



Title	亜臨界水を用いたイヌリン加水分解物の質量分析
Author(s)	伊藤, 貴則; 清水, 直人
Citation	日本食品工学会誌, 15(3), 165-172 https://doi.org/10.11301/jsfe.15.165
Issue Date	2014
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68430
Rights	著作権は日本食品工学会にある。利用は著作権の範囲内に限られる。
Type	journal article
File Information	Inulin_F14406.pdf



① 亜臨界水による DFA III の生産

② 亜臨界水を用いたイヌリン加水分解物の質量分析

③ 伊藤貴則¹, 清水直人^{2†}

④ ¹北海道大学大学院農学院

〒060-8589 札幌市北区北 9 条西 9 丁目

²北海道大学大学院農学研究院

〒060-8589 札幌市北区北 9 条西 9 丁目

⑤ Mass spectrometry of inulin hydrolyzate prepared using subcritical water.

⑥ Takanori ITOH¹, Naoto SHIMIZU^{2†}

⑦ ¹Graduate School of Agriculture, Hokkaido University,

Kita 9 Nishi 9, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido, 060-5889, Japan

²Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University,

Kita 9 Nishi 9, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido, 060-5889, Japan

⑧ 清水直人

Fax 番号 011-706-3848

E-mail : shimizu@bpe.agr.hokudai.ac.jp

1 英文要旨

2 In order to establish the industrial production of difructose anhydride III (DFA III) from inulin using
3 subcritical water, we investigated the effect of subcritical water phases (5 preset temperature: 150,
4 155, 160, 165, 170°C, pressure: 3.0–5.0 MPa) on hydrolysis of inulin. The inulin hydrolyzate
5 components determined by mass spectrometry were difructose anhydrides (DFAs) including DFA III,
6 monosaccharides and oligosaccharides with degrees of polymerization (DPs) of 2–12. The DPs of
7 oligosaccharides prepared at 165 and 170°C were 2–4 and those at 150, 155 and 160°C were 2–12.
8 Hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural were also detected in the inulin hydrolyzate by UV-Vis
9 spectrometry. The optimum temperature for converting inulin to DFA III was temperature of
10 160–165°C, pressure of 3.0–5.0 MPa. This study showed a potential of formation of DFA III from
11 inulin under these subcritical water phases.

12

13 **Keywords: subcritical water, inulin, DFA III, MS, hydrolyzate**

1. 緒 言

近年，日本において，一人あたりの砂糖消費量が減少していることから，糖料作物以外の作物生産が求められている．また，低カロリー食品や食物繊維を付与した食品など，健康機能性を持つ食品に対して注目が集められている．そのような背景から，北海道の十勝地方で新たな作物，チコリの栽培と，チコリ由来の食物繊維であるイヌリンの生産が検討されている．チコリは甜菜の転作作物であり，イヌリンが 15-20%ほど[1]含まれている．イヌリンやイヌリンから抽出される成分を有効活用することができれば，チコリを北海道の新たな栽培作物として定着させることができる．

イヌリンはチコリやキクイモ，ゴボウなど，キク科の植物の貯蔵物質として豊富に存在する多糖類である．その構造はフルクトースが β -2,1 グリコシド結合によってつながった直鎖状フルクタンであり，末端にスクロースが結合している．分子量は 5,000-6,300 程度であり，化学的・酵素的加水分解により，単糖類や二糖類，オリゴ糖などを生成する．イヌリンから生成される二糖類の中には，ジフルクトース無水物（以下，DFA）がある．DFA は多くの異性体を持つ．その中でも，ジフルクトース無水物 III（以下，DFA III）は，ヒトの体内においてカルシウムの吸収を促進する[2]など，有効な機能を持つことから注目が集められている．現在，DFA III はイヌリンに DFA III 合成酵素（EC.4.2.2.18）を添加する酵素法により製造されている．これまで DFA III 合成酵素の生産菌として，*Arthrobacter aurescens* SK 8.001[3]，*A. globiformis* C11-1[4]，*A. ilicis* OKU17B[5]，*A. pascens* T13-2[6]，*A. ureafaciens*[7]，

32 *Arthrobacter* sp. A-6[8], *Arthrobacter* sp. H65-7[9], *Arthrobacter* sp. L68-1[10], *Bacillus* sp.
33 *snu-7*[11], *Flavobacterium* sp. LC-413[12], *Leifsonia* sp. T88-4[13]などが報告されている。こ
34 れらの生産菌から得られる DFA III 合成酵素を使用することによって、イヌリンから DFA III
35 を特異的に生産することができる。しかし、DFA III 合成酵素を用いた製造法では、生産菌
36 の培養に時間やコストがかかる。また、イヌリンとクエン酸の混合物を 150-180℃で熱処理
37 する [14-15], イヌリンと塩基を混合したものを減圧熱分解する [16], イヌリン粉末を 200℃
38 で約 7 分間[17]または 100-195℃で約 60 分間[18]熱分解することによって DFA III が生産さ
39 れることも報告されている。しかし、熱処理や熱分解による生産法では、事前に酸・塩基
40 などと混合する前処理が必要となることや、試料の焦げ付きが問題点になる。

41 亜臨界水は温度 100-374℃で液体状態を保つように加圧された熱水のことである。亜臨界
42 水は常温・常圧の水と比べた場合、誘電率の低下やイオン積の増加などの特徴があげられ
43 る[19]。特に後者の特徴であるイオン積の増加から、酸・塩基触媒としての働きを利用して、
44 未利用バイオマスから有効成分を抽出する研究[20-21]や、単糖類・二糖類・オリゴ糖・多
45 糖類などの加水分解特性についての研究が多く行われている[22-28]。また、工業的な視点
46 で見たとき、亜臨界水を用いた抽出技術は魅力的な技術である。具体的には、安価で大量
47 に存在する水を使用する、温度操作・圧力操作によって望みの反応場を作り出せる、反応
48 時間を制御（数秒から数時間程度まで）できる、有機溶媒を用いないため環境に優しい、
49 などの利点を持つ。今のところ、亜臨界水を用いてイヌリンから DFA III を生産したという

知見は得られていない。亜臨界水を用いて DFA III を生産することができれば、上記に記した問題点の解決がはかれる。さらに、近い将来、亜臨界水を用いてイヌリンから DFA III を安価で大量に生産することができれば、北海道農業のさらなる発展へと貢献できると考えられる。

そこで本研究は亜臨界水を用いてイヌリンから DFA III の工業的製造法の確立を目指した。本報では、亜臨界水（設定温度：150-170℃，圧力：3.0-5.0 MPa）を用いてモデル的にダリア由来イヌリンの加水分解を行い、各温度（150, 155, 160, 165, 170℃）で得られたイヌリン加水分解物の違いについて、質量分析と紫外・可視吸収スペクトル測定を用いて調べた。また、亜臨界水処理によって生じたイヌリンの化学構造変化について観察するため、赤外吸収スペクトル測定を行った。

2. 実験方法

2.1 供試材料

供試材料として、キク科植物のダリア (*Dahlia Cav.*) から抽出・精製されたイヌリン（重合度：約 25[1]）（和光純薬工業株式会社，大阪）を使用した。また、標準試料としてジフルクトース無水物 III (difructose anhydride III: DFA III)（和光純薬工業株式会社，大阪）を用いた。次項に述べる、亜臨界水を用いて調製した、イヌリン加水分解物を含んだ溶液（以下、イヌリン調製溶液）と比較を行うため、イヌリン水溶液（濃度 1.0% (w/v)）および DFA III 水溶液（濃度 1.0% (w/v)）をコントロールとしてそれぞれ調製した。

2.2 亜臨界水処理

バッチ式リアクタにてイヌリンの加水分解を行った。内容器（テフロン製， ϕ 20 mm）にイヌリン（0.1 g），イオン交換水（10 mL），攪拌子を入れ耐圧容器（SUS 316 製， ϕ 30 mm）に設置した。耐圧容器に圧力計（SUS 316 製， $\sim$ 6.0 MPa）を取り付け，耐圧容器内の空気を窒素ガスにて 3 回置換したのち，圧力 3.0 MPa まで窒素ガスを注入し密閉した。耐圧容器を有機合成装置 Chemi Station TM PPV-3000（東京理化器械株式会社，東京）に設置し，亜臨界水処理を行った[29]。装置の設定温度を 150，155，160，165，170 $^{\circ}$ C の 5 水準，攪拌回転数は 1000 rpm に設定し，室温から設定温度まで加熱を行った。耐圧容器内の温度は K 熱電対を用いて 1 秒ごとに測定し，装置温度および耐圧容器内圧力は目視で 5 分ごとに測定した。亜臨界水処理中の装置温度および耐圧容器内の温度と圧力の経時変化を Fig. 1 に示す。装置温度が上昇するとともに，耐圧容器温度および耐圧容器内圧力も上昇していることがわかる。装置温度が設定温度に到達してから 15 分後，耐圧容器を冷却水中（水温：5 $^{\circ}$ C）に浸し反応を終了させた。反応終了後のイヌリン調製溶液はバイアルに入れ，5 $^{\circ}$ C のインキュベータにて保存した。

Fig. 1

2.3 ESI-MS 法による質量分析・精密質量分析

質量分析計 Exactive（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社，神奈川）を用いてイヌリン加水分解物の質量分析を行った。イヌリン調製溶液およびコントロールとして用意した DFA III 水溶液の希釈にはメタノールを用いた。エレクトロスプレーイオン化法

(electrospray ionization: ESI) により, イヌリン加水分解物のイオン化を行った. 荷電数 (z) あたりの質量数 (m) で表わされる分子量関連イオン (m/z) の測定範囲は m/z 150-2000, 測定イオンモードはポジティブモード・ネガティブモードの両方で測定を行った. そのほかの測定条件は以下のとおり設定した. スプレ電圧 3.0 kV (ポジティブモード), 2.6 kV (ネガティブモード), シースガス流量および補助ガス流量はそれぞれ 30 (a.u.) と 15 (a.u.), キャピラリ温度およびヒータ温度はそれぞれ 300°C と 260°C, キャピラリ電圧, チューブレレンズ電圧およびスキマ電圧はそれぞれ ± 25 V, ± 80 V, ± 30 V に設定した (正負はそれぞれポジティブモード, ネガティブモードを示す). 質量分析で得られたマスペクトルにて対象ピーク (本研究では DFA III に相当するピーク) を確認したのち, 対象ピークに対して精密質量分析を行った. 測定イオンモードは, 質量分析で得られた対象ピークのイオン強度が強く検出されたイオンモードで測定を行った. 測定精密質量との質量精度が 5 ppm 以内の条件で算出された組成式から対象ピークの分子式を推定した.

ESI 法は, 高分子試料でも測定が可能であり, 主に $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+nH]^{n+}$, $[M-H]^-$, $[M-nH]^-$ などの分子量関連イオンが検出される. M は試料の分子量を表す. つまり, ポジティブモードで測定を行った場合, 試料にナトリウム原子が 1 個分, または, 水素原子が 1 個または n 個分付加した, 分子量関連イオンが検出される (ネガティブモードでは水素原子が脱離した分子量関連イオンが検出される).

2.4 赤外吸収スペクトル測定

赤外吸収スペクトルの測定はフーリエ変換赤外分光光度計 FT/IR-6100（日本分光株式会社，東京）を用い，減衰全反射法（ATR 法）により測定を行った．ATR 測定には，ATR アタッチメント ATR PRO450-S（日本分光株式会社，東京）を使用した．アタッチメントのプリズム部分の材質はセレン化亜鉛（ZnSe）を用いた．イヌリン調製溶液，イヌリン水溶液および DFA III 水溶液の計 7 種の試料溶液をプリズム部分にそれぞれ約 200 μL ずつ滴下し測定した．赤外分光光度計の検出器には硫酸トリグリシン検出器（Tri-Glycine Sulfate : TGS 検出器）を使用し，分解能 4 cm^{-1} ，積算回数 256 回で測定を行った．

2.5 紫外・可視吸収スペクトル測定

紫外・可視吸収スペクトルの測定は紫外可視分光光度計 V-560（日本分光株式会社，東京）を用いて測定を行った．イヌリン調製溶液（0.1 mL）をイオン交換水（4.9 mL）にて希釈を行ったのち，希釈液を合成石英ガラスセル S10 標準セル（ジーエルサイエンス株式会社，東京）に入れ，波長域 200-900 nm にて測定を行った．

3. 結果および考察

3.1 イヌリン加水分解物の質量分析

亜臨界水を用いてイヌリンの加水分解を行い，得られたイヌリン加水分解物のマスペクトルを m/z 150-2000 の範囲で Fig. 2(a)-(e)に，コントロールとして DFA III のマスペクトルを Fig. 2(f)に示す．150，155，160 $^{\circ}\text{C}$ の 3 水準では， m/z 150-2000 までの広い範囲にわたってイヌリン加水分解物の存在を確認した．それに対し 165，170 $^{\circ}\text{C}$ の 2 水準においては，大

Fig. 2

部分のイヌリン加水分解物は m/z 700 以下にのみ存在した。150, 155, 160°C の 3 水準で確認されたイヌリン加水分解物に着目すると, m/z 179 [M-H]⁺ のピークが検出された。このピークはフルクトースやグルコースなどの単糖類に相当する[30]。さらに m/z 179 [M-H]⁺ に m/z 162 ずつ加算されて検出されたピーク (m/z 341, 503, 665, 827, 989, 1151, 1313, 1475, 1637, 1799, 1961 [M-H]⁺) は, それぞれ重合度 2-12 のオリゴ糖と推測される。特に, m/z 503, 665, 827 [M-H]⁺ の検出ピークは, それぞれ 1-kestose (GF₂), nystose (GF₃), fructosyl nystose (GF₄) に対応し, これらはフラクトオリゴ糖 (FOS) と考えられる。

次に 165, 170°C の 2 水準で確認されたイヌリン加水分解物に着目すると, 150, 155, 160°C の 3 水準と同様にフルクトースやグルコースなどの単糖類に相当する成分の確認とともに, 165°C においては GF₄ や GF₄ から水分子 1 個分脱水した糖 (m/z 647 [M-H]⁺), そして二糖類 (m/z 341[M-H]⁺) などの成分が, 170°C では二糖類 (m/z 339 [M-3]⁺) に相当する成分がそれぞれ確認された。これは, 処理温度が高くなるにつれて亜臨界水のイオン積が増加し [19,29], イヌリンの加水分解反応が促進されたためと考えられる。他の研究報告においても, 糖類や多糖類を亜臨界水で処理した場合, 処理温度を高くすると加水分解反応速度も増加し, より短時間で糖類や多糖類の加水分解反応が進行する報告[24,26,31] があることから, 本研究で得られた結果は妥当であると判断できる。これらの結果から, 亜臨界水を用いてイヌリンの加水分解を行い, 得られたイヌリン加水分解物には単糖類やオリゴ糖 (重合度 2-12) などの成分が含まれていることがわかる。さらに 150, 155, 160°C の 3 水準で調製したイヌ

リン加水分解物を構成するオリゴ糖の重合度は 2-12 であったのに対し、165, 170°C の 2 水準で調製したオリゴ糖の重合度は 2-4 であった。すなわち、イヌリン加水分解物を構成するオリゴ糖の重合度は、亜臨界水処理温度に依存し、処理温度が高くなるほど、オリゴ糖の重合度は低くなることが明らかになった。

コントロールとして用意した DFA III（分子量：324）のマススペクトルから、DFA III は m/z 323 [M-H]⁻ のピークが基準ピークとして検出された（Fig. 2(f)）。この結果を踏まえ、イヌリン加水分解物のマススペクトルに着目すると、150, 155, 160, 165, 170°C の 5 水準すべてにおいて、DFA III と同じ m/z 323 [M-H]⁻ の検出ピークが、さらに 165°C では DFA III の二量体 m/z 647 [2M-H]⁻ が検出された。 m/z 323 [M-H]⁻ で与えられるピークの分子式の推定を行うため、165°C で得られたイヌリン加水分解物に対して、ポジティブモードで精密質量測定を行った。ポジティブモードでは試料にナトリウム原子が 1 個分付加した [M+Na]⁺ が検出され、測定精密質量は m/z 347.0957 [M+Na]⁺ で与えられた。組成式の演算結果から、計算精密質量 m/z 347.0949 [M+Na]⁺、質量精度 2.48 ppm (< 5 ppm) で組成式 C₁₂H₂₀O₁₀Na が算出された。組成式 C₁₂H₂₀O₁₀Na からナトリウム原子 1 個分を除いた組成式 C₁₂H₂₀O₁₀ は DFA III の分子式 C₁₂H₂₀O₁₀ と一致する。本報では、イヌリン加水分解物の中には DFA III と同じ分子式を持つ DFAs が構成成分として含まれているところまでは明らかとなったが、得られた DFAs の中に DFA III が含まれていると断定することはできない。しかし、Christian らはイヌリンとクエン酸の混合物を 160°C で熱処理して得られた DFAs の異性体の内訳を解析して、

生産量の多いほうから DFA I, DFA III, DFA II の順で熱分解されることを報告している[15].

本報においてもほぼ同じ温度域で実験を行っていることから、得られた DFAs の中でも DFA III を含んでいる可能性は高いと推測できる。このことから、亜臨界水を用いて調製したイヌリン加水分解物には、DFA III を含む DFAs が構成成分として存在するものと考えられる。

3.2 赤外・紫外・可視吸収スペクトル

イヌリン調製溶液、イヌリン水溶液、DFA III 水溶液の赤外吸収スペクトル測定を行い、指紋領域 ($1400\text{-}600\text{ cm}^{-1}$) における赤外吸収スペクトルを Fig. 3 に示す。イヌリン水溶液スペクトルにおける 1144 , 1029 , 991 , 934 cm^{-1} の吸収バンドに帰属する振動モードは次のとおりである。 1144 cm^{-1} の吸収バンドは、C-H, C-O-H 変角振動を伴った、C-O, C-C 伸縮振動に帰属する[32-33]。同様に、 1029 cm^{-1} の吸収バンドは C-O-H 変角振動に、 991 cm^{-1} の吸収バンドは CH_2 に関連した振動にそれぞれ帰属される[33-34]。また、 934 cm^{-1} の吸収バンドはイヌリン中に存在する $\beta\text{-}2,1$ グリコシド結合に帰属される[32,35,36]。イヌリン調製溶液と DFA III 水溶液のスペクトルに着目すると、 150 , 155 , 160 , 165 , 170°C の 5 水準すべてにおいて、イヌリン調製溶液のスペクトルと DFA III 水溶液のスペクトルは類似していた。また、これらのスペクトルではイヌリン水溶液のスペクトルで確認された吸収バンド (1144 , 1029 , 991 , 934 cm^{-1}) は観察されなかった。特にイヌリン調製溶液のスペクトル (5 水準)、すべてにおいて 934 cm^{-1} の吸収が変化したことから、同波長に帰属する $\beta\text{-}2,1$ グリコシド結合が消失したことがわかる。すなわち、イヌリンは亜臨界水の加水分解作用によって、 $\beta\text{-}2,1$

Fig. 3

グリコシド結合部分で切断されていることがわかった。以上に述べたように、イヌリン調製溶液、イヌリン水溶液、DFA III 水溶液の赤外吸収スペクトルの解析結果から、亜臨界水を用いてイヌリンを処理すると、化学構造の変化が生じることが明らかになった。

イヌリン調製溶液の紫外・可視吸収スペクトルを Fig. 4 に示す。160, 165, 170°Cの3水準では 280 nm 付近において、また、すべての温度水準で 750 nm 付近に吸収バンドが観察された。280 nm 付近における吸収バンドは 5-ヒドロキシ-2-メチルフルアルデヒド (HMF) やフルフラールの存在を[21]を、750 nm 付近の吸収バンドはフェノール酸の存在[37]をそれぞれ示す。これらの化合物は亜臨界水の熱分解作用によって生成された。すなわち、イヌリンはグルコースやフルクトースへと加水分解され、さらに HMF やフルフラールへと熱分解される[38]。また、亜臨界水中ではフルクトースからマンノースへの異性化反応が起きる[39]ことや、亜臨界水中においてグルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、ソルボースから HMF への分解が動力的に調べられている[22]。280 nm 付近の吸光度に着目すると、165, 170°Cの2水準では、150, 155, 160°Cの3水準に比べて吸光度の値が大きいことがわかる。さらに、既往の研究報告において、亜臨界水処理温度が高くなるほど単糖類の熱分解反応が進み、HMF やフルフラールの生成量が増加する報告[20-22]もあることから、165, 170°Cの2水準で得られたイヌリン調製溶液には、150, 155, 160°Cの3水準で得られたものに比べ、HMF やフルフラールなどの副生成物を多く含むことが示唆された。

Fig. 4

3.3 推定反応スキーム

亜臨界水を用いてダリア由来イヌリンを加水分解したときの推定反応スキームを Fig. 5 に示す。亜臨界水を用いてイヌリンを加水分解することにより、イヌリンの β -2,1 グリコシド結合が切断されイヌリン加水分解物が得られた。イヌリン加水分解物の構成成分として、フルクトースやグルコースなどの単糖類、そして重合度が 2-12 のオリゴ糖などが含まれており、さらに DFA III を含む DFA などの成分も含まれることが推測された。イヌリン加水分解物を構成するオリゴ糖の重合度は亜臨界水処理温度に依存し、処理温度が高くなるほど重合度の低いオリゴ糖が主な成分として存在した。また、イヌリン加水分解物に含まれる単糖類が HMF、フルフラール、フェノール酸などへと熱分解されることも確認された。

4. 結 論

亜臨界水を用いてモデル的にダリア由来イヌリンの加水分解を行い、各温度で得られたイヌリン加水分解物の違いについて調べた。質量分析、紫外・可視吸収スペクトル測定で分析した結果、イヌリン加水分解物の構成成分として単糖類やオリゴ糖（重合度：2-12）などが含まれていた。また、DFA III を含む DFA についても構成成分として含まれていることが示唆された。イヌリン加水分解物に含まれる単糖類は、HMF、フルフラール、フェノール酸などの副生成物へと熱分解されることも確認された。さらに、150, 155, 160℃の 3 水準で調製したイヌリン加水分解物を構成するオリゴ糖の重合度は 2-12 であるのに対し、165, 170℃の 2 水準で調製したオリゴ糖の重合度は 2-4 であった。このことから、イヌリン加水分解物を構成するオリゴ糖の重合度は亜臨界水処理温度に依存し、処理温度が高くな

るほど、重合度は低くなることが明らかとなった。また、亜臨界水処理温度は HMF やフルフラールなどの副生成物の生成に対しても影響を及ぼし、処理温度が高くなるほど副生成物の生成が進む傾向が見られた。亜臨界水によって調製されたイヌリン加水分解物は、イヌリンに存在する β -2,1 グリコシド結合が切断されて生成されたものであることが赤外吸収スペクトル測定によって示された。

以上で得られた結果から、イヌリン加水分解物の中に DFA III を含む DFAs が構成成分として存在し、なおかつ HMF やフルフラールなどの副生成物が少量である温度域は 160-165°C であった。すなわち、亜臨界水を用いてイヌリンから DFA III を含む DFAs の生産を目指した場合、160-165°C の温度域で亜臨界水処理を行うことが適していると考えられる。

謝 辞

本研究は、科学研究費基盤研究 (C) 課題番号 23580157、一部は農林水産省委託プロジェクト食品ナノテクノロジー研究で実施されていることを記し、謝意を表します。

引用文献

- 1) H. Kikuchi, M. Inoue, H. Saito, H. Sakurai, T. Aritsuka, F. Tomita, A. Yokota; Industrial production of difructose anhydride III (DFA III) from crude inulin extracted from chicory roots using *Arthrobacter* sp. H65-7 fructosyltransferase. J. Biosci. Bioeng., **107**, 262-265 (2009).
- 2) N. Shigematsu, Y. Okuhara, T. Shiomi, F. Tomita, H. Hara; Effect of difructose anhydride III on calcium absorption in humans. Biosci. Biotechnol. Biochem., **68**, 1011-1016 (2004).

- 230 3) M. Zhao, W. Mu, B. Jiang, L. Zhou, T. Zhang, Z. Lu, Z. Jin, R. Yang; Purification and
231 characterization of inulin fructotransferase (DFA III-forming) from *Arthrobacter aurescens* SK
232 8.001. Bioresour. Technol., **102**, 1757-1764 (2011).
- 233 4) K. Haraguchi, M. Kishimoto, K. Seki, K. Hayashi, S. Kobayashi, K. Kainuma; Purification and
234 properties of inulin fructotransferase (Depolymerizing) from *Arthrobacter globiformis* C11-1.
235 Agric. Biol. Chem., **52**, 291-292 (1988).
- 236 5) M. Kawamura, S. Takahashi, T. Uchiyama; Purification and some properties of inulin
237 fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter ilicis*. Agric. Biol. Chem., **52**, 3209-3210
238 (1988).
- 239 6) K. Haraguchi, T. Yamanaka, K. Ohtsubo; Purification and properties of a heat stable inulin
240 fructotransferase (DFA III-producing) from *Arthrobacter pascens* T13-2. Carbohydr. Polym., **50**,
241 117-121 (2002).
- 242 7) T. Uchiyama, S. Niwa, K. Tanaka; Purification and properties of *Arthrobacter ureafaciens*
243 inulase II. Biochim. Biophys. Acta., **315**, 412-420 (1973).
- 244 8) J. Park, Y. Choi; Purification and characterization of inulin fructotransferase (depolymerizing)
245 from *Arthrobacter* sp. A-6. J. Microbiol. Biotechnol., **6**, 402-406 (1996).
- 246 9) A. Yokota, K. Enomoto, F. Tomita; Purification and properties of an inulin fructotransferase
247 (depolymerizing) from *Arthrobacter* sp. H65-7. J. Ferment. Bioeng., **72**, 262-265 (1991).

- 248 10) K. Haraguchi, M. Yoshida, K. Ohtsubo; Thermostable inulin fructotransferase (DFA
249 III-producing) from *Arthrobacter* sp. L68-1. Carbohydr. Polym., **59**, 411-416 (2005).
- 250 11) S. I. Kang, W. P. Kim, Y. J. Chang, S. I. Kim; Purification and properties of inulin
251 fructotransferase (DFA III-producing) from *Bacillus* sp. snu-7. Biosci. Biotechnol. Biochem., **62**,
252 628-631 (1998).
- 253 12) C. M. Cho, Y. S. Lim, S. K. Kang, K. L. Jang, T. H. Lee; Production of inulin fructotransferase
254 (depolymerizing) from *Flavobacterium* sp. LC-413. J. Food Sci. Nutr., **1**, 121-126 (1996).
- 255 13) K. Haraguchi, M. Yoshida, K. Ohtsubo; Inulin fructotransferase (DFA III-producing) from
256 *Leifsonia* sp. T88-4. Carbohydr. Polym., **66**, 75-80 (2006).
- 257 14) M. M. Harris, G. N. Richards; Di-D-fructose dianhydrides and related oligomers from thermal
258 treatments of inulin and sucrose. Carbohydr. Res., **287**, 183-202 (1996).
- 259 15) T. J. Christian, M. M. Harris, R. J. Field, B. A. Parker; Kinetics of formation of Di-D-fructose
260 dianhydrides during thermal treatment of inulin. J. Agric. Food Chem., **48**, 1823-1837 (2000).
- 261 16) G. R. Ponder, G. N. Richards; Pyrolysis of inulin, glucose, and fructose. Carbohydr. Res., **244**,
262 341-359 (1993).
- 263 17) A. E. Blize, M. M. Harris, G. N. Richards; Di-d-fructose dianhydrides from the pyrolysis of
264 inulin. Carbohydr. Res., **265**, 31-39 (1994).
- 265 18) A. Böhm, I. Kaiser, A. Trebstein, T. Henle; Heat-induced degradation of inulin. Eur. Food Res.

- Technol., **220**, 466-471 (2004).
- 19) P. E. Savage; Organic chemical reactions in supercritical water. Chem. Rev., **99**, 603-621 (1999).
- 20) J. Wiboonsirikul, Y. Kimura, M. Kadota, H. Morita, T. Tsuno, S. Adachi; Properties of extracts from defatted rice bran by its subcritical water treatment. J. Agric. Food Chem., **55**, 8759-8765 (2007).
- 21) P. Khuwijitjaru, K. Watsanit, S. Adachi; Carbohydrate content and composition of product from subcritical water treatment of coconut meal. J. Ind. Eng. Chem., **18**, 225-229 (2012).
- 22) S. Haghighat Khajavi, Y. Kimura, T. Oomori, R. Matsuno, S. Adachi; Degradation kinetics of monosaccharides in subcritical water. J. Food Eng., **68**, 309-313 (2005).
- 23) T. Oomori, S. Haghighat Khajavi, Y. Kimura, S. Adachi, R. Matsuno; Hydrolysis of disaccharides containing glucose residue in subcritical water. Biochem. Eng. J., **18**, 143-147 (2004).
- 24) S. Haghighat Khajavi, Y. Kimura, T. Oomori, R. Matsuno, S. Adachi; Decomposition kinetics of maltose in subcritical water. Biosci. Biotechnol. Biochem., **68**, 91-95 (2004).
- 25) S. Haghighat Khajavi, S. Ota, Y. Kimura, S. Adachi; Kinetics of maltooligosaccharide hydrolysis in subcritical water. J. Agric. Food Chem., **54**, 3663-3667 (2006).
- 26) M. Sasaki, B. Kabyemela, R. Malaluan, S. Hirose, N. Takeda, T. Adschiri, K. Arai; Cellulose hydrolysis in subcritical and supercritical water. J. Supercrit. Fluids, **13**, 261-268 (1998).

- 27) M. Sasaki, Z. Fang, Y. Fukushima, T. Adschiri, K. Arai; Dissolution and hydrolysis of cellulose in subcritical and supercritical water. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **39**, 2883-2890 (2000).
- 28) Y. Ogihara, R. L. Smith, H. Inomata, K. Arai; Direct observation of cellulose dissolution in subcritical and supercritical water over a wide range of water densities (550-1000 kg/m³). *Cellulose*, **12**, 595-606 (2005).
- 29) H. Yoshioka, N. Shimizu; "Characterization of the nanoscale processing of waxy rice starch using compressed hot water" (in Japanese). *Japan J. Food. Eng.*, **15**, 95-100 (2014).
- 30) T. Barclay, M. G. Markovic, M. R. Johnston, P. D. Cooper, N. Petrovsky; Analysis of the hydrolysis of inulin using real time ¹H NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.*, **352**, 117-125 (2012).
- 31) T. Rogalinski, K. Liu, T. Albrecht, G. Brunner; Hydrolysis kinetics of biopolymers in subcritical water. *J. Supercrit. Fluids*, **46**, 335-341 (2008).
- 32) N. Santha, K. G. Sudha, K. P. Vijayakumari, V. U. Nayar, S. N. Moorthy; Raman and infrared spectra of starch samples of sweet potato and cassava. *J. Chem. Sci.*, **102**, 705-712 (1990).
- 33) P. D. Vasko, J. Blackwell, J. L. Koenig; Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates. Part II: Normal coordinate analysis of α -D-Glucose. *Carbohydr. Res.*, **23**, 407-416 (1972).
- 34) S. Pavlovic, P. R.G. Brandao; Adsorption of starch, amylose, amylopectin and glucose monomer and their effect on the flotation of hematite and quartz. *Miner. Eng.*, **16**, 1117-1122 (2003).

302 35) M. Sekkal, V. Dincq, P. Legrand, J. Huvenne; Investigation of the glycosidic linkages in several
303 oligosaccharides using FT-IR and FT Raman spectroscopies. *J. Mol. Struct.*, **349**, 349-352
304 (1995).

305 36) J. J. Cael, J. L. Koenig, J. Blackwell; Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates Part III:
306 Raman spectra of the polymorphic forms of amylose. *Carbohydr. Res.*, **29**, 123-134 (1973).

307 37) C. Fabian, N. Y. T. Thi, N. S. Kasim, Y. H. Ju; Release of phenolic acids from defatted rice bran
308 by subcritical water treatment. *J. Sci. Food Agric.*, **90**, 2576-2581 (2010).

309 38) M. J. Antal, W. S. L. Mok, G. N. Richards; Mechanism of formation of
310 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde from D-fructose and sucrose. *Carbohydr. Res.*, **199**, 91-109
311 (1990).

312 39) C. Usuki, Y. Kimura, S. Adachi; Isomerization of Hexoses in Subcritical Water. *Food Sci.*
313 *Technol. Res.*, **13**, 205-209 (2007)

314

315

316

和文要旨

317

和文表題：亜臨界水を用いたイヌリン加水分解物の質量分析

318

著者名：伊藤貴則，清水直人

319

320

亜臨界水を用いてイヌリンから DFA III の工業的生産法の確立を目的とし，亜臨界水の処

321

理温度（設定温度：150-170℃，圧力：3.0-5.0 MPa）がイヌリンの加水分解に与える影響に

322

ついて調べた．イヌリン加水分解物の質量分析結果から，イヌリン加水分解物の構成成分

323

は DFA III を含むジフルクトース無水物（DFAs），単糖類，オリゴ糖（重合度：2-12）など

324

であった．150，155，160℃の3水準で調製したイヌリン加水分解物を構成するオリゴ糖の

325

重合度は2-12であるのに対し，165，170℃の2水準で調製したオリゴ糖の重合度は2-4で

326

あった．また，紫外・可視スペクトル測定において，イヌリン加水分解物には HMF やフル

327

フラールなどの成分を含むことも確認した．本方式によってイヌリンから DFA III を変換す

328

る最適温度域は160-165℃であった．本研究は，上述した亜臨界水の状態においてイヌリン

329

から DFA III を生産できることを示した．

330

331

332

Figure legends

Fig. 1 Temperature and pressure changes in the subcritical water process.

Fig. 2 ESI-MS spectra (negative ion mode) of the inulin hydrolyzate prepared at (a) 150°C, (b) 155 °C , (c) 160 °C, (d) 165 °C and (e) 170 °C and (f) DFA III. Asterisk (*) shows DFA III signals m/z 323 [M-H]⁻.

Fig. 3 ATR-FTIR spectra of inulin hydrolyzate, inulin and DFA III in aqueous solutions.

Fig. 4 UV-Vis spectra of inulin hydrolyzate. Inset: spectra from 700–800 nm.

Fig. 5 Hydrolysis of inulin extracted from dahlia by subcritical water.

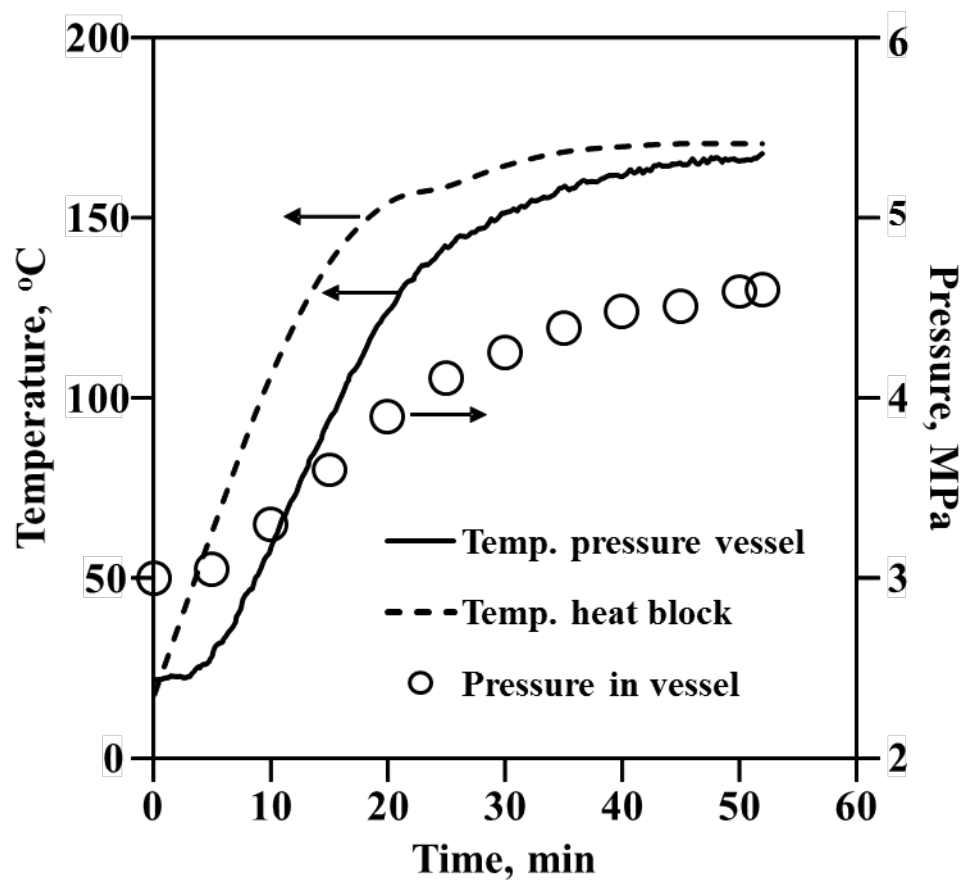


Fig. 1 Temperature and pressure changes in the subcritical water process.

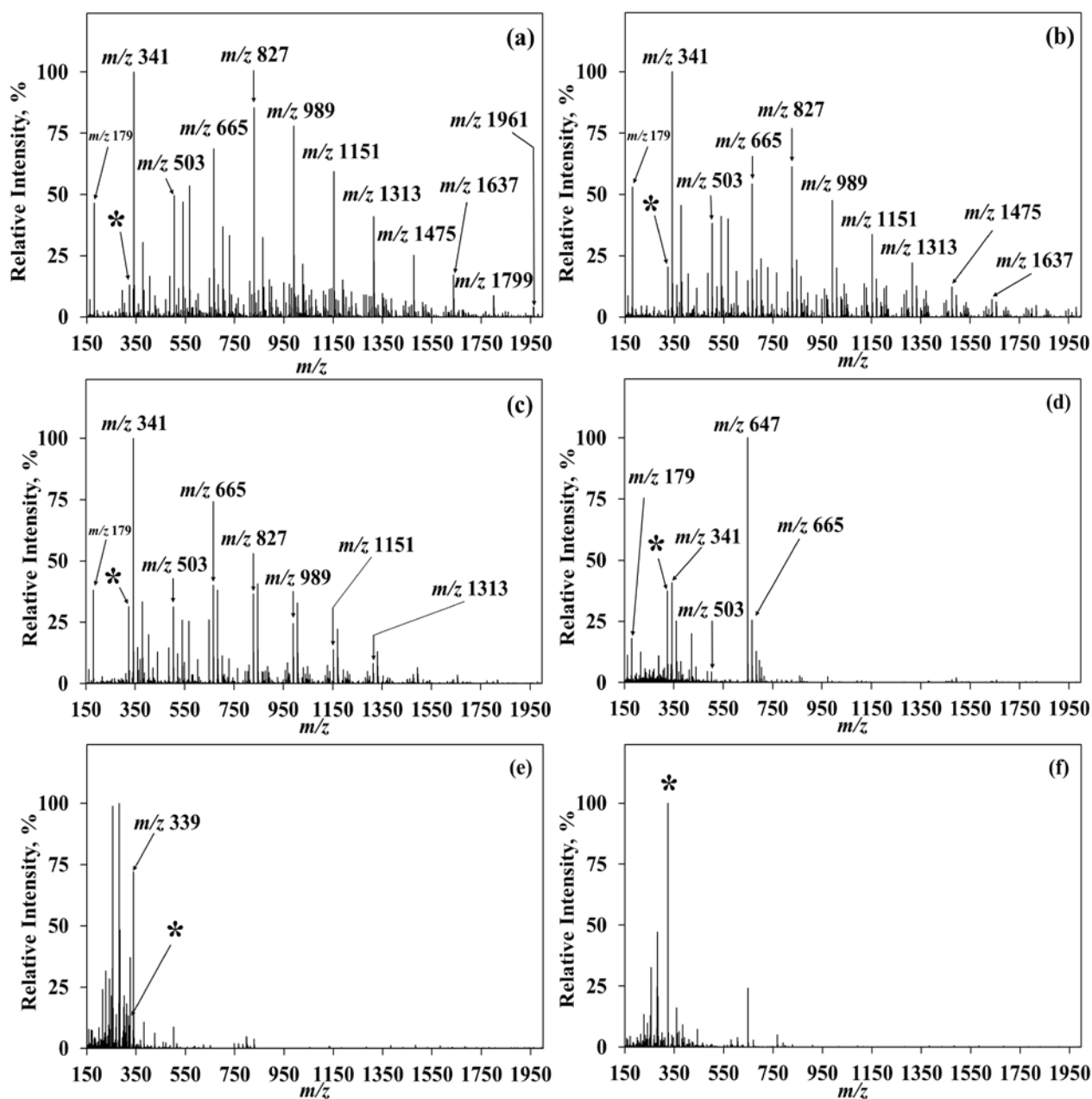


Fig. 2 ESI-MS spectra (negative ion mode) of the inulin hydrolyzate prepared at (a) 150°C, (b) 155 °C , (c) 160 °C, (d) 165 °C, and (e) 170 °C and (f) DFA III. Asterisk (*) shows DFA III signals m/z 323 $[M-H]^-$.

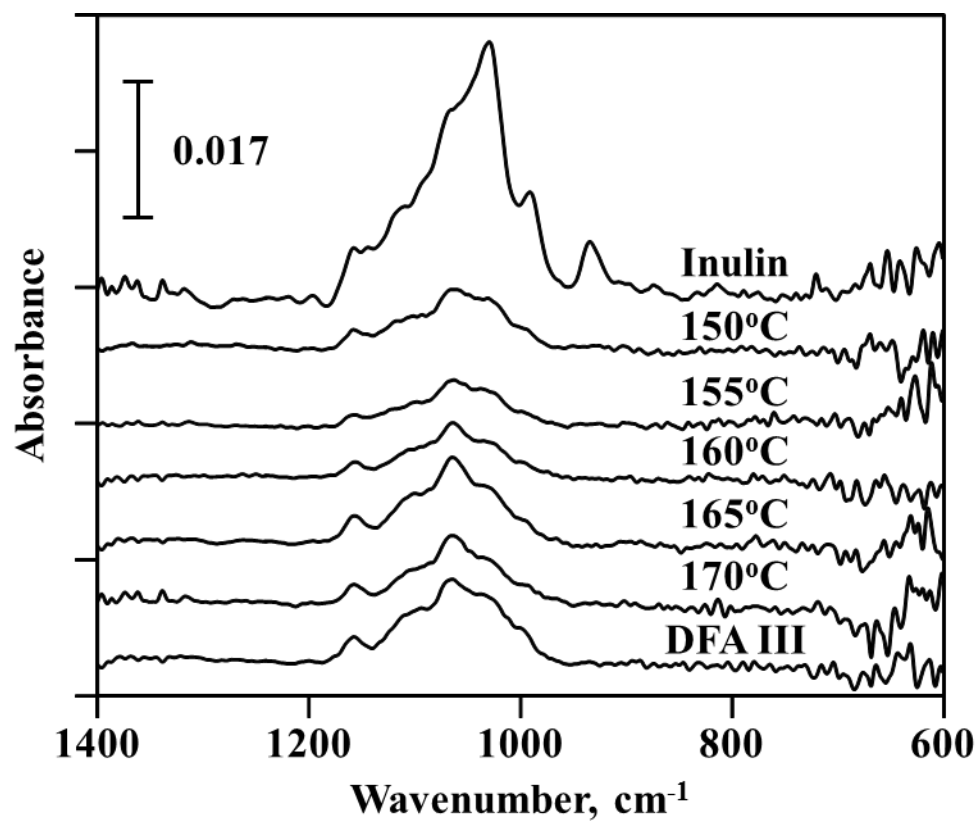


Fig. 3 ATR-FTIR spectra of inulin hydrolyzate, inulin and DFA III in aqueous solutions.

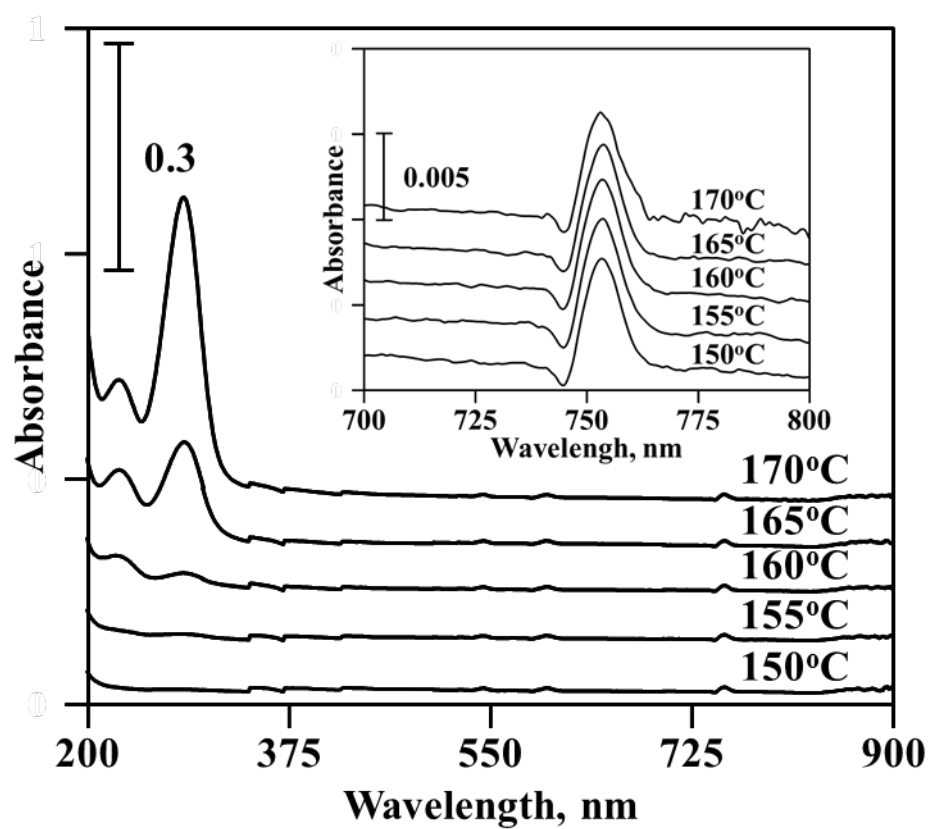
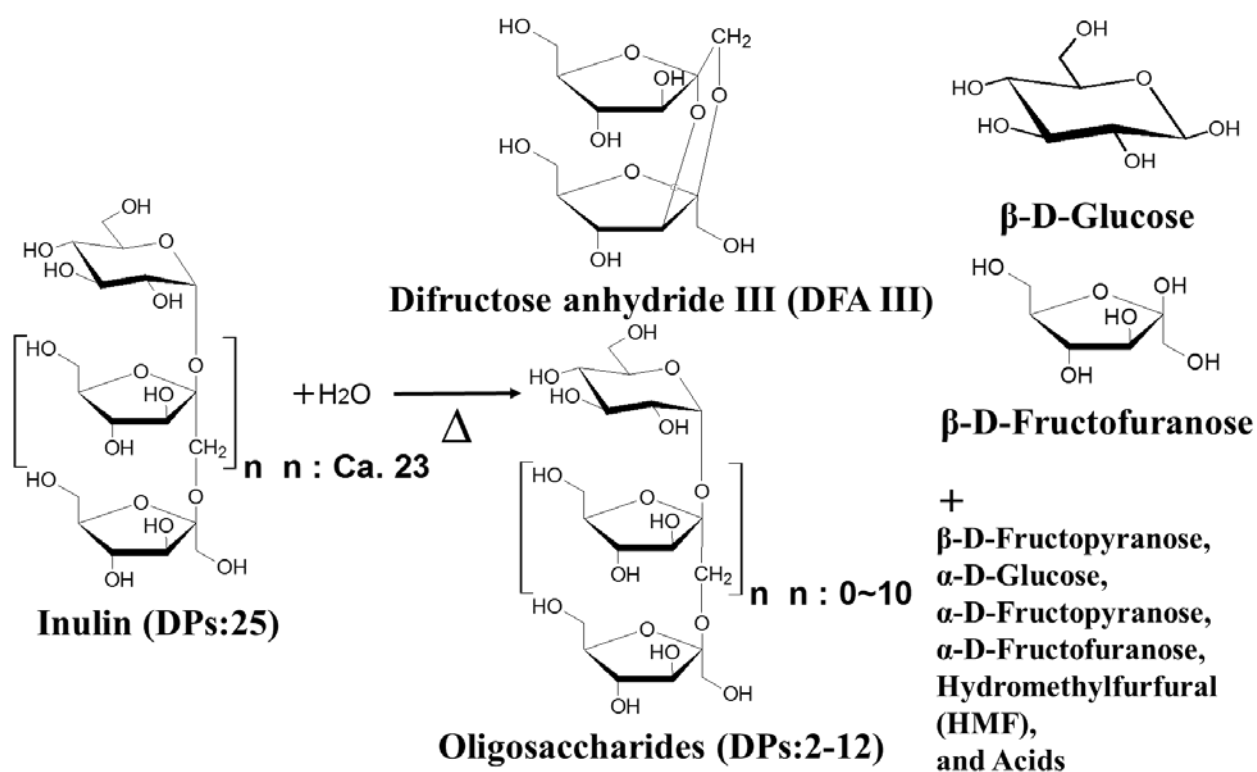


Fig. 4 UV-Vis spectra of inulin hydrolyzate. Inset: spectra from 700–800 nm.



371

372 **Fig. 5 Hydrolysis of inulin extracted from dahlia by subcritical water.**