もある(Naczki and Shahidi, 2004; Belwal et al., 2016)。

次に、抽出条件と各測定値との関係性を可視化するにあたり、ここでは分散分析と二次多項式の妥当性について調べた。Table 3-3は、符号化された2つの独立変数を表す温度と時間に対する5つの従属変数DPPH、ABTS⁺、SOD、FRAP

およびポリフェノール含量の ANOVA(分散分析)の結果を示している。**Table 3-4**には RSM 法による従属変数の予測二次多項式モデルを等式としてまとめた。分散分析表ではそれぞれの応答性を表す F 値に基づき、ヤーコン茶の抗酸化作用における関連パラメーターのうち、特に DPPH および FRAP の両モデルでは、抽出温度と時間による影響を有意に予測できることが判明した(**Table 3-3** 参照)。各検定について応答性を個々に調べた結果、抽出温度(X_1)は DPPH、ABTS⁺、SOD、FRAP およびポリフェノール含量の全てのパラメーターとの間で有意な相関関係を示すものの、抽出時間(X_2)との間には有意な相関性を得るには至らなかった。このとき、温度の二乗項(X_1^2)が ABTS⁺および FRAP に対してのみ関連付けられるものの、時間の二乗項(X_2^2)ならびに温度と時間の間における交互作用項(X_1X_2)はいずれの応答因子との間でも有意な関連性を示さなかった。注目すべき点として、それぞれの二次多項式モデルはいずれの応答変数においても不適合度(lack of fit)検定で有意性が認められないことから、これらモデルは適切であることが判明した。更に、全てのモデルの相関係数値(R^2)は 66.9-85.5% の範囲であり、分散分析では残渣誤差と純粋誤差が観察されなかったことより、これらの等式が応答の予測に使用するための適切なモデルであると判断できた。妥当性についてさらに調べるため、予測二次多項式モデルの等式に各々の条件における実測値を代入して予測値を算出してみた結果、予測値と実測値との間で極端なばらつきは認められなかった(**Figure 3-1**)。このことから、得られた二次多項式モデルの妥当性が確認できた。

Figures 3-2A から **3-2E** にかけて、それぞれ DPPH、ABTS⁺、SOD、FRAP およびポリフェノール含量と、抽出温度および時間からなる独立変数との間で可視化された応答曲面図を示した。抽出温度が上昇すると DPPH ラジカル消去活性が上昇した(**Figure 3-2A, Table 3-4 (Eq. 2)**)。抽出温度および時間のいずれかが増加しても DPPH の活性値に二次関数的な影響を認めることは無かった。本実験条件では、抽出時間よりも温度がヤーコン茶の DPPH ラジカル消去活性を上昇させるのに重要な影響を及ぼすことが確認できた。同様に抽出温度が上昇するにつれて、ABTS⁺ラジカル消去活性(**Figure 3-2B, Table 3-4 (Eq. 3)**)、SOD 様活性(**Figure 3-2C, Table 3-4 (Eq. 4)**)、FRAP 活性(**Figure 3-2D, Table 3-4 (Eq. 5)**)およびポリフェノール含量(**Figure 3-2E, Table 3-4 (Eq. 6)**)もまた上昇した。これらの抗酸化作用およびポリフェノール含量は 90-100°C 付近で最大に達する傾向が観察された。抽出温度を上昇させると、植物由来の原材料からポリフェノールの抽出効率が向上することは広く報告されている(Wang et al., 2008b; Tan et al., 2013; Belwal et al., 2016)。また、お茶ポリフェノール含量と DPPH ラジカル消去活性(Turkmen et al., 2006)および ABTS/FRAP 活性(Liu et al., 2009)の間には相関性がある。異なる条件下で調製したヤーコン茶の各抽出液における様々な抗酸化作用のデータは、抽出されてきたポリフェノール成分の抽出効率の違いにより生じた可能性がある。

第2項 抽出温度と時間の最適化

実用的な抽出温度と時間の最適化は、DPPH、ABTS⁺、SOD、FRAP およびポリフェノール含量の各応答値が最大を示す結果に近づくよう実施した。「望ましき」を表す関数値は 0 (望ましくない応答)から 1 (望ましい応答)まで変化させた。「望ましき」の値は、測定された各実測値の上限と下限に基づき、任意の尺度に当てはめて算出を行った。CCD 法を用いた RSM 法では、最適な「望ましき」を表す範囲は 0.80-0.63 であると提唱されている(Lazic, 2004; Puttongsiri and Haruenkit, 2010)。本研究で試験された各パラメーターの「望ましき」の値は 0.737-1.00 の範囲にあり、複合的な「望ましき」の値としても十分に高い 0.863 が得られた(Table 3-5)。この条件を満たす本研究の抽出時の最適温度および最適時間は、それぞれ 89.3°C および 2.50 分であることが判明した。同抽出条件における DPPH、ABTS⁺、SOD、FRAP および TPC の各予測値は、それぞれ 30.3 μg TE/mL、117 μg TE/mL、1,443 μg TE/mL、43.0 μg TE/mL および 0.634 mg GAE/mL であった。最適化された抽出条件においてはポリフェノール含量のみで「望ましき」の値が 1.00 を示した。本研究では、抽出条件の最適値を算出し決定する際に、複合的な「望ましき」の値が 0.853 から 0.863 を示す複数の候補を得ている。他の最適条件の候補については Table 3-6 に示した。その際、候補 No.1, 2 および 3 の抽出温度や時間においては大きな違いはないものの、比較的「望ましき」の値が高い候補 No.1 の条件を Table 3-5 で採用した。

これらの結果は、CCD 法を用いた RSM 法が狭い範囲の抽出温度および時間内であっても、ヤーコン茶の飲用時の実用的な最適抽出条件を決定するために適用可能なツールであることを支持している。CCD 法による RSM 法は他の研究者らによっても利用されており、植物体から効率良く生理活性成分を抽出する際の抽出条件の最適化が行われている。例えば、ローズマリーからロスマリン、カルノシン酸およびカルノソールの効率の良い最適抽出条件が 55 分間のエタノール-水抽出であること(Oliveira et al., 2016)、ヘンナ葉の高ポリフェノール回収のための最適条件が 48.07%アセトンにより 39.57°C で 73.87 分間抽出を行うこと(Uma et al., 2010)、また緑茶から効率よくエピガロカテキンガレート含量とともに抗酸化作用を得るための最適抽出条件が 57.7%のエタノールにより 70°C で 15 分間抽出を行うこと(Kim et al., 2016)などが報告されている。ヤーコン茶の最適抽出を産業へ応用し生産条件に取り入れる際には、より広範囲の抽出時間や温度を今後検討していく必要がある。

市販の熊本県産ヤーコン茶を用いた以前の研究において、我々は乾燥重量 100 g 当たりの抗酸化作用が DPPH ラジカル消去活性では 7.56 g TE、ABTS⁺ ラジカル消去活性では 10.5 g、O₂⁻ラジカル消去(SOD 様)活性では 208 g TE、ポリフェノール含量が 7.76 g CAE であることを報告した(Sugahara et al., 2015)。本章では、最適条件における茶葉の乾燥重量 100 g 当たりで算出した際の抗酸化作

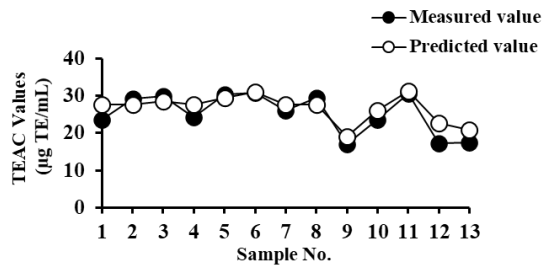
用は同 DPPH で 0.152 g TE、ABTS⁺で 0.585 g TE、SOD で 7.22 g TE、ポリフェノール含量が 3.17 g GAE と、いずれも以前の報告値より低い値を示した。これらの違いは、恐らく抽出時の条件や製品のロット等の違いによるものと考えられる。例えば、我々の以前の報告では 90-100°C で 45 分間の熱水抽出を連続して 3 回行った(Sugahara et al., 2015)。また、抽出後に得られる活性成分の組成や含量もまた抽出条件が異なると変化し得る。一方で、原料となるヤーコン葉の採取時期、栽培環境、栽培品種のほか、葉の天日乾燥と熱風乾燥など乾燥工程や加熱温度にも起因して、ポリフェノールや抗酸化作用などの機能性がロットごとに変動する可能性も十分に考えられる。これらの点を明確にするためにも更なる研究を必要とする。興味深いことに、SOD 様活性で認められた抗酸化作用は標準物質の Trolox よりも高い値を示していた。これまでに我々は市販ヤーコン茶の抗炎症作用(Ueda et al., 2017a)および糖類分解酵素阻害作用を報告してきた(Ueda et al., 2017b)。本研究ではヤーコン茶の飲用を例に食材の身近な熱水抽出条件の最適化を試みたものの、将来的にはこのような手法がヒトの健康有益性を企図した保健機能成分の効果的な抽出法の設定と確立に利用できる可能性がある。

第4節 小括

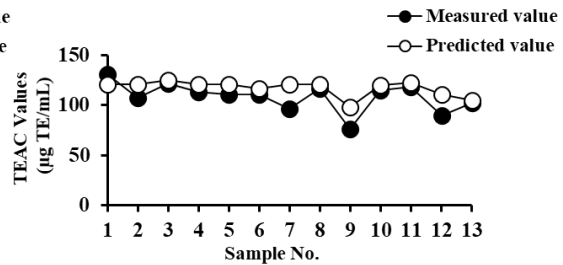
通常の飲用時を想定して市販の熊本県産ヤーコン茶の実用的な熱水抽出条件を設定し、CCD 法に基づく RSM 法による解析とともに、高い抗酸化作用とポリフェノール含量を提供しうる最適抽出条件について調べた。抽出温度を 75.0-96.0°C、抽出時間を 2.00-5.50 分と狭い範囲内に定め、これら 2 つを独立変数とし、各々の条件下の抽出液を調製後、実測値を得た。抽出条件の最適化を図ったところ、89.3°C および 2.50 分間の条件下でヤーコン茶を熱水抽出した場合には、0.863 の「望ましさ」値とともに、高い抗酸化作用とポリフェノール含量を提供できる最適条件となり得ることを見出した。CCD 法による RSM 法は、通常は大規模な工業生産現場における工程や条件の最適化を設定するための方法論として利用される。本解析法を用いることで、ヤーコン茶の飲用を例に、食材の身近な熱水抽出時の最適化を図ることができた。ヤーコン葉のポリフェノールのみならず健康有益性を企図した保健機能成分の効果的な抽出法の設定と確立のため、さらなる研究を必要とする。

第 5 節 添付図表等

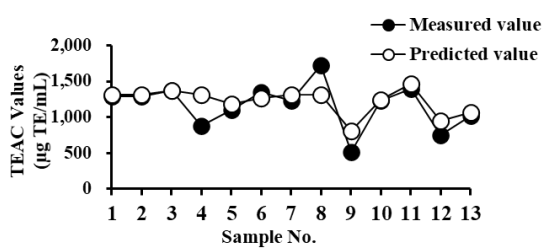
(A) DPPH radical



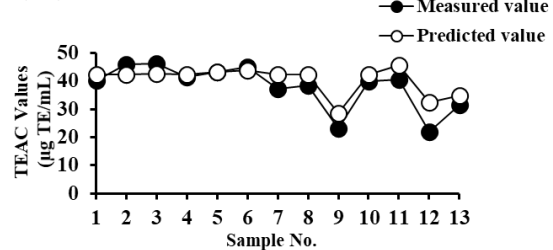
(B) ABTS⁺ radical



(C) SOD



(D) FRAP



(E) TPC

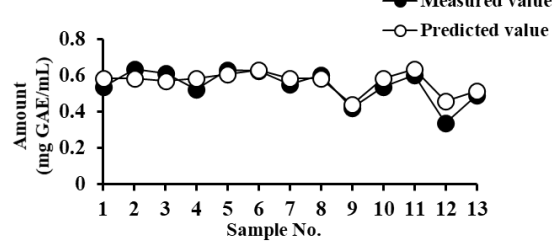
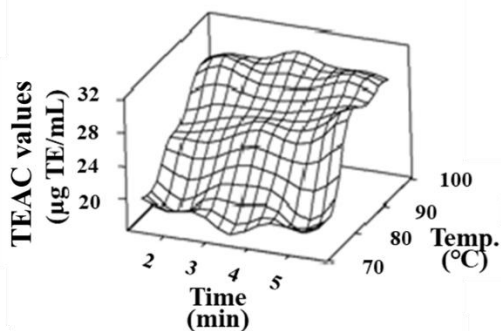
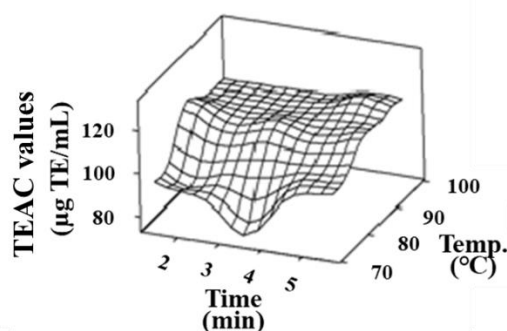


Figure 3-1. Comparison of the measured values in DPPH (A), ABTS⁺ (B), SOD (C), FRAP (D) and TPC (E), *v.s.* their predicted values using individual quadratic equation models. The quadratic models are from **Table 3-4**. Sample number corresponds to the run number appeared in **Table 3-1**.

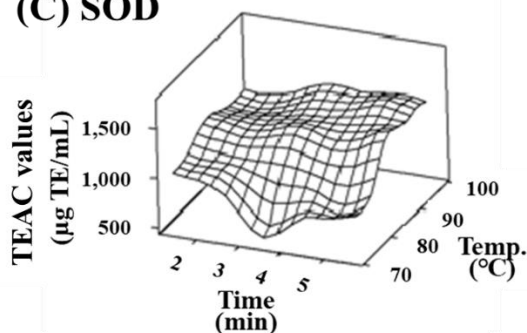
(A) DPPH radical



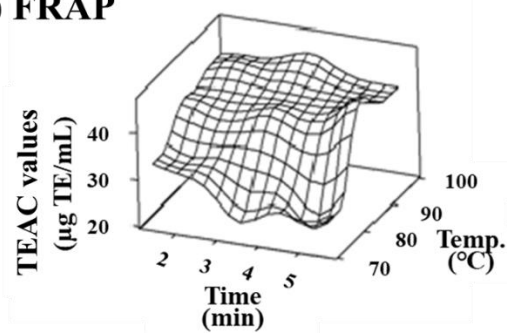
(B) ABTS⁺ radical



(C) SOD



(D) FRAP



(E) TPC

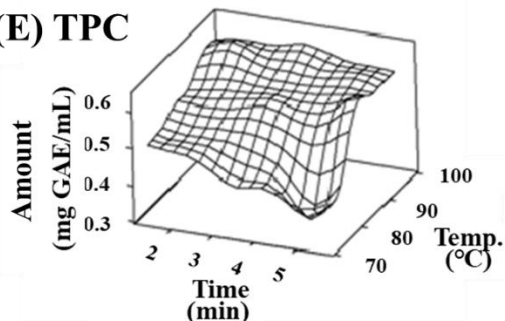


Figure 3-2. Response surface plots of extraction temperature and time on four antioxidant activities, including DPPH (A), ABTS⁺ (B), SOD (C), and FRAP (D), and TPC (E) of yacon herbal tea leaves. TE; trolox equivalent, GAE; gallic acid equivalent.

Table 3-1. Central composite design and experimental response values in the hot-water extraction of yacon herbal tea.

Run	Coded		Uncoded				Response			
	X ₁	X ₂	Temp (°C) (X ₁)	Time (min) (X ₂)	DPPH (µg TE/ mL) (Y ₁)	ABTS ⁺ (µg TE/ mL) (Y ₂)	SOD (µg TE/ mL) (Y ₃)	FRAP (µg TE/ mL) (Y ₄)	TPC (mg GAE/ mL) (Y ₅)	
1*	0	0	86.0	3.75	23.5±0.9	131±10	1,288±153	40.2±0.7	0.540±0.027	
2*	0	0	86.0	3.75	29.1±2.0	107±6	1,293±263	45.8±0.7	0.633±0.013	
3	0	1.41	86.0	5.50	29.9±1.5	122±10	1,373±199	46.1±1.6	0.611±0.051	
4*	0	0	86.0	3.75	24.3±1.1	113±15	875±205	41.4±1.6	0.523±0.026	
5	1	-1	93.0	2.50	30.3±2.8	111±6	1,098±204	43.1±0.8	0.632±0.023	
6	1.41	0	96.0	3.75	30.7±2.4	111±1	1,343±119	44.9±0.5	0.627±0.014	
7*	0	0	86.0	3.75	26.0±2.0	96.1±7.8	1,233±256	37.2±0.3	0.554±0.013	
8*	0	0	86.0	3.75	29.3±0.7	117±7	1,721±205	38.5±1.6	0.605±0.017	
9	-1.41	0	75.0	3.75	17.1±2.4	76.4±8.0	512±143	23.1±1.6	0.421±0.039	
10	0	-1.41	86.0	2.00	23.6±1.6	115±11	1,232±143	39.8±2.2	0.540±0.013	
11	1	1	93.0	5.00	30.5±1.1	118±8	1,400±182	40.4±0.4	0.602±0.034	
12	-1	1	78.0	5.00	17.3±1.6	89.6±21.9	748±212	21.8±0.4	0.336±0.008	
13	-1	-1	78.0	2.50	17.4±2.0	102±3	1,020±131	31.4±1.3	0.493±0.038	
Max.					30.7	131	1,721	46.1	0.633	
Ave.					25.3	108	1,164	38.0	0.547	
Min.					17.1	76.4	512	21.8	0.336	

*The central point of the design in a square. The five coded levels were incorporated as described (see Materials and Methods section). TE; trolox equivalent, GAE; gallic acid equivalent, Max.; maximum, Ave.; average, Min.; minimum.

Table 3-2. Correlations between the variable parameters obtained in this study.

	Correlation coefficient (<i>r</i>)				
	DPPH (μg TE/mL)	ABTS ⁺ (μg TE/mL)	SOD (μg TE/mL)	FRAP (μg TE/mL)	TPC (mg GAE/mL)
Temp (°C)	0.888***	0.628*	0.635*	0.806**	0.810***
Time (min)	0.173	0.0312	0.0741	-0.0450	-0.101
DPPH (μg TE/mL)	1.00	0.619*	0.770*	0.871***	0.920***
ABTS ⁺ (μg TE/mL)		1.00	0.744**	0.776**	0.655*
SOD (μg TE/mL)			1.00	0.708**	0.778**
FRAP (μg TE/mL)				1.00	0.927***
TPC (mg GAE/mL)					1.00

Significant at * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, or *** $P < 0.001$ using Pearson's correlation test.

Table 3-3. Analysis of variance of independent variables on the response variables for hot-water extraction of yacon herbal tea.

Source	df	<i>F</i> -value				
		DPPH	ABTS ⁺	SOD	FRAP	TPC
Model	5	8.25**	2.99	2.83	6.31**	4.46
X ₁ (Temp)	1	37.10***	8.13*	8.06*	23.86**	18.60**
X ₂ (Time)	1	1.47	0.30	0.12	0.07	0.29
X ₁ ²	1	2.68	6.05*	4.43	6.83*	2.19
X ₂ ²	1	0.04	0.08	<0.004	<0.004	0.08
X ₁ X ₂	1	<0.004	0.06	1.46	0.61	1.24
Residual Error	7	-	-	-	-	-
Lack of Fit	3	0.92	0.14	0.12	2.84	2.22
Pure Error	4	-	-	-	-	-
<i>R</i> ²	-	0.8549	0.6808	0.6689	0.8183	0.7613

Coded X₁ and X₂ indicate temperature and time, respectively. Significant at **P* < 0.05, ***P* < 0.01 or ****P* < 0.001. df; degree of freedom.

Table 3-4. Predictive models from the response surface methodology.

Dependent values	Quadratic models	Eq.
DPPH	$Y_1 = -171+4.00*X_1+0.930*X_2-0.0202*X_1^2-0.0922*X_2^2+0.00556X_1X_2$	(2)
ABTS ⁺	$Y_2 = -885+22.3*X_1+6.16*X_2-0.123*X_1^2+0.518*X_2^2-0.100*X_1X_2$	(3)
SOD	$Y_3 = -14,389+382*X_1-868*X_2-2.34*X_1^2-0.833*X_2^2+10.6*X_1X_2$	(4)
FRAP	$Y_4 = -374+9.50*X_1-11.3*X_2-0.0541*X_1^2+0.0400*X_2^2+0.128*X_1X_2$	(5)
TPC	$Y_5 = -2.35+0.0678*X_1-0.185*X_2-0.000395*X_1^2-0.00278*X_2^2+0.00235*X_1X_2$	(6)

X₁ = temperature (°C)

X₂ = time (min)

Eq.; equation.

Table 3-5. Optimization of extraction temperature and time in terms of composite properties.

Response variable	Optimization of extraction temperature and time					
	Goal	Lower	Upper	Target	Predicted responses	Desirability
DPPH ($\mu\text{g TE/mL}$)	Maximize	17.1	30.7	30.7	30.3	0.968
ABTS ⁺ ($\mu\text{g TE/mL}$)	Maximize	76.4	131	131	117	0.737
SOD ($\mu\text{g TE/mL}$)	Maximize	512	1,721	1,721	1,443	0.770
FRAP ($\mu\text{g TE/mL}$)	Maximize	21.8	46.1	46.1	43.0	0.872
TPC (mg GAE/mL)	Maximize	0.336	0.633	0.633	0.634	1.00
Extraction temperature = 89.3°C, Extraction time = 2.50 min						
Composite desirability = 0.863						

Table 3-6. Several candidates of the optimized temperature and time for extraction in terms of composite properties.

Number	Predicted responses							Desirability
	Temp (°C)	Time (min)	DPPH (µg TE/mL)	ABTS ⁺ (µg TE/mL)	SOD (µg TE/mL)	FRAP (µg TE/mL)	TPC (mg CAE/mL)	
1*	89.3	2.50	30.3	117	1,443	43.0	0.634	0.863
2	89.5	2.50	30.3	117	1,437	43.1	0.635	0.863
3	89.1	2.50	30.2	117	1,450	42.8	0.632	0.862
4	93.0	4.84	30.7	118	1,451	42.2	0.614	0.856
5	93.0	4.75	30.5	118	1,439	42.5	0.612	0.853

* Number 1 herein is the optimum condition as selected in **Table 3-5**.

総括

本論文は、試験管レベルでの初期評価アッセイ技術と多変量解析ならびに中心複合計画(CCD)法に基づく応答曲面計画(RSM)法を用いて、主に熊本県内で栽培されるヤーコンの特に未利用資源となりうる葉の加熱時のポリフェノール含量や抗酸化作用に及ぼす加熱の影響、品種と導入系統間での比較、ヤーコン茶の飲用時を想定した実用的な熱水抽出条件について調査したものである。

ヤーコンはキク科スマランサス属の一種で、南米アンデス山脈地方原産の植物である。過去数十年にわたり日本を含むアジア、オセアニアおよびヨーロッパ等に導入された(Ojansivu et al., 2011; Gurung et al., 2018)。主に塊根が食用とされるのみならず、伝統薬としても一部で利用される。ペルー由来のペルーA 群系統(SY11 を含む)が 1984 年にニュージーランドを経由して我が国に導入されて以来(Sugiura et al., 2014)、現在までに「サラダオトメ」(SY201) (Sugiura et al., 2007)、「アンデスの雪」(SY206) (Fujino et al., 2008)、「サラダオカメ」(SY217) (Fujino et al., 2008)および「アンデスの乙女」(SY237) (Sugiura et al., 2014)が日本において品種登録されている。SY11 は国内で育種および栽培研究のために選別され普及した導入時のペルーA 郡系統(導入系統)の 1 つであり、国内における標準系統として用いられる。ヤーコンの塊根に豊富に含まれるフラクトオリゴ糖に注目した研究が推進されてきたものの、葉にもまた抗酸化作用、血糖降下作用、抗真菌活性および抗癌活性などの機能性を有する成分やポリフェノール等の存在が報告されており、葉の有効利用が期待される。大部分の茎葉部が塊根収穫後の未利用資源となる一方で、地域によっては葉を加工利用したヤーコン茶が製品化ならびに消費されている。国内への導入歴が浅いことに加えて、国産ヤーコン登録品種の葉に注目した機能性や機能性成分、さらには加工処理時の詳細な研究や解析は未だ途上にある。健康志向食品に利用されるヤーコン葉に注目し、抗酸化作用と加熱処理による影響、品種と導入系統間での抗酸化作用などの比較、熱水抽出条件について検証や解析を行うことは、食品科学的な見地からも重要である。

本研究では国産ヤーコンの葉を有望な機能性食品素材として確立することを目標に、葉のポリフェノール含量と抗酸化作用に及ぼす加熱処理の影響を調べた。次に 4 年にわたり同一環境下で栽培され、採取されたヤーコン葉を用いて、登録品種 SY11 との間で抗酸化作用の比較と多変量解析を行った。さらに、ヤーコン茶飲用時を想定して CCD 法に基づく RSM 法を用いた熱水抽出条件の最適化について調べた。

第 1 章では、熊本県阿蘇郡南阿蘇村に位置する本学圃場で栽培されたヤーコン栽培品種 SY206 の葉を加熱すると、非加熱時の葉と比べてポリフェノール含量およびフリーラジカルを消去する抗酸化作用が高まることを明らかにした。HPLC による分析を行い、加熱後の葉のカフェ酸含量が加熱前の葉よりも高い

ことを実証し、その際にクロロゲン酸含量がやや低い値を示す傾向を認めた。5年にわたり同時期に採取された同品種のヤーコン葉を用いてポリフェノール含量に及ぼす加熱処理の影響を検証し、すべての年で加熱後に有意に高い値を得ることができた。従って、加熱処理がヤーコン葉の活性成分や含量に影響を及ぼし、抗酸化作用を上昇できる可能性があることを見出した。

第2章では、本学圃場において2013年、2015年、2016年および2017年にわたり試験栽培された4品種と国内における標準系統として用いられる導入時のSY11のヤーコン葉に機能的な差異が認められるかについて検証を行った。ここでは、葉のポリフェノール含量と抗酸化作用はSY11よりもSY237で高いこと、しかしながらそれぞれの栽培品種で得られた測定値は試験期間を通して変動が大きく一貫性が得られにくいことを明らかにした。次に、糖類分解酵素阻害作用を調べた際には、試験期間を通して変動が大きかったものの、少なくともSY237を含む3つの栽培品種がSY11と同等かそれ以上の α -グルコシダーゼ阻害を示すことを実証した。さらに、得られた4年分の機能性の測定データを用いて多変量解析を行い、これらヤーコン栽培品種とSY11の特徴的な位置付けを体系的に視覚化することができた。ここではSY237がSY11よりも優れた品種となりうることを示された。しかしながら本結果は、限定的な試験区や測定データによるため部分的な解釈となる可能性があり、年次変動の影響が大きいことにも留意する必要がある。

第3章では、通常の飲用時を想定して市販の熊本県産ヤーコン茶の実用的な熱水抽出条件を設定し、CCD法に基づくRSM法による解析とともに、高い抗酸化作用とポリフェノール含量を提供しうる最適抽出条件について調べた。実用的な抽出温度を75.0-96.0°C、抽出時間を2.00-5.50分と狭い範囲内に定め、これら2つを独立変数とし、各々の条件下の抽出液を調製後、実測値を得た。抽出条件の最適化を図ったところ、89.3°Cおよび2.50分間の条件下でヤーコン茶を熱水抽出した場合には、0.863の「望ましき」値とともに、高い抗酸化作用とポリフェノール含量を提供できる最適条件となり得ることを見出した。CCD法によるRSM法は、通常は大規模な工業生産現場における工程や条件の最適化を設定するための方法論として利用される。本解析法を用いることで、ヤーコン茶の飲用を例に、食材の身近な熱水抽出時の最適化を図ることができた。

以上より、熊本県阿蘇郡南阿蘇村の本学圃場で栽培されるヤーコン葉のポリフェノール含量と抗酸化作用に着目し、加熱処理がポリフェノール含量の上昇を伴って抗酸化作用を上昇させること、ここでは少なくともカフェ酸を例にフェノール酸の一部が上昇することを明らかにした。次に4年にわたる調査で、4つの栽培品種のうちSY237が導入系統SY11よりも抗酸化作用などの機能面で優れた品種となりうることを見出した。さらに、ヤーコン茶飲用時に高い抗酸化作用とポリフェノールが効率良く得られる最適抽出条件を明らかにした。従って、ポリフェノール含量や抗酸化作用などに及ぼす加熱処理の影響や品種

と導入系統間での差異と熱水抽出における最適条件を見出した本研究は、保健機能に優れた国産ヤーコン品種の選抜と改良を進めるための先駆的な成果であり、また、葉部分の種々の活性成分や機能性を効率よく上昇できる加工処理法のさらなる開発を行う上で重要な知見を提供するものである。

今後は、加熱処理条件を変えてヤーコン葉のポリフェノールの組成分析、細胞レベルでの抗酸化作用、*in vivo*での血糖上昇抑制作用などの生物活性に及ぼす影響を詳細に調べていくことが重要である。また、未利用資源となるヤーコン葉を有望な機能性食品素材として確立するためにも、ヤーコン栽培品種間のみならず採取時期の異なる葉を用いて生物活性の比較や加熱処理による影響を明らかにしていく必要がある。更に、本植物の採取年ごとに得られた機能性データは圃場での栽培によるばらつきの大きさも課題となり得たため、今後は環境要因が制御された人工気象器やポットでのハウス栽培なども行い、明瞭な機能性や生理学的な差異を品種および導入系統間で、単一年のみならず中長期的に明らかにしていくことも重要である。これらの研究成果や課題点について取り組むことで、特色ある農林資源ヤーコンの機能性食品素材への開発と活用が推進できるものと期待される。

参考文献

- Andrade EF, Souza-Leone R, Ellendersen LN. (2014) Phenolic profile and antioxidant activity of extracts of leaves and flowers of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Ind Crops Prod*, **62**, 499-506.
- Aybar MJ, Sanchez RAN, Grau A, Sanchez SS. (2001) Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, **74**, 125-132.
- Bai J, Suo T, Wei X, Dou P, Ran X, Anug KKA, Dou D, Zeng Z. (2017) Anticancer action and pharmacokinetics of sesquiterpene lactone extracts of yacon leaves. *Int J Pharmacol*, **13**, 74-82.
- Baroni S, da Rocha BA, Oliveira de Melo J, Comar JF, Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA. (2016) Hydroethanolic extract of *Smallanthus sonchifolius* leaves improves hyperglycemia of streptozotocin induced neonatal diabetic rats. *Asian Pac J Trop Med*, **9**, 432-436.
- Barreto GPM, Benassi MT, Mercadante AZ. (2009) Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis to free radical scavenger activity. *J Braz Chem Soc*, **20**, 1856-1861.
- Belwal T, Dhyani P, Bhatt ID, Rawal RS, Pande V. (2016) Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM). *Food Chem*, **207**, 115-124.
- Benzie IF and Strain JJ. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, **239**, 70-76.
- Benzie IF and Strain JJ. (1999) Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol*, **299**, 15-27.
- Blois MS. (1958) Antioxidant determinations by the use of the stable free radical. *Nature*, **26**, 1199-1200.
- Burillo SP, Giménez R, Henares JAR, Pastoriza S. (2018) Effect of brewing time and temperature on antioxidant capacity and phenols of white tea: Relationship with sensory properties. *Food Chem*, **248**, 111-118.
- Chagas-Paula DA, Oliveira TB, Faleiro DPV, Oliveira RB, Costa FBD. (2015) Outstanding anti-inflammatory potential of selected Asteraceae species through the potent dual inhibition of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Planta Med*, **81**, 1296-1307.
- Chang CH, Lin HY, Chang CY, Liu YC. (2006) Comparisons on the antioxidant

- properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *J Food Eng*, **77**, 478-485.
- Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M, STOP-NIDDM Trail Research Group. (2002) Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet*, **359**, 2072-2077.
- Choi JS, Kim HY, Seo WT, Lee JH, Cho KM. (2012) Roasting enhances antioxidant effect of bitter melon (*Momordica charantia* L.) increasing in flavan-3-ol and phenolic acid contents. *Food Sci Biotechnol*, **21**, 19-26.
- de Andrade EF, de Souza-Leone R, Ellendersen LN, Masson ML. (2014) Phenolic profile and antioxidant activity of extracts of leaves and flowers of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Ind Crops Prod*, **62**, 499-506.
- de Maria CAB, Trugo LC, de Mariz e Miranda LS, Salvador E. (1998) Stability of 5-caffeoylquinic acid under different conditions of heating. *Food Res Int*, **31**, 475-477.
- Derringer G and Suich R (1980) Simultaneous optimization of several response variables. *J Quality Tech*, **12**, 214-219.
- Feng S, Song L, Liu Y, Lai F, Zuo G, He G, Chen M, Huang D. (2013) Hypoglycemic activities of commonly-used traditional Chinese herbs. *Am J Chinese Med*, **41**, 849-863.
- Friedman M, Levin CE, Choi SH, Lee SU, Kozukue N. (2009) Changes in the composition of raw tea leaves from the Korean yabukida plant during high-temperature processing to pan-fried kamairi-cha green tea. *J Food Sci*, **74**, C406-412.
- Fujino M, Nakanishi T, Ishihara J, Ono S, Doi Y. (2008) A new yacon cultivar, “Andes no yuki” and “Salad Okame”. Kinki Chuugoku Shikoku Nogyo Kenkyu Center Kenkyu Houkoku (*Bull Nat Agric Res Center West Reg*), **7**, 131-143. (In Japanese)
- Girard-Lalancette K, Pichette A, Legault J. (2009) Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures: Analysis of fruit and vegetable juices. *Food Chem*, **115**, 720-726.
- Gulcin I. (2006) Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, **217**, 213-220.
- Gurungs S, Mahato SK, Thapa B, Binoy C. (2018) An introduction to ground apple (*Smallanthus sonchifolius*): a review. *Int J Genet*, **10**, 401-404.
- Gutowski M, Kowalczyk S. (2013) A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta Biochim Pol*, **60**, 1-16.
- Honoré SM, Genta SB, Sánchez SS. (2015) *Smallanthus sonchifolius* (yacon) leaves: an emerging source of compounds for diabetes management. *J Res Biol*, **5**, 021-042.
- Ishiguro K and Yokota S. (2018) Alterations in polyphenol and inulin contents of roasted

- Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Jap Soc Food Sci Technol*, **65**, 7-14. (in Japanese)
- Ivanova V, Stefova M, Chinnici F. (2010) Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. *J Serb Chem Soc*, **75**, 45-59.
- Iwasa K, Ôta I, Torii H. (1970) Improvement of official chemical analysis of tea (Part 3): Examination of tannin determination. *Tea Res J*, **40**, 69-73. (In Japanese).
- Jambrak AR. (2011) Experimental design and optimization of ultrasound treatment of food products. *J Food Process Technol*, **2**, 1-3.
- Jara PJ, Fulgencio SC. (2018) Fruit peels as sources of non-extractable polyphenols or macromolecular antioxidants: Analysis and nutritional implications, *Food Res Int*, **111**, 148-152.
- Juaniz I, Ludwig IA, Huarte E, Pereira-Caro G, Moreno-Rojas JM, Cid C, De Pena MP. (2016) Influence of heat treatment on antioxidant capacity and (poly) phenolic compounds of selected vegetables. *Food Chem*, **197**, 466-473.
- Kabata K, Okamoto C, Koike A, Honda T, Honda K, Matsuda Y, Murata T. (2006) Studies on the cultivation of yacon plants (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson) and the preparation of yacon silage in Aso area. *Kyushu Tokai Daigaku Nogakubu Kiyo (Proc School Agric Kyushu Tokai Univ)*, **25**, 9-14. (in Japanese).
- Kim HW, Murakami A, Nakamura Y, Ohigashi H. (2002) Screening of edible Japanese plants for suppressive effects on phorbol ester-induced superoxide generation in differentiated HL-60 cells and AS52 cells. *Cancer Lett*, **176**, 7-16.
- Kim MJ, Ahn JH, Kim SB, Jo YH, Liu Q, Hwang BY, Lee MK. (2016) Effect of extraction conditions of green tea on antioxidant activity and EGCG content: Optimization using response surface methodology. *Nat Prod Sci*, **22**, 270-274.
- Kitai Y, Hayashi K, Otsuka M, Nishiwaki H, Senoo T, Ishii T, Sakane G, Sugiura M, Tamura H. (2015) New sesquiterpene lactone dimer, uvedafofin, extracted from eight yacon leaf varieties (*Smallanthus sonchifolius*): cytotoxicity in HeLa, HL-60, and murine B16-F10 melanoma cell lines. *J. Agric Food Chem*, **63**, 10856-10861.
- Kobayashi T, Kurata R, Kai Y. (2019) Seasonal variation in the yield and polyphenol content of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) foliage. *Hort J*, **2**, 270-275.
- Lachman J, Fernández EC, Viehmannová I, Šulc M, ěpková P. (2007) Total phenolic content of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) rhizomes, leaves, and roots affected by genotype. *New Zeal J Crop Hort Sci*, **35**, 117-123.
- Langley-Evans SC. (2000) Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay. *Int J Food Sci Nutr*, **51**, 181-188.
- Lazic ZR. (2004) "Design of Experiments in Chemical Engineering-A Practical Guide",

Wiley-VCH, Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim.

- Lee WJ, Choi SW. (2012) Quantitative changes of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves in relation to varieties, harvest period, and heat processing. *Prev Nutr Food Sci*, **17**, 280-285.
- Lin F, Hasegawa M, Kodama O. (2003) Purification and identification of antimicrobial sesquiterpene lactones from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. *Biosci Biotechnol Biochem*, **67**, 2154-2159.
- Liu L, Sun Y, Laura T, Liang X, Ye H, Zeng X. (2009) Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng. *Food Chem*, **112**, 35-41.
- Liu L, Jiang W, Zhang L, Li F, Zhang Q. (2011) Chemical correlation between Shuanghuanglian injection and its three raw herbs by LC fingerprint. *J Sep Sci*, **34**, 1834-1844.
- Marchyshyn S, Hudz N, Dakhym I, Husak L, Mishchenko L. (2017) Analysis of phenolic compounds from *Polymnia sonchifolia* Poepp. & Endl. leaves by HPLC-method. *Pharma Innovation*, **6**, 980-983.
- Matsui T, Yoshimoto C, Osajima K, Oki T, Osajima Y. (1996) *In vitro* survey of alpha-glucosidase inhibitory food components. *Biosci Biotechnol Biochem*, **60**, 2019-2022.
- Mendoza RP, Vidar WS, Oyong GG. (2017) *In vitro* cytotoxic potential of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) against HT-29, MCF-7 and HDFn cell lines. *J Med Plants Res*, **11**, 207-217.
- Naczka M and Shahidi F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A*, **1054**, 95-111.
- Nakamura Y, Murakami A, Ohto Y, Torikai K, Tanaka T, Ohigashi H. (1998) Suppression of tumor promoter-induced oxidative stress and inflammatory responses in mouse skin by a superoxide generation inhibitor 1'-acetoxychavicol acetate. *Cancer Res*, **58**, 4832-4839.
- Narita Y, Inouye K. (2009) Kinetic analysis and mechanism on the inhibition of chlorogenic acid and its components against porcine pancreas alpha-amylase isozymes I and II. *J Agric Food Chem*, **57**, 9218-9225.
- Oboh G, Agunloye OM, Adefegha SA, Akinyemi AJ, Ademiluyi AO. (2015) Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (*in vitro*): a comparative study. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, **26**, 165-170.
- Ojansivu I, Ferreira CL, Salminen S. (2011) Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends Food Sci Technol*, **22**, 40-46.
- Oki T, Sugawara T, Sato-Furukawa M, Suda I. (2013) 4-Dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC) method for determination of total proanthocyanidin content in grain legumes. *J Jpn Soc Food Sci Technol*, **60**, 301-309. (In Japanese).

- Oliveira GAR, Oliveira AE, Conceicao EC, Leles MIG. (2016) Multiresponse optimization of an extraction procedure of carnosol and rosmarinic and carnosic acids from rosemary. *Food Chem*, **211**, 465-473.
- Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. (2006) Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev*, **58**, 87-114.
- Patras A, Brunton NP, Downey G, Rawson A, Warriner K, Gernigon G. (2011) Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify fruits and vegetables commonly consumed in Ireland based on in vitro antioxidant activity. *J Food Compos Anal*, **24**, 250–256.
- Pekal A, Pyrzynska. (2014) Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods*, **7**, 1776-1782.
- Puttongsiri T and Haruenkit R. (2010) Formulation of chitosan-oleic acid coating for kiew wan tangerine by response surface methodology. *Kasetsart J (Nat Sci)*, **44**, 462-470.
- Ramírez-Anaya Jdel P, Samaniego-Sánchez C, Castañeda-Saucedo MC, Villalón-Mir M, de la Serrana HL. (2015) Phenols and the antioxidant capacity of Mediterranean vegetables prepared with extra virgin olive oil using different domestic cooking techniques. *Food Chem*, **188**, 430-438.
- Roy MK, Juneja LR, Isobe S, Tsushida T. (2009) Steam processed broccoli (*Brassica oleracea*) has higher antioxidant activity in chemical and cellular assay systems. *Food Chem*, **114**, 263-269.
- Russo D, Malafrente N, Frescura D, Imbrenda G, Faraone I, Milella L, Fernandez E, De Tommasi N. (2015a) Antioxidant activities and quali-quantitative analysis of different *Smallanthus sonchifolius* [(Poepp. and Endl.) H. Robinson] landrace extracts. *Nat Prod Res*, **29**, 1673-1677.
- Russo D, Valentão P, Andrade PB, Fernandez EC, Milella L. (2015b) Evaluation of antioxidant, antidiabetic and anticholinesterase activities of *Smallanthus sonchifolius* landraces and correlation with their phytochemical profiles. *Int J Mol Sci*, **16**, 17696-17718.
- Sama K, Murugesan K, Sivaraj R. (2012) *In vitro* alpha amylase and alpha glucosidase inhibition activity of crude ethanol extract of *Cissus arnottiana*. *Asian J Plant Sci Res*, **2**, 550-553.
- Sasaki K, Oki T, Kai Y, Okuno S. (2015) Changes in Contents of Caffeic Acid and Seven Species of Caffeoylquinic Acids in Sweet Potato Cultivar ISuiohm Leaves During Boiling Treatment. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi (J Jpn Soc Food Sci Technol)*, **62**, 470-476. (In Japanese)
- Singleton VL, Rossi JA Jr. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-

- phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, **16**, 144-158.
- Sriwilajaroen N, Fukumoto S, Kumagai K, Hiramatsu H, Odagiri T, Tashiro M, Suzuki Y. (2012) Antiviral effects of *Psidium guajava* Linn. (guava) tea on the growth of clinical isolated H1N1 viruses: Its role in viral hemagglutination and neuraminidase inhibition. *Antiviral Res*, **94**, 139-146.
- Suda I, Oki T, Nishiba Y, Masuda M, Kobayashi M, Nagai S, Hiyane R, Miyashige T. (2005) Polyphenol contents and radical-scavenging activity of extracts from fruits and vegetables in cultivated in Okinawa, Japan. *J Jpn Soc Food Sci Technol*, **52**, 462-471. (In Japanese).
- Sugahara S, Ueda Y, Fukuhara K, Kamamuta Y, Matsuda Y, Murata T, Kuroda Y, Kabata K, Ono M, Igoshi K, Yasuda S. (2015) Antioxidant effects of herbal tea leaves from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on multiple free radical and reducing power assays, especially on different superoxide anion radical generation systems. *J Food Sci*, **80**, C2420-C2429.
- Sugahara S, Chiyo A, Fukuoka K, Ueda Y, Tokunaga Y, Nishida Y, Kinoshita H, Matsuda Y, Igoshi K, Ono M, Yasuda S. (2018) Unique antioxidant effects of herbal leaf tea and stem tea from *Moringa oleifera* L. especially on superoxide anion radical generation systems. *Biosci Biotechnol Biochem*, **82**, 1973-1984.
- Sugawara T, Negishi Y, Kai Y, Ishiguro K, Oki T, Suda I. (2011) Effect of Cooking Method on the Lutein and Polyphenol Contents in Edible Leaves of the Suioh Sweet Potato Cultivar. *J Cook Sci Jpn*, **44**, 291-298. (In Japanese)
- Sugiura M, Nakanishi T, Kameno T, Doi Y, Fujino M. (2007) A new yacon cultivar, "Sarada otome". *Kinki Chuugoku Shikoku Nogyo Kenkyu Center Kenkyu Houkoku (Bull NARO West Reg Agric Res Center)*, **6**, 1-13. (in Japanese)
- Sugiura M, Nakanishi T, Fujino M, Ishikawa K. (2014) A new yacon cultivar, 'Andesu no Otome'. *Kinki Chuugoku Shikoku Nogyo Kenkyu Center Kenkyu Houkoku (Bull NARO West Reg Agric Res Center)*, **13**, 59-69. (in Japanese)
- Sugiura M. (2016) Studies on some cultivation methods for early harvesting of yacon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) Robinson). *Kinki Chuugoku Shikoku Nogyo Kenkyu Center Kenkyu Shiryu (Misc Pub NARO West Reg Agric Res Center)*, **12**, 1-27. (in Japanese)
- Sugiura M, Yano T. (2016) Researches on morphological characteristics of a yacon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson) cultivar 'Andesu no otome' and similarities with those of other cultivars and lines during each growth. *Kinki Chuugoku Shikoku Nogyo Kenkyu Center Kenkyu Shiryu (Misc Pub NARO West Reg Agric Res Center)*, **12**, 29-38. (in Japanese)
- Svobodova E, Dvorakova Z, Cepkova PH, Viehmannova I, Havlickova L, Cusimamani EF, Russo D, Zela GM. (2013) Genetic diversity of yacon (*Smallanthus sonchifolius*

- (Poepp. & Endl.) H. Robinson) and its wild relatives as revealed by ISSR markers. *Biochem Syst Ecol*, **50**, 383-389.
- Takenaka M, Nanayama K, Inoue E. (2011) Evaluation of polyphenol content and other properties of 16 cultivars/strains of yacon. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi (J Jpn Soc Food Sci Technol)*, **58**, 537-541. (in Japanese)
- Terada S, Ito K, Taka M, Ogose N, Noguchi N, Koide Y. (2003) α -Glucosidase inhibitory active components and glucose level lowering effect of yacon aerial part extract. *Nat Med*, **57**, 89-94.
- Terada S, Ito K, Yoshimura A, Noguchi N, Ishida T. (2006) Constituents relating to anti-oxidative and alpha-glucosidase inhibitory activities in yacon aerial part extract. *Yakugaku Zasshi (J Pharm Soc Jpn)*, **126**, 665-669. (in Japanese)
- Tan MC, Tan CP, Ho CW. (2013) Effects of extraction solvent system, time and temperature on total phenolic content of henna (*Lawsonia inermis*) stems. *Int Food Res J*, **20**, 3117-3123.
- Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Byrne DH. (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal*, **19**, 669-675.
- Turkmen N, Sari F, Velioglu YS. (2006) Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chem*, **99**, 835-841
- Ueda Y, Sugahara S, Matsuda Y, Murata T, Kuroda Y, Hoshi Y, Kabata K, Ono M, Igoshi K, Yasuda S. (2017a) Effects of hot-water extract of herbal tea leaves from yacon (*Smallanthus sonchifolius*): lipoxxygenase inhibition and suppression on nitric oxide generation in RAW264.7 mouse macrophage-like cells. *Proc Sch Agric Tokai Univ*, **36**, 37-43. (in Japanese).
- Ueda Y, Sugahara S, Matsuda Y, Murata T, Kuroda Y, Hoshi Y, Kabata K, Ono M, Igoshi K, Yasuda S. (2017b) *In vitro* α -glucosidase and α -amylase inhibitory effects of herbal tea leaves from yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Tokai Daigaku Bull Inst Adv Biosci*, **1**, 33-37. (in Japanese).
- Uma DB, Ho CW, Aida WMW. (2010) Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from henna (*Lawsonia inermis*) leaves. *Sains Malays*, **39**, 119-128.
- Valentova K, Sersen F, Ulrichova J. (2005) Radical scavenging and anti-lipoperoxidative activities of *Smallanthus sonchifolius* leaf extracts. *J Agric Food Chem*, **53**, 5577-5582.
- Valentova K, Lebeda A, Dolezalova I, Jirovsky D, Simonovska B, Vovk I, Kosina P, Gasmanova N, Dziechciarkova M, Ulrichova J. (2006) The biological and chemical variability of yacon. *J Agric Food Chem*, **54**, 1347-1352.

- Wang BS, Yu HM, Chang LW, Yen WJ, Duh PD. (2008a) Protective effects of pu-erh tea on LDL oxidation and nitric oxide generation in macrophage cells. *LWT-Food Sci Technol*, **41**, 1122-1132.
- Wang J, Sun BG, Cao YP, Tian Y, Li XH. (2008b) Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chem*, **106**, 804-810.
- Wolfe KL, Liu RH. (2007) Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidant, foods, and dietary supplements. *J Agric Food Chem*, **55**, 8896-8907.
- Xue JJ, Wang L, Chzn YK, Liao Z, Liu W, Yang GY, Hu QF. (2011) Lignans from the leaf of *Smallanthus sonchifolius*. *Asian J Chem*, **23**, 933-934.
- Yoshida T. (2003) "Illustration food processing", ed. Yoshida T, Kogyo Chosakai, Tokyo, Japan, pp.217-222. (in Japanese)
- Yoshino K, Sugimoto N, Shiokawa A, Yoshino H, Goto K, Shimizu A. (2018) Antioxidant activity of polyphenolic components in Kosencha. *J Technol Edu*, **25**, 37-45. (in Japanese)
- Ziarovska J, Padilla-Gonzalez GF, Viehmannova I, Fernandez E. (2019) Genetic and chemical diversity among yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] accessions based on iPBS markers and metabolomic fingerprinting. *Plant Physiol Biochem*, **141**, 183-192.
- 今田 伊助, 佐藤 英介, 井上 正康. (1999) 生体における活性酸素・フリーラジカルの産生と消去. *化学と生物*, **37**, 434-434.
- 気象庁 HP; <http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php> (アクセス日: 2020.10.25.)
- 公益財団法人日本特産農産物協会 2012 年調査報告書 (http://www.jsapa.or.jp/Acrop_Jpaper/index.html)
- 佐野 浩亮, 内海 英雄. (1999) 生体フリーラジカル反応の *in vivo* 検出. *日本薬理学雑誌*, **114**, 107-114.
- 柴田 真理朗, (2013) 技術用語解説 応答曲面法. *日本食品科学工学会誌*, **60**, 728-729.
- 農林水産省 HP; https://www.maff.go.jp/j/pr/aff/0907/mf_news_04.html (アクセス日: 2020. 10. 25.)

本論文に関わる報告

1. Ueda Y, Matsuda Y, Murata T, Hoshi Y, Kabata K, Ono M, Kinoshita H, Igoshi K, Yasuda S. (2021) Investigation of the total polyphenol content, antioxidant activity, and carbohydrate-hydrolyzing enzyme inhibition of yacon leaves among four domestic cultivars and a Peru line for over four years. *JARQ*, forthcoming.
2. Ueda Y, Matsuda Y, Murata T, Hoshi Y, Kabata K, Ono M, Kinoshita H, Igoshi K, Yasuda S. (2019) Increased phenolic content and antioxidant capacity of the heated leaves of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Biosci Biotechnol Biochem*, **83**, 2288-2297.
3. Ueda Y, Apiphuwasukcharoen N, Tsutsumi S, Matsuda Y, Areekul V, Yasuda S. (2019) Optimization of hot-water extraction of dried yacon herbal tea leaves: enhanced antioxidant activities and total phenolic content by response surface methodology. *Food Sci Technol Res*, **25**, 131-139.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇意なるご指導とご鞭撻を賜りました、東海大学農学部バイオサイエンス学科食品機能科学研究室の安田伸教授に深甚の謝意を表します。

本論文のご校閲ならびにご助言を賜りました、共同研究先の東海大学農学部応用植物科学科植物分子遺伝学研究室 松田靖准教授ならびに基盤工学部電気電子情報工学科(前農学部応用植物科学科植物育種学研究室) 村田達郎教授、農学部バイオサイエンス学科天然物化学研究室 小野政輝教授、東海大学農学部応用植物科学科植物環境科学研究室 星良和教授、農学部バイオサイエンス学科生物化学研究室 米田一成准教授に感謝申し上げます。

本研究にご協力およびご助言賜りました農学部バイオサイエンス学科食品バイオ化学研究室 木下英樹講師、井越敬司 東海大学名誉教授、梶田聖孝 東海大学名誉教授に御礼申し上げます。

タイへの研究留学時には、King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)大学の Dr. Varipat Areekul、Ms. Nippitch Apiphuwasukcharoen、Dr. Tongchai Puttongsiri、堤秀平氏をはじめ、留学先の皆様に大変お世話になりました。

日々の研究活動を通じて研鑽するうえで、互いに切磋琢磨した東海大学農学部バイオサイエンス学科食品機能科学研究室メンバー各位に感謝します。酒井温子先輩には学部時代より実験のご指導をいただきました。同じ研究グループのメンバーである森田智子女史、木崎皓介氏、立石浩喜氏、上満教央女史、平野巧海氏、井上共人氏、川原渉聖氏に深く御礼申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたり、精神的、金銭的に支えてくれた家族に心から感謝します。

2020年11月
上田 裕人