

サツマイモの機械的傷害による  
フラノテルペンの生成

島 佳 久

1998



①

サツマイモの機械的傷害によるフラノテルペンの生成

Formation of furanoterpenes in sweetpotato  
roots by mechanical injury

島 佳久

1998



## 目次

|  |         |
|--|---------|
| 略号   | -----1  |
| 序章   | -----3  |
| 第1章 サツマイモの主要フラノテルペンの単離・同定とイポメ<br>アマロン及びフラノテルペンの定量法 |         |
| I. 緒言  | -----7  |
| II. 材料及び方法   | -----7  |
| 1. サツマイモ塊根試料                                       | -----7  |
| 2. 塊根スライスの塩化水銀(II)処理                               | -----8  |
| 3. 試料のフラノテルペンの抽出                                   | -----8  |
| 4. 分析法   | -----8  |
| (1) 比色   | -----8  |
| (2) GLC  | -----11 |
| (3) TLC  | -----11 |
| (4) HPLC   | -----12 |
| (5) GC-MS  | -----12 |
| (6) 紫外部吸収スペクトル                                     | -----12 |
| III. 結果  | -----12 |
| 1. 塩化水銀(II)処理によるフラノテルペンの誘導とそれらの分<br>画              | -----12 |
| 2. イポメアマロン及びデヒドロイポメアマロンの精製と同定                      | --14    |



|   |    |
|---|----|
| 3. イポメアマロン標品の分子吸光度と、比色による総フラノテルペン量及びGLCによるイポメアマロン量の算出式----- | 14 |
| 4. その他のフラノテルペンの同定 -----                                     | 17 |
| IV. 考察 -----  | 22 |
| V. 小括 -----   | 23 |

## 第2章 サツマイモの機械的傷害によるフラノテルペンの生成と 塊根成分の動向

|                     |    |
|---------------------|----|
| I. 緒言 -----         | 25 |
| II. 材料及び方法 -----    | 26 |
| 1. サツマイモ塊根試料 -----  | 26 |
| 2. 傷害塊根の調製 -----    | 26 |
| 3. 分析法 -----        | 28 |
| (1) 一般成分 -----      | 28 |
| (2) ポリフェノール -----   | 30 |
| (3) イポメアマロン -----   | 30 |
| (4) 組織染色 -----      | 31 |
| (5) 組織の硬度 -----     | 31 |
| III. 結果 -----       | 31 |
| 1. 組織の変化 -----      | 31 |
| (1) 染色による組織観察 ----- | 31 |
| (2) 重量と硬度 -----     | 31 |
| 2. 一般化学成分の動向 -----  | 34 |
| 3. ポリフェノールの消長 ----- | 38 |



|                           |         |
|---------------------------|---------|
| 4. フラノテルペン及びイポメアマロンの生成と消長 | -----38 |
| 5. 流通過程における傷害塊根とフラノテルペン生成 | -----41 |
| IV. 考察                    | -----41 |
| V. 小括                     | -----47 |

### 第3章 サツマイモの機械的傷害によるフラノテルペン誘導因子 の生成とその性質

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| I. 緒言                         | -----49 |
| II. 材料及び方法                    | -----50 |
| 1. サツマイモ塊根試料                  | -----50 |
| 2. 傷害塊根抽出液の調製                 | -----50 |
| 3. 分析法                        | -----50 |
| (1) 一般成分                      | -----50 |
| (2) フラノテルペン及びイポメアマロン          | -----52 |
| (3) フラノテルペン誘導活性のバイオアッセイ       | -----52 |
| (4) 誘導活性画分の分画                 | -----53 |
| (5) 誘導活性画分の各種処理               | -----55 |
| (6) TLC                       | -----56 |
| (7) 電気泳動                      | -----56 |
| III. 結果                       | -----56 |
| 1. 傷害塊根におけるフラノテルペン誘導因子の生成     | -----56 |
| (1) 保蔵期間と誘導因子の生成              | -----56 |
| (2) 抽出液によるフラノテルペン及びイポメアマロンの誘導 | -----58 |
| (3) 塊根スライスの各部位におけるフラノテルペン誘導量の |         |



|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| 差異                               | -----61 |
| 2. 分子量分画膜及びSep-Pakカートリッジ分画による誘導活 |         |
| 性と一般成分の動向                        | -----61 |
| (1) 分子量分画膜による分画                  | -----64 |
| (2) Sep-Pakカートリッジによる分画           | -----64 |
| (3) 凍結乾燥重と一般成分の動向                | -----64 |
| 3. 活性画分DM05-3の各種の処理に伴う活性の変化      | -----72 |
| 4. 誘導因子の単離                       | -----72 |
| (1) Biogel P2カラム分画               | -----72 |
| (2) Sep-Pak QMA 吸着画分の ステップワイズ溶出  | -----72 |
| 5. 誘導因子の2,3の性質                   | -----75 |
| IV. 考察                           | -----75 |
| V. 小括                            | -----80 |

#### 第4章 塩化水銀(II)及び機械的傷害に対するフラノテルペン

##### 誘導感受性のサツマイモ品種・系統間の差異

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| I. 緒言                           | -----82 |
| II. 材料及び方法                      | -----83 |
| 1. サツマイモ塊根試料                    | -----83 |
| 2. 傷害塊根の調製                      | -----83 |
| 3. フラノテルペン及びイポメアマロンの定量          | -----84 |
| III. 結果                         | -----84 |
| 1. 塩化水銀(II)処理によるフラノテルペン誘導量の経日変化 | ---84   |
| 2. 普及品種の品種間における塩化水銀(II)感受性の差異   | -----88 |



|   |     |
|---|-----|
| 3. 育成系統間における塩化水銀(II)及び機械的傷害に対する感<br>受性の差異 ----- | 88  |
| 4. 育成系統間における塩化水銀(II)及び機械的傷害に対する<br>感受性の相関 ----- | 91  |
| IV. 考察 -----                                    | 91  |
| V. 小括 -----                                     | 95  |
| 要約 -----  | 96  |
| 文献 -----  | 99  |
| 謝辞 -----  | 108 |



## 略号

本論文で使用する略号は次の通りである。

### 1. 化合物名

|                    |                                       |
|--------------------|---------------------------------------|
| FT                 | フラノテルペン                               |
| Ip                 | イポメアマロン                               |
| DHIp               | デヒドロイポメアマロン                           |
| 7-OHMy             | 7-ハイドロキシミオポロン                         |
| OHDMy              | ハイドロキシデヒドロミオポロン                       |
| IpOH               | イポメアマロノール                             |
| PP                 | ポリフェノール                               |
| TS                 | 全糖 (フェノール硫酸法)                         |
| NS                 | 中性糖                                   |
| Ua                 | ウロン酸                                  |
| UA                 | ウロン酸(補正)                              |
| HMG-CoAレダクターゼ      | 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル<br>コエンザイム A レダクターゼ |
| C <sub>12</sub> OH | ラウリルアルコール                             |
| C <sub>16</sub> OH | セチルアルコール                              |

### 2. サツマイモ品種名

|     |         |
|-----|---------|
| KS  | コガネセンガン |
| SY  | シロユタカ   |
| K14 | 高系14号   |



|           |        |
|-----------|--------|
| BA        | ベニアズマ  |
| BH        | ベニハヤト  |
| N1        | 農林1号   |
| YM        | 山川紫    |
| SH        | サツマヒカリ |
| Kyushu100 | 九州100号 |

### 3. 保蔵条件

|     |     |
|-----|-----|
| Wet | 高湿度 |
| Dry | 低湿度 |

### 4. その他

|      |         |
|------|---------|
| mg % | mg/100g |
| RH   | 相対湿度    |
| IS   | 内部標準    |



## 序章

サツマイモ (*Ipomea batatas* Lam.) は世界の三大いも類の一つとして熱帯から温帯に至る広い地域において栽培されており、それぞれの地域で食糧・飼料あるいは澱粉や発酵原料として用いられて、歴史的にも大きな役割を果たしてきた。

わが国では、これまで、青果用及び澱粉、焼酎、加工などの原料として広く利用されてきているが、近年は製品の多様化、高級化が進んできている。そして、炭水化物源としてだけでなくさらに、その食品としての3次機能、すなわち「健康」に関連する機能性が見直されつつある<sup>(1)</sup>。また、食品としてではなく、環境保全型の生分解性天然素材として用いる計画もある。

このようにサツマイモの用途が多岐になるに従って、生産性とともに、その品質の向上と安定供給の必要性が強く求められている。

しかしながら、サツマイモは熱帯原産の多水分系の根菜であり、低温や傷害などによる生理障害<sup>(2)</sup>を契機として病害菌に侵されやすく、収穫後も活発な生理活性を保持している<sup>(3)</sup>。従って、輸送や貯蔵など、収穫から利用・加工に至る過程での種々の障害により、組織の劣化あるいは異常代謝を誘発しやすく、これらの問題への対処がポストハーベストでの大きな課題となっている<sup>(2-4)</sup>。

すなわち、サツマイモは上記の障害によりポリフェノール(PP)の増大<sup>(2,9)</sup>やイポメアマロン(Ip)のようなフラノテルペン<sup>(5,6,7)</sup>生成などの異常代謝を引き起こしやすい。PPは一般に褐変の原因<sup>(8,9)</sup>となることがよく知られているが、サツマイモのフィトアレキシンであ



るIpは特有の苦味<sup>(7)</sup>を有し、サツマイモの品質劣化に大きな影響を与える。

従来、このようなサツマイモにおけるフィトアレキシン生成は黒斑病菌感染<sup>(5,6,7,10)</sup>やアリモドキゾウムシの食害<sup>(11)</sup>(生物的ストレス)により起こることが報告されており、これまでに瓜谷の研究グループが詳細な生化学的研究を行っている<sup>(12-16)</sup>。

一般にフィトアレキシンはエリシターによって誘導・生成されることが知られている<sup>(17)</sup>。サツマイモの生物的ストレスによるIpなどのフラノテルペン(FT)の誘導・生成に関連して、瓜谷らは上記の病害虫由来のエリシターについて検索している<sup>(18-20)</sup>。

さらにFT生成反応は、人工的にはサツマイモの化学薬剤<sup>(13,21)</sup>、特に塩化水銀(II)<sup>(21)</sup>のような毒物による処理(化学的ストレス)でも起こることが確かめられている。

一方、上述のポストハーベストにおける問題の一つである機械的傷害(物理的ストレス)、すなわち、収穫時の切断傷害、掘り取りや輸送中の傷害・打撲・振動などでは傷害呼吸<sup>(3,4)</sup>が起こることが知られている。

瓜谷らは塩化水銀(II)や黒斑病菌によるFT生成反応をサツマイモ塊根ディスクで調べている。そして、切断傷害の関与について、「ディスク調製に伴う切断のみではFT生成の律速酵素であるHMG-CoAレダクターゼ(3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイムAレダクターゼ)<sup>(22)</sup>は活性化されず、Ipもほとんど生成されない。しかし、切断にさらに塩化水銀(II)処理や黒斑病感染などの継続的ストレスが加わって、この律速酵素が活性化される。」と述べている



(12,14)。

このこととは別に、永浜らは<sup>(23)</sup>さきに、見かけ上黒斑病などの病斑のない健全に見える焼酎原料塊根について、その皮層部の水蒸気蒸留液を調べたところ、Ipの存在を認めた。そして、傷害モデルとして人為的擦過傷や打撲を与えた塊根皮層にもIpが生成することを報告した。

このように、機械的傷害によるFT生成については、切断で評価した瓜谷らと擦過傷や打撲で評価した永浜らとの間では相反する結果が得られている。その原因の一つとして、サツマイモの保蔵技術であるキュアリング<sup>(24,25)</sup>の例にみられるように、傷害部治癒に対する貯蔵条件<sup>(26,27)</sup>の関与が考えられる。従って、機械的傷害によるFT生成に関して、傷害後の貯蔵条件の影響が検討課題となっていた。

そこで、本研究では、サツマイモ塊根の収穫後に被りやすい機械的傷害によるFT生成を明らかにするため、傷害と以後の保蔵条件との関係を調べ、さらに傷害反応の品種による差異について検討した。また、傷害により生成するエリシターについても調べた。

まず、第1章において、塩化水銀(II)で処理した塊根から単離精製したIp標品を用い、比色の総FT量及びGLCのIp量についての算出式を作成して、ストレス反応におけるFT生成の評価法を確立した。

第2章では、機械的傷害として擦過傷を与えた塊根を湿度や温度の異なる条件下で保蔵し、傷害塊根におけるFT生成を追跡した。そして、傷害作用の発現に対する保蔵条件の影響を検討した。

第3章では、上記の機械的傷害によるFT生成に先立って内生すると考えられる誘導因子の検索のため、まず塊根ディスクを用いる誘



導活性の評価法を確立し、誘導因子を分画してその成分や性質を調べた。

第4章ではストレス感受性の品種間差異について調べるために、普及品種及び原料用サツマイモ育成系統を用いて、塩化水銀(II)処理と機械的傷害によるFT生成反応を比較・評価した。さらに両処理に対する感受性の相関を検討した。



## 第1章 サツマイモの主要フラノテルペンの単離・同定とイポメアマロン及びフラノテルペンの定量法

### I. 緒言

黒斑病に侵されたサツマイモ塊根組織では異常二次代謝物が生成するが、その主成分を初めに樋浦<sup>(5)</sup>がテルペン系精油成分として分画・単離してイポメアマロン (Ip)と命名した。その後、久保田ら<sup>(6)</sup>によりその構造決定が行われた。また、Akazawa<sup>(7)</sup>は、実験室で調製した黒斑病菌感染塊根からカラムクロマト法により一連のフラノテルペン類 (FT)の主要成分であるIpを単離精製して、各種の物理的特性値を明らかにした。

一方、BoydやWilsonら<sup>(28,29)</sup>は、黒斑病菌に感染したサツマイモ塊根について、GLCにより直接Ipを、あるいはTMS化してイポメアノールなどを検出している。その後、Schneiderら<sup>(30)</sup>は黒斑病や塩化水銀(II)により誘導・生成されたFT関連生成物の中で、構造未定のA、Bグループを単離してGC-MSにより構造を決定し、生合成経路を補完した。

このような異常二次代謝物生成に関して、今回著者らが本研究を進めるにあたり、まず上記のIp及び主要FTの標品を調製することが必要であった。

本章では実験室的に容易なFT標品の調製法として、塊根を塩化水銀(II)溶液処理し、生成する主要FTをTLC及びHPLCにより単離精製した。特に、Ipについてはクロマト的に純粋な標品を得て比色法ならびにGLC法による定量化を図った。



## II. 材料及び方法

### 1. サツマイモ塊根試料

本実験に使用したコガネセンガン (KS) は、本学農学部附属農場で栽培、収穫した後、あらかじめ200倍希釈オスバン液を噴霧し、床に水を張った小室 (15~20℃) に貯蔵したものである。

### 2. 塊根スライスの塩化水銀(II)処理

病徴や傷痕のない健全な塊根 (一個平均200g) を0.1%次亜塩素酸ナトリウムに30分間浸漬した後、長軸に直角にスライス (2~5mm厚) して、Fig.1-1に示すように、プラスチック製容器内のマット上におき、容器内の0.1%塩化水銀(II)溶液にスライス下面を接触させた。

室温でインキュベートし、経日的に採取した試料の抽出液についてFTの生成経過を調べた。

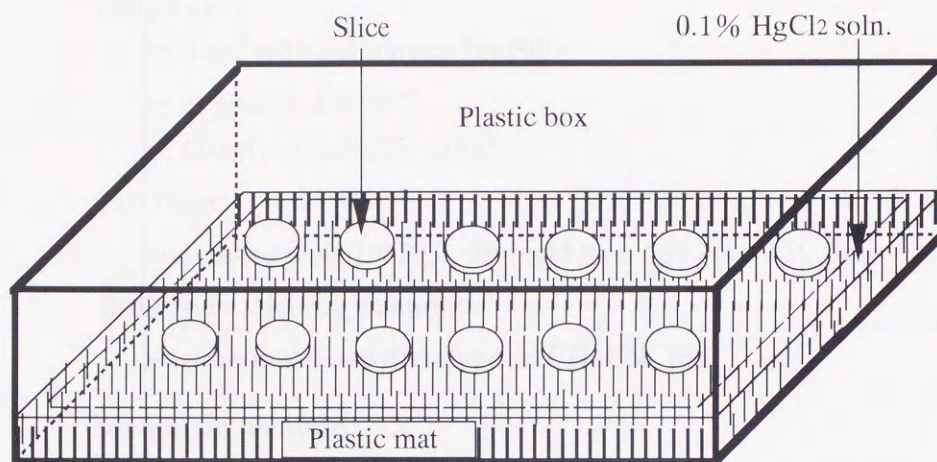
### 3. 試料のフラノテルペンの抽出

Hyodoらの方法<sup>(10)</sup>を一部改変して、Fig.1-2に示すようにして分析試料を調製した。すなわち、塊根組織20gを細切してクロロホルム-メタノール(1:1)混液40mlとともに摩砕、抽出を2回繰り返して、得られた抽出液のクロロホルム層からエーテル可溶の中性画分を分画し、最終的にアセトニトリル1ml溶液とした。

FTの調製においても、供試量に相応した容量(組織20g/抽出液1mlの割合)で同様に行った。

### 4. 分析法





Slices ( 2~5mm in thickness )

- put on the mat in the 0.1 % HgCl<sub>2</sub> soln.
- covered with gauze
- allowed to stand at room temp.

Treated slices

Fig. 1-1. Treatment of sweetpotato slices with 0.1% HgCl<sub>2</sub> solution



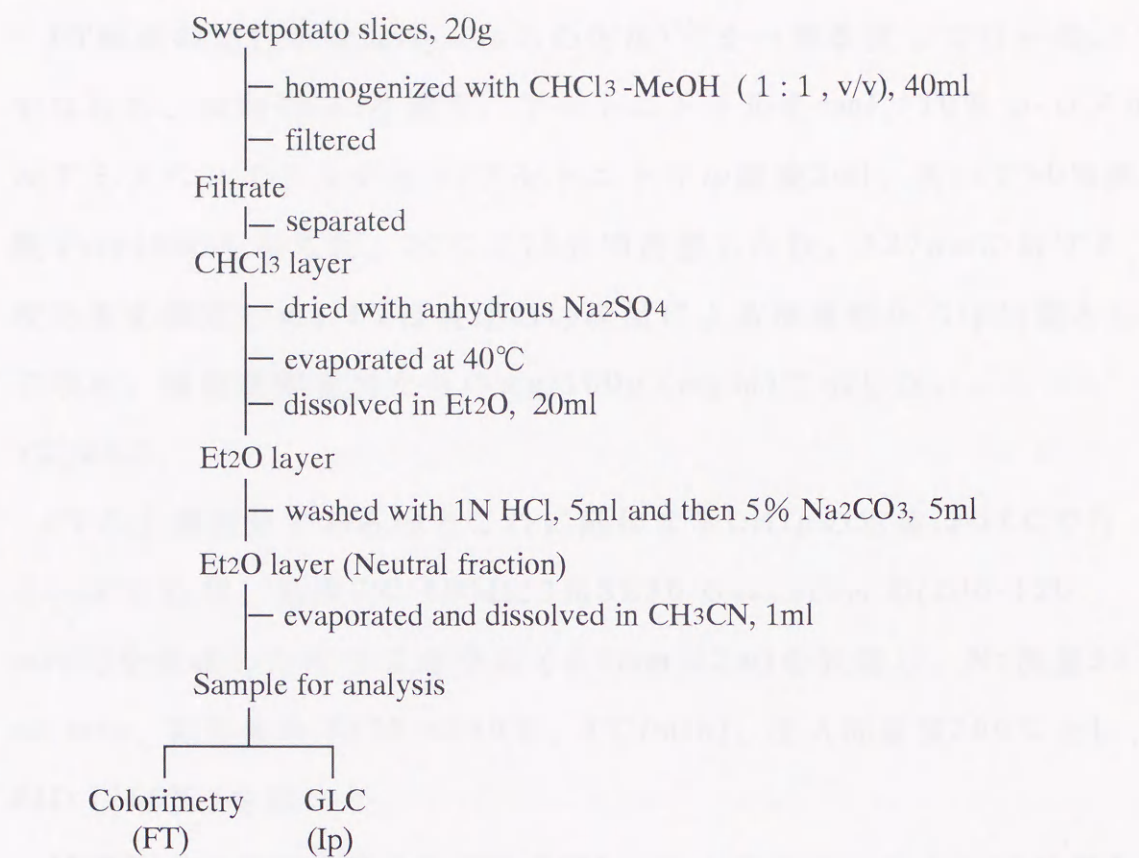


Fig. 1-2. Extraction and analysis of FT and Ip from sweetpotato slices



### (1) 比色

FT総量の比色定量はHyodoらの方法<sup>(10)</sup>を一部改変して行った。すなわち、試料40  $\mu$ lを取り、アセトニトリルを4ml、10% *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド/アセトニトリル溶液2ml、次いで40%硫酸 (v/v) 4mlを加えた。30℃に15分間放置した後、527nmにおける吸光度を測定した。FTは後述のIp標品による検量線からIp当量として求め、塊根新鮮重当たりのmg/100g (mg%)で示した。

### (2) GLC

FTの主要成分であるIpとこれに随伴するDHIpの定量はGLCで行った。すなわち、島津GC-4BMに3% SE30/Gaschrom Q(100-120 mesh)を充填したガラスカラム ( $\phi$  3mm  $\times$  2m)を装着し、N<sub>2</sub>流量35 ml/min、昇温条件下(70 $\rightarrow$ 240℃、4℃/min)、注入部温度260℃とし、FID (260℃)を用いた。

試料5  $\mu$ lに内部標準として0.25%セチルアルコールまたはドデカノール3  $\mu$ lを加えてGLCに供した。Ip含量は後述のIp標品を用いて作成した内部標準に対する試料のIpのピーク面積比による検量線から算出し、塊根新鮮重当たりのmg%で示した。DHIpについても同様にしてIp当量として示した。

### (3) TLC

シリカゲル/アルミニウムプレート(Merck社)(一般分析用10cm、調製用20 $\times$ 20cm)により、ベンゼン-酢酸エチル (8:2, v/v)を用いて展開した。発色剤としてエールリッヒ試薬 (1% *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド/エタノール-濃塩酸 (1:1)) <sup>(7,31)</sup>を噴霧し、加熱した。

### (4) HPLC



TLCにより分画した各バンド成分の精製にはHPLCを用いた。

JEOL BIP-1 (UV検出器、215nm) にWaters Bondapak C18を装着して70%メタノール (流速5.0ml/min) で溶出し、フラクションコレクターで1mlずつを分取した。

#### (5)GC-MS

GLCはHewlett Packard 5890Aにより、HP Ultra #2( $\phi$  0.32mm  $\times$  50m)、He気流下でカラム槽温度150 $^{\circ}$ C (1min) $\rightarrow$ 230 $^{\circ}$ C (5 $^{\circ}$ C/min)、注入部温度250 $^{\circ}$ C、MSはJMS-DX303でイオン化電圧70eVで測定した。

#### (6)紫外外部吸収スペクトル

島津自記分光光度計UV265を用いて走査・記録した。

### Ⅲ. 結果

#### 1. 塩化水銀(Ⅱ)処理によるフラノテルペンの誘導とそれらの分画

KS塊根のスライスを0.1%塩化水銀(Ⅱ)で処理してFT誘導・生成を予備的に調べたところ、室温下で6日までFT比色値が増大することが確かめられた。そこで、KSのスライス220gについて5日間処理した後、同様にFTを抽出してIp精製用の試料とした。

試料をセミケルダール蒸留器で水蒸気蒸留し、得られた溜出液150mlと残留液100mlからそれぞれのエーテル抽出液を調製した。

蒸留前の試料と溜出画分のエーテル抽出液についてFT組成をTLCで調べた結果、Fig.1-3に示すようにエールリッヒ試薬陽性のスポット1~11が認められ、その中で主要なスポット3とスポット4はRf値からIp<sup>(23)</sup>及びデヒドロイポメアマロン(DHIp)<sup>(32)</sup>に相当した。この



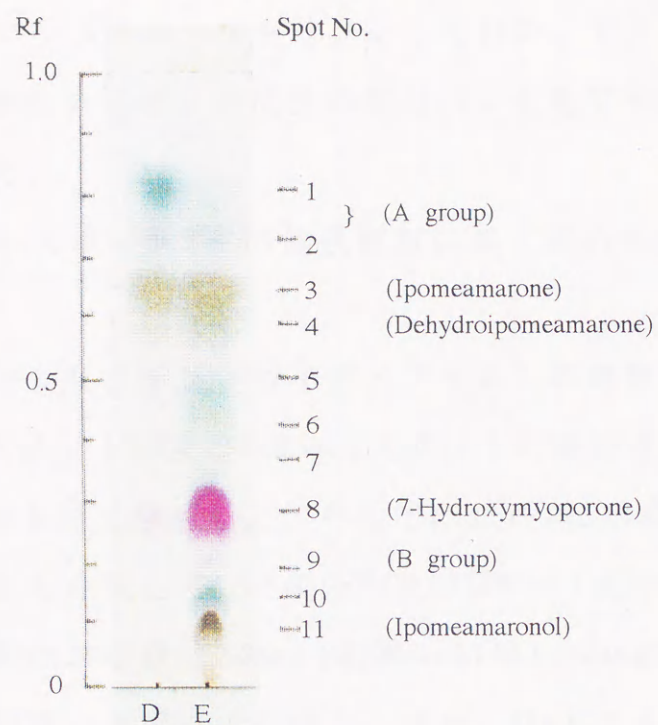


Fig. 1-3. TLC of FT from  $\text{HgCl}_2$ -treated sweetpotato slices

Sample E: Extract, D: Steam distillate

TLC: Silica gel / Al-plate, Benzene-EtOAc(8:2).



2つのFT成分はスポット1、2とともに溜出画分に移行していることが認められた。

これらのFTを分離するために、溜出液画分をシリカゲルプレート20枚に塗付してバンドクロマトグラフィーを行い、ガイドストリップに従ってそれぞれのスポット成分の相当バンドを切り取って、エーテルで抽出した。

なお、低Rf値のスポット5～11は残留液に多く認められた。

## 2. イポメアマロン及びデヒドロイポメアマロンの精製と同定

TLC上のIp (スポット3)及びDHIp (スポット4)画分をさらにHPLC逆相クロマト法で分画した。そしてFig.1-4に示すように、それぞれの主ピークを分取してIp (成分3)及びDHIp (成分4)の精製画分とした。それぞれの収量は24mg (収率0.01%)と6mgであった。

いずれもTLCで単一スポットを示し、また、GLCでもFig.1-5に示すように単一ピークであった。

両者のGC-MSはFig.1-5に示すとおりである。成分3は250[M<sup>+</sup>]、151、110、85(base)、57、43<sup>(23,33)</sup>、また、成分4は248[M<sup>+</sup>]、151、108、83 (base)、55、43<sup>(32,33)</sup>の開裂パターンを示し、それぞれIp及びDHIpであることが確かめられた。

## 3. イポメアマロン標品の分子吸光度と、比色によるフラノテルペン及びGLCによるイポメアマロンの算出式

以上のようにして得られたIpとDHIpの精製画分は以後の実験においてそれぞれの標品として用いた。



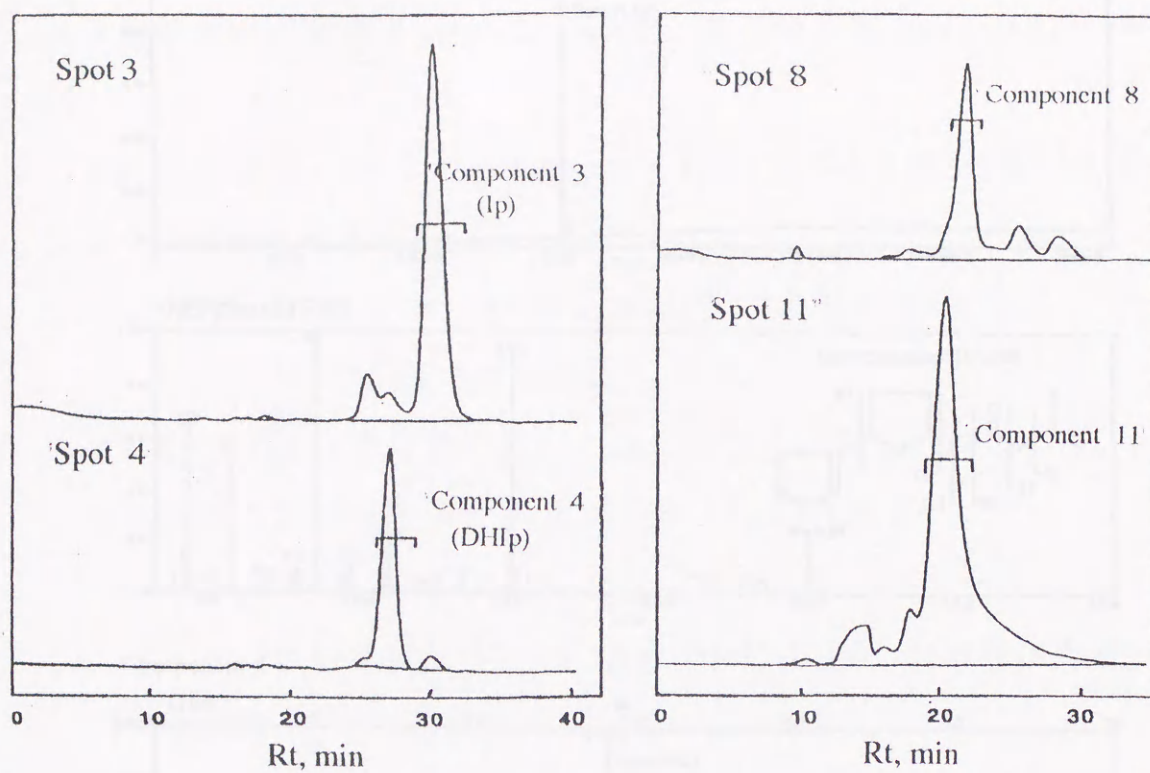
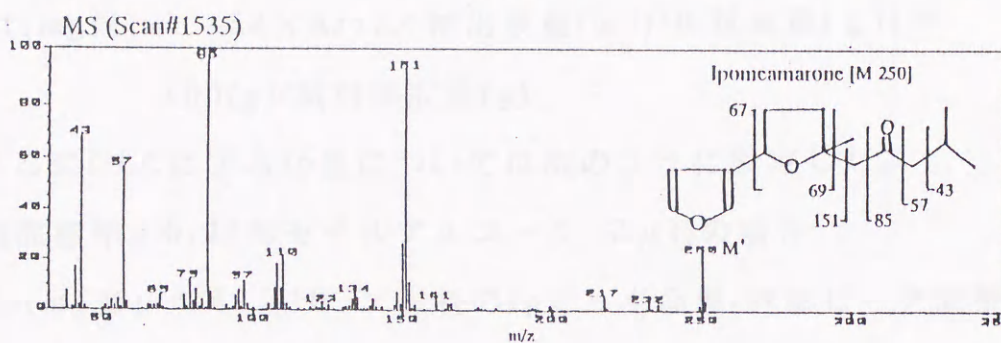
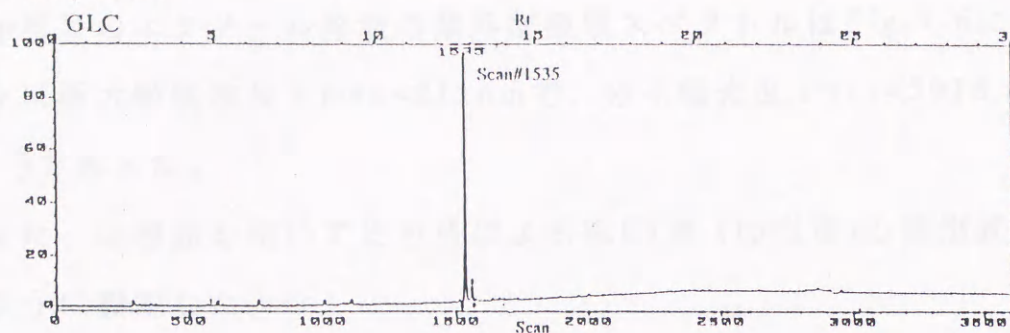


Fig. 1-4. HPLC of Spots 3 (Ip), 4 (DHIp), 8 and 11

Instrument: JEOL BIP-I; Column: Waters Bondapak C18;  
 Solvent: 70% MeOH; Flow rate: 5.0ml/min.  
 Detector: UV (at 215nm).



Component 3



Component 4

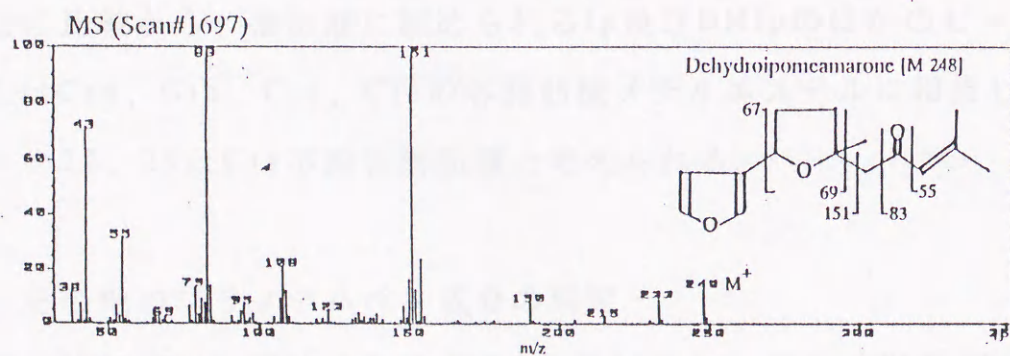
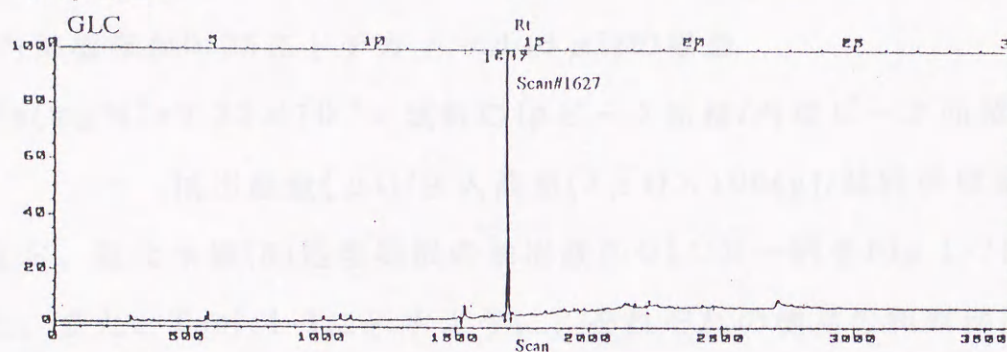


Fig. 1-5. GC-MS of Components 3 and 4

GLC Instrument : Hewlett Packard 5890A, Column: HP Ultra#2  
 (30m x 0.32mm), Oven : 150°C (1min)→230°C (5°C/min),  
 Carrier gas : He, Injector : 250°C.  
 MS Instrument : JEOL SX102, Ionization volt : 70eV.



Ip標品のエタノール溶液の紫外吸収スペクトルはFig.1-6に示すように極大吸収波長 $\lambda_{\max}=211\text{nm}$ で、分子吸光度 $\varepsilon_{211}=5916\text{ (M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ であった。

また、Ip標品を用いて比色法による総FT量 (Ip当量)の算出式を次のように設定した。

$$\text{FT(mg \%)} = 1.858 \times A_{527} \times \text{抽出液量}(\mu\text{l}) / \text{供試液量}(\mu\text{l}) \times 100(\text{g}) / \text{試料採取量}(\text{g})$$

さらにGLCによるIp量については次のように設定した。

内部標準が0.25%セチルアルコール ( $3\mu\text{l}$ )の場合

$$\text{Ip(mg \%)} = 6.88 \times 10^{-3} \times \text{試料のIpピーク面積} / \text{内標ピーク面積} \times \text{抽出液量}(\mu\text{l}) / \text{注入液量}(5\mu\text{l}) \times 100(\text{g}) / \text{試料採取量}(\text{g})$$

内部標準が0.25%ドデカノール( $3\mu\text{l}$ )の場合

$$\text{Ip(mg \%)} = 9.33 \times 10^{-3} \times \text{試料のIpピーク面積} / \text{内標ピーク面積} \times \text{抽出液量}(\mu\text{l}) / \text{注入液量}(5\mu\text{l}) \times 100(\text{g}) / \text{試料採取量}(\text{g})$$

なお、塩化水銀(II)処理塊根の抽出液のGLCの一例をFig.1-7に示した。また、Table1-1に示すように、それぞれの標品の相対保持時間との比較から、抽出液に認められるIp及びDHIpのほかのピークの多くはC<sub>10</sub>、C<sub>12</sub>、C<sub>16</sub>、C<sub>18</sub>の各脂肪酸メチルエステルに相当した。ピーク22、25はC<sub>18</sub>不飽和脂肪酸と考えられる。

#### 4. その他のフラノテルペン成分の同定

溜出液に僅かに認められる成分8及び11についても、TLC (Fig.1-3)及びHPLC (Fig.1-4)により同様に分離したが、単一成分に精製できなかった。しかし、Fig.1-8に示すようにGC-MSにおいて、



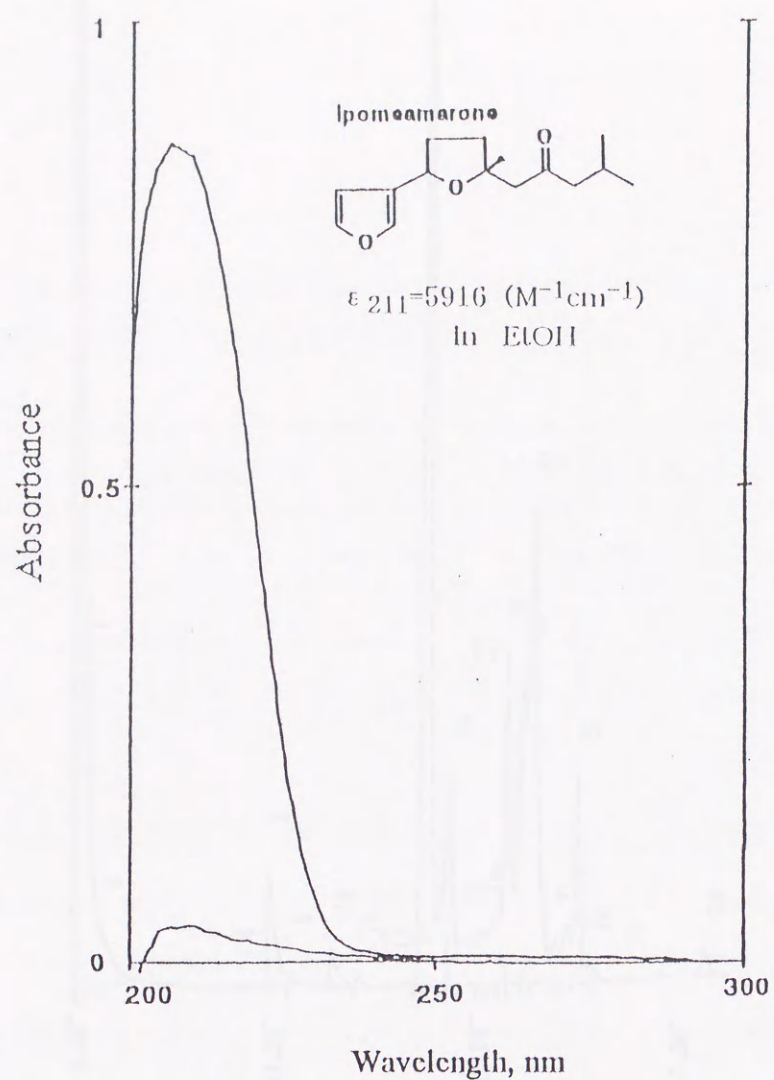


Fig. 1-6. UV spectrum of Component 3

Instrument : Spectrophotometer Shimadzu-UV265



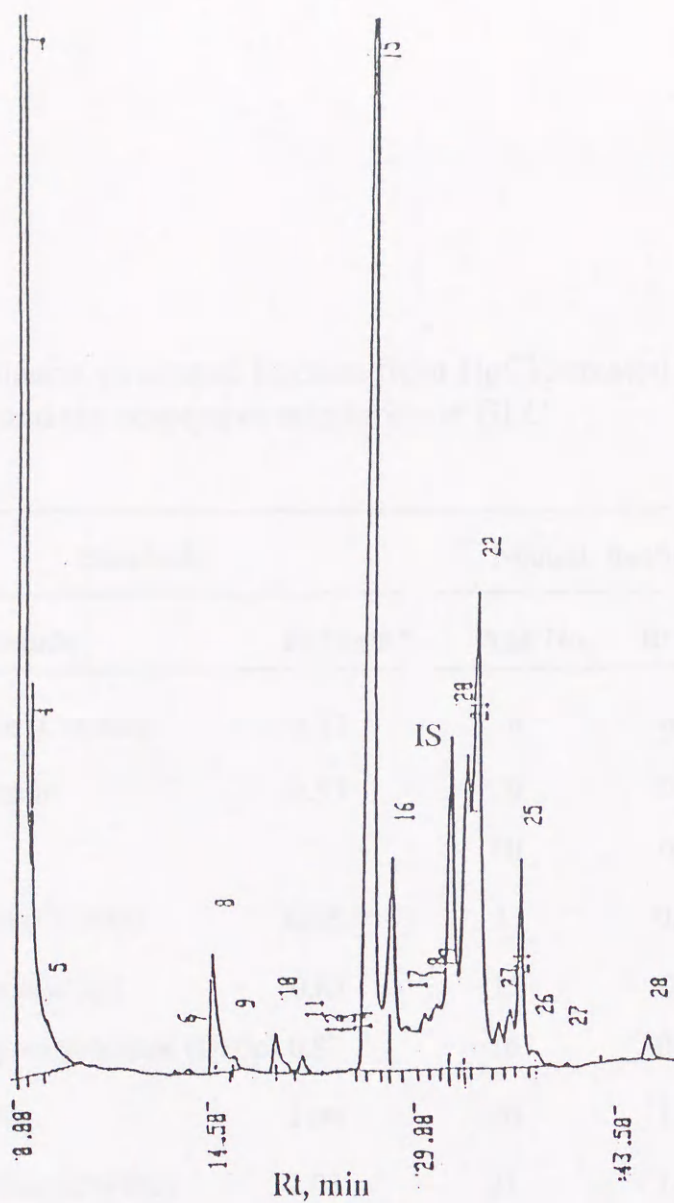


Fig. 1-7. GLC of neutral fraction from 0.1% $\text{HgCl}_2$ -treated sweetpotato slices

Sweetpotato slices were treated with 0.1% $\text{HgCl}_2$  at room temperature for 5 days. The extract, 5  $\mu\text{l}$ , was injected with 3  $\mu\text{l}$  of 0.25%  $\text{C}_{16}\text{OH}$  as internal standard (IS).

Instrument : Shimadzu GC-4BM

Column : ( $\phi$  3mm  $\times$  2m) 3%SE30 / Gaschrom Q (100-120 mesh)

Carrier gas :  $\text{N}_2$ , 35ml/min

Column temperature: 70 $^\circ\text{C}$   $\rightarrow$  240 $^\circ\text{C}$  (4 $^\circ\text{C}$  / min); Injector: 260 $^\circ\text{C}$

Detector : FID, 260 $^\circ\text{C}$

Cultivar : BH treated for 5 days



Table 1-1. Components in neutral fraction from HgCl<sub>2</sub>-treated sweetpotato slices and the respective standards on GLC

| Standards                          |                        | Neutral fraction |                        |
|------------------------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| Compounds                          | Rt C <sub>16</sub> OH* | Peak No.         | Rt C <sub>16</sub> OH* |
| Me-caprate (C <sub>10</sub> -Me)   | 0.47                   | 8                | 0.48                   |
| Me-cinnamate                       | 0.53                   | 9                | 0.53                   |
|                                    |                        | 10               | 0.62                   |
| Me-laurate (C <sub>12</sub> -Me)   | 0.68                   | 11               | 0.68                   |
| Ipomeamarone (Ip)                  | 0.83                   | 15               | 0.83                   |
| Dehydroipomeamarone (DHIp)         | 0.87                   | 16               | 0.87                   |
| IS (C <sub>16</sub> OH)            | 1.00                   | 20               | 1.00                   |
| Me-palmitate (C <sub>16</sub> -Me) | 1.03                   | 21               | 1.04                   |
|                                    |                        | 22               | 1.06                   |
|                                    |                        | 25               | 1.16                   |
| Me-stearate (C <sub>18</sub> -Me)  | 1.19                   | 26               | 1.19                   |
|                                    | 1.46                   | 28               | 1.46                   |

See Fig. 1-8. for detail.

\* Relative retention time to C<sub>16</sub>OH



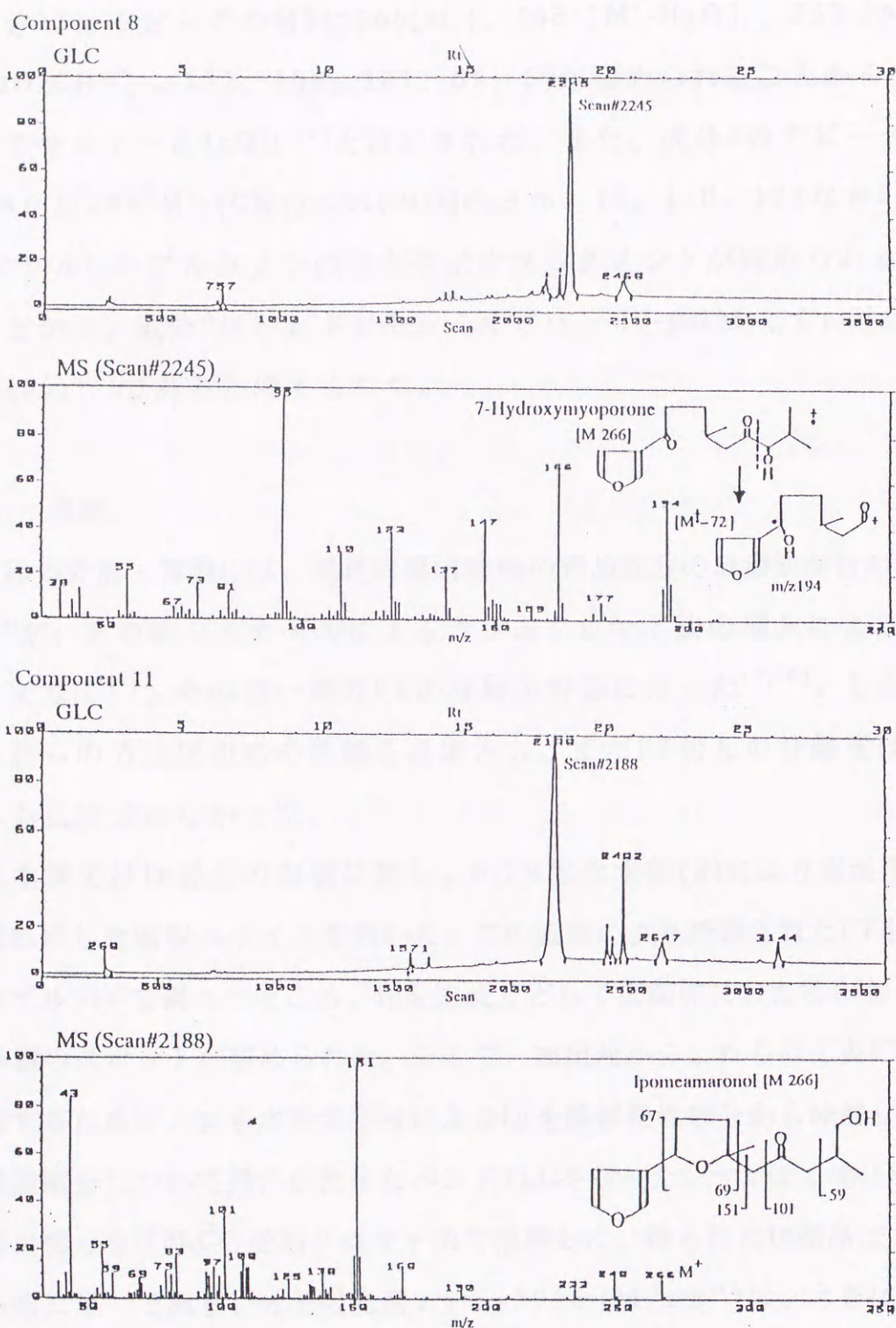


Fig. 1-8. GC-MS of Components 8 and 11

GLC Instrument : Hewlett Packard 5890A, Column: HP Ultra#2  
(30m x 0.32mm), Oven : 150°C (1min)→230°C (5°C/min),  
Carrier gas : He, Injector : 250°C.

MS Instrument : JEOL SX102, Ionization volt : 70eV.



成分11は主ピークのMSに266[M<sup>+</sup>]、248 [M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O]、233 [M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>]、151、108、101、69、59が認められることからイボメアマロノールIpOH<sup>(34)</sup>と同定された。また、成分8の主ピークのMSには194[M<sup>+</sup>-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCHO]のほか、95、110、123など1-(3-フリル)-1-アルカノンの存在を示すフラグメントが認められることなどから、成分8は7-ヒドロキシミオポロン (7-OHMy、C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>、M266)<sup>(35)</sup>であると考えられた。

#### IV. 考察

Ipの分離・精製には、黒斑病罹病塊根の精油成分の分溜法が行われた<sup>(5,6)</sup>が、その後シリカゲルによるカラムクロマト法の導入によりIpだけでなく<sup>(7)</sup>、その他一連のFTの分離が容易になった<sup>(7,30)</sup>。しかし、これらの方法は相応の熟練を必要とし、またFT相互の分離度は必ずしも良好ではなかった。

本章ではIp標品の調製に際し、0.1%塩化水銀(II)により室温下で5日間処理した塊根スライスを用いた。この処理により誘導されたFTをシリカゲルTLCで調べたところ、Ipを主成分として広範囲にわたるRf値のFT 11個のスポットが認められた。そこで、抽出液からこれらの主要FTを単離するために、まず水蒸気蒸留によりIpを難揮発性成分から分離した後、溜出画分について操作が簡単なバンドTLCを行った。ついで、各バンドの溶出画分をHPLCの逆相クロマト法で精製した。得られたIp標品はクロマト的に単一であり、分子吸光度  $\epsilon_{211}=5916$  (M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)は、さきに Akazawaらが精製Ipについて求めた  $\epsilon_{211}=5650$ <sup>(7)</sup>より幾分か高い値であった。



従って、このようなIp標品に基づいて設定したFTあるいはIpの算出式を用いることにより、一連の実験における定量の信頼度も高まったものと考えられる。

なお、Ipのほか、溜出画分からDHIp、7-OHMy及びIpOHを分離してGC-MSで同定した。DHIpはFTの生合成経路上でIpの直前に位置する成分であり、GLC及びTLCにおいて、Ip生合成に伴いIpに隣接して検知される。一方、IpOHはIpのヒドロキシル化により生成され、TLCではスポット11としてエールリッヒ試薬により青褐色を呈するが、GLCでは気化しにくく検知もされにくい。また7-OHMyはIp生合成の初期段階でファルネソールのヒドロキシル化により派生するFTであり、TLCではスポット8として特徴的なピンク～紫色を呈する。これは1つのOH基と2つのCO基を持っておりGLCにおいては気化し難く、IpやDHIpと同時に分析することは困難である。

従って、親水性基をもつFTをGLCで同時分析するには、TMS化などの前処理が必要と考えられる。また、FT全体像の消長の解析には、目的に応じて定量的TLCあるいはHPLCの併用を図るべきであろう。

## V. 小括

甘藷スライスの塩化水銀(II)処理により誘導される一連のFT成分を水蒸気蒸留し、溜出液からTLCとHPLCによりIp標品を0.01%の収率で単離したほか、主要な3成分を分離した。GC-MSにより、これらはそれぞれ、DHIp、7-OHMy、IpOHと同定された。Ip標品はTLC、HPLC、GLCなどのクロマトグラム上で単一であり、これを用いて、比色法による総FT量及びGLC法によるIp量の算出式を設定した。



また、これらの主要FT成分のTLCあるいはGLCにおける諸挙動を構造との関連において考察した。



## 第2章 サツマイモの機械的傷害によるフラノテルペンの生成と塊根成分の動向

### I. 緒言

機械的傷害には切断、打撲、破壊、振動、摩擦など種々のものがあり、これらによる傷害呼吸などについては、多くの青果物でよく研究されている<sup>(3,4)</sup>。サツマイモについても、従来、ジャガイモとともに、切断傷害による呼吸の上昇が古くから研究されてきた<sup>(3)</sup>。しかし、傷害とIp生成との関連についてはあまり明確にされてない。

瓜谷の研究グループは塊根の切断ディスクを用いた実験系により、切断や黒斑病菌感染による呼吸量や成分変化<sup>(3,6)</sup>についてまたサツマイモ特有の反応として黒斑病菌<sup>(7,18)</sup>やアリモドキゾウムシ<sup>(11)</sup>、各種薬剤処理<sup>(21)</sup>などに起因するIpなどのFTの生成機構について詳細な研究を行っている<sup>(12~16)</sup>。

その中で、機械的傷害とFT生成との関係については、切断傷害のみではFTの代謝を律速する酵素であるHMG-CoAレダクターゼ<sup>(22)</sup>はほとんど活性化されず、従ってIpもほとんど生成されない、あるいは生成してもごくわずかであると報告している<sup>(12,14)</sup>。

一方、永浜らはさきにサツマイモ製焼酎の原料由来の香味成分の検索に際して、病斑のない原料サツマイモの皮部の水蒸気蒸留液中にIpの存在を認めた<sup>(23)</sup>。そして、人為的につけた擦過傷の部分にもIpが生成・蓄積することから、塊根の収穫、輸送の間に日常的に起こる機械的傷害自体によってもIpが生成し得ることを示唆した。このことは実際の塊根の取り扱いにおいても重要な知見であり<sup>(3,7)</sup>、



さらに傷害以後の保蔵条件の影響を明らかにすることが今後の問題として残されていた。

このような経緯から、あらためてポストハーベストにおける機械的傷害とFT生成との関係、特に機械的傷害の作用が発現する環境としての保蔵条件との関係を明確にすることが必要となった。

そこで本章では、除菌条件下で擦過傷を与えた塊根を一定の温度、湿度環境に保蔵して、傷害反応生成物、特にIp生成と一般成分の変化に対する保蔵条件の影響を調べた。

## II. 材料及び方法

### 1. サツマイモ塊根試料

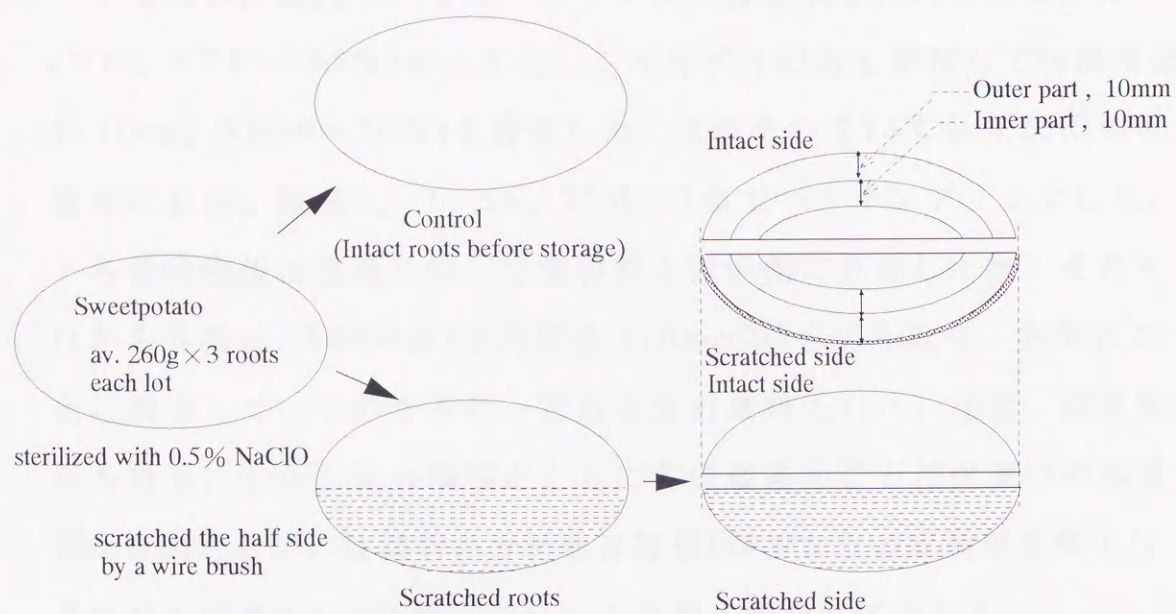
塊根試料はコガネセンガン (KS)、シロユタカ (SY)、高系14号 (K14)の3品種を用いた。いずれも鹿児島大学農学部附属農場で栽培、収穫し、あらかじめ200倍希釈オスバン液を噴霧した貯蔵庫(20℃前後、RH80~85%)においた。

### 2. 傷害塊根の調製

貯蔵庫においた塊根の中から表面に病徴や傷痕のない健全なもの(平均重260g)を選び、よく水洗して、0.5%次亜塩素酸ナトリウムに20分間浸漬、表面殺菌した後、殺菌水で洗浄して供試した。器具や容器はエタノール殺菌し、実験試料の調製は無菌室で行った。恒温室は実験に先立ちオスバン液を噴霧し、また殺菌灯を照射した。

実験の概要をFig. 2-1に示した。供試塊根の片側の側面皮層に長軸方向にワイヤーブラシにより擦過傷(深さ1~2mm)をつけて傷害





Cultivars : Koganesengan (KS)  
 Siroyutaka (SY)  
 Kokei 14 (K14)

Storage conditions : "Wet" (RH 85~95%) or "Dry" (RH 60~70%)  
 at 13 or 25°C for 3, 7, 14, and 21 days

Fig. 2-1. Preparation of injured sweetpotato roots by scratching



側とし、反対側の側面は無傷側とした。このようにして調製した傷害塊根を保蔵条件ごとに、蓋付きプラスチックボックス(40×80×深さ30cm)に入れて、それぞれ次のような保蔵環境下においた。

すなわち湿度については、ボックスに蒸留水を入れて高湿度条件(Wet、RH85～95%)を、また、シリカゲルの量を調整して低湿度条件(Dry、RH60～70%)を設定した。それぞれを13℃及び25℃の恒温温室におき、保蔵3、7、14、21日に3個ずつをサンプリングした。

各傷害塊根は長軸に沿って傷害側と無傷側に分割した後、それぞれから外部位(10mm厚)と内部位(10mm厚)を切り取り、各部位ごとに細切して、そのうちの一定量を分析試料とした。なお、健全塊根を対照におき、傷害塊根とともに各保蔵条件ごとに保蔵中の重量変化を測定した。各試料の分析値は塊根1個当たりの変動値を補正し、それぞれ保蔵0日の新鮮重当たりの含量に換算して示した。

### 3. 分析法

#### (1) 一般成分

各分析試料は、凍結乾燥の後、粉碎して分析に供した。

##### 1) 水分

常法により、新鮮試料の凍結乾燥時ならびに粉末試料の105℃乾燥時における損失重量から求めた。

##### 2) 可溶性糖

試料約1gに80%エタノール40mlを加えて70℃で30分間加熱、抽出した。抽出液についてソモギー-ネルソン法<sup>(38)</sup>で直接還元糖を測定して、グルコースとして表わした。また、抽出液5mlに5%塩酸



5mlを加えて沸騰浴中で15分間加水分解した後、中和し、同様に還元糖を測定し、可溶性全糖をグルコースとして表わした。

また、低分子成分についてTLCで調べた<sup>(39)</sup>。シリカゲル-アルミプレートを用い、展開はクロロホルム-メタノール-水(30:15:3、v/v)で行い、発色剤としてジフェニルアミン-アニリン-アセトン-80%リン酸(2g-2ml-100ml-15ml)液を噴霧後、80℃で加熱して発色させた。

### 3) 澱粉価

試料約250mgを2.5%塩酸50mlにより沸騰浴で3時間加水分解した後、中和し、上記と同様にして全糖量を求め、(全糖-可溶性全糖)×0.9の値で示した。

### 4) 水溶性ペクチン

試料約1gをエタノール50mlに一夜浸漬した後、遠心分離し、残渣を同様に水で抽出した。得られた水抽出液について、次のウロン酸と全糖の項で述べるカルバゾール変法<sup>(40)</sup>とフェノール硫酸法<sup>(41)</sup>を行い、全糖の項での補正式に基づいて求めた真のガラクチュロン酸値をもって水溶性ペクチンとした。

### 5) ウロン酸

カルバゾール変法で求めた。すなわち、試料液1mlをとり4Mスルファミン酸アンモニウム水溶液0.1ml、1Mホウ酸緩衝液(pH 8.4)を0.1ml加え、これを氷冷しながら濃硫酸5mlを加えて攪拌した。沸騰浴中に6.5分間おき、流水で10分間冷却したのち0.2%カルバゾール/エタノール液0.2mlを加え沸騰浴中に10分間おき、流水で10分間冷却して、530nmで比色し、ガラクチュロン酸(Ua)として表した。



#### 6) 全糖

フェノール硫酸法により測定した。すなわち試料1mlをとり、これに5%フェノール液1mlを加え、攪拌しながら濃硫酸5mlを加え20分間放置したのち、490nmで比色してグルコースとして表した。

中性糖(NS)とウロン酸(UA)の混合液において、中性糖はカルバゾール変法でガラクチュロン酸の3%の発色を示し、ウロン酸はフェノール硫酸法でグルコースの60%の発色を示す。

これらのことから次のような補正を行った。

$$UA = (Ua - 0.03TS) / 0.982$$

$$NS = TS - 0.6UA$$

なお、Ua及びTSは、上記の、カルバゾール変法で求めたガラクチュロン酸( $\mu g$ )、及びフェノール硫酸法で求めたグルコース( $\mu g$ )である。

#### (2) ポリフェノール

新鮮試料10gをメタノール20mlでホモゲナイズしてろ過した。これを2回繰り返して得られたろ液をメンブランフィルターに通した後、水を加え、減圧下でメタノールを留去し水溶液を得た。ヘキサン5mlを加えて分液の後、水層についてフォリン-チオカルト法<sup>(42)</sup>によりPP量を測定した。すなわち、抽出液2mlにフェノール試薬(10倍希釈)2mlを加えたのち、1%炭酸ナトリウム(w/v)2mlを加えて、35℃で60分間放置し、765nmでの比色値からクロロゲン酸当量として表わした。

#### (3) イポメアマロン

Ipの定性・定量は第1章に記したTLC、GLC及びGC-MSにより行っ



た。

#### (4) 組織染色

傷害塊根の中央部を10mm厚に輪切りにして、切断面に塩化鉄溶液あるいはエールリッヒ試薬<sup>(10,31)</sup>を直接塗付し、PPあるいはFTそれぞれの呈色を観察した。

#### (5) 組織の硬度

上記の塊根組織切断面について、果実硬度計（木屋製作所、Lタイプ、球頭プランジャー）を用いて測定した。

### Ⅲ. 結果

#### 1. 組織の変化

##### (1) 染色による組織観察

種々の保蔵条件下での傷害塊根の中央部切断面の変化を経日的に観察した。その一例としてKS14日の状況をFig. 2-2に示した。Wet条件では13℃、25℃ともに、擦過傷の部分にもほとんど変化が認められなかった。しかし、Dry条件においては、13℃では、傷害側皮層にのみ変色とPPとIpのわずかな呈色が現われたが、25℃ではこれらが顕著になり内部位にも広がることが認められた。

##### (2) 重量と硬度

Table 2-1に、保蔵14日における傷害塊根のいも重量の変化を示した。

傷害塊根の重量変化はKS、K14ともにWet条件では健全塊根と同様に±2%であったが、Dry条件では13℃で13～15%、25℃では28～32%の損失が認められた。なお、表の脚注に示したように、健全



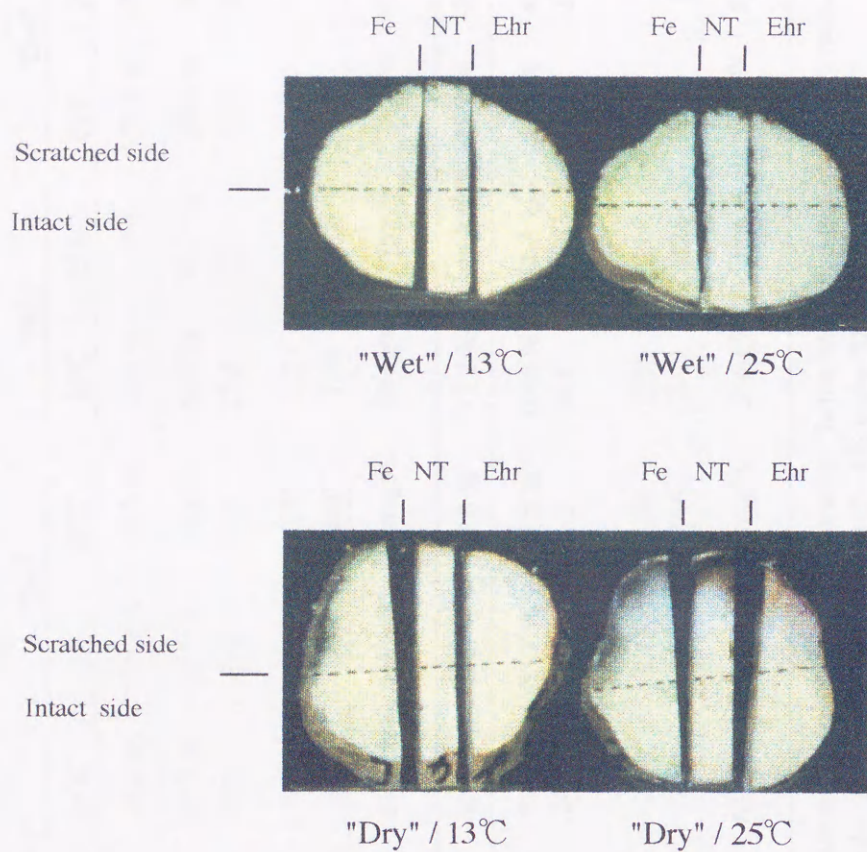


Fig. 2-2. Photograph of cross sections of scratching-injured sweetpotato roots

Fe : stained with  $\text{FeCl}_3$  solution for PP.  
 NT : not treated.  
 Ehr : stained with Ehrlich's reagent for Ip.



Table 2-1. Changes in carbohydrates of scratching-injured sweetpotato roots under various storage conditions

| Cultivars | Components                                   | Control<br>(0-day) | Inner part of scratched side |        |         |         | Inner part of intact side |        |         |         |
|-----------|--|--------------------|------------------------------|--------|---------|---------|---------------------------|--------|---------|---------|
|           |  |                    | "Wet"                        |        | "Dry"   |         | "Wet"                     |        | "Dry"   |         |
|           |  |                    | 13°C                         | 25°C   | 13°C    | 25°C    | 13°C                      | 25°C   | 13°C    | 25°C    |
| KS        | Weight* <sup>1</sup>                         | 0 %                | +0.8 %                       | +2.0 % | -13.2 % | -32.0 % | +0.8 %                    | +2.0 % | -13.2 % | -32.0 % |
|           | Moisture                                     | 66.5 %             | 68.5 %                       | 67.3 % | 56.3 %  | 39.8 %  | 68.1 %                    | 69.7 % | 59.4 %  | 45.2 %  |
|           | Starch value                                 | 28.4               | 27.5                         | 28.1   | 25.4    | 23.1    | 27.6                      | 27.1   | 26.0    | 25.3    |
|           | Soluble sugars                               |                    |                              |        |         |         |                           |        |         |         |
|           | Reducing                                     | 0.29               | 0.34                         | 0.31   | 0.28    | 0.77    | 0.24                      | 0.20   | 0.24    | 0.26    |
|           | Total  | 2.01               | 2.59                         | 2.03   | 2.00    | 2.00    | 1.98                      | 2.08   | 1.91    | 1.86    |
|           | Pectic compt.<br>Water soluble* <sup>2</sup> | 69mg%              | 60mg%                        | 61mg%  | 89mg%   | 108mg%  | 55mg%                     | 57mg%  | 73mg%   | 67mg%   |
| K14       | Weight* <sup>1</sup>                         | 0 %                | -1.2 %                       | +0.8 % | -15.2 % | -28.8 % | -1.2 %                    | +0.8 % | -15.2 % | -28.8 % |
|           | Moisture                                     | 70.8 %             | 69.6 %                       | 71.6 % | 55.7 %  | 45.5 %  | 69.4 %                    | 71.3 % | 55.3 %  | 46.1 %  |
|           | Starch value                                 | 24.3               | 24.2                         | 24.0   | 24.2    | 21.1    | 24.5                      | 24.5   | 24.3    | 23.6    |
|           | Soluble sugars                               |                    |                              |        |         |         |                           |        |         |         |
|           | Reducing                                     | 1.97               | 2.51                         | 2.28   | 2.13    | 1.00    | 2.35                      | 2.08   | 2.07    | 1.74    |
|           | Total  | 2.48               | 2.77                         | 2.54   | 2.47    | 2.18    | 2.49                      | 2.23   | 2.22    | 2.16    |
|           | Pectic compt.<br>Water soluble* <sup>2</sup> | 53mg%              | 64mg%                        | 63mg%  | 65mg%   | 71mg%   | 55mg%                     | 53mg%  | 55mg%   | 59mg%   |

\* 1 : expressed as change in weight of a whole tuberous root with scratching-injured and intact sides. In the case of non-treated tuberous roots,  $\pm 2\%$  under "Wet"/13°C and 25°C conditions,  $-1\sim 2\%$  under "Dry"/13°C conditions and  $-3\sim 4\%$  under "Dry"/25°C conditions.

\* 2 : expressed as galacturonic acid in water extract after EtOH extraction.

The respective inner parts of injured or intact sides were analyzed after 14-day storage, and the data were calculated on the basis of the fresh weight of 0-day storage samples.

Storage : 14 days



塊根の重量損失はWet条件では±2%、Dry条件では13℃で1~2%、25℃で3~4%に留まった。Fig. 2-3にKSについての例を示した。

各保蔵条件下における傷害塊根の中央部切断面の硬度はTable 2-2に示すように、Dry /25℃で最も大きい低下が見られた。K14は他の2品種に比べて硬度の低下が少なかった。

## 2. 一般化学成分の動向

保蔵14日における傷害塊根の傷害側及び無傷側それぞれの内部位の一般化学成分の変動をTable 2-1に示した。澱粉の減少は、Wet条件では傷害側、無傷側ともに少なく、傷害反応が抑制されているのに対して、Dry条件では、澱粉と水分の減少が大きくなり、特にKSの25℃では、保蔵前に比べて、傷害側において水分は40%、澱粉価は19%減少した。さらに無傷側でもそれぞれ32%、11%減少した。

可溶性全糖は、いずれも2%前後で変動が少なく、総体的にみて、KSでは非還元糖、K14では還元糖の割合が高かった。低分子成分について、Fig. 2-4に傷害側14日の外部位及び内部位のTLCを示した。非還元糖としてスクロース、還元糖としてグルコース、フラクトースが認められ、これらの消長には保蔵条件や品種により、多少の違いが見られた。

細胞壁の構造変化を示す水溶性ペクチンについては、Dry条件で、傷害側での増加が認められた。(Table 2-1)

このような澱粉や水溶性ペクチンのDry条件における変動は、K14に比べてKSで大きく現われた。



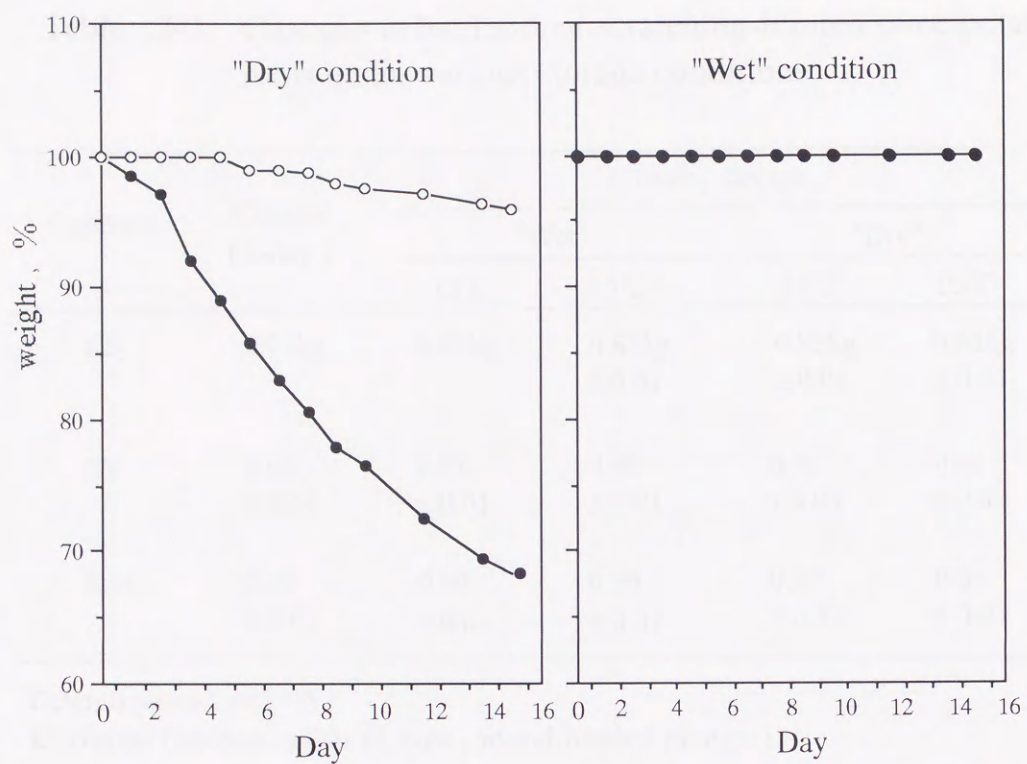


Fig. 2-3. Change in weight of scratching-injured sweetpotato roots during storage

Cultivar : KS, Storage temperature : 25°C

—●— : Injured, —○— : Intact



Table 2-2. Changes in hardness of scratching-injured sweetpotato roots under various storage conditions

| Cultivars | Control<br>(0-day) | 14-day storage |                 |                 |                 |
|-----------|--------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|           |                    | "Wet"          |                 | "Dry"           |                 |
|           |                    | 13°C           | 25°C            | 13°C            | 25°C            |
| KS        | 0.92kg             | 0.89kg         | 0.85kg<br>±0.01 | 0.83kg<br>±0.01 | 0.82kg<br>±0.01 |
| SY        | 0.92<br>±0.01      | 0.91<br>±0.01  | 0.90<br>±0.01   | 0.85<br>±0.01   | 0.81<br>±0.01   |
| K14       | 0.90<br>±0.01      | 0.90<br>±0.01  | 0.90<br>±0.01   | 0.87<br>±0.02   | 0.85<br>±0.01   |

Determination : n=3~5

Universal hardness meter (L type , round-headed plunger)



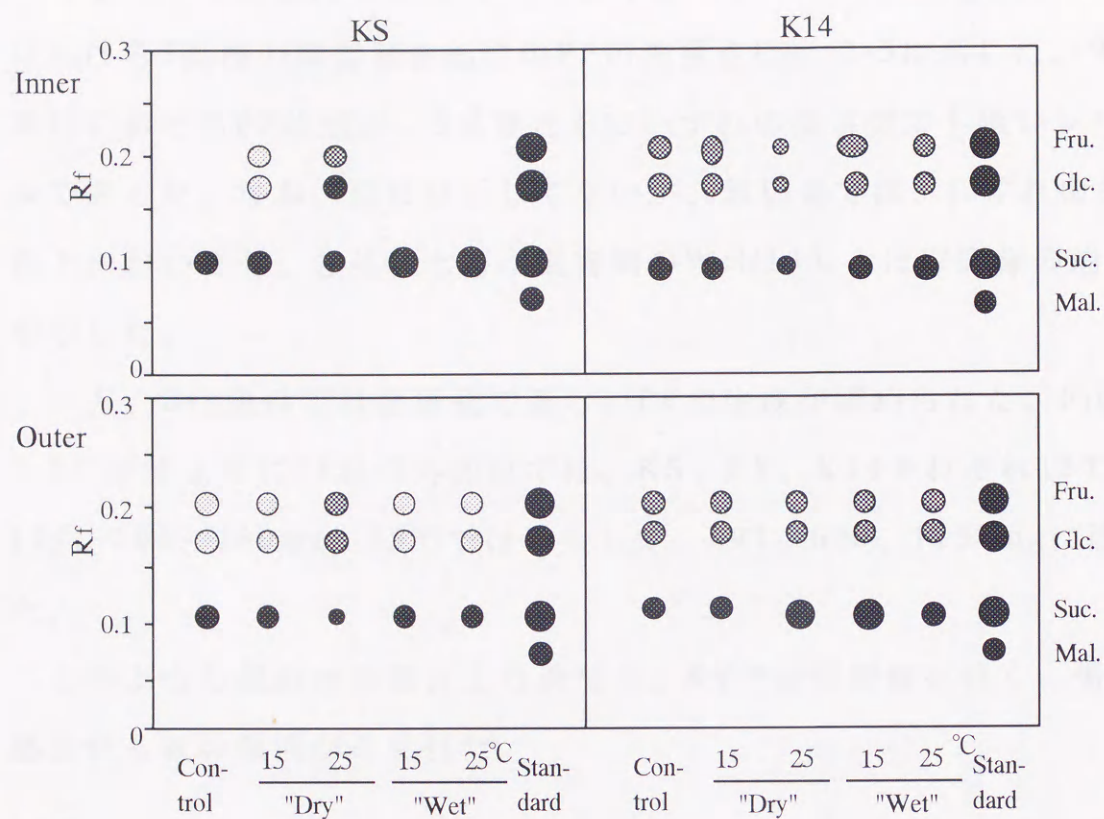


Fig. 2-4. TLC of soluble sugar in scratching-injured side of sweetpotato roots under various storage conditions

Storage : 14-day

TLC condition : silicagel / Al plate ;  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$   
( 30 : 15 : 3 )

diphenylamine-aniline-acetone-80%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , heated



### 3. ポリフェノールの消長

障害に伴う代表的生成物の一つであるPPについて、各保蔵条件下における3品種の傷害側各部位のPPの消長をFig. 2-5に示した。Wet条件におけるPP生成は、3品種ともにいずれの傷害側でも低いレベルであった。なお、図には示していないが、無傷側では、いずれの条件下においても、各品種ともに傷害側のWet/13℃とほぼ同様の消長を示した。

一方、Dry条件では傷害側で著しいPPの生成が認められた。Fig. 2-5に示すように14日の外部位では、KS、SY、K14それぞれ13℃で174、204、260mg、25℃では増大して、697、630、1157mgに達した。

このような傾向は品種により異なり、SYでは対照値が低く、傷害感受性も低い傾向がみられた。

### 4. フラノテルペン及びイポメアマロンの生成と消長

傷害塊根をDry/25℃においたとき、保蔵14日から傷害側にFT特有のエールリッヒ試薬による発色が見られたことから、KSの外部位抽出液についてシリカゲルプレートによるTLCを行ったところ、Ip (Rf 0.78)及びDHIp (Rf 0.74)をはじめとする一連のエールリッヒ試薬陽性のスポットが認められた。また、Fig. 2-6に示すようにGLCによりIpならびにDHIpに相当するピークが見出され、第1章で単離したそれぞれの標品と一致することを確認した。さらに、これらのピークはGC-MSでもIp及びDHIp標品と同じ開裂パターンを示した。



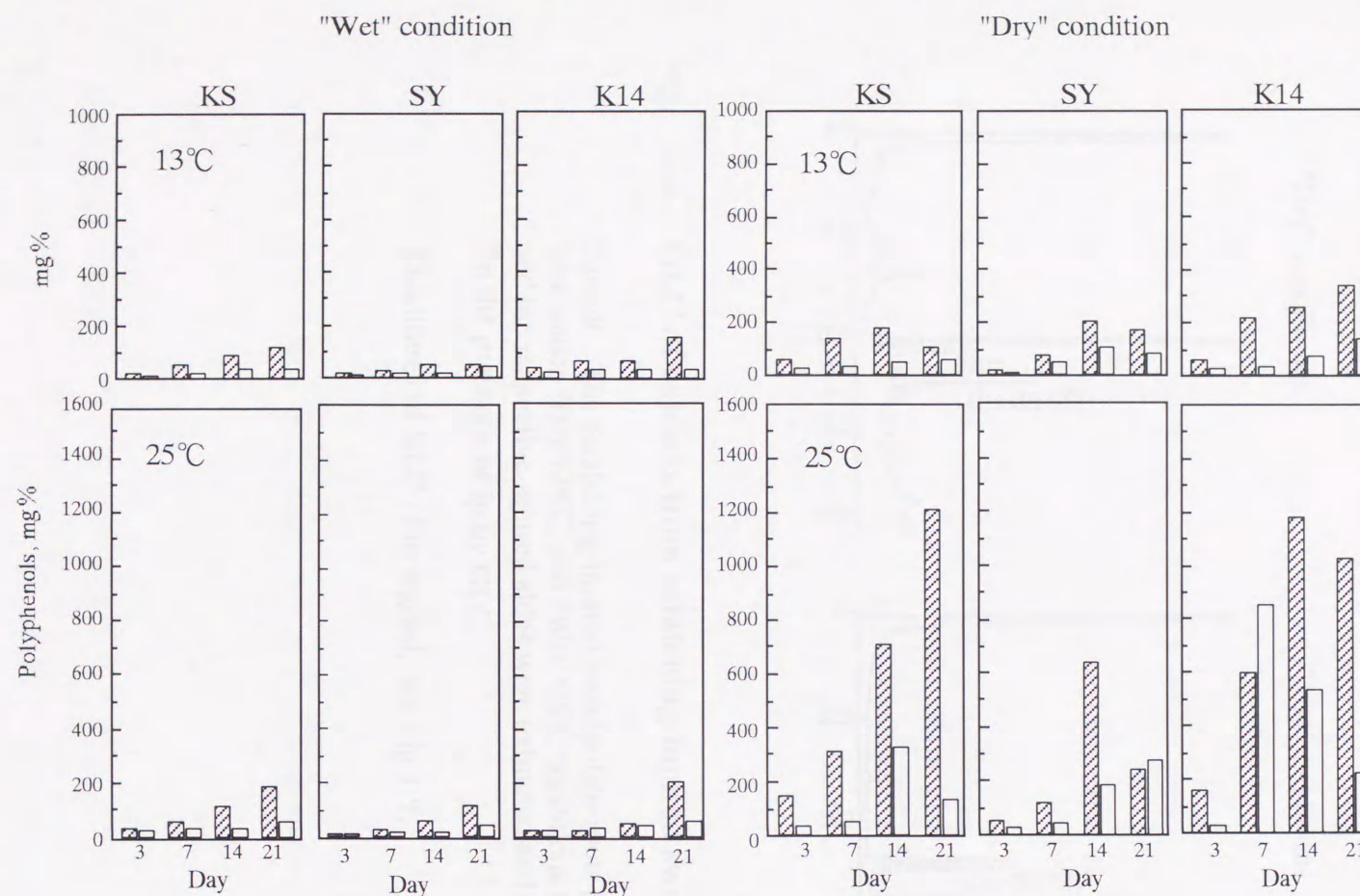


Fig. 2-5. Formation of PP on scratching-injured side of sweetpotato roots under various storage conditions

Abbreviations and experimental methods: refer to the diagram of experiments shown in Fig. 2-1.

Content of PP on the intact side of the respective cultivars under all the storage conditions was similar to that of cultivars under "Wet"/13°C condition.

▨ : Outer part , □ : Inner part.



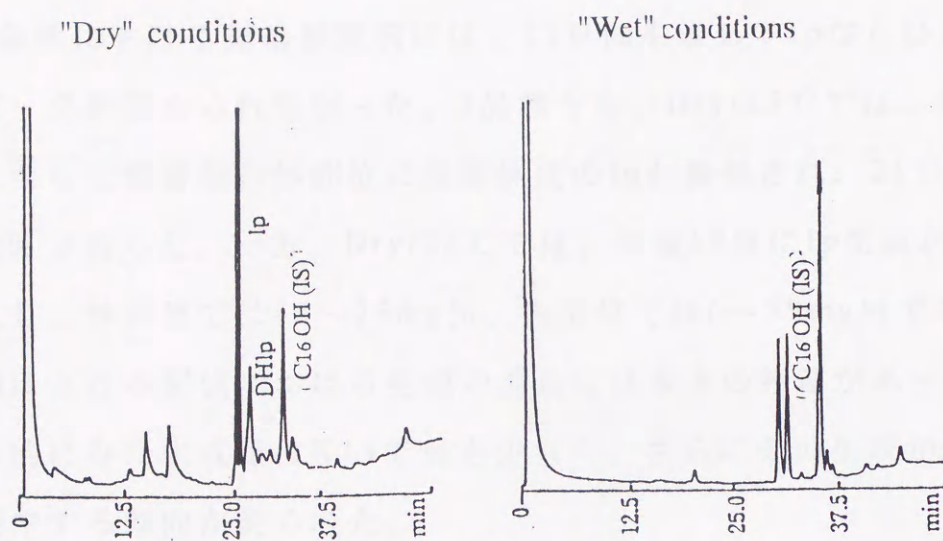


Fig. 2-6. GLC of extracts from scratching-injured sweetpotato roots.

Sample : The scratching-injured sweetpotato roots (KS) were kept under "Dry"/25°C and "Wet"/25°C conditions for 14 days, and the respective injured sides were extracted and analyzed for the presence of Ip by GLC.

Conditions of GLC : For legend, see Fig.1-7.



各部位の抽出液についてGLCによりIp定量を行ったところ、Dry条件における傷害側にのみIpの生成が認められたので、この結果をFig. 2-7に示した。図には示さなかったが、Wet条件の全試料とDry条件における無傷側試料には、21日間を通してIpならびにDHIpのピークが認められなかった。3品種とも、Dry/13℃では、保蔵14日に至って傷害部の外部位に痕跡程度のIpが検知され、21日でも4~7mg%であった。一方、Dry/25℃では、保蔵14日にIp生成が著しく増大し、外部位では45~73mg%、内部位では6~79mg%であった。品種により各部位における生成の消長には多少の相違があったが、全体的にみた生成量はK14で最も少なく、さらにその生成が外部位に集中する傾向が見られた。

#### 5. 流通過程における傷害塊根とフラノテルペン生成

これまでの実験は人工的な擦過傷によるものであったが、サツマイモの流通過程において著しい擦過傷がついた塊根を市場で入手し、これを実験室で前記のDry及びWet条件において室温で貯蔵した。Table 2-3に示したように、Wet条件ではIp、FTともごくわずかしき生成が見られなかったが、Dry条件では顕著なIp、FTの生成が認められ、傷害後の保蔵条件が重要であることが確かめられた。

#### IV. 考察

サツマイモ特有のフィトアレキシン<sup>(14)</sup>であるIpなど一連のFTは機械的傷害だけでは生成されにくく、各種化合物や病原菌、害虫などによる加害が継続的ストレスとなって誘導蓄積される<sup>(16)</sup>ものと理解



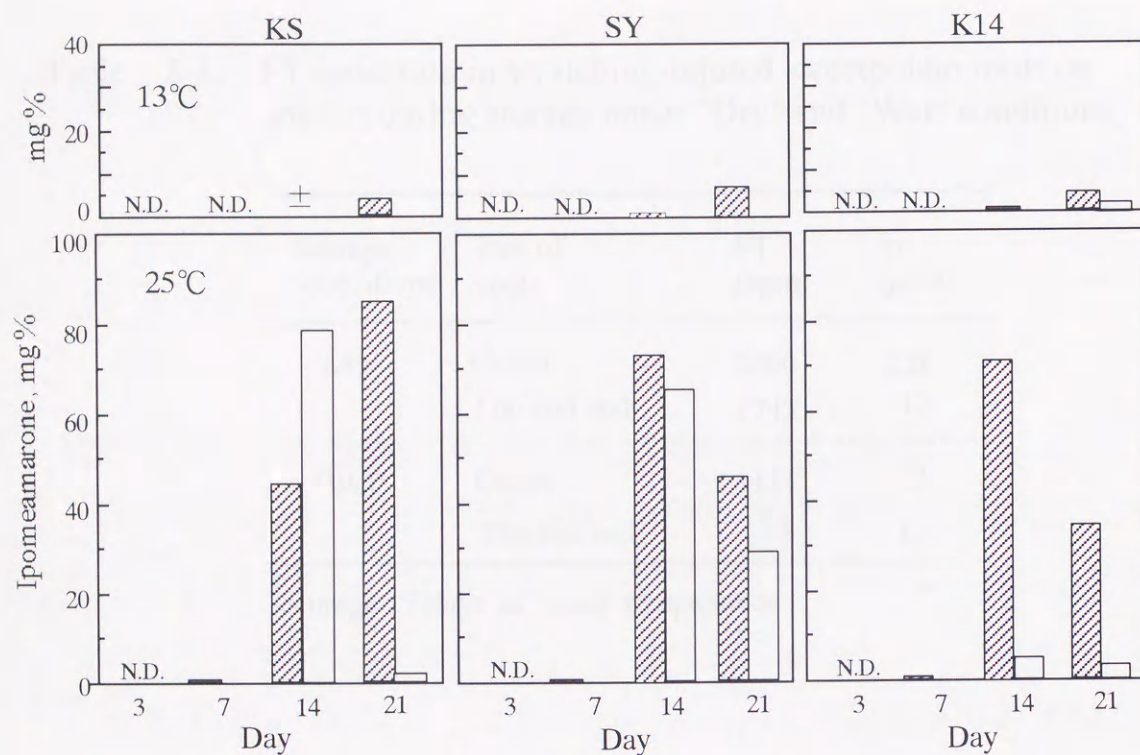


Fig. 2-7. Formation of Ip on scratching-injured side of sweetpotato roots under "Dry" conditions

Abbreviations and experimental methods : refer to the diagram of experiments shown in Fig. 2-1.

▨ : Outer part , □ : Inner part , N.D. : not detected.



Table 2-3. FT-induction in scratching-injured sweetpotato roots on market during storage under "Dry" and "Wet" conditions

| Storage conditions | Part of roots | FT (ppm) | Ip (ppm) |
|--------------------|---------------|----------|----------|
| "Dry"              | Center        | 2090     | 225      |
|                    | Top and end   | 1742     | 15       |
| "Wet"              | Center        | 151      | 2        |
|                    | Top and end   | 85       | 13       |

Storage : 9 days at room temperature



され、誘導因子(エリクター)の検索が試みられている<sup>(18,19,20)</sup>。一方、このような塊根の傷害に起因する品質劣化を抑制する実用手段として、傷害塊根を最適の温度・湿度条件下において傷口に治癒組織の生成を促し、その後の貯蔵中の変敗・損失を防止できること<sup>(24,25)</sup>が知られている。さきに永浜ら<sup>(23)</sup>が報告したように人為的傷害塊根におけるIp生成にも、傷害後の保蔵条件が重要な要素となっているものと考えられた。

#### 傷害塊根の異常代謝に及ぼす保蔵湿度と温度の影響について

本研究<sup>(33)</sup>の目的に従って、塊根試料、使用器具、実験施設はそれぞれ適当な殺菌法を行なって、全操作を通じて菌汚染の防止に努めた。

塊根試料の両側面の一方の表層に人為的に擦過傷を与えて傷害側とし、反対側はそのままにおいて無傷側とした。また、それぞれをさらに外部位と内部位に切り分けて分析し、傷害の影響が及ぶ範囲を検討した。(Fig. 2-1)

機械的傷害によるサツマイモの一般的応答として、呼吸の増進、澱粉の減少、可溶性蛋白質の低分子化、PPの増大、組織・細胞膜壁などの変性、そしてこれらの変動に対応した関連酵素の消長などが知られている<sup>(12,36)</sup>。また、キュアリングや諸貯蔵条件下における重量損失と貯蔵歩留まり、化学成分、組織の物性などが調べられている<sup>(43,44)</sup>。

そこで、Wet (RH85~95%) 条件とDry (RH60~70%) 条件で保蔵した傷害塊根について諸要素の消長を調べた。



Wet 条件貯蔵下では、重量損失や各糖質成分にほとんど変動が認められず (Fig. 2-3、Table 2-1)、また、PP も低いレベルで推移した (Fig. 2-5)。特に13℃ではこれらの変化が少なく、傷害に伴う異常代謝がこの温度では抑制されていることが示唆された。

また、切断面の肉眼的観察や染色試験、あるいは硬度測定の結果からも、Wet条件では全体的にほぼ健全状態を保持していることが認められた (Fig. 2-2、Table 2-2)。

さらにこのようなWet条件では、傷害側でも、GLC分析により、Ipの生成が検知されなかった。

一方、Dry条件では、傷害側で水分の損失と澱粉の減少、水溶性ペクチンの増加 (Table 2-1)や、PPの生成 (Fig. 2-5)、また、組織の硬度の低下 (Table 2-2) や組織の変化が認められ (Fig. 2-2)、傷害に対する直接的応答が進行していることがわかった。また、これらの現象は25℃で進行する傾向にあり、温度の影響も大きいことが示された。

さらに、Wet条件では検知されなかったIpが、Dry条件では傷害側に認められ、13℃に比べて25℃では著しく増大して、21日間の最高値はKSの外部位における86mg%であった (Fig. 2-7)。

このように傷害反応は保蔵条件によって大きく異なり、乾燥条件が品質の変化を引き起こし、その度合が25℃で増大したと考えられた。

これらのことから、傷害塊根の貯蔵中の品質管理において、最も重要な要素は湿度であり、高湿度保蔵で品質の変化が小さかったのは、キュアリング<sup>(25,43)</sup>による傷害組織の治癒効果によるものと考え



られた。このことは原料塊根の貯蔵技術の上でも重用な知見である。

また、市場で入手した流通過程で著しい擦過傷がついた塊根を実験室でDry及びWet条件において室温で保蔵した場合、Wet条件ではIp、FTともごくわずかしかな生成が見られなかったが、Dry条件では顕著なIp、FTの生成が認められた (Table 2-3)。この知見は、ワイヤブラシでの人工的な機械的傷害によるIp・FTの生成が、実際における機械的傷害のモデル系として有効なことを示している。

今回の実験では、Dry条件下においた健全塊根の重量損失は3~4%に止まり、Ipの生成は認められなかった。また、同じ傷害塊根の無傷側、あるいは健全塊根を強い乾燥条件下において傷害塊根と同じように約30%の重量損失を示した試料でもIpの生成は認められなかった。

以上の事実は、Ipの生成・蓄積には、機械的傷害に続くその後の保蔵環境、特にDry条件のような低湿度環境がいわゆる継続的ストレス<sup>(16)</sup>として作用することを強く示唆している。

#### Dry条件下における傷害塊根のIp生成について

Ipを主体とするFTの生合成機構について、大羽や瓜谷らは、塊根切片の調製自体が切断傷害となって蛋白質合成や傷害応答系の転写、翻訳機構が増大するが、Ip合成系の律速酵素が活性化されず、Ipの生成・蓄積には至らないとしている<sup>(12-14,16)</sup>。

これらの塊根切片を用いた実験系は、本実験における塊根を傷害試料とした場合と試料サイズが異なるが、その後の塊根切片は充分に湿度を保った容器中でインキュベートされているので、本実験に



におけるWet条件に準ずると見なされる。従って、今回の傷害塊根のWet条件下での保蔵の結果は、瓜谷<sup>(16)</sup>らの実験系と同様に傷害が一過性のストレスに止まって、Ipの生成に至らなかったことを意味していると考えられる。

このように、Wet条件あるいはDry条件における傷害ストレスの発現を考察する上で、傷害塊根の治癒を促すキュアリング<sup>(24,25,45)</sup>の温・湿度条件は大きな示唆を含んでいる。

従来、サツマイモの長期貯蔵に際して、RH70~75%の低湿度では健全塊根の貯蔵歩留まりが低下することが知られている<sup>(25)</sup>。一方、キュアリングにおける塊根傷口の治癒、すなわち傷口周皮細胞のスベリン化やその下層の傷害コルク層の形成は、最適条件とされる高湿度のRH95%/約30℃の場合に比べて、低湿度のRH60%/約21℃ではその発達と完成速度が極めて遅いことが報告されている<sup>(26,27)</sup>。

また、Walterら<sup>(46,47)</sup>は、塊根の切り傷の治癒は傷口直下の細胞のスベリン化と、その下層の傷害コルク細胞層の生成によって創傷治癒(wound healing)が完成するが、しかし低湿(RH40~71%)低温(17~25℃)の諸条件下では創傷治癒の完成が遅くなることを指摘している。

このような創傷治癒の完成条件を考え合わせると、Dry条件下においては、創傷部位の治癒が起りにくく、傷害自体が継続的にストレスとして作用してIpの生成・蓄積に至るものと考えられる。

## V. 小括

サツマイモ特有のストレス応答反応として、病虫害や各種薬剤処



理などによるIpなどのFTの生成が知られている。

本章では、傷害塊根の品質劣化、特にIp生成について、機械的傷害自体とその後の保蔵条件の影響を調べた。

除菌条件下で塊根の片側側面の皮層に擦過傷をつけ、一定の温・湿度条件下で保蔵して、3、7、14、21日の試料について重量変化と傷害側、無傷側それぞれの部位別の成分変化を追跡した。

その結果、高湿度条件 (Wet : RH85~95%、13℃、25℃) では全体的に成分変動が極めて少なく、Ipも検出されなかった。一方、低湿度条件 (Dry : RH60~70%、13℃、25℃) では、重量損失や組織の軟化、澱粉の減少、PPの増加が認められ、これらの変動は傷害側で大きく現れた。Ipは傷害側だけに確認され、その生成は25℃で著しく増進された。健全な塊根では、上記の両条件下での重量損失も少なく、Ip生成も認められなかった。

これらの結果は、Ipを含むFTの生成・蓄積には機械的傷害と、その後の保蔵環境、特に低湿度が重要な要因となることを示している。このような条件では擦過傷部位の修復が進行せず、傷害自体が継続的にストレスとして作用するものと考えられる。

なお、使用したKS、SY、K14では、傷害感受性に多少の品種間差異が認められた。

これらの知見は、原料塊根の貯蔵技術の上でも、有用なものと思われる。



### 第3章 サツマイモの機械的傷害によるフラノテルペン誘導因子の生成とその性質

#### I. 緒言

サツマイモのフィトアレキシンIp生成の誘導因子(エリシター)に関する研究として、瓜谷の研究グループは、黒斑病菌体や胞子体<sup>(18)</sup>あるいはアリモドキゾウムシ成虫<sup>(20)</sup>や幼虫<sup>(19)</sup>の磨砕物から、FT誘導因子を分離しているが、構造や機能などの詳細は不明確のままに残されている。

その間、各種の感染植物についてフィトアレキシンが単離され<sup>(17)</sup>、関連するエリシターや、これらの構造とシグナルとしての機能なども明らかにされてきた<sup>(48,49)</sup>。

しかし、いずれの研究も、上記のような病虫害や化学薬剤による外因性の生物学的あるいは化学的ストレスに惹起するものであり、物理的ストレスについては、凍結<sup>(50)</sup>や紫外線傷害<sup>(51)</sup>に伴う植物自体の内生エリシターに関する報告があるにすぎない。

このような研究例の少ない物理的ストレスに関して、前章ではサツマイモについての機械的傷害の作用を以後の保蔵条件と関連させて検討するため、除菌条件下で人為的に擦過傷を与えた塊根について保蔵の温・湿度の影響を調べた。その結果、低湿度条件では著しい品質劣化とともにIpが生成することを認め、さらにその成因を考察したところ、低湿度条件下の保蔵によって内生Ip誘導因子が生成されることが考えられた。

そこで本章では、このような傷害塊根にIpを生成させる低湿度条



件下での保蔵過程において、IpなどのFTが生成していない保蔵段階にある傷害塊根の傷害部水抽出液の作用を調べた結果、抽出液にFT誘導活性があることを見出した。そして、この水抽出液より分離された活性成分について種々の分画や処理を行い、それに伴う活性と組成の変化などを調べ、介在する誘導因子の性質を明らかにした。

## II. 材料及び方法

### 1. サツマイモ塊根試料

品種はKSで、主として鹿児島県知覧町及び鹿児島大学農学部附属農場産のサツマイモを用いた。いずれも供試するまで、あらかじめ200倍希釈オスバン液を噴霧した貯蔵庫(15~20℃、RH80~90%)で保蔵した。

実験に際して、塊根は水洗した後、0.5%次亜塩素酸ナトリウムに20分間浸漬し、使用器具や装置などはエタノールその他で殺菌して用いた。

### 2. 傷害塊根抽出液の調製

第2章II-2に準じて傷害塊根を調製した後、Fig. 3-1に示したように傷害部位(5mm厚)を0.2%L-アスコルビン酸ナトリウム液<sup>(52)</sup>で抽出し、そのDiaflow膜YM10通過画分DM10を得た。

### 3. 分析法

#### (1) 一般成分

第2章II-3に準じて、全糖はフェノール硫酸法<sup>(41)</sup>によりグルコース



Fresh sweetpotato roots , 582g

- scratched whole surface by a wire brush
- kept under "Dry" condition (RH60~70%, 25°C) for 3 or 7 days

Injured sweetpotato roots

- steeped in 0.2% Na L-ascorbate under reduced pressure
- divided into two parts

Outer part , 5mm in thickness (295g <sup>a</sup>)

Inner part

- homogenized with one volume of the steeping solution  
in the presence of PVPP<sup>b</sup> (5%wt. of outer part)
- filtered through 4-folded gauze

Filtrate

- treated with 50ml of CHCl<sub>3</sub> , and then centrifuged

Aqueous layer

CHCl<sub>3</sub> layer

- filtered through membrane filter (0.45  $\mu$  ), then through  
Diaflow membrane filter YM10
- lyophilized

Fraction DM<sub>10</sub> , 10.9g

Control : CM<sub>10</sub> from fresh roots and WM<sub>10</sub> from injured roots kept under "Wet"  
condition (RH85~95% at 25°C) for 7 days

Fig. 3-1. Preparation of FT-inducing factor (elicitor) from scratching-injured sweetpotato roots

a) converted into weight of fresh sweetpotato roots

b) polyvinylpolypyrrolidone (nacalai tesque Co.)



として、ウロン酸はカルバゾール変法<sup>(40)</sup>によりガラクチュロン酸として、PPはフォルイン-チオカルト法<sup>(42)</sup>によりクロロゲン酸として求めた。

蛋白質は、試料0.5mlをとり、ローリー法<sup>(53)</sup>により得られた660 nmでの比色値よりアルブミンとして表した。

## (2) フラノテルペン及びイポメアマロン

第1章Ⅱ-2に準じて抽出試料液を調製し、比色、TLC、及びGLCによる分析を第1章Ⅱ-3に示した方法で行った。

## (3) フラノテルペン誘導活性のバイオアッセイ

### 1) 誘導因子の投与とインキュベーション

塊根を厚さ5mmに輪切りした後、各スライスを2～3個の扇型に切断し、各切片の片面に豆剣山（直径20mm、針数61本、針深2mm）を押し付けて投与面とした。1試料につき3～5枚の各切片に50あるいは100  $\mu$ l（塊根傷害部0.25g相当量/切片）を投与した後、容器に入れ、25℃で3～5日間培養して測定に供した。

対照切片には、殺菌水あるいは緩衝液を投与した。

なお、これらの操作は無菌室で行った。また、容器には殺菌水を入れたシャーレを置いて高湿度を保った。

### 2) 活性の評価

#### a) GC及び比色による定量

切片の試料投与部について第1章Ⅱ-2に従って抽出し、第1章Ⅱ-3により求めた総FT量あるいはIp量で評価した。

#### b) 発色試薬の直接塗布による呈色の評価

簡便法として、切片の試料液投与部にエールリッヒ試薬<sup>(10)</sup>100  $\mu$ l



を直接塗布し、FTによる赤紫色の度合を肉眼で5段階で評価した。  
また、切片上の呈色の数値化には分光測色計 (CM-2002、Minolta)  
による $a^*$ 値と $b^*$ 値から求めた色相差 $\Delta H^*$ を用いた<sup>(54)</sup>。 $\Delta H^*$ の算出  
法は次のとおりである。

$$\Delta H^* = [(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 - (\Delta C^*)^2]^{1/2}$$

$$\Delta C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} - [(ac^*)^2 + (bc^*)^2]^{1/2}$$

ac: 対照の $a$ 値、bc: 対照の $b$ 値

Fig. 3-2 に上記のFT誘導活性のバイオアッセイ法の概要について  
まとめた。

#### (4) 誘導活性画分の分画

##### 1) 限外ろ過膜

分子量分画には各種のDiaflow膜を用いた。YM10で得られた画分  
DM10からYC05の通過画分DM05を除き、膜上に残った画分DM05-10  
からYM3の通過画分DM05-3を得た。膜上の各画分は蒸留水を加えて  
希釈・濃縮を数回繰り返して精製した後、凍結濃縮して以後の実験  
に供した。

##### 2) Sep-Pakカートリッジ

各種のSep-Pakカートリッジ (Waters)を用いた。DM05-3の1ml  
(塊根試料5g相当) をあらかじめメタノールで前処理したPlusC18に  
通し、水2mlで洗って素通り画分とした。次いでエタノール2mlで溶  
出して吸着画分とした。

一方、DM05-3 1mlをAccell PlusCM、続いてPlusQMAに通して  
中性画分を分離した。両カートリッジの吸着成分はいずれも1M塩化  
ナトリウム 1mlで溶出、水洗して、それぞれを塩基性画分、酸性画



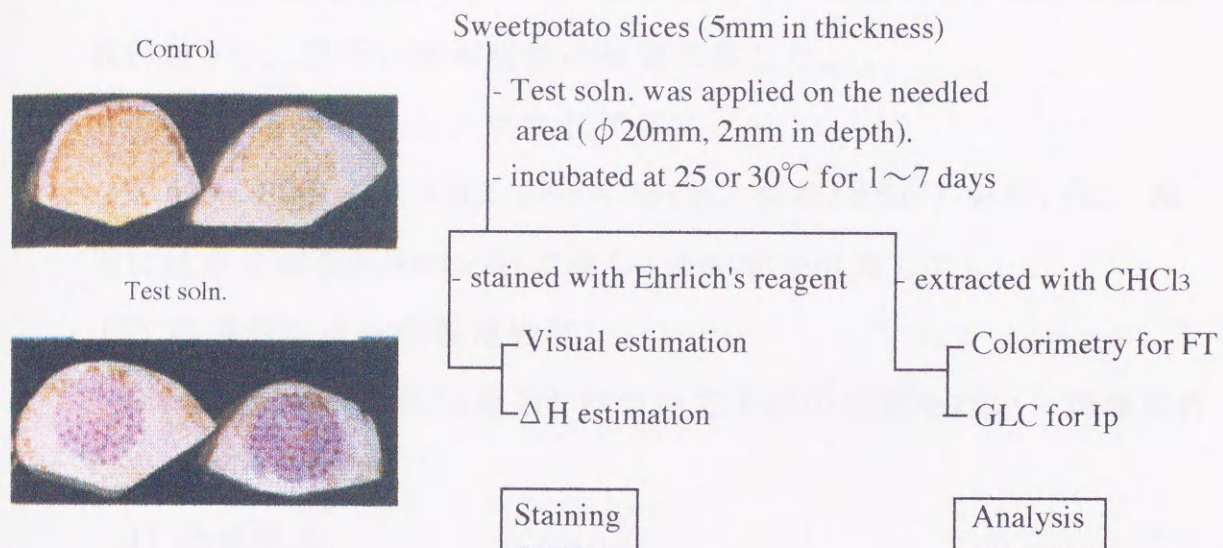


Fig. 3-2. Bioassay of FT-induction



分とした。また別にDM05-3のQMA吸着成分を、段階的に0.125～2.0M塩化ナトリウムで溶出した。

各画分は必要に応じてYC05膜で脱塩し、原液あるいは凍結濃縮液(1ml)を、分析と誘導活性の検定に供した。

### 3) ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

Biogel P2カラム ( $\phi$  2.2cm $\times$ 76cm、容積288ml) を用いた。溶出には水を流量8.4ml/hrで流し、5mlずつ分画した。

### (5) 誘導活性画分の各種処理

DM05-3 (塊根試料5g相当) について下記の処理を行い、誘導活性の変化を調べた。

#### 1) 加熱処理

水1mlに溶解して沸騰浴中で5分間加熱した。

#### 2) 酸あるいはアルカリによる加水分解

1N 塩酸3mlに溶解して、沸騰浴中に1時間おいた後、1N 水酸化ナトリウムで中和、遠心分離して上澄液を凍結乾燥した。また、0.1N 水酸化ナトリウム3mlに溶解して、1時間加熱の後、中和して同様に処理した。

#### 3) プロナーゼあるいはグリコシダーゼによる分解

20mMリン酸緩衝液 (pH6.5) 2mlに溶解し、プロナーゼE (科研化学) 2mg/緩衝液 0.5mlを加えて、37℃に3時間おいた後、5分間加熱して反応を止めた。

一方、サザエ由来のグリコシダーゼ (*Turbo cornutus*、生化学工業、mixed:N-アセチルグルコサミニダーゼ、マンノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フコシダーゼなどを含む) を20mM酢酸緩衝液 (pH



4.5、1mg/ml)に溶解し、同じ緩衝液に対して透析した後の透析内液0.1mlをDM05-3溶液(同上緩衝液)2mlに加えて37℃に3時間おいた後、同様に反応を停止させた。

対照には、加熱処理した各酵素液を用いた。

#### (6) TLC

ウロン酸は、展開を酢酸エチル-酢酸-水(10:5:6)により行い、オルシノール-硫酸液を噴霧後、加熱して発色させた<sup>(55)</sup>。

PPについては、展開をクロロホルム-メタノール-水(15:10:2)<sup>(39)</sup>で行い、発色にはスルファニルアミド試薬<sup>(56)</sup>を用いた。

#### (7)電気泳動

担体はSeparaxセルロース-アセテート膜(6×11cm)を用い、緩衝液<sup>(57)</sup>には10%ピリジン+0.3%酢酸+50mMエチレンジアミン四酢酸-4ナトリウム(pH6.5)を使用した。12mAの定電流で20分間泳動を行ったが、この間、電圧は550Vから350Vまで変化した。染色は、酸性糖に0.5%トルイジンブルー/1%酢酸を、蛋白質には0.8%ボンソー-3S(+6%トリクロロ酢酸/水)を用いた。また、洗液には0.1%酢酸を使用した。

### Ⅲ. 結果

#### 1. 傷害塊根におけるフラノテルペン誘導因子の生成

##### (1) 保蔵期間と誘導因子の生成

第2章で傷害塊根をDry条件で21日間保蔵し、保蔵14、21日の傷害塊根で顕著なFTの生成を認めた。本章では、まずFT生成がほとんど認められなかった7日(第2章Ⅲ-4)と、さらに遡った保蔵3日の傷害



Table 3-1. Inducing activity of extract from injured sweetpotato roots kept under "Dry" conditions

| Period kept under "Dry" <sup>a</sup> conditions | Ip (ppm) in injured roots | Inducing activity of DM <sub>10</sub> <sup>b</sup> |          |
|---|---------------------------|--|----------|
|   |                           | FT (ppm)   | Ip (ppm) |
| Control   | 0                         | 52   | 0        |
| 3 days  | 0                         | 81   | 2        |
| 7 days  | 0                         | 1050   | 50       |

a) Mechanically injured sweetpotato roots were kept under "Dry" conditions for 3 or 7 days.

b) Sweetpotato slices were dosed with the respective DM<sub>10</sub> prepared from the injured or intact sweetpotato roots, corresponding to 0.5g each. They were incubated for 5 days at 25°C. Then, FT and Ip induced in the slices were estimated by colorimetry and GLC, respectively.



塊根の抽出液によるFT誘導について、バイオアッセイにより調べた。

すなわち、保蔵3及び7日の傷害塊根から調製した抽出液を健全塊根切片に投与し、切片でのFT及びIpの誘導を調べた。Table 3-1に示したように、誘導量は、保蔵3日の塊根抽出液でのFTが81ppmであり、Ipはほとんど認められなかった。一方、保蔵7日の塊根抽出液では急激な増大が見られ、FTは1050ppm、Ipは50ppmの生成を示した。

保蔵7日の傷害塊根の皮層部の水及びクロロホルム-メタノール抽出液には、IpはGLCで認められなかった。またFTについては、水抽出液には認められずクロロホルム-メタノール抽出液では健全塊根と同レベルの比色値を示した。

このように保蔵7日はFTやIpの急激な生成に先立つ段階にあった。

誘導活性のほとんどは、分子量分画膜YM10による通過画分DM10のみに見出された。以後、この保蔵7日の傷害塊根の皮層部抽出画分DM10中の誘導因子について検索した。

## (2) 抽出液によるフラノテルペン及びイポメアマロンの誘導

### 1) フラノテルペン及びイポメアマロンの誘導・生成

画分DM10により誘導される成分をGLCとTLCで検討した結果、Fig. 3-3に示したようにIp (GLC、 $R_t=25.7\text{min}$  ; TLC、 $R_f=0.61$ ) とDHIp (GLC、 $R_t=27.1\text{min}$  ; TLC、 $R_f=0.55$ ) に相当するピークやスポットが認められ、これらは第1章で調製したそれぞれの標品と一致した。

### 2) 誘導量の経日変化

DM10により塊根切片に誘導・生成される総FT量及びIp量はFig.



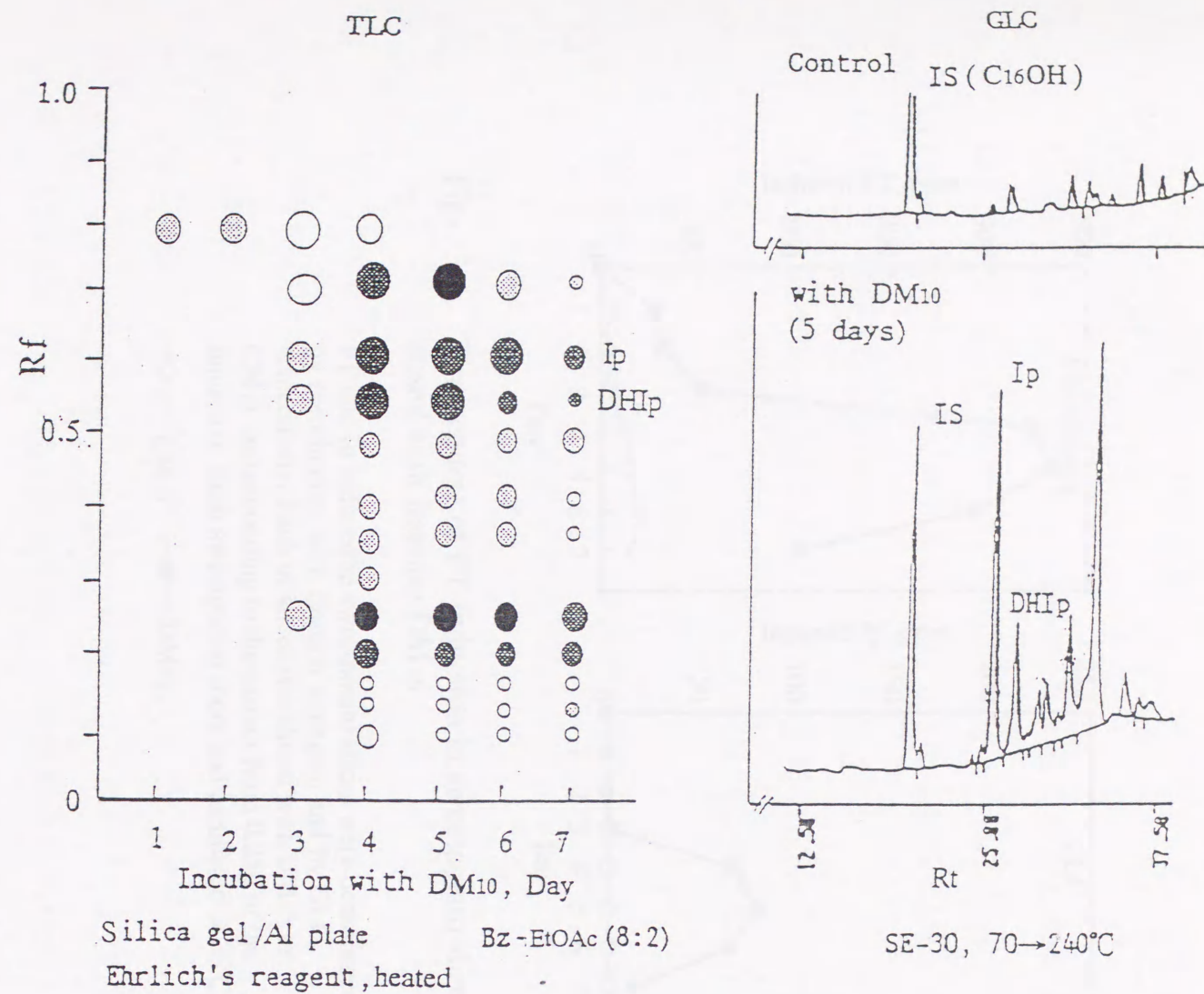


Fig. 3-3. TLC and GLC of FT induced in slices dosed with DM 10

For legend, see Fig. 1-7.



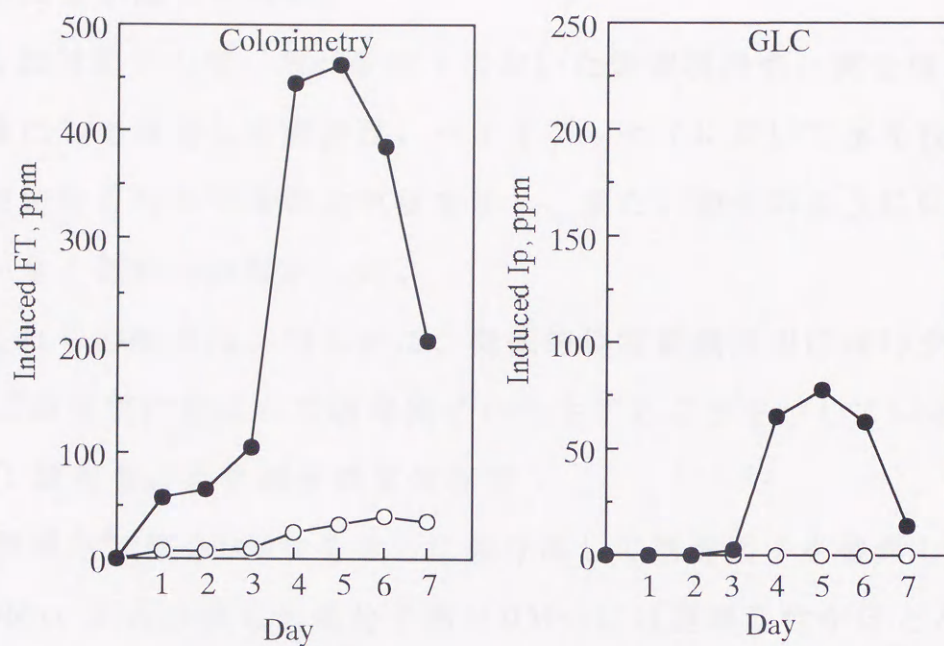


Fig. 3-4. Time course of FT-induction in sweetpotato slices dosed with fraction DM<sub>10</sub>

FT and Ip induced in sweetpotato slices were determined by colorimetry with Ehrlich's reagent and by GLC, respectively. Each of slices was dosed with DM<sub>10</sub> or CM<sub>10</sub> corresponding to the extract from 0.25g of the injured or fresh sweetpotato roots and incubated at 25°C.

—○— : CM<sub>10</sub> , —●— : DM<sub>10</sub> .



3-4に示すような経日的消長を示し、いずれも4～6日の間に最高値に至ることが認められた。

なお対照として、Wet条件下においた傷害塊根や、健全塊根から、同様にして調製した画分は、バイオアッセイにおいて水を投与した塊根切片と同レベルの比色値を示し、また、後述のようにGLCでもIpが全く認められなかった。

これらの結果は、明らかに、機械的傷害組織周辺にはIpや関連するFTの生成に先立って誘導因子が内生することを示している。

### 3) 誘導量の活性画分濃度依存性

誘導活性画分DM<sub>10</sub>をさらに膜分画して誘導因子を検索した。

DM<sub>10</sub> から分離した低分子画分DM<sub>05</sub>には誘導活性がほとんど認められなかった。活性を示すDM<sub>05-10</sub>について、塊根切片への投与希釈率とFTやIpの誘導量との関係を調べた結果、Fig. 3-5に示すように、この実験の範囲ではいずれにも直線関係が認められ相関係数 $r=0.999$ 、 $0.994$ であり、FTやIpの誘導は共に投与量に比例した。

### (3) 塊根スライスの各部位におけるフラノテルペン誘導量の差異

塊根を輪切りにして調製したスライスの全面にDM<sub>10</sub>を投与し、25℃で5日インキュベートしたものについて、Fig. 3-6のように切り分けた各部位のFTの生成を比較した。形成層を含むPart 1-1ではFTの誘導量が極めて多く、Part 2-1と3-1ではほぼ同じレベルの誘導量であった。

このことより、本章における誘導活性のバイオアッセイでは、II-3-(3)に記したように、扇型切片のPart 1-1及び1-2にあたる皮層部5mmを除いた部位を用いて誘導活性を調べた。



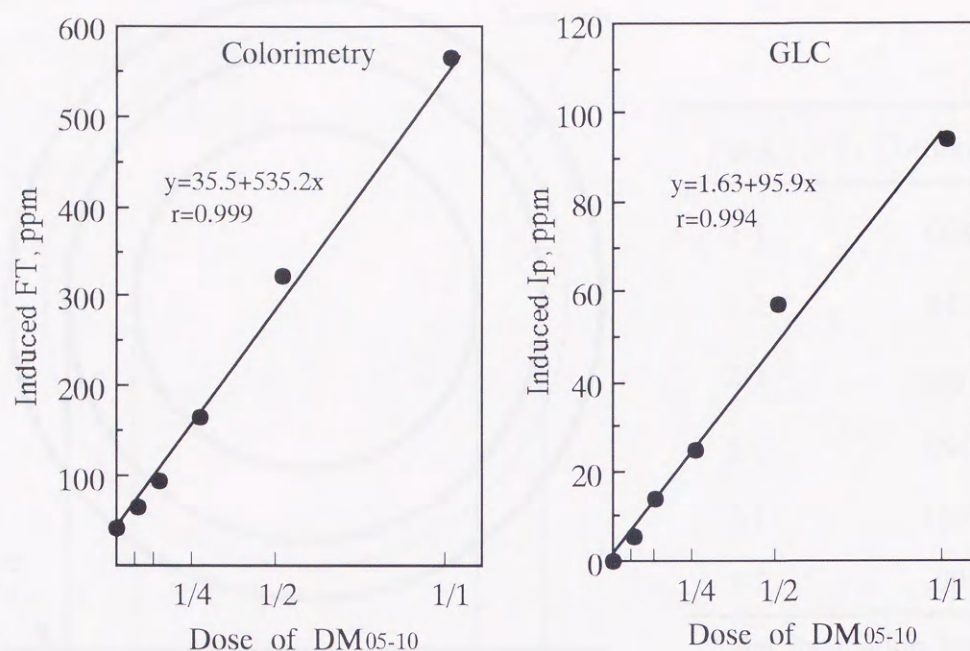


Fig. 3-5. Relationship between dose of fraction DM 05-10 and FT-induction in sweetpotato slices

FT and Ip induced in sweetpotato slices dosed with various dilutions of DM05-10 were determined after 5-day incubation. Dilution 1/1 corresponds to the extract from 0.25g of the injured sweetpotato roots.



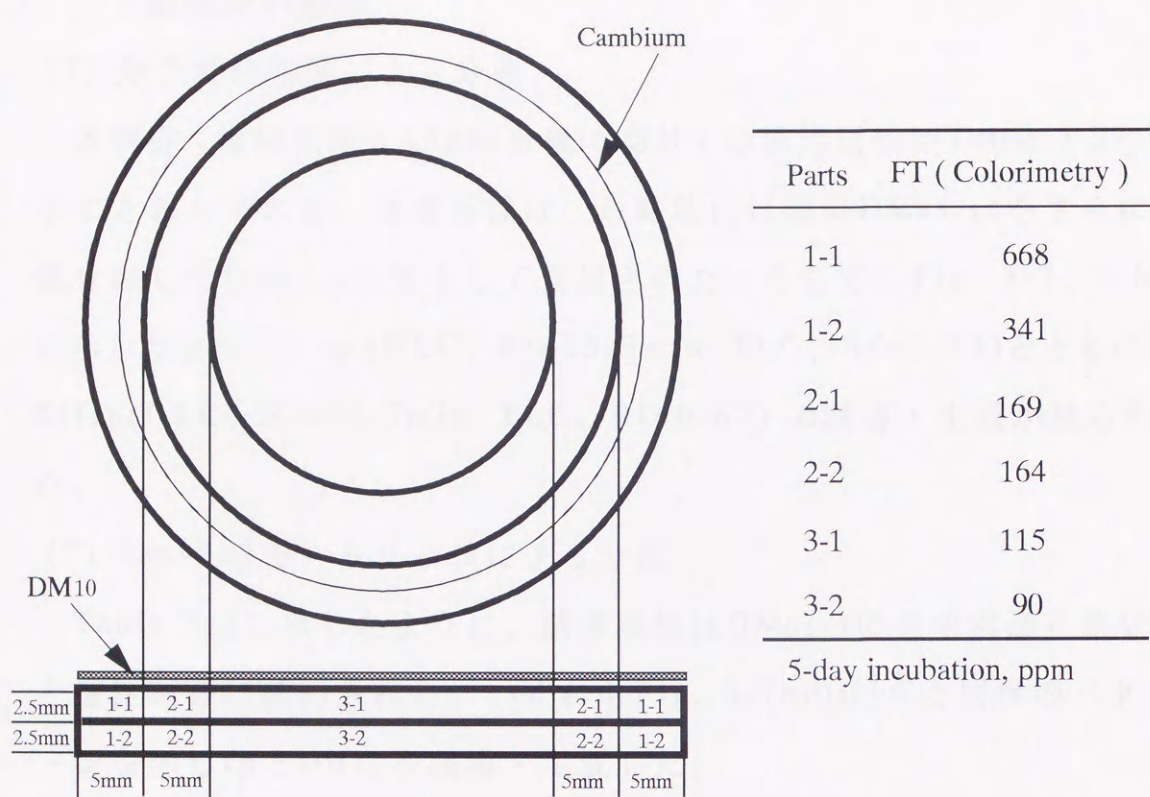


Fig. 3-6. FT-induction in slices dosed with DM 10



## 2. 分子量分画膜及びSep-Pakカートリッジ分画による誘導活性と一般成分の動向

### (1) 分子量分画膜による分画

各画分（塊根試料0.25g相当量 / 切片）の誘導活性はTable 3-2に示すとおりである。誘導活性は、最終的には画分DM05-10をさらに膜分画したDM05-3に集中して見出された。そして、Fig. 3-7、3-8に示したように、Ip (GLC、 $R_t=25.3\text{min}$ ; TLC、 $R_f=0.73$ )とともに、DHIp (GLC、 $R_t=26.7\text{min}$ ; TLC、 $R_f=0.67$ ) の誘導・生成が見られた。

### (2) Sep-Pakカートリッジによる分画

Table 3-3に示したように、誘導活性はDM05-3の逆相素通り画分と酸性画分に認められた。いずれもFig. 3-7bのGLCと同様のパターンを示しIpとDHIpを誘導・生成した。

### (3) 凍結乾燥重と一般成分の動向

Table 3-4に示したように、活性画分DM10から活性を示すDM05-3・酸性画分までの分画過程における凍結乾燥重は、DM05-3・酸性画分において初めの画分DM10の約30分の1になった。一方、この分画過程における誘導活性は、Table 3-2、3-3に示したようにほぼ変わらなかった。このことは、分画過程で凍結乾燥重あたりの誘導活性が約30倍に精製されたことを示している。

Table 3-5に、各画分の成分組成を示した。上記2-(2)で示したように、活性は画分DM05-3とさらにその逆相素通り画分や酸性画分に認められたが、Table 3-5に示したようにこれらの活性画分にはいずれもウロン酸が多かった。



Table 3-2. Inducing activity of the fractions obtained through membrane-filters <sup>a</sup>

| Fractions <sup>b</sup>      | Inducing activity <sup>c</sup> |                       |
|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------|
|                             | FT <sup>d</sup> (ppm)          | Ip <sup>e</sup> (ppm) |
| CM05-3 ( 500 < Mr < 3000)   | 40                             | 0                     |
| WM05-3 ( 500 < Mr < 3000)   | 42                             | 0                     |
| DM10 ( Mr < 10000)          | 575                            | 96                    |
| DM05 ( Mr < 500)            | 65                             | 4                     |
| DM05-10 ( 500 < Mr < 10000) | 564                            | 94                    |
| DM3-10 (3000 < Mr < 10000)  | 62                             | ±                     |
| DM05-3 ( 500 < Mr < 3000)   | 514                            | 95                    |

a) Ranges of molecular weight cut through corresponding Diaflow membrane filters (YC05, YM3, and YM10 for cutting Mr 500, 30000, and 10000, respectively) was shown according to the respective filtration characteristics.

b) For legend, see Fig. 3-1 and Experimentals.

W and D mean the extracts from injured sweetpotato roots kept under "Wet" and "Dry" conditions, respectively, and C from fresh sweetpotato roots.

c) Inducing activity was expressed as the amount of FT and Ip, ppm, induced in sweetpotato slices. Each slice was dosed with the fraction corresponding to 0.25g of the injured or fresh sweetpotato roots.

d) Total FT including Ip was estimated by colorimetry with Ehrlich's reagent as Ip

e) Ip, one of FT, was determined by GLC.



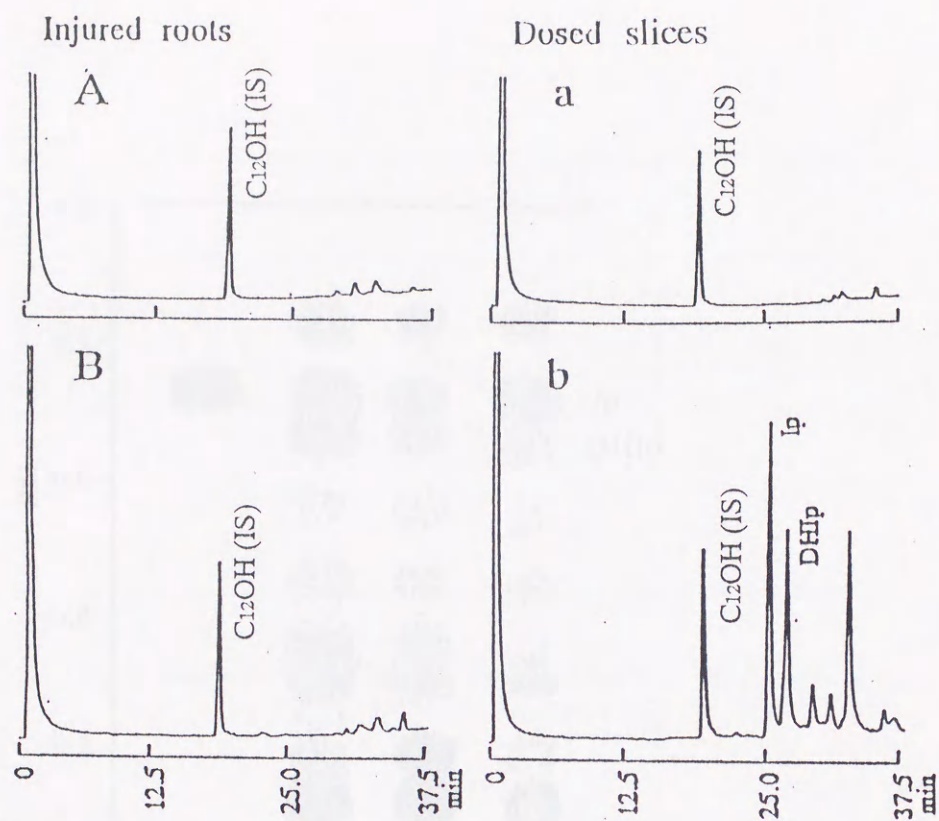


Fig. 3-7. GLC of the extracts from injured sweetpotato and slices dosed with fraction DM05-3

Injected samples

Injured roots : A, kept under "Wet" condition for 7 days

B, kept under "Dry" condition for 7 days

Dosed slices : a, dosed with WM05-3 and incubated at 25°C for 5 days

b, dosed with DM05-3 and incubated as shown above

C<sub>12</sub>OH was used as IS.



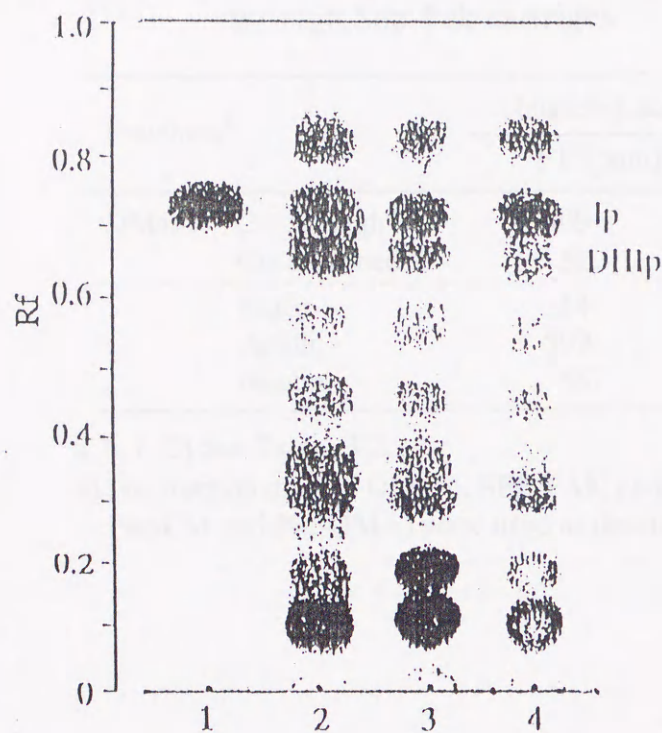


Fig. 3-8. TLC showing FT-induction in injured sweetpotato or slices dosed with fraction DM05-3

Samples :

- 1, authentic Ip
- 2, slices dosed with Macerozyme R-10 (Yakult Co.)<sup>(54)</sup>
- 3, injured root kept under "Dry" condition for 14 days
- 4, slices dosed with DM05-3 and incubated for 5 days

TLC : For legend, see Fig. 3-3.



Table 3-3. Inducing activity of the fractions obtained through Sep-Pak cartridges

| Fractions <sup>a</sup> |                          | Inducing activity <sup>b</sup> |                       |
|------------------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------------|
|                        |                          | FT <sup>c</sup> (ppm)          | Ip <sup>d</sup> (ppm) |
| DM05-3                 | C18 through <sup>e</sup> | 509                            | 92                    |
|                        | C18 adsorbed             | 51                             | 0                     |
|                        | Basic                    | 54                             | 0                     |
|                        | Acidic                   | 509                            | 92                    |
|                        | Neutral                  | 58                             | 1                     |

a, b, c, d) See Table 3-2.

e) For fractionation of DM05-3, SEP-PAK cartridges (PlusC18 PlusCM and PlusQMA) were used as described in the text.



Table 3-4. Weight of freeze-dried powder of fractions

| Fractions | Weight * |
|-----------|----------|
| DM10      | 36.9     |
| DM05      | 23.4     |
| DM3-10    | 1.1      |
| DM05-10   | 8.2      |
| DM05-3    | 6.3      |
| Basic     | 0.6      |
| Acidic    | 1.2      |
| Neutral   | 4.2      |

\* mg / g of fresh sweetpotato tissues



Table 3-5. Chemical composition of the fractions obtained through membrane-filter and Sep-Pak cartridges

| Fractions <sup>a</sup> | Component, $\mu\text{g/g}$ of fresh or injured sweetpotato <sup>b</sup> |                            |                         |                      |
|------------------------|---|----------------------------|-------------------------|----------------------|
|                        | Uronic acid <sup>c</sup>  | Neutral sugar <sup>d</sup> | Polyphenol <sup>e</sup> | Protein <sup>f</sup> |
| CM05-3                 | 0.5   | 4251                       | 242                     | 2087                 |
| DM05                   | 648   | 14088                      | 485                     | 2305                 |
| DM3-10                 | 12  | 193                        | 45                      | 765                  |
| DM05-3                 | 94  | 3590                       | 451                     | 1844                 |
| C18 adsorbed           | 85  | 3338                       | + <sup>g</sup>          | n.d. <sup>h</sup>    |
| C18 through            | 8   | 167                        | - <sup>g</sup>          | n.d. <sup>h</sup>    |
| Basic                  | 2   | 130                        | 12                      | 406                  |
| Acidic                 | 75  | 787                        | 222                     | 159                  |
| Neutral                | 0   | 2644                       | 142                     | 1066                 |

a) See Table 3-2 and Experimentals in the text for detail.

b) Analytical data,  $\mu\text{g/g}$  of outer part, correspond to 200  $\mu\text{l}$  of the respective fractions, and 50  $\mu\text{l}$  of each was given to sweetpotato slices.

c) PhOH-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method, as glucose

d) modified carbazol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method, as GalUA

e) Folin-Ciocalteu method, as chlorogenic acid

f) Lowry method, as albumin

g) by TLC

h) not determined



Table 3-6. Effect of hydrolysis on inducing activity of fraction DM 05-3

| Treated <sup>a</sup>     | Inducing activity <sup>b</sup> (ppm) |    |
|--------------------------|--------------------------------------|----|
|                          | FT                                   | Ip |
| Before treatment         | 514                                  | 95 |
| Heated <sup>c</sup>      | 510                                  | 93 |
| Hydrolyzed with          |                                      |    |
| 0.5N HCl <sup>d</sup>    | 67                                   | 2  |
| 0.05N NaOH <sup>e</sup>  | 316                                  | 31 |
| Pronase <sup>f</sup>     | 490                                  | 87 |
| Glycosidase <sup>g</sup> | 68                                   | 1  |

a) See Experimentals in the text for detail.

b) See Table 3-2 for detail.

c) 2ml of water solution of DM05-3 was boiled for 5min.

d) 3ml of water solution of DM05-3 was dissolved in 3 ml of 1N HCl and heated at boiling point for 60min.

e) 3ml of water solution of DM05-3 was dissolved in 3 ml of 0.1N NaOH and heated at boiling point for 60min.

f) 2ml of solution of DM05-3 + Pronase E (Kaken Kagaku Co.) / 20mM phosphate buffer, pH 6.5, was incubated at 37°C for 3hr.

g) 2ml of solution of DM05-3 + Glycosidase (mixed type from *Turbo cornutus*, Seikagaku Kogyo Co.) / 20mM phosphate buffer, pH 4.5, was incubated at 37°C for 3hr.



### 3. 活性画分DM05-3の各種の処理に伴う活性の変化

Table 3-6に、活性画分DM05-3を化学的あるいは酵素的に加水分解したときの誘導活性の変化を示した。FT及びIpの生成量で示される誘導活性は、加熱あるいは蛋白分解酵素プロナーゼによってほとんど失活しなかった。しかし、アルカリ加熱では誘導活性が半減し、さらに酸加水分解やグリコシダーゼの作用により対照区レベルにまで失活することが認められた。これらのことから、誘導因子は蛋白質よりも糖関連物質である可能性が示唆された。

### 4. 誘導因子の単離

#### (1) Biogel P2カラム分画

活性画分DM05-3をBiogel P2カラムに通して、低分子物質を除くことによりさらに精製できた。Fig. 3-9に示したように、活性は高分子画分Fr. A及びBにのみ認められた。

#### (2) Sep-Pak QMA吸着画分のステップワイズ溶出

誘導活性は、DM05-3のSep-Pak QMA分画での素通り画分になく、吸着された酸性画分にのみ存在した (Table 3-3)ので、Fig. 3-10に示したように、上記のBiogel P2分画で得られた活性画分Fr. A (Fig. 3-9)をSep-pak QMAに吸着させた。塩化ナトリウム濃度を段階的に変えて溶出した結果、誘導活性のピークは0.5M溶出画分Q-19に見出され、そのウロン酸 / 中性糖 ( $7 \mu\text{g}/12.7 \mu\text{g}$ ) の比は0.55の高い値を示した。

このように、誘導因子の分画の進行に伴い、酸性糖比が高まる傾向にあった。



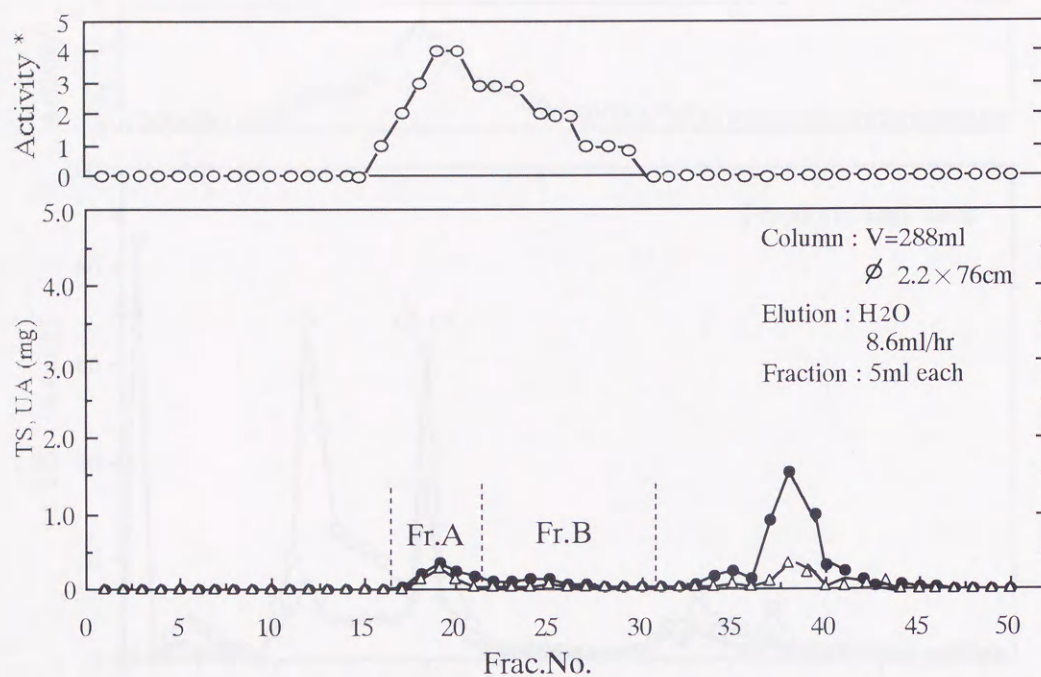


Fig. 3-9. Fractionation of M<sub>05-3</sub> by Biogel P2 and FT-inducing activity of each fraction

\* Activity was visually estimated on direct staining by bioassay after 48hrs incubation.

—●— : TS, —△— : UA



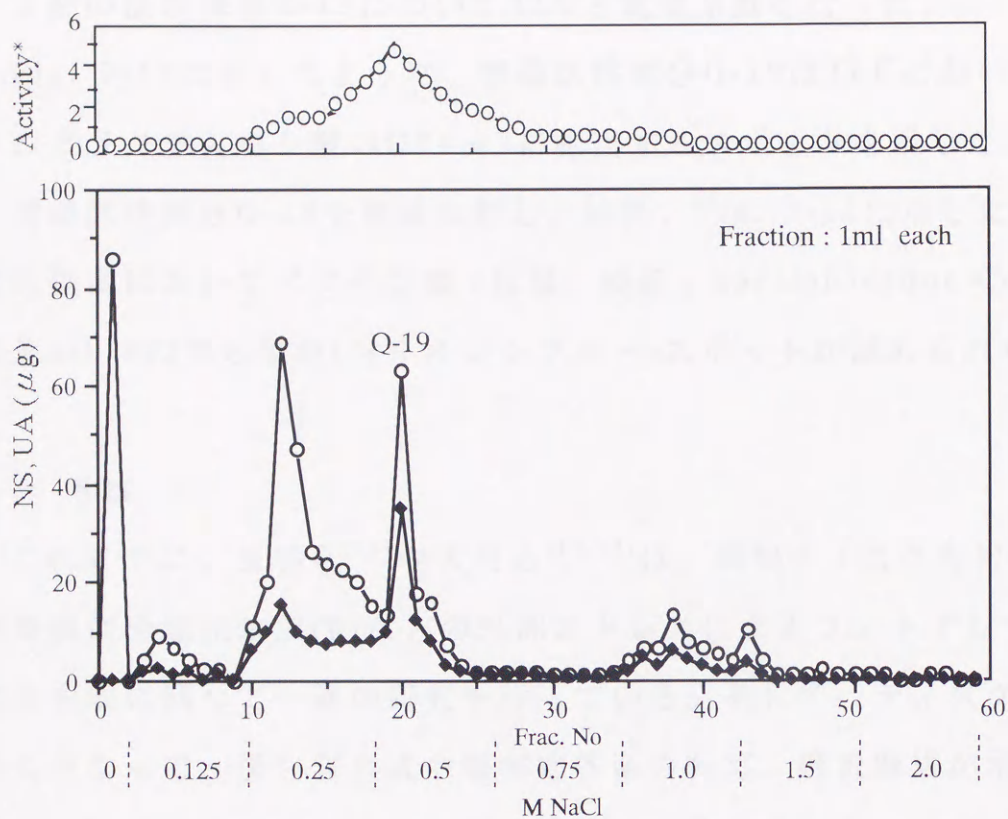


Fig. 3-10. Fractionation of the Ip-inducing factor in Fr.A by Sep-Pak QMA and activity of each fraction

\* Activity was represented as  $\Delta H$  by bioassay after 48hrs incubation.

—○—: NS, —●—: UA



## 5. 誘導因子の2,3の性質

上記の活性画分Q-19についてTLCと電気泳動を行った。

Fig. 3-11に示したように、誘導活性画分Q-19はTLCにおいてオリゴガラクチュロン酸のDP4~7に相当するスポットを示した。

誘導活性画分Q-19を電気泳動した結果、Fig. 3-12に示したように泳動度においてペクチン酸(柑橘、特級、nacalai tesque Co.)との比が0.8の青の呈色(トルイジンブルー)スポットが認められた。

## IV. 考察

これまでに、瓜谷ら<sup>(16)</sup>や大羽ら<sup>(12,13)</sup>は、塊根ディスクを用いて、黒斑病菌や塩化水銀(II)などの外部ストレスによるフィトアレキシンの生合成に関して一連の研究を行っている。そして、ディスクの切断に伴って、蛋白質合成や傷害応答系の転写、翻訳機構が増大するが、そのままではIp合成系律速酵素は活性化されず、Ipの生成・蓄積しないと報告している。

著者ら<sup>(33)</sup>は第2章において、塊根の擦過傷などの機械的傷害によるIpやFTの生成について研究し、傷害塊根をWet条件で保蔵すると傷害部周辺に創傷治癒が起こる<sup>(47)</sup>が、Dry条件下では完成されにくく、傷害が継続的ストレスとなってIpが生成されることを認めた。

このように、塊根の機械的傷害と保蔵時の湿度条件などの物理的要因によりフィトアレキシンの生成されることより、塊根自体に誘導因子が内生することがわかった。

本章においては、このようにDry条件下にあってなお、Ipと関連FTの生成が認められない段階にある傷害塊根の皮層部抽出液(



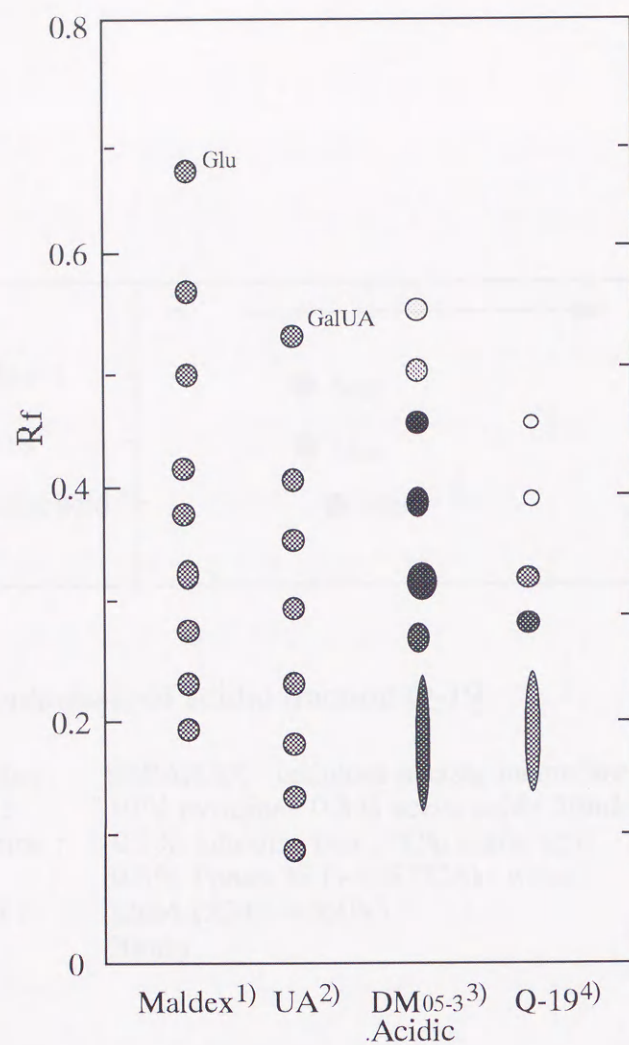


Fig. 3-11. TLC of acidic fraction of DM 05-3 and Q-19

- 1) Maltoligosaccharides (mixture)
- 2) Oligogalacturonic acids (mixture)
- 3) Acidic fraction of DM05-3
- 4) See Fig. 3-10.

Developing solvent : EtOAc-AcOH-H<sub>2</sub>O  
( 10 : 5 : 6 )

Coloring reagent : orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, heated



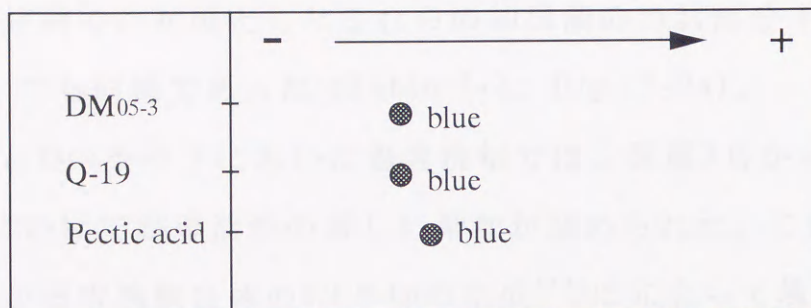


Fig. 3-12. Electrophoresis of acidic fraction Q-19

Supports : SEPARAX cellulose-acetate membrane (6×11cm)  
 Buffer : 10% pyridine+ 0.3% acetic acid+ 50mM EDTA (pH6.5)  
 Coloration : 0.5% toluidine blue / 1% acetic acid  
               0.8% Ponso-3S (+ 6%TCA) / water  
 Current : 12mA (550V→350V)  
 Time : 20min



Fig. 3-7B) からFT誘導因子の分画・分離を図った。各画分の誘導活性は、試料を健全塊根の切片に投与してバイオアッセイにより評価した。健全塊根や、本来FTが生成されない条件下にある傷害塊根では、皮層部抽出液にFT誘導活性のないことが確かめられた。また、その後の分画で、対照としたこれらの抽出液の当該画分 (CM05-3、WM05-3) でも同様であった (Table 3-2、Fig. 3-7a)。

しかし、Dry条件下においた傷害塊根では、保蔵3日からFT生成直前の7日にかけて誘導活性の著しい増加が認められた。このことは、誘導因子が傷害塊根自体のFTやIpの生成<sup>(33)</sup>に先立って塊根組織で内生されることを示す興味ある知見である。

この抽出液の誘導活性は、分子量分画によってDM05-3に集中して分画されたことから、誘導因子は比較的低分子であることがわかった (Table 3-2)。

活性画分による塊根切片でのIp及びFTの誘導・生成は、ともに投与後3～5日の間に高い値を示し (Fig. 3-4)、それらの生成と投与量の間に高い相関が認められた (Fig. 3-5)。

生成するFTのパターンについては、活性画分の投与切片でも、傷害塊根の場合<sup>(33)</sup>と同様に、GLCでもIpとともにDHIpが認められた (Fig. 3-7b)。また、TLCでも、別に行ったマセロザイムR10によるFT誘導の場合<sup>(20,54)</sup>と同様に、互いによく似た特徴を示した (Fig. 3-8)。

なお、DM05-3酸性画分 (塊根試料0.25g相当/切片) を投与した塊根切片表層のネクロシス周辺部位におけるFT誘導は3.0～3.8mg/g (Table 3-2の測定値から換算) に相当し、傷害塊根の傷害部周辺にお



けるFT 1.3mg/g (7日～14日の間) に比べて、分画により誘導効果が高まったことがわかる。

外因性ストレスと比較すると、サツマイモの主要病害菌6菌種によるFT誘導は0.5～6.5 mg/g (25℃、3日～4日)<sup>(58)</sup>、また、マセロザイムR10 (PG活性1U)の投与切片ではFT 4.5mg/g (12時間後)の例がある<sup>(54)</sup>。また、後述の外因性誘導因子についてはFT 4～18mg/g (30℃)と概算され<sup>(12,18,19,20)</sup>、本章の内生誘導因子に比べて早期に幾分か高いFT誘導量が示されている。報告者により実験系や評価法が異なるため比較が困難であり、今後の誘導機作の解明に待ちたい。

傷害塊根に内生する誘導因子の構造については、DM05-3の分析値や酵素分解と各種クロマト法におけるそれぞれの挙動から、熱に安定な非蛋白性低分子 (膜分離特性からMr=500～3000) 成分で、ウロン酸関連物質が関与しているものと考えられる<sup>(59)</sup> (Table 3-2、3、5、6)。

外因性FT誘導因子については、黒斑病では孢子や菌体の摩砕物から透析性の熱に安定な中性成分が分離され<sup>(18)</sup>、また、アリモドキゾウムシでは成虫体のペクチン分解酵素<sup>(20)</sup>のほか、幼虫体の糖蛋白質とその活性化因子である蛋白性高分子物質及び熱安定性低分子物質<sup>(19)</sup>が報告されている。いずれも詳細は未解明であるが、誘導因子の多様性を示している。一方、Arinzeらによるとジャワ黒斑病菌による塊根の病斑形成には菌由来のポリガラクトナーゼG3活性が関与するが<sup>(60)</sup>、病斑周辺に見いだされるFT<sup>(61)</sup>との関係は明らかにされてない。

以上の報告を含めて、各種植物の生物学的ストレスによるフィトア



レキシン生成の多くは、細胞膜・壁の破壊や変性に伴う植物防衛反応と認識されている。そして、侵入生物体の成分や細胞膜・壁の部分分解物などがエリシターとして分離されている<sup>(17,49)</sup>が、いずれも外因性のものである。

物理的ストレスによる内生エリシターとしては、Hargreavesら<sup>(50)</sup>により凍結傷害を受けたインゲン胚軸から分離された透析性因子や、Phillipsら<sup>(51)</sup>により紫外線照射下でのアズキ細胞培養液から分離された酸性オリゴ糖が知られているにすぎない。最近、Mondenら<sup>(62)</sup>は、過酸化水素で処理した馬鈴薯切片から中性糖を含む酸性オリゴ糖を内生エリシターとして分離している。

本章では、低湿度条件下に保蔵した機械的傷害塊根について、これらの物理的要因によるフィトアレキシンの生成に先行して、誘導因子が傷害組織周辺に内生されることが確かめられた。そして、組織抽出液の低分子酸性物質が、塊根切片に対して定量的にIp及びFTの誘導活性を示すことを見出した。誘導活性画分の成分分析や諸性質から、構成成分にはウロン酸関連物質が関与するものと考えられる。

まだ未精製ではあるが、このような内生誘導因子の分離は、物理的ストレスに伴う内生エリシターに関する数少ない知見に新たな一つを加えるものである。

## V. 小括

除菌環境下で人為的に過擦傷を与えた傷害塊根を低湿度環境におくと、サツマイモ特有のフィトアレキシンであるIpや関連のFTが生



成されることから、傷害組織周辺において内生するFT誘導因子(エリシター)の検索を行った。

誘導活性は傷害組織抽出液を健全塊根切片に投与して生成するIpあるいはFT量から評価した。

誘導活性は、上記の物理的ストレス下にある塊根の傷害組織周辺において、FT生成に先立つ段階で認められた。

組織抽出液を各種の分子量分画膜とSep-Pakカートリッジで分画した結果、誘導活性は低分子画分(膜特性値Mr500~3000)の酸性成分として分離された。塊根切片上で投与量に比例してIp及びFTが誘導生成され、生成物のGLCとTLCのパターンは傷害塊根自体のFTと同様であった。

活性画分の構成成分の分析結果や、加熱やプロナーゼにより失活しないこと及び酸加水分解やグリコシダーゼにより失活することなどから、本FT誘導因子の構成成分としてウロン酸関連糖質が関与することが示唆された。

以上のことから、傷害サツマイモにおける内生エリシターの存在が明らかになった。



#### 第4章 塩化水銀(II)及び機械的傷害に対するフラノテルペン誘導感受性のサツマイモ品種・系統間の差異

##### 1. 緒言

サツマイモの品質劣化については、原料塊根では取り扱い中に起こりやすい打撲や擦過傷などの物理的ストレスが問題となる。第2章で、塊根の機械的傷害によるFT生成において、傷害作用の発現がその後の保蔵条件に依存し、低湿度条件下での継続的ストレスとしての作用が品質劣化とともにIpなどのFT生成反応を誘発することを示した。加えて、供試したKS、SY、K14の3品種において、反応性に相違のあることが認められた。

このような品質劣化の問題解決には育種面からのアプローチもあるが、従来の育種は耐病性に重点をおいてなされてきている。

従って、サツマイモ塊根の貯蔵条件あるいは品種特性の評価には、これまでほとんど考慮されることのなかった、上記の物理的ストレスに対する感受性を加えることが要求され、その評価においては、IpあるいはFTの誘導・生成を指標とすることが適当と考えられる。

しかし、第2章で述べたような機械的傷害に対する感受性の判定には長時間を要することから、実用的には簡便な評価法の開発が望まれる。

そこで、本章においては、機械的傷害に代えて、短い日数で評価できる塩化水銀(II)処理について、FT誘導・生成の消長を調べた。さらに、塩化水銀(II)処理と機械的傷害の両傷害に対する品種・系統のFT生成感受性の相関を検討した。



## II. 材料及び方法

### 1. サツマイモ塊根試料

試料には普及品種と原料用育成系統を使用した。

普及品種には、コガネセンガン (KS)、シロユタカ (SY)、ベニアズマ (BA)、ベニハヤト (BH)、サツマヒカリ (SH)、農林1号 (N1)、山川紫 (YM)、九州100号 (Kyushu100)、高系14号 (K14)の9品種を用いた。いずれも鹿児島大学農学部附属農場にて栽培、収穫し、あらかじめ200倍希釈オスバン液を噴霧した貯蔵庫 (20℃前後、RH 80~85%)においたものである。

また、育成系統には焼酎原料用として選抜中の九系136、87005-4、87010-21、87015-26、88007-1、88010-4、88013-3、88040-13、88199-3、88310-2の10系統を使用した。いずれも農水省九州農業試験場畑地利用部 (都城市) 圃場にて栽培、収穫し、上記の普及品種と同様に貯蔵したものである。対照として普及品種であるKS及びK14を用いた。

実験に際して、塊根は表面に病徴や傷痕のない健全なものを選び水洗した後、0.5%次亜塩素酸ナトリウムに20分浸漬し、使用器具や装置などもエタノールその他で殺菌して用いた。

### 2. 傷害塊根の調製

塩化水銀(II)処理塊根は、第1章Fig.1-1に準じて塊根スライスを0日から7日処理して調製した。また、機械的傷害塊根には、第2章Fig.2-1に準じて傷害を与え、低湿度条件としてRH約70%で25℃・14日保蔵したものをを用いた。



### 3. フラノテルペン及びイボメアマロンの定量

第1章 II-3に従って各傷害塊根より抽出・調製したアセトニトリル溶液について、TLC、GLC及び比色による分析を行った。総FTは比色法により、IpとDHIpはGLCで定量した。

## III. 結果

### 1. 塩化水銀(II)処理によるフラノテルペン誘導量の経日変化

Fig. 4-1に、普及品種KSについて、塩化水銀(II)処理におけるFT総量の経日的変化を示した。FT総量は処理7日までほぼ直線的に増加した。

Fig. 4-2に、TLCにおける各FT関連成分の経日的挙動を示した。処理1日では、エールリッヒ試薬に対し青の呈色を示す脂質が認められた<sup>(63)</sup>。FTは処理3日で明確に認められ、Ip (スポット3 Rf0.70)やDHIp (スポット4 Rf 0.66)は処理3日から4日にかけて存在が明確になった。

これらのFTは以後その種類が増加してゆき、処理7日にはIpOH(スポット11 Rf 0.21)などの比較的Rf値の低い成分の生成が認められた。

Fig. 4-3に、普及4品種の14週保蔵塊根についてGLCによりIp、DHIpの経日的消長を調べた結果を示した。Fig. 4-1、4-2と関連して、その中のKSについての動向をみると、Ipの生成は処理6日でピークに達した後7日で減少することが認められた。これらの4品種において、Ipの生成量や経日的動向には差異が認められたが、いずれも4日から6日の間にIp生成量はピークを示し、以後減少した。



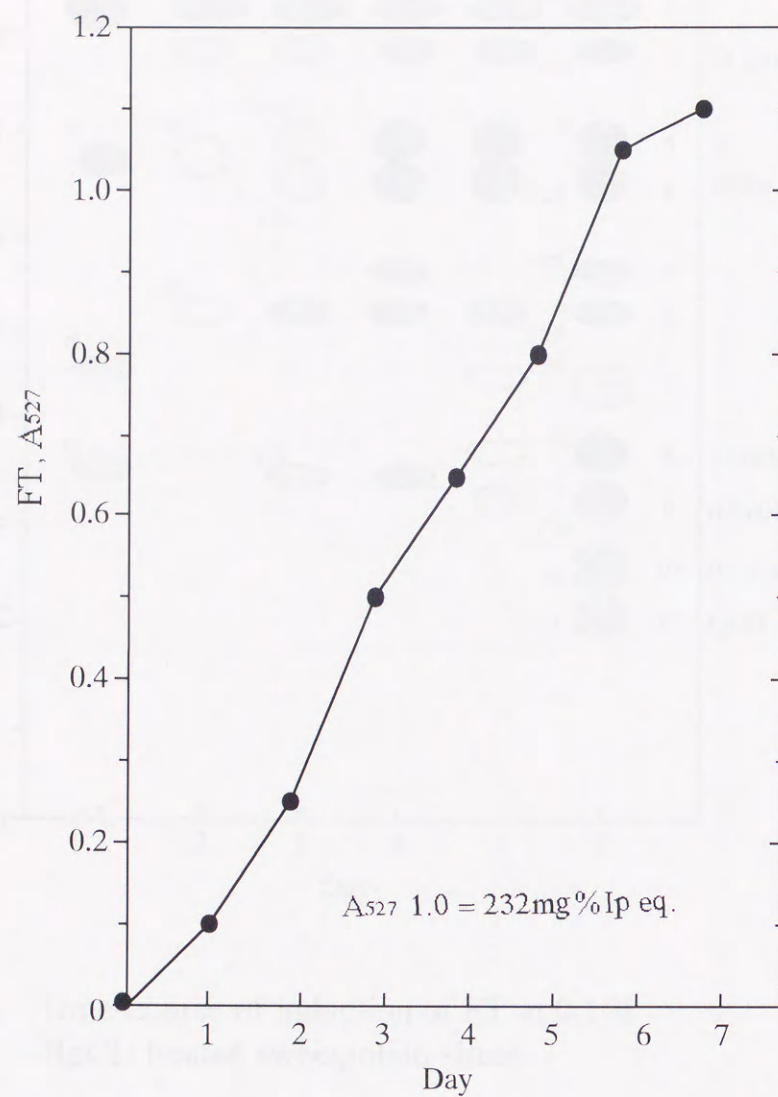


Fig. 4-1. Time-course of induction of FT in 0.1% HgCl<sub>2</sub> treated sweetpotato slices

Cultivar : KS



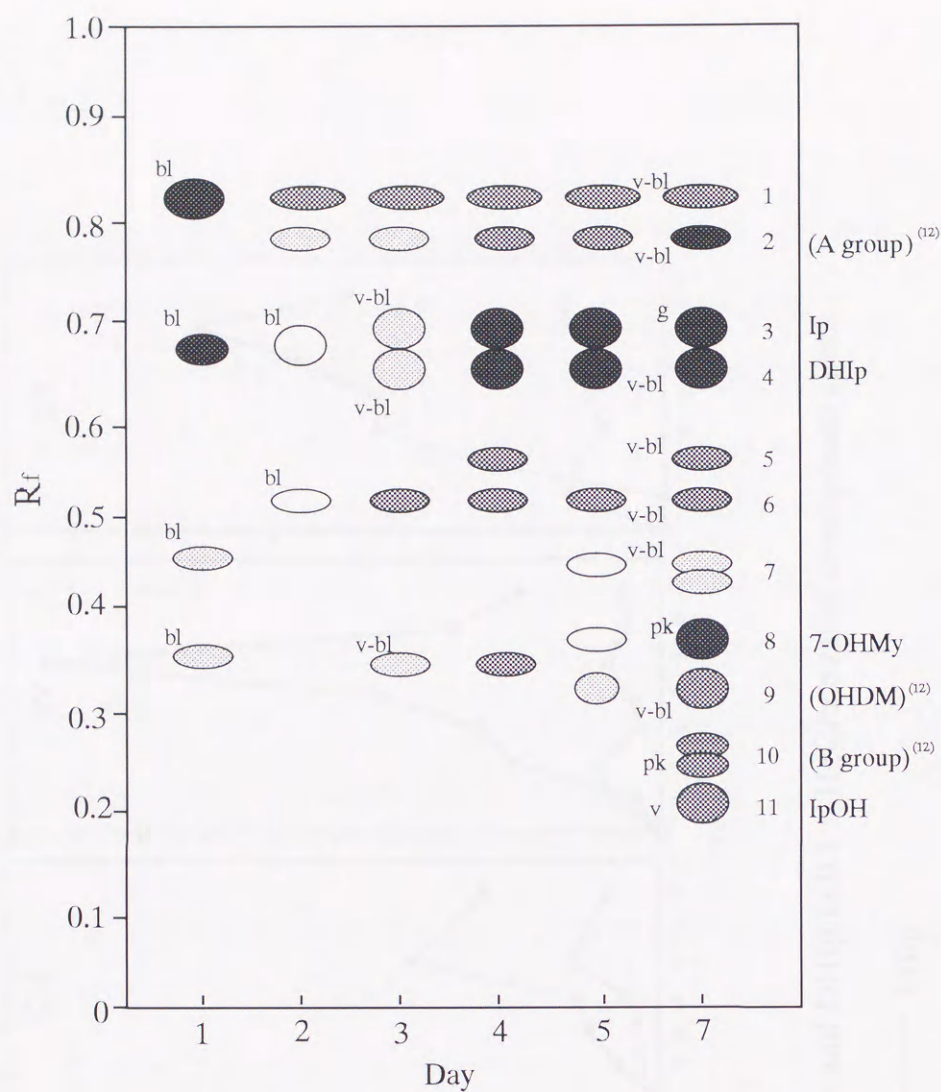


Fig. 4-2. Time-course of induction of FT in 0.1% HgCl<sub>2</sub> treated sweetpotato slices

Cultivar : KS

TLC : Silica-gel / Al plate, Benzene-EtOAc ( 8 : 2 )

Ehrlich's reagent , heated

Color

bl : blue, v-bl : violet-blue, g : greenish-gray,  
pk : pink, v : violet

intensity,

faint ← → deep



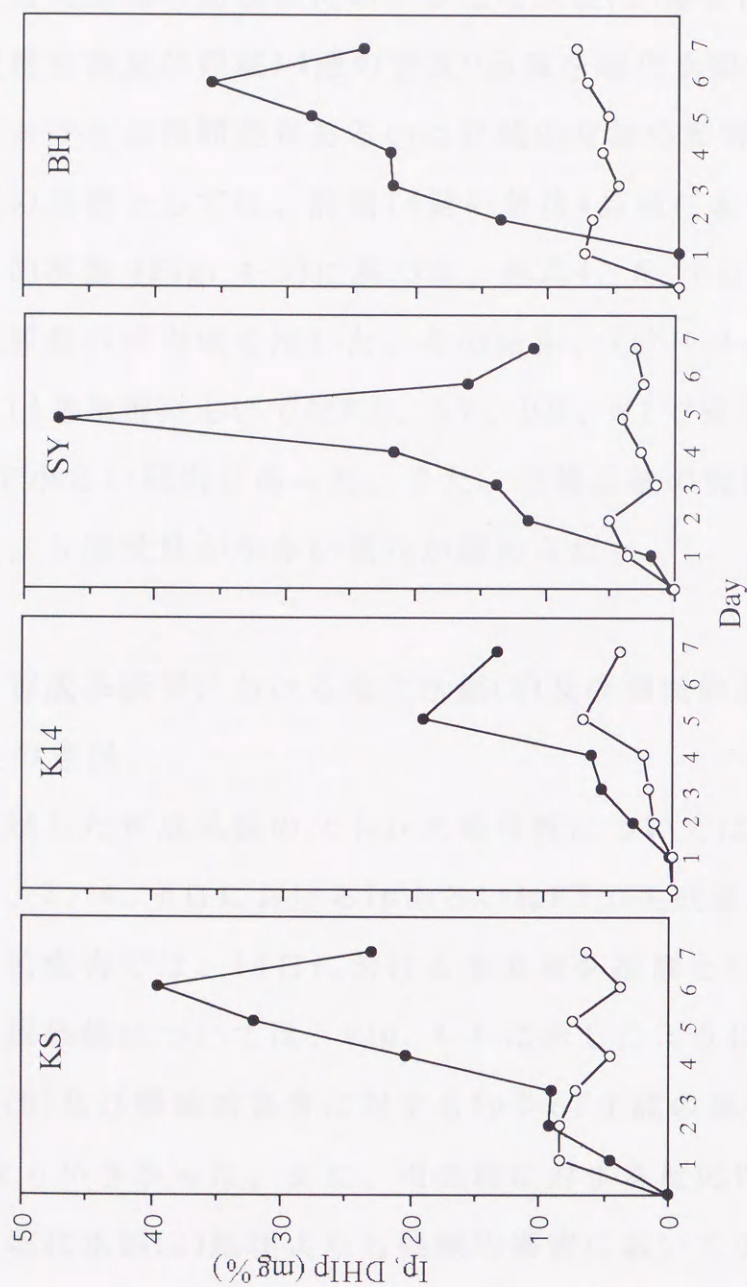


Fig. 4-3. Induction of Ip and DHIp in 0.1%HgCl<sub>2</sub> treated sweetpotato slices

—●— Ip, —○— DHIp



一方、DHIpでは、K14を除いて生成当初はIpより生成量が多く、以後Ipは増加を示すのに対し、一定のレベルで推移した。

## 2. 普及品種の品種間における塩化水銀(II)感受性の差異

収穫直後及び貯蔵14週の普及9品種を塩化水銀(II)処理して、感受性における品種間差異あるいは貯蔵の有無の影響を調べた。感受性評価の指標としては、貯蔵14週の普及4品種におけるIp及びDHIpの経日的挙動 (Fig. 4-3)に基づき、処理4、5、6日のIpあるいはDHIpの生成量の平均値を用いた。その結果、Table 4-1.に示すように、貯蔵14週塊根においてはKS、SY、BH、N1で感受性が大きく、SH、YMで小さい傾向にあった。また、収穫直後の塊根では、貯蔵14週の塊根より感受性が小さい傾向が認められた。

## 3. 育成系統間における塩化水銀(II)及び機械的傷害に対する感受性の差異

供試した育成系統のストレス感受性については、塩化水銀(II)処理では、2、4、6日におけるIpあるいはFTの生成量の平均値を、また、機械的傷害では、14日における生成量を指標として比較した。

育成系統については、Fig. 4-4 に示したように、全体的に、塩化水銀(II)及び機械的傷害に対するIpやFT生成の感受性は、対照としたKSより小さかった。また、両処理に対する反応性が異なり、Ip生成は、塩化水銀(II)処理よりも機械的傷害において少ない傾向がみられた。機械的傷害では、FTが生成しているにもかかわらずIpを生成しない4系統があることから、両傷害への感受性の相関をIp生成によっ



Table 4-1. Ip-induction in slices of various cultivars  
by 0.1% HgCl<sub>2</sub>-treatment

| Cultivars     | Roots just<br>after harvest |               | Roots, 14-<br>week storage |               |
|---------------|-----------------------------|---------------|----------------------------|---------------|
|               | Ip<br>(mg%)                 | DHIp<br>(mg%) | Ip<br>(mg%)                | DHIp<br>(mg%) |
| KS            | 13                          | 2             | 31                         | 5             |
| SY            | 25                          | 2             | 28                         | 3             |
| BA            | 6                           | 5             | 15                         | 9             |
| BH            | n.d.*                       | n.d.*         | 29                         | 6             |
| SH            | 3                           | 1             | 4                          | 5             |
| N1            | n.d.*                       | n.d.*         | 23                         | 6             |
| YM            | n.d.*                       | n.d.*         | 1                          | 3             |
| Kyushu<br>100 | n.d.*                       | n.d.*         | 14                         | 9             |
| K14           | 4                           | 1             | 13                         | 5             |

\* not determined



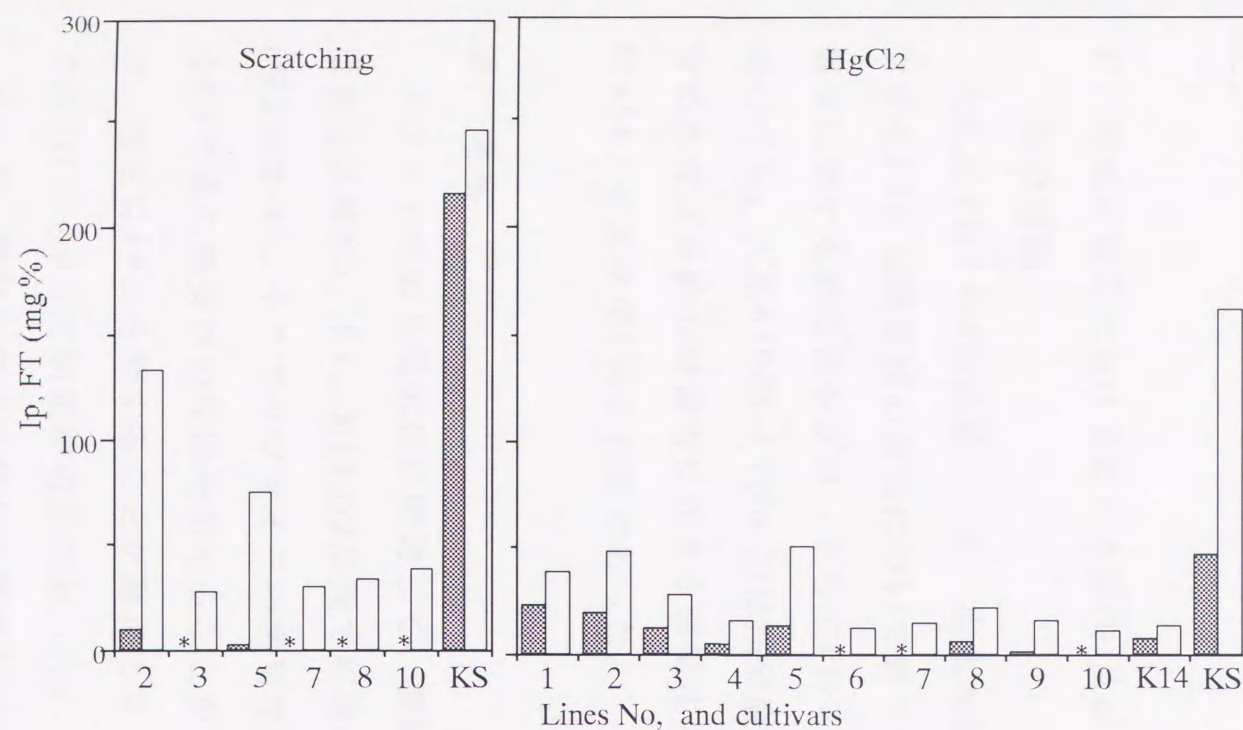


Fig. 4-4. Ip and FT-induction in slices of cultivars by scratching-injury and HgCl<sub>2</sub>-treatment

Samples

1 : Kyukei 136 , 2 : Kyukei 87005-4 , 3 : 87010-21 , 4 : 87015-26 , 5 : 88007-1  
6 : 88010-4 , 7 : 88013-3 , 8 : 88040-13 , 9 : 88199-3 , 10 : 88310-2

Values of Ip, FT in both the treatments were represented as average of those of 2-, 4-, 6-day treatment with HgCl<sub>2</sub> , and as those of 2 weeks after scratching, respectively.

\* : not detected

□ : FT , ▨ : Ip



て検討することは不適當であった。このことから、両傷害に対する感受性の相関は、 $I_p$ でなくFT総量により評価・検討した。

各系統については、両傷害に対し九系87005-4 (No.2)、九系88007-1 (No.5)で感受性が大きく、九系88013-3 (No.7)で小さかった。

#### 4. 育成系統間における塩化水銀(Ⅱ)及び機械的傷害に対する感受性の相関

上記のFig. 4-4の結果のうち、塩化水銀(Ⅱ)処理及び機械的傷害に対するFT生成感受性の相関について調べた。育成系統について、両傷害に対する感受性をプロットしてFig. 4-5に示した。これらの系統のうち、九系87005-4 (No.2)は回帰直線よりはずれるが、これを含めた育成系統の両傷害に対する感受性の相関は、相関係数  $r = 0.954$ 、有意水準1%で有意であった。

#### IV. 考察

サツマイモの品質劣化に関連して、機械的傷害によるFT生成反応は普及品種KS、SY、K14の3品種で相違のあることが認められた(第2章Ⅲ-4)。そこでサツマイモの利用特性の一つとして、品種によるFT生成の感受性の評価を加えることが望まれるが、機械的傷害では、判定に14日を要することが難点となる。一方、塩化水銀(Ⅱ)処理では4日から5日で判定が可能であった。

そこで、機械的傷害に代わる簡便な判定法の確立へのアプローチに際して、塩化水銀(Ⅱ)処理法の有効性を検討した。



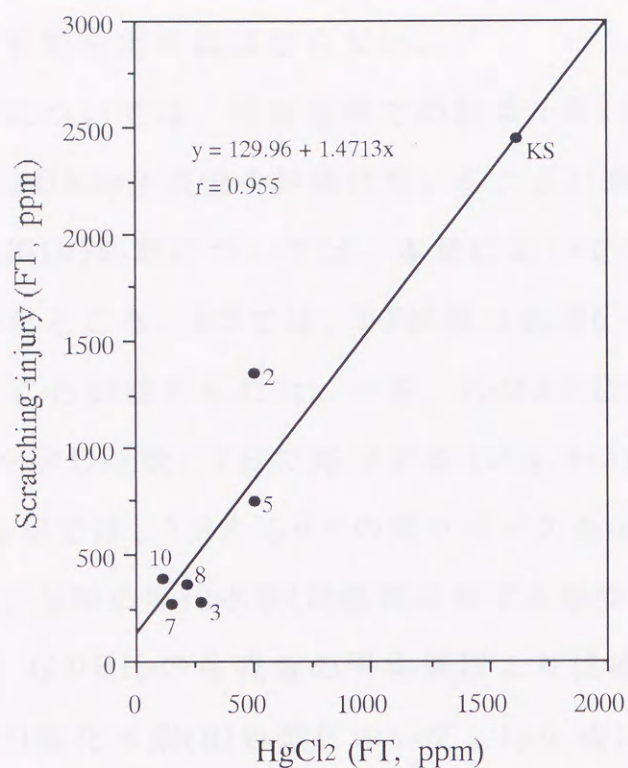


Fig. 4-5. Correlation on FT-induction between scratching-injury and HgCl<sub>2</sub>-treatment

Sample No.

2 : Kyukei 87005-4, 3 : 87010-21, 5 : 88007-1,  
7 : 88013-3, 8 : 88040-13, 10 : 88310-2



感受性の評価の基準となるFT生成量は処理日数によって異なるので、まず各品種のFT生成の経日的挙動を把握して、感受性を正しく反映する処理日数を定めねばならない。

機械的傷害については、普及品種での結果(第2章Ⅲ-4)より14日でのIpあるいはDHIp生成量を評価に用いることが適当と考えられた。一方、塩化水銀(Ⅱ)処理については、本章において生成するFTの経時的挙動を調べたところ、KSでは、FT総量は処理6~7日まで増加する(Fig. 4-1)ことが認められた。一方、Ipは3日以後急激に増加し、6日でピークを示した後、7日で減少する(Fig. 4-3)。また、同様に行った他の3品種では、5日から6日の間でピークを示した(Fig. 4-3)。この結果から、品種の塩化水銀(Ⅱ)処理に対する感受性は、処理4、5、6日のIpあるいはDHIpの生成量の平均値により比較した。

上記のKSの塩化水銀(Ⅱ)処理において、Ip生成にDHIpが随伴して現われ、Ipが減少する処理7日ではIpOHの生成が認められた(Fig. 4-2)。このような一連のFTの代謝に関して、大羽らはファルネソール $\rightarrow$ DHIp $\rightarrow$ Ip $\rightarrow$ IpOHの経路を提示している<sup>(12)</sup>。上述の現象はこの反応経路をよく反映したものと考えられる。

上記の評価法により、普及9品種間の塩化水銀(Ⅱ)処理に対するFT生成感受性の差異を、14週貯蔵塊根について調べたところ、KS、SY、BH、N1は感受性が大きく、SH、YMで小さい傾向にあった。一方、その中の5品種については、SYを除いて、収穫直後では14週貯蔵より感受性が小さい傾向が認められた(Table 4-1)。

KS、SYについては、機械的傷害反応(第2章Ⅲ-4)においてもK14と比較して感受性が大きいことが確かめられている。



次に普及品種より感受性の差異が大きいと考えられる育成系統について、塩化水銀(Ⅱ)処理と機械的傷害に対するFT生成感受性を調べ、同時に両感受性の相関を検討した。感受性の評価に際しては、試料量が限られていることから経日変化は調べず、機械的傷害は14日の生成量を、塩化水銀(Ⅱ)では、普及品種より経日変化の差異が大きくなることを考慮し、2、4、6日の生成量の平均値を用いた。

その結果、機械的傷害及び塩化水銀(Ⅱ)処理に対して、すべての育成系統では対照KSより感受性が小さいことが認められた(Fig.4-4)。また、供試した6育成系統では、特に機械的傷害によるIp生成の感受性が小さく(Fig.4-4)、Ipを生成しない4系統が認められた。これらの結果は、系統により多様な生成反応を示すという予想に反するものであった。

これらのことから、供試した育成系統では、FT生成による品質の劣化がKSよりも小さいことが示唆された。

各系統間の比較では、塩化水銀(Ⅱ)処理と機械的傷害の両者に対して、九系88007-1(No.5)で感受性が大きく(Fig.4-4)、九系88013-3(No.7)で小さかった。これらの感受性は機械的傷害及び塩化水銀(Ⅱ)処理において対応していると考えられた<sup>(64)</sup>。

このような育成系統の中で、機械的傷害及び塩化水銀(Ⅱ)処理に対するそれぞれの感受性を調べた。6系統と対照KSについての両感受性の相関は、相関係数  $r = 0.954$ 、有意水準1%で有意であった(Fig.4-5)。

この結果、塩化水銀(Ⅱ)処理に対するFT生成への感受性の品種間差異は、機械的傷害に対する差異をほぼ反映すると考えられた。そし



て、今後の育種選抜における感受性判定法の確立に向けて、一つの可能性が確かめられた。

#### V. 小括

普及3品種においては、第2章で機械的傷害に対するFT生成感受性が異なることが認められたことから、サツマイモの品種における感受性の簡便な判定法の確立を図った。しかし、上記の機械的傷害は感受性の判定にやや長い日数を要することから、機械的傷害の代わりに期間の短い塩化水銀(Ⅱ)処理を用いることとした。そして品種によるIpやFT生成の経日的挙動を調べて、適当な処理日数を定めた。

普及品種について、同処理に対するFT生成感受性の品種間差異を調べたところ、感受性はKS、SY、BH、N1で大きく、SH、YMにおいて小さい傾向にあった。収穫直後では、14週貯蔵に比べて感受性が小さい傾向が認められた。

普及品種より生成反応の多様性が予想される育成系統については、機械的傷害及び塩化水銀(Ⅱ)処理の両傷害に対する感受性を調べた。その結果、各傷害に対して系統による感受性の差異が認められたが、全系統において感受性は対照の普及品種KSより小さく、予想と異なる結果が得られた。

しかし、両傷害に対するFT生成感受性の相関は、相関係数  $r = 0.954$ 、有意水準1%で有意であった。

これらのことより、品種の育種選抜における感受性の簡便判別法として、機械的傷害の代わりに塩化水銀(Ⅱ)処理を用いることの有効性が示唆された。



## 要約

本研究では、サツマイモのポストハーベストで日常的に起こる機械的傷害による品質劣化、特にIpやFTの誘導・生成を保蔵条件との関連において確かめ、その成因を明らかにすることを目的とした。

そして、機械的傷害によるFT生成について、傷害後の保蔵条件の影響を調べるとともに、内生エリシターの関与を考察した。また、FT生成反応の感受性における品種による差異についても検討した。

研究の概要は以下に示す通りである。

1. 塊根の塩化水銀(II)処理による生成物から、水蒸気蒸留、TLC及びHPLCによりIpと主要FTを単離し、精製過程における挙動を構造との関係において考察した。また、単離されたIp標品を用いて、比色による総FT及びGLC量によるIp量の算出式を求めた。 (第1章)

2. 機械的傷害によるIpなどのFT生成反応における傷害とその作用の発現に対する保蔵条件の関与を調べた。さらに、生成反応の品種間の差異についても検討した。

除菌環境下で片側の側面皮層に擦過傷を与えた普及3品種を各種の条件下で保蔵した結果、FT生成は低湿度条件下で傷害側のみに確認された。また、傷害側では品質劣化を示す一般成分の変化も明らかに認められた。以上の劣化反応は25℃で著しく増進された。

これらの結果から、FTの生成・蓄積には機械的傷害と、その後の保蔵環境、特に低湿度が大きく影響することが明らかになった。



この原因については、高湿度条件下とは異なり低湿度条件下では傷害部の治癒が起こりにくく、傷害作用が継続的ストレスとして働いた結果、FT生成が誘発されるものと考察された。

また、このような傷害に対するFT生成への感受性は、普及3品種の間で差異が認められた。(第2章)

3. 上記の機械的傷害によるFT生成において、関与すると考えられる内生誘導因子の生成とその性質について、傷害部抽出液の活性画分を分画して調べた。

誘導因子の活性は、塊根切片を用いたバイオアッセイにおけるFTの直接染色あるいは抽出・分析によって評価した。

まず、除菌環境下で擦過傷を与えた傷害塊根を低湿度条件下で保蔵すると、FTの誘導・生成に先立つ段階で、傷害組織の抽出液にFT誘導活性が認められた。

活性画分を検索した結果、FT誘導因子は低分子(Mr500~3000)の酸性画分に分離された。活性画分の分析結果や、加熱やプロナーゼにより失活しないこと及び酸加水分解やグリコシダーゼにより失活することなどから、構成成分としてウロン酸関連糖質が関与することが示唆された。

これらのことから、傷害塊根における内生誘導因子の存在が明らかとなった。(第3章)

4. 上述のようなFT誘導について、品種による感受性の差異を検討するため、普及9品種と原料用10育成系統における、塩化水銀(II)処理



及び機械的傷害によるFT生成反応を比較した。

普及品種の塩化水銀(Ⅱ)処理によるFT生成は、貯蔵塊根でKS、SY、BH、N1で大きく、SH、YMで小さい傾向が認められた。また、収穫直後の塊根では、貯蔵の塊根に比較して感受性が小さい傾向にあった。一方、前項における機械的傷害に対しても、KS、SYは感受性が大きいことが認められている。

焼酎原料用育成系統における、塩化水銀(Ⅱ)処理と機械的傷害に対するFT生成の感受性の相関は、相関係数  $r = 0.954$ 、有意水準1%で有意であった。これらのことは、育成選抜における感受性の簡便判別法として、機械的傷害の代わりに塩化水銀(Ⅱ)処理を用いることが有効であることを示唆するものである。(第4章)

以上のように、本研究では、サツマイモ塊根の機械的傷害による品質劣化、特にFT生成を貯蔵条件との関係において明らかにし、サツマイモのポストハーベストについて、基礎及び応用面における新たな知見が得られた。

これらは、塊根の品質劣化反応における一つの成因を明らかにしたものであり、また、その取り扱いの改善に役立つものと考えられる。



文献

- (1) 永浜伴紀：カンショへの期待と可能性 6.食品・工業素材としてのカンショの機能特性. 農業技術, 50, 227-234 (1995).
- (2) 邨田卓夫：青果物の市場病害, 生理障害. 青果保蔵汎論 (緒方邦安編) 建帛社, p. 260-274 (1980).
- (3) 茶珍和雄・緒方邦安：青果物の収穫後の生理, 呼吸生理. 青果保蔵汎論 (緒方邦安編) 建帛社, p.55-56 (1980).
- (4) 中村怜之輔：青果物の輸送, コールド・チェーン, 振動と青果物の生理的反応. 青果保蔵汎論 (緒方邦安編) 建帛社, p.154-156 (1980).
- (5) 樋浦 誠：甘藷の貯蔵並びに腐敗に関する研究(第2報). 岐阜高農学術報告, 50, 5-9 (1943).
- (6) 久保田尚志・松浦輝男：甘藷黒斑病に関する化学的研究 (第6報) イポメアマロンの構造. 日化誌, 74, 101, 197, 248, 668 (1952).
- (7) T. Akazawa : Chromatographic isolation of pure ipomeamarone and reinvestigation of its chemical properties. Arch. Biochem. Biophys, 90, 82-89 (1960).
- (8) 山村 颯：甘藷デンプンの白度に関する研究. 鹿児島県農業試験場特別報告, p.1-73 (1961).
- (9) J. A. Woolfe : Polyphenolics. In; Sweet potato an untapped food resource. Cambridge University Press (Cambridge) p.64-67 (1992).
- (10) H. Hyodo, I. Uritani, and S. Akai : Production of furano-terpenoids and other compounds in sweet potato root tissue in



- response to infection by various isolates of *Ceratocystis fimbriata*. Phytopath.z., 65, 332-340 (1969 ).
- (11) T. Akazawa, I. Uritani, and H. Kubota : Isolation of ipomeamarone and two coumarin derivatives from sweet potato roots injured by the weevil, *Cylas formicarius elegantulus*. Arch. Biochem. Biophys, 88, 150-156 (1960).
- (12) 大羽和子 : 罹病植物におけるファイトアレキシン生成・蓄積機構の酵素学的研究. 農化, 55, 1009-1016 (1981).
- (13) K. Oba, and I. Uritani : Mechanism of furano-terpene production in sweet potato root tissue injured by chemical agents. Agric. Biol. Chem., 45, 1635-1639 (1981).
- (14) 瓜谷郁三 : 異常代謝産物の生合成経路. 植物病理化学最近の進歩 (富山 宏平編) 同刊行会 p.95-102 (1978).
- (15) I. Uritani, K. Oba, A. Takeuchi, K. Sato, H. Inoue, R. Ito, and I. Ito : Biochemistry of furanoterpenes produced in mold-damaged sweet potatoes. In; Antinutrients and Natural Toxicants in Foods. (R. L. Ory ed.) Food & Nutrition Press, Inc. (Westport ) p. 1-16 (1980).
- (16) I. Uritani and K. Oba : The tissue slice system as a model for studies of host-parasite relation-ships. In; Biochemistry of wounded plant tissues (G.Kahl ed.). Walter de Gruyter & Co. (Berlin-New York) p.287-308 (1978).
- (17) A. G. Darvill and P. Albersheim : Phytoalexins and their elicitors -A defense against microbial infection in plants. Ann. Rev. Plant



- physiol., 35, 243-275 (1984).
- (18) W. K. Kim and I. Uritani : Fungal extracts that induce phytoalexins in sweet potato roots. *Plant Cell Physiol.*, 15, 1093-1098 (1974).
- (19) K. Sato and I. Uritani : Characterization of the terpene-inducing factor isolated from the larvae of the sweet potato weevil, *Cylas formicarius fabricicus* (Coleoptera : Brentidae) *Appl. Ent. Zool.*, 16, 103-112 (1981).
- (20) K. Sato and I. Uritani : Properties of terpene-inducing factor extracted from adults of the sweet potato weevil, *Cylas formicarius* Fabricius. *Appl. Ent. Zool.*, 17, 368-374 (1982).
- (21) I. Uritani, M. Uritani, and H. Yamada : Similar metabolic alterations induced in sweet potato by poisonous chemicals and by *Ceratostomella fimbriata*. *Phytopathol.*, 50, 30-34 (1960).
- (22) H. Suzuki, K. Oba, and I. Uritani : The occurrence and some properties of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in sweet potato roots infected by *Ceratocystis fimbriata*. *Physiol. Plant Pathol.*, 7, 265-276 (1975).
- (23) 永浜伴紀・井上啓子・昇 吉継・藤本滋生・蟹江松雄 : 甘藷の水蒸気蒸留成分について. *農化*, 51, 597-602 (1977).
- (24) J. B. Edmond : Harvesting, curing, and storing. In: Sweet Potatoes; production, processing, marketing. (J. B. Edmond ed.) AVI Publishing Co., Inc. (West-port, Connecticut) p.208-246 (1971).
- (25) J. A. Woolfe : Postharvest procedures. In: Sweet potato and



- untapped food resource. Cambridge University Press (Cambridge)  
p.219-262(1992).
- (26) E. Artschwager, and R. G. Starrett : Suberization and wound  
periderm formation in sweet potatoes and gladiolus as affected  
by temperarure and relative humidity. J. Agr. Res., 43, 353-  
364 (1931).
- (27) D. L. Strider C. L. McCombs : Rate of wound phellem formation  
in the sweet potato. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 72, 435-442  
(1958).
- (28) M. R. Boyd and B. J. Wilson : Preparative and analytical  
gaschromatography of ipomeamarone. A toxic metabolite of sweet  
potatoes. J. Agr. Food Chem., 19, 547 (1971).
- (29) B. J. Wilson, M. R. Boyd, T. M. Harris and D. T. D. Yamg : A  
lung oedema factor from mouldy sweet potatoes. Nature,  
231, 52-53 (1971).
- (30) J. A. Schneider, J. Lee, Y. Naya, K. Nakanishi, K. Oba, and I.  
Uritasni : The fate of the phytoalexin ipomeamarone furanoterpenes  
and butenolides from *Ceratocystis fimbriata*-infected sweet  
potatoes. Phytochem., 23, 759-764 (1984).
- (31) 鈴木直治・瓜谷郁三 : 甘藷褐変組織及び周辺に現われるエールリヒ氏  
アルデヒド試薬による反応陽性成分について. 日植病, 16, 51-56  
(1952).
- (32) I. Oguni and I. Uritani : Isolation of dehydro-ipomeamarone, a new  
sesqui-terpenoid from the black-rot fungi infected sweet potato



- root tissue and its relation to the biosynthesis of ipomeamarone. *Agric. Biol. Chem.*, 37, 2443-2444 (1973).
- (33) 島 佳久・永浜伴紀・菅沼俊彦・北原兼文：サツマイモの傷害と保蔵条件による品質変化, 特にイポメアマロンの生成. *熱帯農業*, 40, 204-212 (1996).
- (34) D. T. D. Yang, B. J. Wilson and T. M. Harris : The structure of ipomeamaranol. A new toxic furanosesquiterpene from moldy sweet potatoes. *Phytochem.*, 10, 1653-1654 (1971).
- (35) L. T. Burka, R. M. Bowen, and B. J. Wilson : 7-Hydroxymyoporone, a new toxic furanosesquiterpene from mold-damaged sweet potatoes. *J. Org. Chem.*, 39, 3241-3244 (1974).
- (36) C. Kato and I. Uritani : Changes in carbohydrate content of sweet potato in response to cutting and infection by black rot fungus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 42, 181-186 (1976).
- (37) 永浜伴紀：原料甘藷の用途適性と品質. *醸協誌*, 88, 830-838 (1993).
- (38) 福井作蔵：還元糖の定量法 第2版. *生物化学実験法1* (瓜谷郁三・駒野 徹・志村憲助・中村道德・船津 勝 編) 学会出版センター, p.9-11 (1990).
- (39) 山崎光廣・宮崎 博・佐藤宗衛：薄層クロマトグラフィーによる糖質の分離挙動と食品試料への応用. *分析化学*, 37, 121-127 (1988).
- (40) J. T. Galambos : The relation of carbazole with carbohydrates. I. Effect of borate and sulfamate on carbazole color of sugars. *Anal. Biochem.*, 19, 119-132 (1967).
- (41) 福井作蔵：還元糖の定量法 第2版. *生物化学実験法1* (瓜谷郁三・



- 駒野 徹・志村憲助・中村道徳・船津 勝 編) 学会出版センター, p. 50-52 (1990).
- (42) V. L. Singleton and J. A. Rossi, Jr. : Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult*, 16, 144-158 (1965).
- (43) B. D. Ezell, M. S. Wilcox, and K. D. Demaree : Physiological and biochemical effects of storage humidity on sweet potatoes. *Agric. Food Chem.*, 4, 640-644 (1956).
- (44) D. H. Picha : Weight loss in sweet potatoes during curing and storage. Contribution of transpiration and respiration. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 111, 889-892 (1986).
- (45) S. J. Kays : Postharvest physiology of perishable plant products. Van Nostrand Reinhold (New York) p. 35-36 (1991).
- (46) W. M. Walter, Jr. and W. E. Schadel : A rapid method for evaluating curing progress in sweet potatoes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 107, 1129-1133 (1982).
- (47) W. M. Walter, Jr. and W. E. Schadel : Structure and composition of normal skin (periderm) and wound tissue from cured sweet potatoes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 108, 909-914 (1983).
- (48) 大橋祐子・瀬尾茂美 : 傷害に対する細胞 ; 細胞の増殖とシグナル応答. 「植物の分子細胞生物学. 細胞の構築・ダイナミズム・シグナル応答」 細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ 3, 秀潤社 p.193-205 (1995).
- (49) C. A. Ryan and E. E. Farmer : Oligosaccharide signals in plants.;



- A current assessment. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Bio., 42, 651-674 (1991).
- (50) J. A. Hargreaves and J. A. Bailey : Phytoalexin production by hypocotyls of *Phaseolus vulgaris* in response to constitutive metabolites released by damaged bean cells. Physiol. Plant Pathol., 13, 89-100 (1978).
- (51) N. Phillips, S. Imoto, Y. Ohta, and K. Nakanishi : Partial purification of an endogenous elicitor from suspension-cultured cells of red bean, *Vigna angularis*. Experimenta, 48, 683-687 (1992).
- (52) 瓜谷郁三・大羽和子：植物起源酵素分離・生成の問題点 別冊「蛋白質, 核酸, 酵素」, 76; 2, 共立出版 p.170-179 (1976).
- (53) 菅原 潔・副島正美：蛋白質の定量法 第2版. 生物化学実験法7 (駒野 徹・志村憲助・中村研三・中村道徳・山崎信行 編) 学会出版センター - p.96-99 (1995).
- (54) 永浜伴紀・福山淳子・原健二郎・北原兼文・菅沼俊彦：原料甘藷のストレス感受性と焼酎の品質劣化要因について; 原料甘藷の品質評価に関する生化学的指標の検索に関する研究 本格焼酎技術開発事業研究成果報告書 (平成6年度) 日本酒造組合中央会・鹿児島県本格焼酎技術開発研究システム p.66-74 (1995).
- (55) R. Pressey and R.S. Allen : Paper chromatography of oligogalacturonides. J. Chromatography, 16, 248-51 (1964).
- (56) 滝谷昭司・鈴木政雄：薄層クロマトグラフ法. 共立出版 p.89 (1985).
- (57) A. J. Barrett and D. H. Northcote : Apple fruit pectic substances



Biochem.J., 94, 617-627 (1965).

- (58) 永浜伴紀・浜碕隆一・北原兼文・菅沼俊彦：各種病害菌によるフラノテルペン類の生成。本格焼酎技術開発事業研究成果報告書(平成7年度)日本酒造組合中央会・鹿児島県本格焼酎技術開発研究システム p.77-81 (1996).
- (59) 島 佳久・永浜伴紀・菅沼俊彦・北原兼文：機械的傷害によるサツマイモの内生フラノテルペン類誘導因子の検索。農化, 71, 1313-1320 (1997).
- (60) A. E. Arinze and I. M. Smith : Production of a polygalacturonase complex by *Botryodiplodia theobromae* and its involvement in the rot of sweet potato. Physiol.Plant Pathol., 14, 141-152 (1979).
- (61) A. E. Arinze and I. M. Smith : Antifungal furanoterpenoids of sweet potato in relation to pathogenic and non-pathogenic fungi. Physiol. Plant Pathol., 17, 145-155 (1980).
- (62) T. Monden, T. Toida, H. Nakamura, N. Sato, and A. Murai : Isolation of an endogenous elicitor induced by hydrogen peroxide from potato. Chem. Lett., 173-174 (1995).
- (63) M. Fujita, K. Oba and I. Uritani : Ipomeamarone 15-Hydroxylase from cut-injured and *Ceratocystis fimbriata*-infected sweet potato root tissues. Agric.Biol. Chem., 45, 1911-1913 (1981).
- (64) 永浜伴紀・島 佳久・菅沼俊彦・北原兼文：甘藷のストレスによるフラノテルペンの生成における品種間差異(予報)。本格焼酎技術開発事業研究成果報告書(平成4年度)日本酒造組合中央会・鹿児島県



本格焼酎技術開発研究システム p.69-73 (1993).

本書は、鹿児島大学農学部 生物化学科 焼酎利用学研究室で研究されたものである。

本研究に当たり、指導教授である藤田孝一、また焼酎の親切な御教授を賜った鹿児島大学農学部 生物化学科 焼酎利用学研究室 (鹿児島大学農学部) に感謝の意を表します。

また、御指導と御協力の御教授を賜った鹿児島大学農学部 焼酎利用学研究室に感謝の意を表します。

指導いただいた鹿児島大学農学部 生物化学科 焼酎利用学研究室の御教授、鹿児島大学農学部 下田豊之助教授、鹿児島大学農学部 橋本文男教授、鹿児島大学農学部 畑田 功教授に感謝いたします。

さらに、助言を頂いた焼酎利用学研究室 北城基文助教授に鹿児島大学の御教授に感謝いたします。



## 謝 辞

本研究は、鹿児島大学農学部 生物資化学科 澱粉利用学研究室で行ったものである。

本研究に当たり、始終御指導を賜わり、また原稿の懇切な御校閲を頂きました前鹿児島大学農学部 永浜伴紀教授（現鹿児島大学名誉教授）に深甚な感謝の意を捧げます。

また、御鞭撻と原稿の懇切な御校閲を頂きました鹿児島大学農学部 菅沼俊彦教授に感謝の意を表します。

御審査下さった鹿児島大学農学部 田寺謙次郎教授ならびに菅沼俊彦教授、宮崎大学農学部 下川敬之教授、鹿児島大学農学部 橋永文男教授、琉球大学農学部 知念 功教授に感謝いたします。

さらに、助言を頂いた澱粉利用学学研究室 北原兼文助手ならびに専攻学生の皆様に心からお礼申し上げます。



