

舞茸を用いた発酵オカラの機能性糖タンパク質及び多糖類の精製
とその生理活性評価

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
持続環境学専攻
博士（環境学）学位論文

朱 丹

概要

産業廃棄物であるオカラは食品としての需要が少なく、また品質の劣化が早く日持ちがしないため、家畜の飼料として一部を活用している。また、脱水して保存性を高めて供給されるほかは、ほとんどが廃棄されている。近年、産業廃棄物の有効利用は、生産コストならびに環境負荷低減の有効な手法として注目されている。オカラは栄養豊富で、タンパク質、脂肪、澱粉、糖類に富み、土壌用のボカシ肥や家畜の飼料として利用されてきたが、高品質の微生物発酵基質としての利用も可能である。一方、多種類の食用キノコ類菌は、中国の伝統的な漢方薬として昔から病気の治療、寿命の延長、体力の促進及び体調の改善に利用されて来た。近年になって、抗ガン作用、抗酸化作用など、さまざまな機能が新たに発見されている。

本研究はバイオマスの利・活用や生物資源リサイクルシステム構築の観点から、食品残渣から新規な機能性糖タンパク質及び多糖類の発見や新規な機能性素材の開発を本研究の目的とした。

本研究では、まず舞茸菌株を用いたオカラの発酵及び発酵前後の比較を行った(第2章)。未発酵オカラより発酵オカラの方は最も高い生理活性を有することが確認された上、次に発酵オカラからの水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の抽出及びその生理活性評価を行った(第3章)。しかしながら、現実の生産過程において、保存や運輸のコストを低減するため、発酵物に対する乾燥処理が必要とする。従って本研究において、発酵物の乾燥処理は有用物質の抽出に対する影響を検討するため、さらに舞茸発酵オカラに対して、3種類の乾燥処理を行い、それぞれ水溶性物質(AE-HA、AE-FE、AE-DN)、多糖類(PS-HA、PS-FE、PS-DN)、糖タンパク質(Gp-HA、Gp-FE、Gp-DN)の抽出及び生理活性の比較を行った(第4章)。

今までの研究成果は以下の通りである。

1. 舞茸を用いたオカラ発酵条件の検討及び発酵前後各要素の比較

本研究において、既往研究の発酵条件を参照して、以下の発酵条件を確立した。オカラと米糠の乾燥重量比は 7:3 であり、培地滅菌前の含水率は $66.43 \pm 0.25\%$ であり、舞茸の接種量、発酵温度、発酵時間それぞれは 6%、 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、60 日間であった。

発酵前後の比較については、まずは物質の量の変化であった。発酵後のオカラは発酵する前より含水量は大体変化がない状態で 30g ごとに 7.21g の重量が減少した。遊離アミノ酸の含有量は、発酵する前の $20.09 \pm 0.52 \text{ nmol/mg}$ から発酵後の $433.13 \pm 4.33 \text{ nmol/mg}$ まで 20 倍以上増加した。次に形態の変化について、発酵後オカラの表面では、ポアと鱗状突起構造が多数観察され、全体的に発酵する前より、緩い構造になった。つまり、発酵後オカラの比表面積が増加され、多糖類、糖タンパク質などの抽出率を高めることができた。さらに発酵前後水溶性物質の抗ガン生理活性の比較について、発酵後のオカラから抽出された水溶性物質は 24 時間の暴露時間で HeLa 細胞に対して最も高い増殖抑制作用が確認され、その場合の IC_{50} は $40.81 \pm 1.19 \mu\text{g/mL}$ であった。以上の結果により、発酵はオカラの栄養組成及び物理化学性質を改善できる方法の一つであることを示した。

2. 舞茸発酵オカラからの水溶性物質、糖タンパク質、多糖類の抽出及びその生理活性評価。

抽出された水溶性物質は DPPH ラジカル、 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 消去活性及び還元力を持ち、濃度依存的なラジカル消去活性を有することが確認された。それぞれの IC_{50} は $9.86 \pm 1.03 \text{ mg/mL}$ 、 $2.48 \pm 0.02 \text{ mg/mL}$ 、 $1.27 \pm 0.05 \text{ mg/mL}$ であった。また水溶性物質は抗ガン生理活性を持ち、24 時間の暴露時間で人肝ガン細胞の HepG2 に対する増殖抑制作用が確認され、その場合の IC_{50} は $183.3 \pm 8.17 \mu\text{g/mL}$ であった。

抽出された糖タンパク質は $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 消去活性を有し、 $\cdot\text{OH}$ を消去する IC_{50} は $3.50 \pm 0.29 \text{ mg/mL}$ であった。48 時間の暴露時間で

HeLa に対する増殖抑制作用の IC_{50} は $16.68 \pm 0.47 \mu\text{g/mL}$ であり、HepG2 に対する増殖抑制作用の IC_{50} は $96.71 \pm 2.33 \mu\text{g/mL}$ であり、優れた抗ガン生理活性を有することが確認された。

抽出された多糖類は $ABTS^+$ 、 $\cdot\text{OH}$ に対して濃度依存的な消去活性を有し、それぞれの IC_{50} は $3.46 \pm 0.09 \text{ mg/mL}$ 、 $1.34 \pm 0.11 \text{ mg/mL}$ であった。

3. 発酵オカラの乾燥方法による抽出物生理活性に対する影響

発酵オカラに対して異なる乾燥方法では、異なる抽出物の抽出率、抗酸化生理活性、抗ガン生理活性が得られた。熱風乾燥した発酵オカラから抽出した水溶性物質に最も高い抗酸化生理活性が確認された。AE-HA の DPPH ラジカル消去能力は AE-FE より 7.78~8.97 倍高い。また発酵オカラの無乾燥の場合、水溶性物質には高い抗ガン生理活性があると確認された。AE-DN の HeLa の増殖抑制作用は AE-HA より 9.01~10.60 倍、AE-FE より 2.09~2.42 倍高い。AE-DN の HepG2 の増殖抑制作用は AE-HA より 1.49~2.08 倍、AE-FE より 1.48~1.66 倍高い。発酵オカラの異なる乾燥方法では、抽出された糖タンパク質は特異性を示した。Gp-HA 及び Gp-FE の $ABTS^+$ 消去活性はほぼ同様に、Gp-DN の 20 倍程度高く、それぞれの IC_{50} は $6.27 \pm 0.10 \text{ mg/mL}$ と $13.77 \pm 1.02 \text{ mg/mL}$ であった。48 時間の暴露時間で HeLa の増殖抑制作用については Gp-DN と Gp-HA はほぼ同様に、Gp-FE より高く、それぞれの IC_{50} は $16.68 \pm 0.47 \mu\text{g/mL}$ と $19.41 \pm 1.38 \mu\text{g/mL}$ であった。48 時間の暴露時間で Gp-HA の HepG2 の増殖抑制作用は Gp-DN と Gp-FE より強い、 IC_{50} は $32.33 \pm 2.41 \mu\text{g/mL}$ であった。熱風乾燥と無乾燥の発酵オカラからの多糖類は高い抗酸化生理活性を示した。PS-HA と PS-DN の $\cdot\text{OH}$ と $ABTS^+$ 消去活性は有意差がないが、PS-FE の 2 倍である。

抽出された糖タンパク質の Gp-DN は優れた抗ガン生理活性を持っていることが確認されたが、RAW264.7 に対しても増殖抑制作用があった。抽出物に RAW264.7 に対して毒性を示す物質が含有され

ていることが考えられた。

以上の結果はオカラの低コストリサイクル及び新規な機能性素材の開発に有用な情報として考えられる。

目 次

概 要.....	I
第 1 章 緒論.....	1
1.1 背景.....	1
1.2 オカラについて.....	1
1.3 真菌について.....	3
1.3.1 既往研究.....	3
1.3.2 舞茸.....	5
1.4 生体高分子の多糖類と糖タンパク質について.....	6
1.4.1 糖タンパク質について.....	6
1.4.2 多糖類について.....	7
1.5 乾燥方法について.....	7
1.6 研究目的及び論文の構成.....	8
第 2 章 舞茸菌株を用いたオカラの発酵条件の検討及び発酵前後各要素の比較.....	18
2.1 はじめに.....	18
2.2 材料及び方法.....	19
2.2.1 試薬.....	19
2.2.2 オカラ及び菌種.....	19
2.2.3 発酵.....	19
2.2.4 発酵条件の検討.....	20
2.2.5 発酵前後の比較.....	21
2.3 統計分析.....	23
2.4 結果及び考察.....	23
2.4.1 発酵条件.....	23
2.4.2 発酵前後の比較.....	24
2.5 まとめ.....	27
第 3 章 発酵オカラを用いた水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の抽出及びその生理活性 の評価.....	41
3.1 はじめに.....	41
3.2 材料及び方法.....	42

3.2.1 試薬及び実験材料	42
3.2.2 水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の抽出	42
3.2.3 抽出物の抗酸化生理活性の評価	43
3.2.5 各抽出物の抗ガン生理活性及び免疫生理活性についての評価	46
3.2.6 統計分析	47
3.3 結果及び考察	47
3.3.1 AE-DN、PS-DN、GP-DN の抽出率及び抗酸化生理活性	47
3.3.2 ガン細胞に対する増殖抑制作用	49
3.3.3 RAW264.7 の増殖に対する影響	50
3.3.4 正常細胞の C2C12 に対する毒性	50
3.4 まとめ	50
第 4 章 発酵オカラの異なる乾燥方法における各抽出物の生理活性影響に関する評価	65
4.1 はじめに	65
4.2 実験材料及び方法	65
4.2.1 試薬及び実験材料	65
4.2.2 発酵オカラの乾燥処理	66
4.2.3 乾燥させた発酵オカラから水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の抽出	66
4.2.4 抽出された水溶性物質、糖タンパク質の Tricine-SDS-PAGE 電気泳動	67
4.2.5 各抽出物の抗酸化生理活性に関する評価	67
4.2.6 各抽出物の抗ガン生理活性に関する評価	68
4.2.7 各抽出物の免疫生理活性	68
4.2.8 統計分析	68
4.3 結果及び考察	68
4.3.1 発酵オカラの乾燥処理	68
4.3.2 各抽出物の抽出率	69
4.3.3 水溶性物質及び糖タンパク質の Tricine-SDS-PAGE 電気泳動	69
4.3.4 発酵オカラに対する異なる乾燥方法は抽出物に対する抗酸化生理活性の影響	70
4.3.5 発酵オカラに対する異なる乾燥方法は抽出物に対する抗ガン生理活性の影響	71

4.3.6 各抽出物の免疫生理活性に関する検討.....	72
4.4 まとめ.....	73
第5章 総括.....	91
謝辞.....	93
参考文献.....	94
付録.....	103

目 録

図 1-1 食品廃棄物等の年間総発生量及び再生利用等の実施率	15
図 1-2 本研究室に保管されているアミガサタケ、冬虫夏草、霊芝、舞茸の菌糸体	16
図 1-3 N-グリコシド結合、O-グリコシド結合、膜糖タンパク質概略図	17
図 2-1 異なる組成の培地に舞茸菌糸の成長状	35
図 2-2 異なった接種量における発酵オカラの水溶性タンパク質濃度の変化	36
図 2-3 発酵後のオカラ	37
図 2-4 発酵前後オカラの走査型電子顕微鏡 (SEM) 写真	38
図 2-5 4000~400 cm^{-1} 周波数範囲における発酵前後オカラのフーリエ変換赤外線吸収 スペクトル	39
図 2-6 発酵前後オカラから抽出された水溶性物質の HeLa に対する増殖抑制作用	40
図 3-1 発酵オカラの水溶性物質の抽出ステップ	54
図 3-2 発酵オカラの多糖類の抽出ステップ	55
図 3-3 発酵オカラの糖タンパク質の抽出ステップ	56
図 3-4 水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の DPPH ラジカル消去活性	57
図 3-5 水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の $\cdot\text{OH}$ 消去活性	58
図 3-6 水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 消去活性	59
図 3-7 糖タンパク質、水溶性物質の HepG2 に対する増殖抑制作用	60
図 3-8 水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の HeLa に対する増殖抑制作用	61
図 3-9 糖タンパク質、水溶性物質の HeLa に対する増殖抑制作用	62
図 3-10 水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の RAW264.7 に対する増殖効果	63
図 3-11 水溶性物質、糖タンパク質の C2C12 生存率に対する影響	64
図 4-1 熱風乾燥、凍結乾燥された発酵オカラの水溶性物質の抽出ステップ	78
図 4-2 熱風乾燥、凍結乾燥された発酵オカラの多糖類の抽出ステップ	79
図 4-3 熱風乾燥、凍結乾燥された発酵オカラの糖タンパク質の抽出ステップ	80
図 4-4 三種類の乾燥処理を行った発酵オカラ	81
図 4-5 水溶性物質及び糖タンパク質の Tricine-SDS-PAGE 電気泳動	82
図 4-6 各抽出物の DPPH ラジカル消去活性	83

図 4-7 各抽出物の $\cdot\text{OH}$ 消去活性.....	84
図 4-8 各抽出物の ABTS^+ 消去活性.....	85
図 4-9 発酵オカラから抽出された水溶性物質の還元力.....	86
図 4-10 各抽出物の HepG2 に対する増殖抑制作用.....	87
図 4-11 HeLa に対する増殖抑制作用.....	88
図 4-12 各抽出物は RAW264.7 の生存率に対する影響.....	89
図 4-13 各抽出物は RAW264.7 の生存率に対する影響.....	90

表 目 録

表 1-1 豆腐、オカラの製造に使われた三種類の大豆の食品化学分析 ^[6]	10
表 1-2 三種類の大豆に作制られた豆腐やオカラの炭水化物の含有 (g/100g) ^[6]	11
表 1-3 アミガサタケと舞茸の菌糸体の一般組成 ^[52]	12
表 1-4 舞茸の薬用価値.....	13
表 1-5 多糖類の構造.....	14
表 2-1 舞茸発酵の C/N 比率の調整.....	30
表 2-2 舞茸発酵の接種量 (培地の量は 20 g)	31
表 2-3 発酵前後総アミノ酸の種類及び含有量の比較.....	32
表 2-4 発酵前後遊離アミノ酸の種類及び含有量の比較.....	33
表 2-5 発酵オカラ発酵前後重量比較.....	34
表 3-1 AE-ND、Gp-ND、PS-ND は HeLa 及び HepG2 に対する増殖抑制作用の IC ₅₀	53
表 4-1 異なる乾燥方法は各抽出物の抽出率に対する影響.....	75
表 4-2 各抽出物の抗酸化生理活性.....	76
表 4-3 各抽出物の抗ガン生理活性.....	77

用語集

HA	熱風乾燥
FE	凍結乾燥
DN	無乾燥
AE-HA	熱風乾燥処理された発酵オカラから抽出された水溶性物質
AE-FE	凍結乾燥処理された発酵オカラから抽出された水溶性物質
AE-DN	無乾燥発酵オカラから抽出された水溶性物質
PS-HA	熱風乾燥処理された発酵オカラから抽出された多糖類
PS-FE	凍結乾燥処理された発酵オカラから抽出された多糖類
PS-DN	無乾燥発酵オカラから抽出された多糖類
Gp-HA	熱風乾燥処理された発酵オカラから抽出された糖タンパク質
Gp-FE	凍結乾燥処理された発酵オカラから抽出された糖タンパク質
Gp-DN)	無乾燥発酵オカラから抽出された糖タンパク質
DPPH	2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
ABTS	2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid Ammonium Salt
Vc	ビタミンC
VE	ビタミンE
FTIR	フーリエ変換赤外線分光分析
MTT	3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide、yellow tetrazole

第1章 緒論

1.1 背景

近年、環境問題の激化とともに、環境保護の意識も高くなってきた。有限な資源の有効利用のため、リサイクルは一番有効な対策として推進されてきた。リサイクルは再循環を指し、製品化された物を再資源化し、新たな製品の原料として利用することである。資源再生、再資源化、再生利用、再生資源化等とも呼ばれる。循環型社会の形成のため、廃棄物のリサイクルは世界的な課題になってきた。食品廃棄物の処分については、一般的な処理方法は産業廃棄物や一般廃棄物としてお金を支払って処理することであった。日本の農林水産省の調査データにより、食品廃棄物の年間発生量は前年度より下がっているうえ、再生利用等実施率は前年度より上昇している（図 1-1）。平成 24 年食品廃棄物の再生利用等実施率は 85%だったが、まだ上昇する可能性がある。

産業廃棄物として排出されているオカラはかなりの栄養成分が残っており、含有する炭水化物の多数は食物繊維であるため^[1]、よく注目されている。生産コスト、栄養性及び付加価値向上の方から考えると、栄養成分がかなり残っているオカラを培地とし、発酵という手段により機能性食品の創出はオカラの一番いいリサイクル法だと考える。

1.2 オカラについて

アジア諸国では、大豆は豆腐、豆乳、豆乳粉末、もやし、豆腐乾、醤油、大豆粉、大豆油などの食品の発酵物として使用されている。オカラは、大豆製品の主な余剰材料である^[2]。豆腐生産の場合、1 kg の大豆は約 1.3 kg の新鮮なオカラ（オカラの含水率を

75~80%とした場合)が発生する。オカラは江戸時代では庶民的な食品として活躍する時期があった^[3]。しかしながら、近年になって、食品としての需要が少なくなってきたと同時に、食品としての受け入れも制限されている。またオカラの品質の劣化が早く日持ちがしないため、脱水して保存性を高めて供給され、ほとんどが動物飼料や肥料等として使用され、あるいは廃棄されているのが現状である^[4]。日本で、毎年 80 万トンのオカラが排出されている。排出されたオカラを処理するために 160 億円の費用も必要である^[5]。日本豆腐協会の資料では「食品リサイクル法に係る発生抑制」によると、排出されたオカラの利用について、飼料用 65%、肥料用 25%、その他 10%となっている。廃棄はその他の 5~9割で、食用は 1%以下である。その他の 5~9割でも 40000~72000 トンがある。この部分が焼却され、環境汚染の原因ともなっている。

近年、産業廃棄物の有効利用は、生産コストならびに環境負荷低減の有効な手法として注目されている。オカラは益々人間に重視されてきた。一方、オカラは栄養豊富で、乾燥したオカラは 25.4~28.4 %のタンパク質、9.3~10.9 %のオイル、40.2~43.6 %の不溶性繊維、12.6~14.6 %の水溶性食物繊維と 3.8~5.3 %の可溶性炭水化物が含まれており (表 1-1、表 1-2) ^[6,7]、土壌用のボカシ肥や家畜の飼料として利用されてきたが、高品質の微生物発酵基質としての利用も可能である^[2]。また、既往研究で、オカラは機能性食品の開発と生物吸着の面にもよく使われている。機能性食品の開発方面でオカラは主に生理活性物質の抽出、生産に使われている。例えば、イソフラボン^[8,9]、食物繊維、血糖降下食品^[10]、タンパク質^[11]、多糖類^[12,13] などである。生物吸着方面で、オカラは主にリンの吸着研究に使われている^[5,14]。しかしながら、オカラの利用量は低いのが現状である。オカラのリサイクル効率を高めるため、利用コストの低減及び産物の利用価の向上は重要で

ある。

1.3 真菌について

真菌は菌類のうち、細菌・変形菌（粘菌）を除く物の総称であり、カビ・キノコとよばれるものが含まれる。カビ毒を産生するカビがいる一方で、私たちの身の回りには暮らしに有用なカビが数多く存在し、有効活用されている。例えば、環境においては、森林の落ち葉を分解して環境浄化や物質循環などに関係するカビがある。食品においては、みそや醤油などをはじめとする様々な発酵食品がある。また、抗生物質や酵素製剤など医薬の発展に貢献してきたカビも数多く存在している。さらに、食用のキノコもカビ類菌の一種である。

多種類の食用キノコの子実体は、中国の伝統的な漢方薬として昔から病気の治療、寿命の延長、体力の促進及び体調の改善に利用されて来た。近年になって、食用キノコは抗ガン作用、抗酸化作用など、さまざまな機能が新たに発見されている。抗腫瘍、免疫調節、抗ウイルスおよび抗菌活性を有するキノコ由来の多糖類^[15,16]、糖タンパク質、テルペン及びフェノールなどの化合物はすでに分離、同定されている^[17]。

1.3.1 既往研究

本研究室では長い間で食用菌を用いたオカラ発酵を行っている。今まで使用した菌種にはアミガサタケ (*Morchella esculenta*) (図 1-2a)、冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) (図 1-2b)、靈芝 (*Ganoderma lucidum*) (図 1-2c) の三種類がある。

アミガサタケは、アミガサタケ科アミガサタケ属に属する子嚢菌類のキノコの一つである。アミガサタケは各種林内の地上に発するが、主にサクラ、モミ、トウヒなどの木の傍らに群生している。アミガサタケの子実体は発育条件が難しく、かつ人工的に栽

培する方法はまだ報告されていないため、入手困難な貴重な食用菌と薬用菌であると言える。既往研究により、子実体のメタノール抽出物は抗酸化生理活性を有する^[18-21]。子実体の抽出物だけではなく、アミガサタケの菌糸体も栄養成分豊富で^[22]、抽出物（主に多糖類）は腎臓、肝臓に対して保護作用があることが証明された^[23,24]。以上の報告により、アミガサタケ菌糸体に対する研究は注目されている。本研究室で応答曲面法(RSM)により多糖類の産量を評価標準とした菌糸体培養条件の最適化や^[25]、アミガサタケを用いたオカラ発酵条件の最適化や^[26]、アミガサタケの菌糸体多糖の抽出条件の最適化^[27]などの研究が行われていた。

冬虫夏草は子囊菌門核菌綱ボタнтаケ目バツカクキン科冬虫夏草属に属している。中国では冬虫夏草の子実体を菌核化した宿主をつけたまま採集して乾燥し、漢方の生薬もしくは中華料理の薬膳食材として珍重されてきた。薬剤として分類されたのは1964年からである^[28]。近年になって冬虫夏草に対する研究は多くなってきた。一方、近年の研究成果により、冬虫夏草の有効成分は心血管疾患^[29]、腫瘍、老化^[30]、高脂血症^[31]などの病気に対して、治療効果を有することが明らかになった。一方、冬虫夏草の過酷な成長環境と益々増えてきた市場需要量は拍車して冬虫夏草の生物量が減少する原因ともなった^[32]。特に、1999年の中国国家林业局農業部令により、冬虫夏草は中国で2級保護野生植物になった。市場需要量を満たすため、冬虫夏草子実体の人工培養及び菌糸発酵の研究が進んできた。本研究室でも冬虫夏草子実体の人工培養に関する研究を行っている。

霊芝はマンネンタケ科マンネンタケ属に属しているキノコである。中国の後漢時代の薬学著作『神農本草経』に命を養う延命の霊薬として記載されて以来、中国ではさまざまな目的で薬用に用いられてきた。子実体は木質であるため、常に熱水で煎じて抽出液を服用するか薬用酒とする。従って、霊芝の水抽出物やアル

コール抽出物に対する研究は多かった。霊芝の水抽出物は糖尿病の降下効果があることが証明され^[33]、アルコール抽出物は水抽出物より強い抗ガン生理活性を有することが証明された^[34]。本研究室で霊芝を用いた発

酵オカラから抽出された多糖類の抗酸化生理活性及び免疫調節生理活性を有することが証明された^[35]。

1.3.2 舞茸

舞茸 (*Grifola frondosa*) (図 1-2d) は、担子菌門トンビマイタケ科のキノコであり、食用として馴染み深い。中国語名は「灰樹花」である。自然環境で、マイタケはコナラ、ミズナラ、シイなどの樹勢の衰えた老木の下に発生する。1970年代半ば頃に子実体の人工栽培は成功し、1990年代頃から菌床栽培の成功と共に広く流通している。

舞茸は消費者の中に人気があるキノコの一つである。その美味さと栄養性(表 1-3)に加え、薬用価値があることから、舞茸の人気は高い^[36]。既往研究で、主に菌糸体と子実体の多糖類の抽出及びその生理活性の評価に関する研究が知られている、特に生理活性を有する多糖類に対する研究が数多く存在する^[37-39]。多糖類以外の化合物では、抗ウイルスタンパク質^[40]及び抗癌生理活性と水溶性を持つ高活性タンパク質分解酵素^[17]が明らかにされている(表 1-4)。舞茸のDソラクシオンは優れた抗ガン生理活性を有する同時に免疫生理活性も有する^[41]ため、抗ガン薬として販売されている。舞茸菌糸に対する研究は、菌糸を用いた有用物質の抽出以外では舞茸菌糸を用いた発酵である。舞茸菌糸を用いた発酵により菌糸体外多糖体の生産^[39]や、豆乳の栄養性と受容性の改善などの報告があった^[42]。

1.4 生体高分子の多糖類と糖タンパク質について

生体高分子とは生体内に存在する高分子の有機化合物のことである。多糖、タンパク質（酵素やペプチド）、核酸（DNA、RNA）等がある。また多糖、タンパク質、核酸などの分子はお互いに組み合わせた産物も生体高分子と呼ばれる。例えば、糖タンパク質、リポタンパク質、糖脂質などである。これらの生体高分子による生化学反応が生命現象を生み出している。多糖類と糖タンパク質はよく注目されている生体高分子である。それらの複雑な構造は、その特別な特性を決定する。例えば、多糖類と糖タンパク質の抗腫瘍メカニズムは顕著な差を有することがすでに証明された。ほとんどの場合、多糖類は、宿主免疫系の活性化を通じて抗腫瘍作用を発揮する^[43]。糖タンパク質は、細胞周期を停止および/または腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することによって腫瘍細胞を直接死滅させる^[17]。多糖類と糖タンパク質に対する研究は長年注目されている。

1.4.1 糖タンパク質について

糖タンパク質とは、タンパク質を構成するアミノ酸の一部に短い糖鎖が結合したものである。グリコシル化は最も一般的なタンパク質翻訳後修飾の一つである。自然界のタンパク質の半分以上は炭水化物によって修飾されると推定されている^[44]。多くのタンパク質は糖鎖を付加され、その特異的な性質を発揮する。糖タンパク質について次のような記述がある^[45]。「糖タンパク質は、ほとんどの生物に見られるが、わずか8つの単糖類は、糖タンパク質の構造と関連している。糖タンパク質のオリゴ糖鎖は、細胞外で作用するタンパク質にタグを付けるために使用される化学マーカーである。」オリゴ糖鎖は、N-グリコシド基(図 1-3a)またはO-グリコシド基(図 1-3a)のいずれかを介してタンパク質に結合される。レクチン、ムチン、およびいくつかのペプチドホルモン

は全部糖タンパク質である。膜結合型の糖脂質および糖タンパク質の炭水化物残基は、細胞の外部表面上に配置されている（図 1-3b）。糖タンパク質の糖成分は、タンパク質選別、免疫・受容体認識、炎症、病原性、ガン転移などの細胞内プロセスにおいて極めて重要な生物学的な機能を果たしている^[46]。

1.4.2 多糖類について

多糖はグリコシド結合によって単糖分子が多数重合した糖鎖の総称である。糖鎖の主鎖中の繰り返し単位は、多くの場合、六個の単糖類である。一般式は $(C_6H_{10}O_5)_n$ で表示されている ($40 \leq n \leq 3000$)。デンプン、セルロースおよびグリコーゲンのように同じ単糖で構成された多糖は、ホモ多糖またはホモグリカンと呼ばれる。アラビノース、ペントース、ガラクトースのように異なるタイプの単糖から構成された多糖は、ヘテロまたはヘテログリカンと呼ばれている。多糖の構造単位は単糖であり、相対的な分子量は数千万～数十万のものである。構造単位は、グルコシド結合によって接続され、結合のタイプは、 α -1,4、 β -1,4 および α -1,6 グルコシドキーである。構造単位は、直鎖と分岐鎖を構成することができる。直鎖は通常 α -1,4 グルコシドにて接続され、分岐鎖は、多くの場合、 α -1,6 グルコシドキーから構成されている。例えば澱粉、グリコーゲン等である(表 1-5)。 β -1,4 結合の構造はセルロースやキチンなどである（表 1-5）。

最近、植物や菌類から抽出された多糖類は、その低い毒性および顕著な抗腫瘍活性^[47]により、研究者や消費者のより多くの注目を集めている。

1.5 乾燥方法について

食品乾燥は世界の約 20% の生鮮農作物を処理しており、植物性食品の加工技術の一つであることが言える^[48]。食品の乾燥方法は

主に 8 種類がある。それぞれは自然乾燥、熱風乾燥、流動層乾燥、噴霧乾燥、ドラム乾燥、低温乾燥、凍結乾燥、減圧乾燥である。異なる乾燥方法は異なる優劣特性を持っているので、乾燥方法を選定する条件としては、乾燥製品の形状と乾燥コストが大きく関係する^[49,50]。栄養成分や色、香りの変化が少なく、食品の復元性を求める場合、低温乾燥、凍結乾燥、減圧乾燥などが利用されるが、乾燥コストは高い。原料の原形を保った乾燥食品を製造する場合は、自然乾燥、熱風乾燥、凍結乾燥などが利用され、野菜エキスのような粉末製品を作る場合は噴霧乾燥が適している。既往研究で、乾燥方法はキノコの構造や風味物質に対する影響に関する研究があった^[50,51]。しかしながら、発酵物に対する異なる乾燥方法は、抽出物の生理活性に対する影響があるかどうかの研究がまだ報告されていない。

1.6 研究目的及び論文の構成

本研究はバイオマスの利・活用や生物資源リサイクルシステム構築の観点から、産業廃棄物のオカラの低コストリサイクル方法の開発及び新規な機能性糖タンパク質及び多糖類の発見や新規な機能性素材の開発を本研究の目的とした。

本論文は六つの章により構成されている。各章の内容は以下の通りである。

第 1 章では、研究背景、研究目的及び論文の構成を記した。

第 2 章では、産業廃棄物のオカラの低コストリサイクル方法の開発を目指して、舞茸菌株を用いたオカラの発酵条件の検討を行った。オカラ発酵前後の形態、栄養性、活性物質の変化を検討するため、発酵前後の各要素の比較を行った。

第 3 章では、発酵オカラから機能性物質の発見・評価するため、水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の抽出及びその生理活性評価を行った。

第4章では、発酵物に対する乾燥処理は有用物質の抽出に対する影響を検討するため、舞茸発酵オカラに対して、3種類の乾燥処理を行い、それぞれは熱風乾燥（HA）、凍結乾燥（FE）、無乾燥（DN）であった。乾燥処理した後、それぞれ水溶性物質（AE-HA、AE-FE、AE-DN）、多糖類（PS-HA、PS-FE、PS-DN）、糖タンパク質（Gp-HA、Gp-FE、Gp-DN）の抽出及び生理活性の比較を行った。

第5章では、第2、3、4章の研究結果をもとに、総合考察を行った。また、残った課題及び今後の展望について述べた。

表 1-1 豆腐、オカラの製造に使われた三種類の大豆の食品化学分析^[6]

大豆品 種	サンプ ル分析	多量 ^c (g/100g)								微量 ^c (mg/100g)											
		タン パク 質 ^a	オイ ル	炭水 化 物 ^b	フィ チン 酸	不溶 性繊 維	水溶 性繊 維	総繊 維	灰分	Ca	Mg	Fe	Na	k	Cu	Zn	Mn	P	ビタミ ン B1	ビタ ミン B2	ニコ チン 酸
Edgar	全体																				
	大豆	40	18.2	19	1.2	18.4	4.8	23.2	4.7	155	262	9.3	11.7	1609	1.7	5.5	3.2	715	0.44	0.06	2.71
	豆腐	53.9	30.2	3.4	1.5	4.7	0.7	5.4	7.2	1849	188	11.1	7.7	206	1.4	6	4.4	926	0.19	0.05	0.76
	オカラ	28.4	9.6	5.3	0.5	42	14.6	56.6	3.2	260	163	6.2	16.2	1046	1.1	3.8	2.5	396	0.59	0.04	1.01
Hutton	全体																				
	大豆	40.1	21	15.2	1.6	16.4	5.3	21.7	5.3	275	282	11.7	9.3	1739	1.7	4.6	4.1	635	0.54	0.06	2.65
	豆腐	53	35	2.5	1.9	5.4	2.3	7.7	6.3	2092	179	9.4	4.9	171	1.5	5.5	5.9	971	0.13	0.04	0.54
	オカラ	25.4	10.9	3.8	1.2	43.6	14.5	58.1	3.7	428	158	7.2	19.1	1094	1.1	3.5	3.1	444	0.49	0.03	0.82
Prima	全体																				
	大豆	39.5	20.4	17.7	1.7	15.5	5.6	21.1	5.4	187	247	11.6	3.5	1693	1.8	6	2.8	830	0.45	0.06	2.9
	豆腐	52.4	32.4	3.7	2.5	4.8	2.8	7.6	6.8	1939	207	9.5	6.1	256	1.4	6.9	3.8	1014	0.23	0.05	0.86
	オカラ	26.2	9.3	4.6	0.9	40.2	12.6	52.8	3	286	165	8.2	18.4	1233	1.2	6.4	2.3	407	0.48	0.03	1.04

注: a. ケルダール法×5.71;

b. 総澱粉、単糖及びオリゴ糖は表 1-2 を参照;

c. すべての値が水分を含まない、全脂肪ベースの状態での測定された。

表 1-2 三種類の大豆に作制られた豆腐やオカラの炭水化物の含有 (g/100g) ^[6]

大豆品種	サンプル分 析	単糖類 (未指定)	オリゴ糖			澱粉
			スタキオース	ラフィノース	スクロース	
Edgar	大豆	2.5	6.3	1.2	8.0	0.95
	豆腐	0.4	0.9	0.2	1.5	0.44
	オカラ	0.7	1.4	0.3	2.3	0.59
Hutton	大豆	2.3	4.9	1.7	5.6	0.74
	豆腐	0.4	0.5	0.2	0.8	0.58
	オカラ	0.6	0.9	0.3	1.3	0.68
Prima	大豆	3.0	5.1	1.6	7.2	0.78
	豆腐	0.2	1.0	0.3	1.6	0.55
	オカラ	0.7	0.9	0.4	1.8	0.79

注: すべての値が水分を含まない、全脂肪ベースの状態での測定された。

表 1-3 アミガサタケと舞茸の菌糸体の一般組成^[52]

組分	含量 (mg/g)	
	舞茸	アミガサタケ
水分	33.0 ±4.5 B	73.0±5.5 A
乾物量	967.0±4.5 A	927.0±5.5 B
炭水化物	333.0±5.7 B	349.3±4.3 B
還元糖	101.9±4.4 B	122.1±2.5 A
粗灰分	39.5±2.6 C	50.3±0.2 B
粗脂肪	246.5±4.7 A	120.3±13.9 C
粗繊維	117.0±15.5 A	63.0±9.8 B
粗蛋白	264.0±4.0 B	417.1±8.5 A

注：

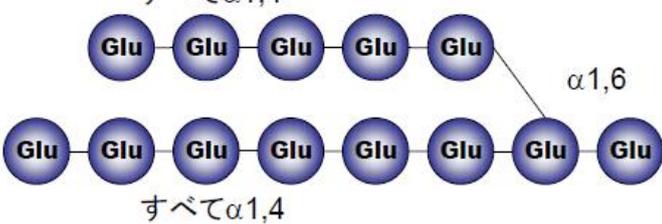
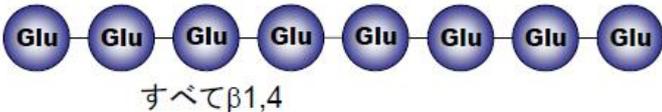
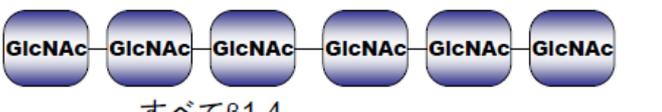
水分と乾物は空気乾燥させた重量に基づいて発表された。他のものは乾燥重量に基づいて発表された。

各値は平均値±SD (n=3) の形で示した；列内の異なるアルファベットは統計的に有意差があることを示している (P<0.05)。

表 1-4 舞茸の薬用価値

	活性成分	生理活性	参考文献
糖タンパク質	多糖類	免疫調節	[53]
	ペプチドグリカン	抗糖尿病	[54]
	MD 組分の β -1,6-グルカナーゼで加水分解産物	抗ガン生理活性	[17,55, 56]
	多糖類	抗酸化	[57]
	MD 組分 β グルカン	抗ウイルス造血幹細胞	[58, 59]
	舞茸粉末(混合物)	血圧上昇を防止	[60]

表 1-5 多糖類の構造

多糖	主な構造
アミロースグリコーゲン	<p>すべてα1,4</p>  <p>すべてα1,4</p>
セルロース	 <p>すべてβ1,4</p>
キチン	 <p>すべてβ1,4</p>

注:

弘前大学 医学部泌尿器科 嶋山真吾 「糖鎖の基礎知識」

http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~uro/html/Research-Publications/Glyco_info_Hatakeyama.pdf#search

= '糖鎖の基礎知識' より転載

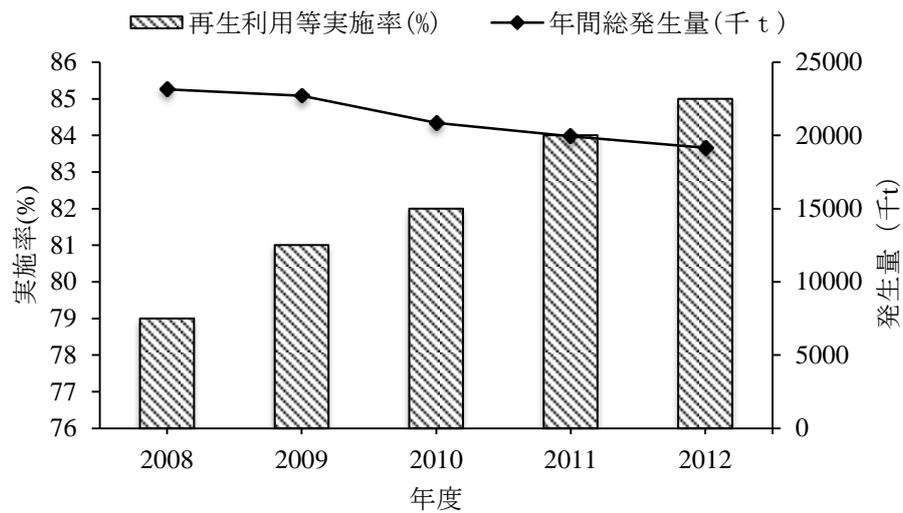


図 1-1 食品廃棄物等の年間総発生量及び再生利用等の実施率

農林水産省の調査データ

<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?bid=000001050974&cycode=0> より作成

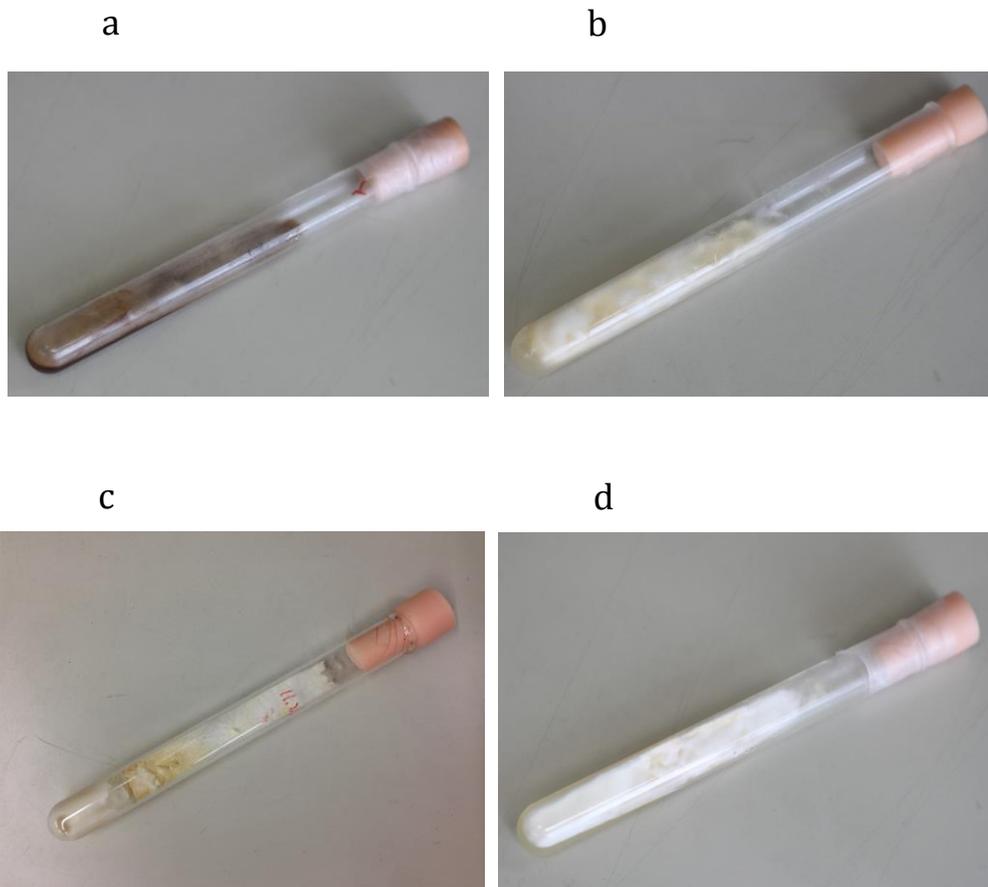


図 1-2 本研究室に保管されているアミガサタケ、冬虫夏草、霊芝、舞茸の菌糸体

a. アミガサタケ; b. 冬虫夏草; c. 霊芝; d. 舞茸

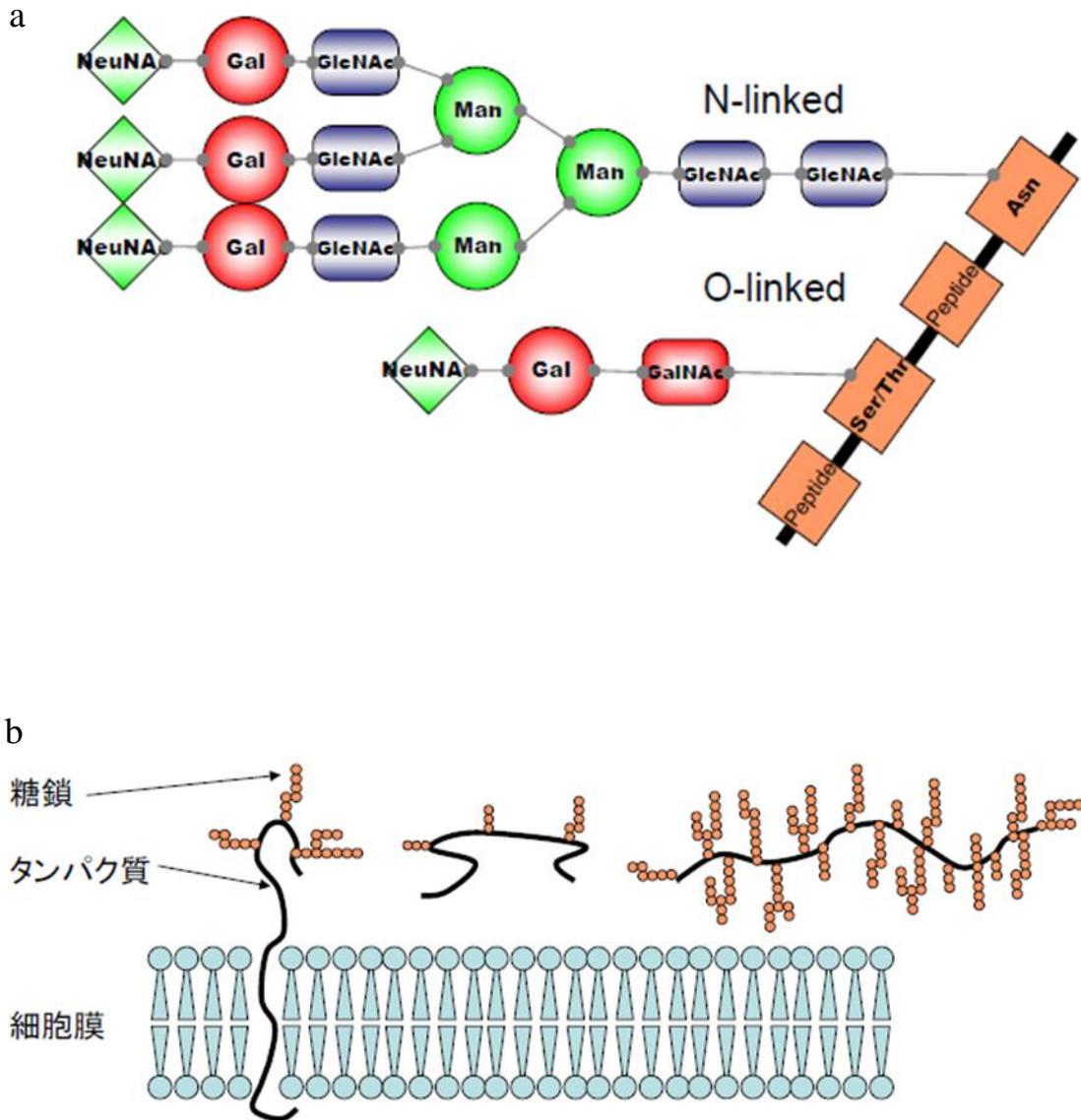


図 1-3 N-グリコシド結合、O-グリコシド結合、膜糖タンパク質概略図

a. N-グリコシド結合と O-グリコシド結合

b. 膜糖タンパク質

(弘前大学 医学部泌尿器科 畠山真吾「糖鎖の基礎知識」

http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~uro/html/Research-Publications/Glyco_info_Hatakeyama.pdf#search='糖鎖の基礎知識'より転載)

第2章 舞茸菌株を用いたオカラの発酵条件の検討及び発酵前後各要素の比較

2.1 はじめに

産業廃棄物であるオカラは食品としての需要が少なく、また品質の劣化が早く日持ちがしないため、肥料や飼料として一部を活用したり、脱水して保存性を高めて供給されるほかは、ほとんどが廃棄されている。近年、産業廃棄物の有効利用は、生産コストならびに環境負荷低減の有効な手法として注目されている。オカラは栄養豊富で、タンパク質、脂肪、澱粉、糖類に富み^[6]、土壌用のボカシ肥や家畜の飼料として利用されてきた、高品質の微生物発酵基質としての利用も可能である^[2]。そして、多種類の食用キノコ類菌は、中国の伝統的な漢方薬として昔から病気の治療、寿命の延長、体力の促進及び体調の改善に利用されて来た。例えば、冬虫夏草、アミガサタケ、舞茸などである。近年になって、冬虫夏草、アミガサタケ、舞茸は抗ガン作用、抗酸化作用など、さまざまな機能が新たに発見されている。

今まで、食用キノコ類菌を用いたオカラ発酵に関する研究は、本研究室以外はまだ報告されていない。すでに本研究室に報告されたの発酵は、すべて多糖類の生産のために、霊芝、アミガサタケ、エノキタケを用いたオカラ発酵条件の最適化及び抽出された多糖類の純化と生理活性評価であった^[13,26,61,62]。舞茸を用いたオカラ発酵と低コストのオカラ発酵に関する研究はまだ報告されていない。本研究はバイオマスの利・活用や生物資源リサイクルシステム構築の観点からオカラの栄養性を改善し、利用価を向上するため、舞茸を用いたオカラの発酵を行った。

2.2 材料及び方法

2.2.1 試薬

エタノール、グルコース、ジャガイモ抽出物、寒天、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6\text{S} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、塩酸、KBr は和光純薬（大阪）から購入した。DMEM 培地、ウシ胎児血清（FBS）、ペニシリン - ストレプトマイシン溶液、DMSO、MTT はシグマアルドリッチ社（セントルイス、MO、USA）から購入した。全ての化学試薬は特級であった。

2.2.2 オカラ及び菌種

新鮮オカラ（75%含水率）が日本の茨城県つくば市の稲本株式会社から購入した。

本研究における発酵菌として、舞茸 ACCC51616(中国北京の中国農業菌種保存庫)を使用した。保存培養は、斜面ポテトデキストロース寒天（PDA）培地を用い、培養条件を 25℃、10 日間とした。培養後、4℃で保存し、そして 3 ヶ月ごとに継代培養を行った。PDA 培地の調製：1000 mL 蒸留水にそれぞれ、20.0g グルコース、4.0g ジャガイモ、20.0 g 寒天、3.0 g KH_2PO_4 および 1.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を加えた。

2.2.3 発酵

(1) 接種液の調製

接種液を調製するために、目標菌糸体を滅菌した 20 mL の PDA 平板培地（直径 100 mm）に斜面培地から移植し、菌糸が 8~9 割覆うまで 25℃で培養した。300 mL のフラスコ内に回転子と 100 mL の液体 PDA 培地を注入し、滅菌した。研究室に特有な接種用カッターを用いて得られた菌糸の 5 mm×5 mm ディスクを液体培地に 10 個を入れて、120 rpm で 7 日間、25℃で培養し、固体発酵

の菌種として使用した。接種操作はすべて無菌操作であった。

(2) 接種

オカラに、確認された比率の米糠を加え、攪拌した後含水量を測定し、30 g/瓶に分けて、15 分間 121℃で滅菌し、常温まで冷却し、接種する。接種操作はすべて無菌操作であった。固体培養実験は、200 mL のガラス瓶の中で行った。

2.2.4 発酵条件の検討

真菌の固体発酵はかなり複雑な過程で、接種量、培地組成、発酵温度、発酵時間等の条件が代謝産物の生成に対して影響があるため^[63]、本研究において、発酵温度を当日の室温(23±2℃)にして、菌糸は培地の全体に生育できるまでの時間を発酵時間とし、培地の組成と接種量を検討した。

(1) 培地の組成

本研究において新鮮なオカラを最大限度活用するために、本研究室の既往研究に基づいて、完全なオカラ培地の上で異なる比率の米糠（日本茨城県つくば市山新グランステージつくば）を添加し、菌糸は培地の全体に生育できるまで、米糠でオカラ培地の C/N 比を調整した。検討された米糠の添加量はそれぞれ 0%、10%、20%、30%、40%であった。本研究で使用されたオカラと米糠の C/N 比はそれぞれ 11.03 と 19.57 であるため、検討された各グループ培地の C/N 比はそれぞれ 11.03:1、11.88:1、12.74:1、13.59:1、14.45:01 であった(表 2-1)。C、N 含有量の測定は筑波大学研究基盤総合センター分析部門の有機元素分析装置(Perkin-Elmer 2400 chn Elemental Analyzer)を利用した。培地の組成を検討する時使用された接種量及び発酵温度はそれぞれ 10%(v/g)、室温(23±2℃)であった。

(2) 接種量

接種量は発酵過程で代謝産物の生成に影響を与える要因の一

つである。従って本研究で、発酵過程で代謝産物の一つの水溶性タンパク質を測定目標とし、舞茸発酵の接種量を検討した。既往研究により、6%、8%、10%、12%、14% 5つのレベルを検討した^[26] (表 2-2)。培地の量は 20 g とした。異なる接種量の発酵オカラを 0.2 g 測定し、磨り潰した後、1.5 mL の超純水を加えホモジネートした後、静止して上澄を回収した。5000 rpm でさらに遠心し、上澄を回収した後、水溶性タンパク質の含有量を測定した (Protein Quantification Kit-Rapid を使用した)。

(3) 発酵温度

舞茸菌糸の成長温度は 20°C~30°C で、既往研究で、舞茸菌糸の発酵温度は 25°C^[64] に設定する機会が多いため、生産コストを低減するために全て当時の室温 23±2°C に設定した。

(4) 発酵時間

菌糸体は培地の全体に生育できるまで使用した時間を発酵時間とした。発酵後のオカラは -20°C で保存した。

2.2.5 発酵前後の比較

(1) 発酵前後のオカラ形態の比較

本研究において、走査型電子顕微鏡 (SEM; JSM6330F、JEOL、Japan) を用いて、発酵前後のオカラの表面形態を比較した。測定条件は加速電圧 : 5 kV、測定倍率 : ×3000 に設定した。

(2) 発酵前後重量の比較

培地に舞茸菌を接種した後、培養する前、6 瓶を取ってそれぞれの重量を測定し表記した。発酵完成した後、表記された 6 瓶の重量を再度測定し、発酵過程での重量変化を検討した。

(3) 発酵前後遊離アミノ酸の量及び種類の変化

62.8 mg のオカラを測定し、磨り潰した後 20 mL の 0.01 N 塩酸を添加し、30 分間抽出した。抽出液を濾過し、上澄みを 2 mL を測定し、8% の $C_7H_6O_6S \cdot 2H_2O$ を 2mL 添加し、混合した後 15 分間

静止した。その後 3000 rpm、20 分間遠心した。上澄みを 0.45 μm のフィルターで濾過した後自動アミノ酸分析装置（JLC-500/V2、JEOL 社、東京、日本）で測定した。

(4) 発酵前後のフーリエ変換赤外線分光分析

FT-IR 分光分析は、JASCO 社製 FT/IR -300 を用いて行った。乾燥された発酵前と発酵後のオカラに臭化カリウム (KBr) 粉末を加入し、粉碎した後錠剤を作成した。錠剤の 4000~400 cm^{-1} の周波数範囲における赤外線吸収スペクトルを測定した。

(5) 発酵前後オカラの水溶性物質は HeLa 細胞に対する増殖抑制作用の比較

4°C で解凍された発酵オカラ(含水率 $66.8 \pm 0.22\%$)を取って、すりつぶした後、乾燥重量 1 に対して蒸留水 30 の比率でホモジネートした。次に、4 °C で 2 時間抽出した後、10000 rpm で、10 分間遠心分離した。上澄を回収し、ガラス繊維ろ紙 GF/B を用い、吸引ろかした。ろか液は凍結し、凍結乾燥した。最終的に抽出された水溶性物質を AE-DN とした。未発酵のオカラに対して、同じな抽出方法を使用した。最終的に抽出された水溶性物質を UN-DN とした。

ヒト子宮頸癌細胞株 (HeLa)、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター (つくば、日本) から購入した。全部の細胞培養は、10% ウシ胎児血清 (FBS) および 1% Penicillin / streptomycin を含む DMEM 培地中で増殖させた。培養物を、37°C で、CO₂ 5% のインキュベーター (ASTECH APC-30D CO₂ インキュベーター福岡、日本) で培養した。細胞は対数増殖期に到達するために 2~3 日間培養し、実験に使用した。

5×10^4 個細胞/mL の密度の HeLa 細胞を 80 μL 96 ウェルプレートに注入し、37°C で、CO₂ 5% のインキュベーターで 24 時間培養した。その後細胞ウェルに、異なる濃度のサンプルを 10 μL 添加し(最終濃度 50、100、150、200、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ にする)、24/48 時間 37°C でインキュベートした後 MTT(0.5 mg/mL)を 10 μL 添加し。さらに 4 時

間 37°C でインキュベートした。次に、MTT を含有する培地を除去して、DMSO を 100 μ L 添加し、よく混合し、10 分間置いた後、マイクロプレートリーダー (BIO-RAD モデル 550) を用いて波長 490nm で吸光度 (OD) を測定した。細胞抑制率は以下の算式によって算出した。

$$\text{抑制率 (\%)} = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank1}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank2}})] \times 100 \cdots \cdots (1)$$

A_{sample} : 細胞と試験サンプルの吸光度;

A_{blank1} : 培地と試験サンプルの吸光度;

A_{control} : 細胞とコントロールの吸光度;

A_{blank2} : コントロールと培地対照の吸光度。

2.3 統計分析

すべての実験は 3 回実施した。統計分析は IBM の統計分析ソフトウェア SPSS Statistics 19.0 を使った。P 値が 0.05 より小さかった場合のみ、統計学的に有意とみなした。

2.4 結果及び考察

2.4.1 発酵条件

本研究室の既往研究に基づいて、低コストな発酵条件が確立された。

まず、C/N 比の調整により培地の組成を確認した。表 2-1 の通り五つの C/N 比を検討した結果、完全なオカラ培地の上でそれぞれ 10%、20%、30%、40% の米糠を添加した後、60 日間の発酵では、30% と 40% の米糠を添加する場合のみ、白い菌糸がうまく増殖でき、培地に蔓延したに対し(図 2-1a)、10% の場合は菌糸の増殖が観察できず、20% の場合は菌糸の増殖が見られたが、培地の全体に蔓延できなかつた(図 2-1b)。オカラの利用率を高めるため、最後米糠の添加率は 30% にした。つまりオカラ : 米糠 = 7:3 (乾燥重量の比率) であり、C/N 比は 13.59:1 であった。培地の含水率は赤

外線水分計(Kett FD610、東京、日本)により測定し、 $66.43 \pm 0.25\%$ であった。

接種量の検討結果により、6%の場合、一番高い水溶性タンパク質の含有量が測定された(図 2-2)。また舞茸の接種量、発酵温度、発酵時間それぞれは6%、 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、60日間であった、発酵物は発酵オカラと称した(図 2-3)。

培地の栄養源は通常、炭素源、窒素源、ミネラルの3種類に大別されるが、これらの培地組成は培養対象とする生物種やその培養目的によって調整される。本研究では、オカラの利用コストを低減するために培養培地組成および発酵条件の確立を初めて検討した。発酵の培地には産業廃棄物のオカラと少量の米糠しかないので、最大限の低コストのオカラリサイクル方法の開発に有用情報を提供できたと考える。また得られた結果により、キノコの接種によるオカラの新しい利用方法提案できると考える。さらに発酵オカラの利用率と付加価値を高めるために、生理活性のある生体高分子の多糖類や糖タンパク質の抽出、精製およびその抽出物の機能性評価を検討する必要がある。

2.4.2 発酵前後の比較

(1) 形態的特性

本研究において、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて、発酵前後のオカラ形態を比較した。SEM は、光学顕微鏡の倍率をナノスケールまで拡大し、材料のトポグラフィー検査に使用されている。図 2-4a は走査型電子顕微鏡を用いて、未発酵のオカラの表面を観察した SEM 写真である。また、図 2-4b は走査型電子顕微鏡を用いて、舞茸菌種で発酵させたオカラの表面を観察した発酵オカラの SEM 写真である。なお、顕微鏡写真は、倍率 3000 倍で撮影を行った。図 2-4a に示したように、未発酵のオカラは表面が滑らかで、不均一的なポアがあることが観察された。縦断面から観

察すると突起と不均一的なポアがあった。これはオカラの固有の構造であった。これに対して、図 2-4b に示すように、発酵させたオカラの表面では、ポアと鱗状突起構造が多数観察され、全体的に発酵する前より、緩い構造になった。多孔質材料は、絶縁体、吸着剤などによく使われているので、発酵後のオカラは生物吸着剤としての利用の可能性があると考えられる。またオカラの表面において多数のポアと鱗状突起構造が形成されることによって、外界に接する表面積が、顕著に広がったため、多糖類および糖タンパク質などの生理活性物質の抽出率を高めることができるようになった。

発酵前後オカラの構造が顕著な変化が生じた原因を考えると、主にオカラの可溶性栄養素が舞茸菌糸に利用され、組織タンパク質が舞茸菌糸にあるタンパク質分解酵素により分解され、可溶性食物繊維画分が舞茸菌糸に分泌された分解酵素により分解されたため、不溶性食物繊維がむきだしの状態になるものと考えられる。

(2) 発酵前後重量の変化

本研究において、発酵前後のオカラの重量について比較した。オカラに舞茸菌種を接種した後 6 本の発酵瓶に番号を付けて、重量を量った。発酵終わった後、標記された 6 本の発酵瓶の重量を再度量った。その結果により発酵後のオカラは 30g ごとに 7.21g の重量が減少した(表 2-3)。従って、発酵過程で有機物の利用と共に、CO₂ 気体の発生、排出や水分の蒸発などの反応が発生したことが考えられる。

(3) 発酵前後遊離アミノ酸の濃度及び種類の変化

アミノ酸は一般的に栄養補助食品として、使用されている。従来の研究で遊離アミノ酸は醤油等の発酵食品の栄養指数とした^[65]。発酵過程でアミノ酸の種類及び各種類の濃度の変化を調べるために、発酵前後のオカラにある遊離アミノ酸及び総アミノ酸の

濃度を検出した。

発酵前後の総アミノ酸の濃度及び種類は表 2-4 に示された通りであった。発酵前後の遊離アミノ酸の濃度及び種類は表 2-5 に示す。結果により、遊離アミノ酸の含有量は、発酵する前の 20.09 ± 0.52 nmol/mg から発酵後の 433.13 ± 4.33 nmol/mg まで 20 倍以上増加した。遊離アミノ酸の種類も発酵前の 14 種類から発酵後の 25 種類まで増加した。発酵過程でタンパク質の加水分解、アミノ酸の生成等の反応が発生したことが考える。

総アミノ酸と遊離アミノ酸含有量の増加は発酵過程でタンパク質類物質の生成及びタンパク質の加水分解等の反応があったことが確認された。遊離のグルタミン酸量は 1.92 ± 0.14 nmol/mg から 94.59 ± 6.06 nmol/mg まで増加したが、グルタミン酸の総量は 233.78 ± 2.53 nmol/mg から 182.13 ± 1.91 nmol/mg まで減少した。グルタミン酸は人体の必須アミノ酸ではないが、生体の代謝に関与する炭素および窒素栄養素として利用されることができるので、減少したグルタミン酸は発酵過程で、栄養素として利用されたことが推測できる。又、発酵後オカラにシスタチオニンが新たに発見された。シスタチオニンはアミノ酸ではないが、生体内でメチオニンからシステインに変換される際の重要な代謝中間体であるため、発酵過程でシステインの生成反応が確認された^[66]。

(4) 発酵前後のフーリエ変換赤外線分光分析

発酵前後のフーリエ変換赤外線分光分析の結果は図 2-5 に示した。官能基分析の結果により、種々の特性を有する官能基の存在が明らかになった。 $3500 \text{ cm}^{-1} \sim 3200 \text{ cm}^{-1}$ 範囲内で強力且つ広い吸収ピークは、多糖類 O-H の伸縮振動およびタンパク質 N-H の伸縮振動であった。 $3000 \text{ cm}^{-1} \sim 2800 \text{ cm}^{-1}$ 範囲内の二つのピークは C-H の伸縮振動及び曲げ振動であった。 $1600 \text{ cm}^{-1} \sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ 範囲内の吸収ピークは炭水化物 C-H の曲げ振動であった。 1658 cm^{-1} の所にアシルアミノの N-H 曲げ振動と C=O の伸縮振動であった。

1200 cm^{-1} ~800 cm^{-1} の間の波数は炭水化物の指紋領域であった^[17]。

発酵オカラの炭水化物の指紋領域にあるピークが発酵前より多くなったため、発酵過程で炭水化物の種類が増加及び小さい分子構造の変化があったことが考える。また発酵後オカラの 3500 cm^{-1} ~3200 cm^{-1} 範囲内のピークは発酵する前より低い周波数の方に 91.37 cm^{-1} を移動した。発酵後オカラの水素結合が発生し、オカラの溶解性の変化も起こったことが考える。

(5) 発酵前後オカラから抽出された水溶性物質の抗ガン生理活性の比較。

人子宮頸ガン細胞 (HeLa) に対する抗ガン生理活性について、未発酵オカラの水溶性物質の増殖抑制作用が確認できずに対し、発酵後オカラの水溶性物質の増殖抑制作用が確認できた。24 時間の暴露時間で、その半数抑制濃度は $40.81 \pm 1.19 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった(図 2-6)。発酵により、オカラの栄養組成が改善されたことが考えるため、続いて機能性物質の抽出及び抽出物の生理活性評価を行う必要がある。

2.5 まとめ

本章では、舞茸菌糸を用いたオカラの発酵条件を確立し、発酵前後のオカラの形態、アミノ酸種類及び含有量、重量、官能基の変化、水溶性物質の抗ガン生理活性についての検討を行い、以下の結果及び知見を得た。

(1) 舞茸菌糸によりオカラ発酵に適用する培地の組成が確認された。結果として、オカラ：米糠=7:3 (乾燥重量の比率)であり、含水率は $66.43 \pm 0.25\%$ であった。発酵条件も確立され、舞茸の接種量、発酵温度、発酵時間はそれぞれ 6%、 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、60 日間であった。

(2) 走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて、発酵前後のオカラ形態を比較した結果により、未発酵のオカラは表面が滑らかであり、

不均一的なポアがあることが観察された。縦断面から観察すると突起と不均一的なポアがあった。これに対して、発酵させたオカラの表面では、ポアと鱗状突起構造が多数観察され、全体的に発酵前より、緩い構造になった。発酵後オカラは外界に接する表面積が、顕著に広がったため、多糖類および糖タンパク質などの生理活性物質の抽出率を高めることができるようになった。

(3) 発酵後のオカラは 30 g ごとに 7.21 g の重量が減少した。発酵過程で有機物の利用と共に、CO₂ 気体の発生や水分の蒸発などの反応が生じたことが考えられる。

(4) 発酵後は発酵する前より総アミノ酸及び遊離アミノ酸の含有量は増加した。総アミノ酸と遊離アミノ酸含有量の増加は発酵過程でタンパク質類物質の生成及びタンパク質の加水分解等の反応によるものと確認された。

(5) 発酵前後ともオカラのタンパク質や多糖類にある特性的な官能基の存在が明らかになった。発酵過程で炭水化物の種類が増加及び小さい分子構造の変化があるため、発酵オカラの炭水化物の指紋領域にあるピークが発酵前より多くなった。特に 611.87 cm⁻¹ の所にあるピークの現れがオリゴ糖の小さい分子構造の変化があることが示している。

(6) 発酵後オカラから抽出された水溶性物質は HeLa に対して増殖抑制作用が確認された。

以上の結果により、舞茸菌糸を用いた発酵によりいろいろな有機物の利用と共にオカラの構造、栄養成分、水溶性物質の生理活性等において利点を確認された。また本研究で、高効率、低コストのオカラ利用が可能になり、オカラのリサイクルに有用な基礎情報が提供できたと考える。

以上の結果により、発酵はオカラの栄養組成及び物理化学性質を改善できる方法の一つであることを示した。

表 2-1 舞茸発酵の C/N 比率の調整

C:N	比率				
	11.03:1	11.88:1	12.74:1	13.59:1	14.45:01
オカラ : 米糠(乾燥重量)	全オカラ	9:1	8:2	7:3	6:4

表 2-2 舞茸発酵の接種量 (培地の量は 20 g)

接種量(%)	6	8	10	12	14
接種量(mL)	1.2	1.6	2.0	2.4	2.8

表 2-3 発酵前後総アミノ酸の種類及び含有量の比較

アミノ酸	発酵前(nmol/mg)	発酵後(nmol/mg)
メチオニン*	2.90±0.22	2.78±0.15
ヒスチジン*	29.37±0.4	32.45±0.39
スレオニン*	73.36±1.92	97.17±1.28
リジン*	78.94±1.12	83.53±0.78
フェニルアラニン*	61.32±1.14	57.77±0.33
バリン*	78.23±1.35	95.73±0.68
ロイシン*	116.49±1.79	112.6±11.09
イソロイシン*	60.39±1.31	65.62±0.41
グリシン	127.37±1.73	160.52±0.82
アラニン	109.23±2.04	143.05±1.29
プロリン	93.9±1.2	88.46±2.44
チロシン	20.1±0.29	32.10±0.32
アスパラギン酸	164.48±2.33	165.28±0.74
グルタミン酸	233.78±2.53	182.13±1.91
システイン	6.17±0.24	7.35±0.25
セリン	104.39±1.11	115.49±1.59
アルギニン	70.18±1.21	75.61±0.70
シトルリン	2.003±0.04	2.02±0.05
α-アミノ酪酸	3.73±0.09	57.11±0.73
γ-アミノ酪酸	3.6±0.13	1.48±0.40
オルニチン	0.9±0.05	3.95±0.08
ヒドロキシプロリン	9.05±0.31	7.49±1
1-メチルヒスチジン	11.64±0.22	11.39±0.07
3-メチルヒスチジン	0±0	3.01±0.24

注：*は必須アミノ酸を示す。

アミノ酸の含有量は「平均値±SD」により示す。

表 2-4 発酵前後遊離アミノ酸の種類及び含有量の比較

アミノ酸	発酵前(nmol/mg)	発酵後(nmol/mg)
スレオニン*	0.34±0.09	34.99±0.29
バリン*	1.5±0.04	11.73±9.73
ロイシン*	0.53±0.06	12.89±0.53
フェニルアラニン*	0.35±0.14	8.2±0.23
ヒスチジン*	0.44±0.07	17.36±0.71
リジン*	0.75±0.05	18.59±0.23
メチオニン*	0	1.35±0.77
イソロイシン*	0	10.42±0.59
ホスホセリン	0	4.11±0.21
タウリン	0	3.3±0.15
サルコシン	0	2.56±0.23
芳香族アミノ酸	0	1.92±0.06
システイン	0	6.05±9.71
β-アラニン	0	1.09±0.05
β-アミノ酪酸	0	0.76±0.25
オルニチン	0	5.5±0.23
アスパラギン	0	7.47±1.69
アスパラギン酸	1.78±0.09	43.96±1.34
セリン	0.61±0.03	38.09±1.05
グルタミン酸	1.92±0.14	94.59±6.06
グリシン	0.91±0.04	38.55±0.67
アラニン	2.02±0.14	41.46±1.93
シトルリン	0.47±0.01	1.61±0.08
チロシン	0.3±0.02	17.98±0.54
γ-アミノ酪酸	2.6±0.23	0.53±0.09
アルギニン	4.57±0.07	8.06±0.22

注：*必須アミノ酸

アミノ酸の含有量は「平均値±SD」により示す。

表 2-5 発酵オカラ発酵前後重量比較

サンプル番号	オカラ発酵前後重量 (g)		
	発酵前	発酵後	発酵後減少した重量
1	232.60	224.27	8.33
2	231.80	225.78	6.02
3	230.90	224.25	6.65
4	231.60	224.14	7.46
5	232.10	225.20	6.90
6	232.30	224.41	7.89
平均値	231.89	224.68	7.21

注: すべての測定は瓶のままの重量である;培地の量は 30g である。

a



b



図 2-1 異なる組成の培地に舞茸菌糸の成長状

a. 30%と40%の米糠を添加したオカラ培地

b. 10%の米糠を添加したオカラ培地

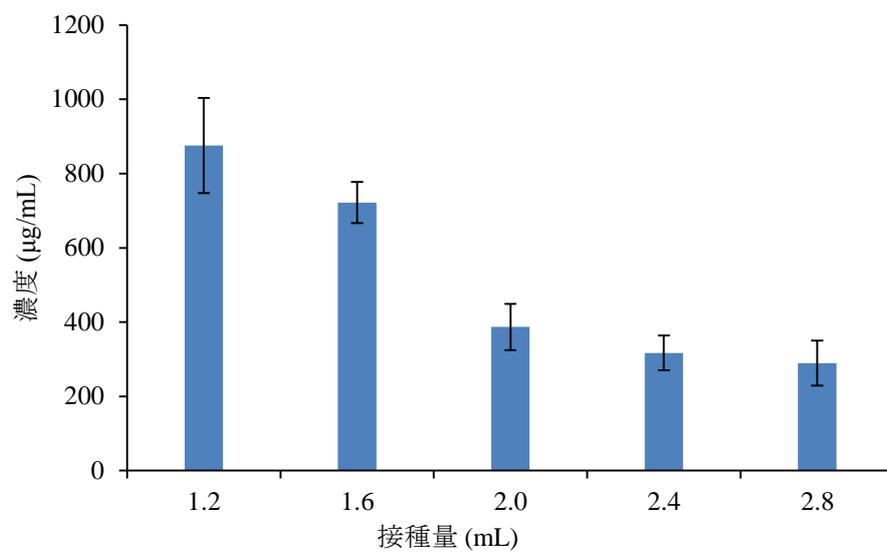


図 2-2 異なった接種量における発酵オカラの水溶性タンパク質濃度の変化

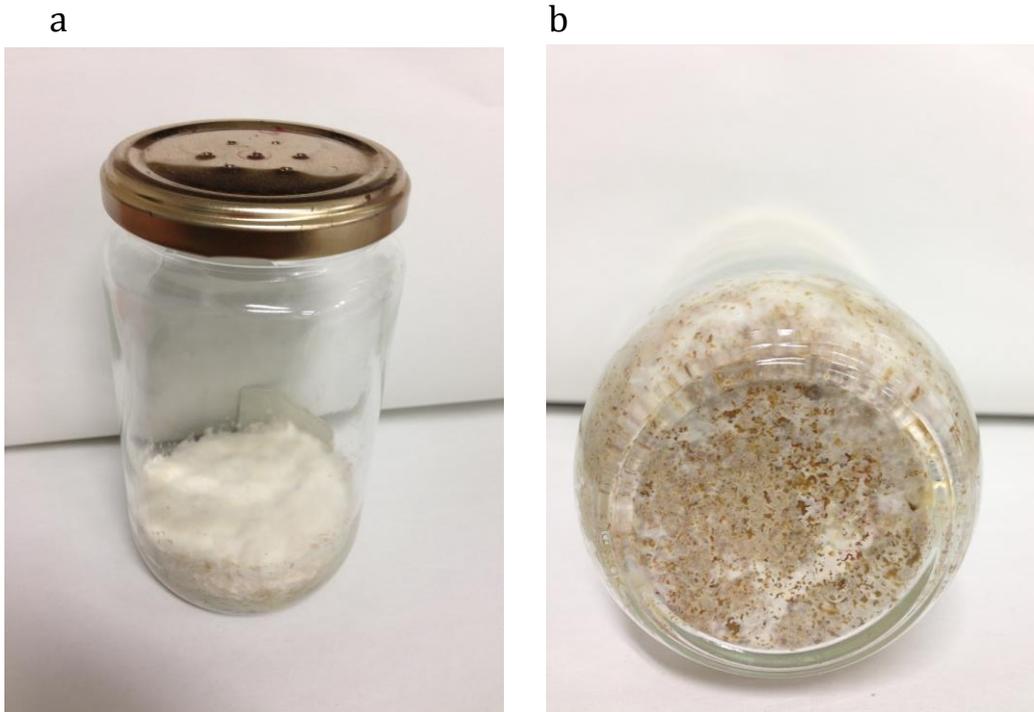


図 2-3 発酵後のオカラ

菌株: 舞茸(*Grifola frondosa*);

発酵温度: 23 ± 2 °C; 発酵時間: 60 日間;

接種量: 6%; 含水率: $66.43 \pm 0.25\%$;

a. 発酵瓶の正面

b. 発酵瓶の底面

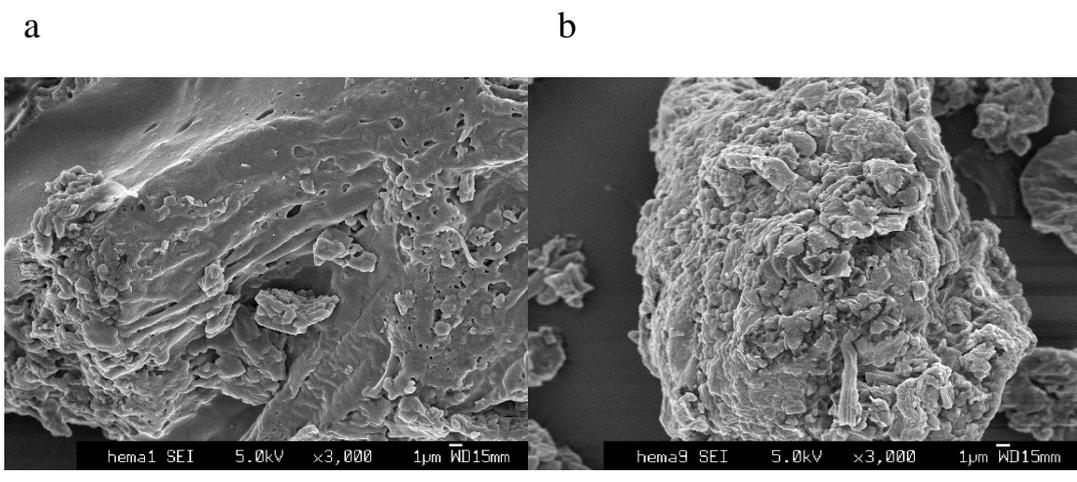


図 2-4 発酵前後オカラの走査型電子顕微鏡 (SEM) 写真

a. 発酵前オカラ

b. 発酵後オカラ

SEM 倍率×3000

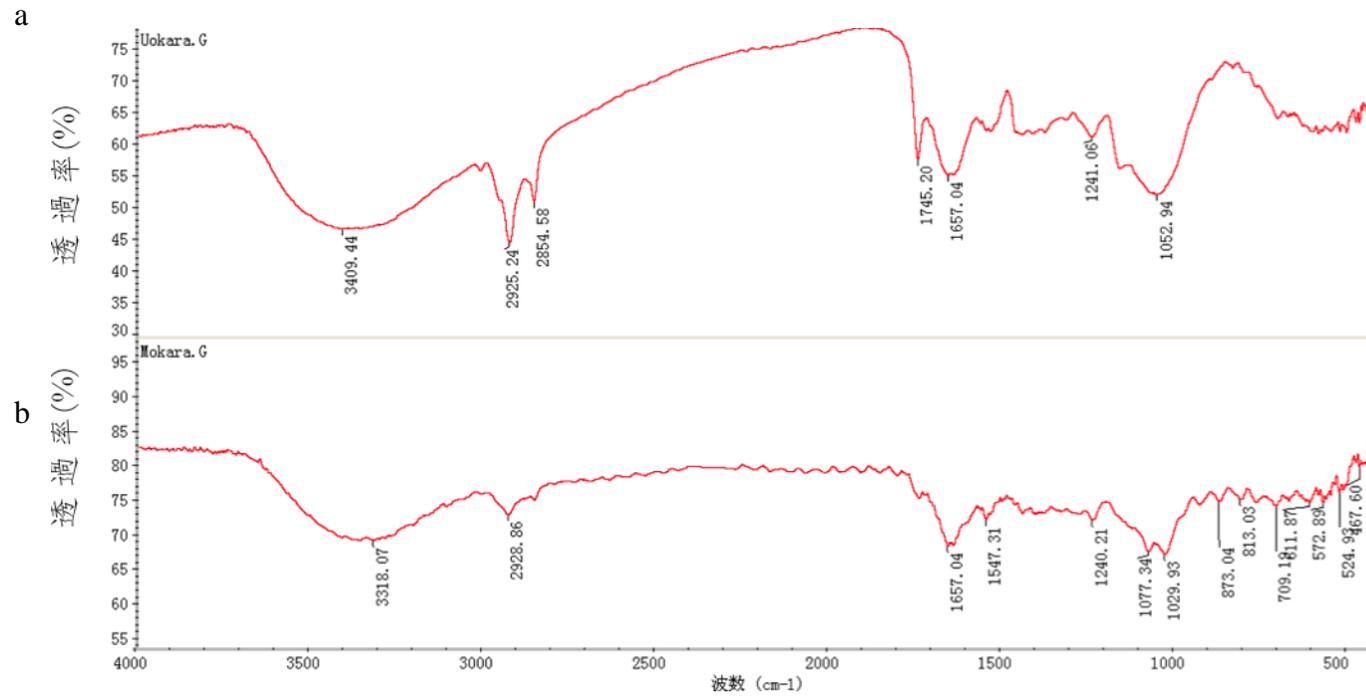


図 2-5 4000~400 cm⁻¹ 周波数範囲における発酵前後オカラのフーリエ変換赤外線吸収スペクトル

a. 発酵前オカラ

b. 発酵後オカラ

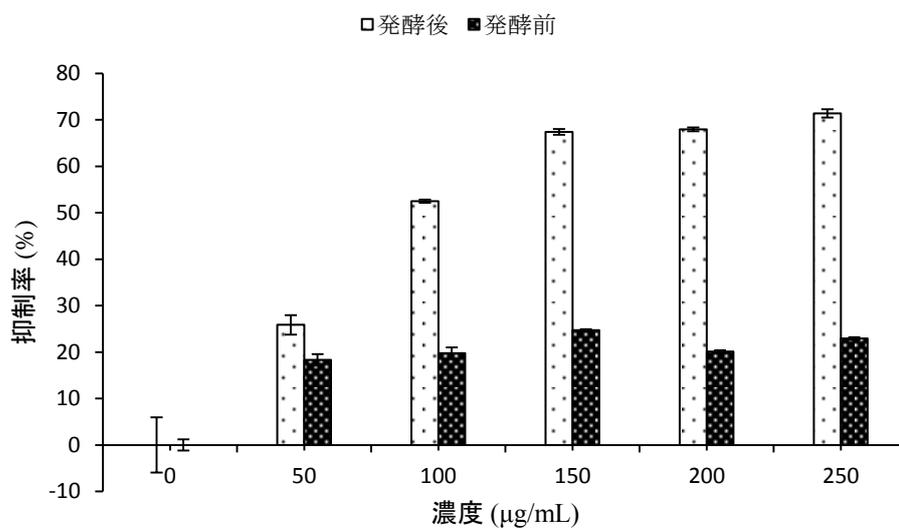


図 2-6 発酵前後オカラから抽出された水溶性物質の HeLa に対する増殖抑制作用

サンプルの最終濃度を 50、100、150、200、250 µg/mL にし、処理時間は 24 時間であった。データは平均値±SD により示す。

第3章 発酵オカラを用いた水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の抽出及びその生理活性の評価

3.1 はじめに

最近、植物や菌類から抽出された水溶性物質^[67]、多糖類、糖タンパク質は、その低い毒性および顕著な抗酸化生理活性、抗腫瘍活性により、研究者や消費者のより多くの注目を集めている。菌類由来の多糖類や糖タンパク質に対する抗酸化生理活性に対する検討も多くなった^[26,68]。

抗酸化生理活性の評価は主にいろいろなラジカルの消去能力の検討を通じて行う。ラジカルとは酸化反応を促進する因子であり、体内ではエネルギー転移の作用を起しているため、エネルギーが発生する時や、体に紫外線が照射したときなどに発生し、発生量は一定の範囲を超えた場合、周囲の物質を酸化、変性させる。生活習慣病、糖尿病、アトピー、アレルギーなどに代表される現代病の原因になると考えられている。

ガンは心血管疾患の次に最も厳しい病気の一つである。人間の健康に影響を与え、早期治療しなければ死に至る可能性がある。GLOBOCAN2008の統計レポートによって2008年、世界で癌症例は1270万及びガン死亡例760万が記録された。さらに2030年前に約2140万新しい癌症の発生及び1320万以上の死亡が発生する可能性があるということが予測された^[69]。ガン治療薬の免疫応答生理活性を改善できれば、抗ガン療法の有効性が改善できる。しかしながら、抗腫瘍薬の多くは、免疫抑制を起こし易い特性があるため、低い毒性作用を有する。従って、宿主防御機制を改善できる効果を有し、ガン細胞の増殖抑制効果を有する抗ガン剤の開発はすでに世界的なニーズになった。近年になって、予防として、天然物からの免疫調節活性を有する漢方薬に対する関心が高まってきた^[17,70]。

第2章の結果により発酵後のオカラは構造、栄養成分、水溶性物質の生理活性等は有利な変化が発生した。従って本章において、新鮮な舞茸発酵オカラを用い、多糖類、糖タンパク質及び水溶性物質の抽出を行い、また各抽出物の抗酸化生理活性と抗ガン生理活性の検討をおこなった。

3.2 材料及び方法

3.2.1 試薬及び実験材料

硫酸アンモニウム、エタノール、水酸化ナトリウム、石油エーテル、クロロホルム、N-ブタノール、硫酸、フェノール、エチルアルコール、アセトン、ジエチルエーテル、エタノール、 Na_2CO_3 、ビタミンC、ビタミンE、 H_2O_2 、 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、過硫酸カリウム、ferrozine、サリチル酸ナトリウムおよびエチレンジアミン四酢酸(EDTA)は和光純薬(日本大阪)から購入した。ドデシル硫酸ナトリウム、ABTS、DPPHは、シグマアルドリッチ社(セントルイス)から購入した。Phosphate buffered saline、DMEM培地、ウシ胎児血清(FBS)、Penicillin/streptomycin溶液、DMSO、MTTはシグマアルドリッチ社(セントルイス、MO、USA)から購入した。全ての化学試薬は特級であった。

3.2.2 水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の抽出

(1) 水溶性物質の抽出

4℃で解凍した発酵オカラ(含水率 $66.8 \pm 0.22\%$)を取って、すりつぶした後、乾燥重量1に対して蒸留水30の比率でホモジネートした。次に、4℃で2時間抽出した後、10000 rpmで、10分間遠心分離した。上澄を回収し、ガラス繊維ろ紙GF/Bを用い、吸引ろかした。ろか液は凍結し、凍結乾燥した。最終的に抽出された水溶性物質をAE-DNとした(図3-1)。

(2) 多糖類の抽出

4℃で解凍した発酵オカラ(含水率 $66.8 \pm 0.22\%$)を取って、すりつぶした後、乾燥重量 1 に対して蒸留水 30 の比率でホモジネートして、沸騰な状態で 2 時間還流した。7500 rpm で 15 分間遠心分離し、上澄を回収した。回収した上澄を減圧状態で 60℃蒸留し、最小体積まで濃縮した。濃縮液にあるタンパク質は savage 試剤(クロロホルム：ブタノール=4：1)で除去した後^[71]、抽出液を減圧状態で 60℃蒸留し、savage 試剤を除去した。多糖を得るために、抽出物を 4℃で 4 倍体積の無水エタノールを添加し、一晚沈殿させ、沈殿物を 15 分間 7500rpm で遠心分離し、上澄を捨てて、沈殿を蒸留水に溶解させ、凍結乾燥した。最終的に抽出された多糖類は PS-DN とした(図 3-2)。

(3) 糖タンパク質の抽出

4℃で解凍した発酵オカラ(含水率 $66.8 \pm 0.22\%$)を取って、磨り潰した後、乾燥重量 1 に対して蒸留水 30 の比率でホモジネートした。次に、4℃で 2 時間抽出した後、8000 rpm で、15 分間遠心分離した。上澄を回収し、ガラス繊維ろ紙 GF/B を用い、吸引ろかした。糖タンパク質を得るために、ろか液を 80%の飽和硫酸アンモニウムを加え一晚沈殿させた^[17]。10000 rpm で、20 分間遠心分離し、上澄をミニメイト TFF カプセル 1K の限外濾過膜で除塩素を行った。除塩素された抽出液を凍結乾燥し、糖タンパク質の Gp-DN を得た(図 3-3)。

3.2.3 抽出物の抗酸化生理活性の評価

(1) DPPH ラジカル消去活性

DPPH ラジカル消去活性の評価は、Brand-Williams (1995)^[72]に掲載された実験方法を一部改善し、行った。本法はメタノールで溶解したサンプル 0.1 mL に、3.9 mL、 6×10^{-5} mol/L の DPPH メタノール溶液を加え、515 nm で吸光度を測定した。本研究では異なる濃度(0.31、0.63、1.25、2.50、5.00、10.00 mg/mL)の各抽出物の

水溶液 0.1 mL に 3.9 mL、25 $\mu\text{g/mL}$ の DPPH エタノール溶液を添加し、混合した後暗所で 30 分間静置させ、517 nm で吸光度を測定した。DPPH の吸光度の減少は、DPPH ラジカル消去活性の増加を示す。ビタミン C を陽性対照として使用した。DPPH ラジカル消去活性は、以下の計算式に従って算出した：

$$\text{ラジカル消去率 (\%)} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \dots\dots(1)$$

A_0 は DPPH のみあり、サンプルの代わりに蒸留水を添加した吸光度とした；

A_1 は DPPH にサンプルを添加した吸光度とした；

A_2 はサンプルのみあり、DPPH の代わりにエタノールを添加した吸光度とした。

(2) ヒドロキシルフリーラジカル($\cdot\text{OH}$)消去活性

$\cdot\text{OH}$ 消去活性の測定は、文献^[73]に報告された方法を一部改善し、行った。本法は反応液 2.5 mL に 0.5 mL FeSO_4 (1.5 mM)、0.35 mL H_2O_2 (6 mM)、0.15 mL サリチル酸ナトリウム (20 mM) 及び 1 mL サンプルが含まれ、37°C で 1 時間反応させ、562 nm で吸光度を測定した。本研究で FeSO_4 の代わりに $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を使った。 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ と H_2O_2 反応して $\cdot\text{OH}$ が生成された。サンプルの $\cdot\text{OH}$ 消去活性は $\cdot\text{OH}$ がサリチル酸に対するヒドロキシル化する能力によって検出された。反応混合物 200 μL に 50 μL の $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.5 mM)、35 μL の H_2O_2 (6 mM)、15 μL のサリチル酸ナトリウム (20 mM)、および異なる濃度 (0.31、0.63、1.25、2.50、5.00 mg/mL) の各抽出物を 100 μL 混合した。またビタミン C を陽性対照として使用し、37°C で 1 時間インキュベートした後、ヒドロキシル化サリチル酸錯体の吸光度を 562 nm で測定した。ヒドロキシルフリーラジカル消去効果は、以下の算式に従って算出した：

$$\text{ラジカル消去率 (\%)} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \dots\dots(2)$$

A_0 は溶媒対照の吸光度とした；

A_2 は H_2O_2 が無い試薬ブランクの吸光度とした；

A_1 はサンプルまたはアスコルビン酸の吸光度とした。

(3) ABTS カチオンラジカル($ABTS^{\cdot+}$)消去活性

$ABTS^{\cdot+}$ 消去活性の測定は文献^[74]に報告された方法を参照した。 $ABTS^{\cdot+}$ は、2.45 mM の過硫酸カリウムと 7 mM の ABTS 溶液を反応させ、混合物を、使用前に室温で暗所に 12~16 時間放置することにより調製された。 $ABTS^{\cdot+}$ 溶液を、734 nm での吸光度が 0.70 ± 0.02 になるように、蒸留水で希釈した。次に、0.15 mL の異なる濃度 (0.31、0.63、1.25、2.50、5.00 mg/mL) のサンプルを 2.85 mL のカチオンラジカル溶液と混合した。最後、室温で 10 分間インキュベートした後 734 nm で吸光度を測定した。ビタミン C は陽性対照として使用した。 $ABTS^{\cdot+}$ の消去活性は、以下の算式に従って算出した：

$$\text{ラジカル消去率 (\%)} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \dots\dots(3)$$

A_1 はサンプルと ABTS の吸光度とした；

A_2 は ABTS 対照とした。 A_0 は溶媒対照の吸光度とした。

(4) 鉄イオンキレート能力

鉄イオンキレート能力の測定は文献^[75]に報告された方法を一部改善し、行った。本法は 1 mL のサンプルに 0.1 mL の $FeCl_2$ (2 mM) を添加し、30 秒を反応させ、0.2 mL の ferrozine (5 mM) を添加し、室温で 10 分間静置させ、562 nm で混合物の吸光度を測定した。本研究で 50 μ L 異なる濃度 (0.31、0.63、1.25、2.50、5.00、10.00 mg/mL) のサンプルに 180 μ L のメタノールと 50 μ L の $FeCl_3$ を添加し、混合した後 10 秒間静置した。次に、10 μ L の ferrozine (5 mM) を添加し、10 分間静置した。最後 562 nm で混合物の吸光度を測定した。陽性対照として EDTA を使用した。以下の算式に従って鉄イオンキレート能力を算出した：

$$\text{鉄イオンキレート能力 (\%)} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \dots\dots(4)$$

A₁ はサンプルの吸光度であった；

A₂ はフェロジンがないサンプルの吸光度であった；

A₀ は溶媒対照の吸光度であった。

3.2.5 各抽出物の抗ガン生理活性及び免疫生理活性についての評価

(1) 細胞の培養

ヒト肝細胞株（HepG2）、マウスマクロファージ細胞株（RAW264.7）、ヒト結腸癌細胞株（DLD-1）、ヒト子宮頸癌細胞株（HeLa）、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞株（A549）、マウス筋芽細胞株（C2C12）は、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター（つくば、日本）から購入した。全部の細胞培養は第2章の2.2 材料及び方法の2.2.5の(5)の培養方法と同様に行った。

(2) ガン細胞に対する抑制率

各抽出物は HepG2、DLD-1、HeLa、A549 四種類のガン細胞に対する抑制能力を検討した。実験方法は第2章の2.2 材料及び方法の2.2.5の(5)と同様に行った。

(3) RAW264.7の増殖に対する影響

RAW264.7 に対する増殖効果の検討は MTT 方法により測定した。5×10⁴ 個細胞/mL の密度の RAW264.7 細胞を 80 μL 96 ウェルプレートに注入し、37℃で、CO₂ 5% のインキュベーターで 24 時間培養した。その後細胞ウェルに、異なる濃度のサンプルを 10 μL 添加し（最終濃度 20、40、60、80、100 μg/mL にする）、24/48 時間 37℃でインキュベートした後 MTT(0.5 mg/mL)を 10 μL 添加し、4 時間 37℃でインキュベートした。次に、MTT を含有する培地を除去して、100 μL DMSO を添加し、よく混合し、10 分間静置した後、マイクロプレートリーダー（BIO-RAD モデル 550）を用いて波長 490 nm で吸光度（OD）を測定した。細胞生存率は以下の算式によって算出した。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank1}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank2}}) \times 100 \dots \dots (5)$$

A_{sample} は細胞と試験サンプルの吸光度とした；

A_{blank1} は培地と試験サンプルの吸光度とした；

A_{control} は細胞とコントロールの吸光度とした；

A_{blank2} は培地対照の吸光度とした。

(4) 正常細胞の C2C12 に対する毒性

実験方法は 3.2.5 の(2)と同じであった。

3.2.6 統計分析

データは、3 回の測定の平均値±標準偏差 (SD) とした。統計分析は、スチューデントの t 検定および分散の一方方向分析を用いて行った。手段の多重比較は、最小有意差検定により行った。すべての計算は、統計ソフトウェア (SPSS、バージョン 19.0) を用いて行った。0.05 以下の P 値は、統計学的に有意とみなした。

3.3 結果及び考察

3.3.1 AE-DN、PS-DN、GP-DN の抽出率及び抗酸化生理活性

AE-DN の抽出率は 37.0% であり、PS-DN の抽出率は 11.9% であり、GP-DN の抽出率は 5.7% であった。

抗酸化生理活性を有する物質は、抗炎症、損傷細胞のラジカルを中和することができるため、生体の健康に重要な役割を果たしている^[76]。各抽出物の抗酸化生理活性を比較するために、生体内での抗酸化生理活性の主な指標として、いくつかの方法が使用されている。本研究においては DPPH ラジカル消去活性、ヒドロキシルフリーラジカル消去活性、ABTS カチオンラジカル消去活性、鉄イオンキレート能力、還元力などの 5 種類の抗酸化生理活性の測定を行った。

(1) DPPH ラジカル消去活性

DPPH フリーラジカルは、安定なフリーラジカルであり、電子または水素ラジカルを受け入れ、安定な反磁性分子になれるフリ

ラジカルである^[77,78]。AE-DN、PS-DN、GP-DNのDPPHフリーラジカル消去活性の結果を図3-4に示した。PS-DN及びGP-DNはDPPHフリーラジカルに対する消去活性がないことが分かった。AE-DNはDPPHフリーラジカル消去活性を有することが確認された。AE-DNの濃度は0.31 mg/mLから10.00 mg/mLまでの増加と共にDPPHフリーラジカル消去活性は5.11%から54.02%まで増加した。IC₅₀は9.79 mg/mLであった。

(2) •OH 消去活性

•OHの除去は生命体を保護するために重要なことである。•OHは、容易に細胞膜を通過することができ、生体内の炭水化物、核酸、脂質等の高分子と反応することで、細胞の死亡及び組織の損傷を生じさせるラジカルである^[79,80]。図3-5に、各抽出物の•OH消去活性を示す。全ての抽出物は•OHに対する消去活性が確認された。Gp-DNとPS-DNよりAE-DNは最も高い•OH消去活性が観察された。IC₅₀は0.85±0.22 mg/mLであった。

(3) ABTS^{•+}消去活性

ABTS^{•+}消去実験は、植物の単一の化合物および各種複雑な混合物の総抗酸化能力の評価によく使用されている^[81]。図3-6に各抽出物のABTS^{•+}消去活性を示す。全ての抽出物においてABTS^{•+}消去活性を有することが確認された。AE-DNが最も高いABTS^{•+}消去活性を有することが確認された。AE-DNのIC₅₀は2.48±0.02 mg/mLであった。次に高い活性を示したものはPS-DNであった。IC₅₀は3.4 mg/mLであった。最も低い活性を示したものはGp-DNであった。

(4) 鉄イオンキレート能力

全ての抽出物において鉄イオンキレート能力は確認できなかった。

3.3.2 ガン細胞に対する増殖抑制作用

(1) HepG2 に対する増殖抑制作用

肝ガンは、よく見られるガンの一つであり、世界中のガン死因の第3位である。HepG2は正常なヒト肝細胞の特徴を多く保持しているため、体外源性代謝及び肝臓毒性によく使われている^[82]。本研究において、各抽出物のHepG2に対する増殖抑制効果に関して検討した。本実験で使用されたサンプル濃度は最低0 µg/mL、最高は250 µg/mLであった。それぞれ24時間と48時間の処理を行った。結果は図3-7に示す。PS-DNはHepG2に対する増殖抑制作用が確認されなかった。AE-DN及びGp-DNはHepG2に対する増殖抑制作用があることが確認された。24時間の処理を経て、それぞれのIC₅₀は183.30±8.17 µg/mLと174.94±4.27 µg/mLであった。48時間の処理を行う場合、Gp-DNのIC₅₀は96.71±2.33 µg/mLになり、AE-DNのIC₅₀は500 µg/mL以上になった(表3-1)。つまり、Gp-DNは48時間以内に安定性を持ち、HepG2に対する増殖抑制作用は濃度と時間の依存性があることが確認された^[83]。AE-DNにあるHepG2の生殖を抑制できる成分は48時間以内に安定的ではないことも確認された。

(2) HeLa に対する増殖抑制作用

HeLaは人由来の最初の株化された細胞として、体外実験での抗ガン生理活性評価試験や研究に幅広く用いられている。生物学実験で抗炎症^[84]、細胞毒性^[85]、細胞増殖及びアポトーシス^[86]によく使われている。図3-8に示したのは抽出されたAE-DN、Gp-DN及びPS-DNがHeLaに対する増殖抑制作用であった。図3-9に示した通り、AE-DNとGp-DNはHeLaに対する増殖抑制作用は濃度と時間の依存性があることが確認された。AE-DNのIC₅₀は30.93±1.03 µg/mLであった。Gp-DNのIC₅₀は16.68±0.47 µg/mLであった。PS-DNのIC₅₀は500 µg/mLより高かったので、HeLaに対する抗ガン生理活性は確認されなかった(表3-1)。

すべての抽出物は A549、DLD-1 に対して増殖抑制作用が確認されなかった。

3.3.3 RAW264.7 の増殖に対する影響

マクロファージの増殖は、免疫生理活性の重要な指標の一つである。従って、抽出物は RAW264.7 細胞に対する細胞毒性効果または増殖効果を評価する必要がある。RAW264.7 に対する増殖効果は、図 3-10 に示す。抽出された AE-DN、Gp-DN 及び PS-DN は RAW264.7 に対して、増殖効果がないことが確認された。また、AE-DN と PS-DN は RAW264.7 に対して、増殖効果毒性も確認されなかった。しかしながら、Gp-DN は RAW264.7 に濃度依存的な毒性を有することを明らかにした。抽出された Gp-DN は粗抽出であるため、RAW264.7 にたいして対して毒性がある物質を含有することが考えられた。

3.3.4 正常細胞の C2C12 に対する毒性

C2C12 は細胞の生殖機制^[87]、酸化応答、アポトシース^[88]等の研究によく使われている。本研究で C2C12 は正常細胞として、抽出物の毒性を測定した。AE-DN 及び Gp-DN は HeLa、HepG2 に対して高い増殖抑制作用を有することが既に証明された。しかしながら多数の抗ガン生理活性を有する物質は抗ガン生理活性を有すると同時に正常細胞に対する毒性もある。AE-DN 及び Gp-DN の毒性を検討するため、C2C12 の生存率実験を行った。図 3-11 に示したのは AE-DN 及び Gp-DN は C2C12 の生存率に対する影響であった。結果により、AE-DN 及び Gp-DN は C2C12 に対して濃度依存性的な弱い毒性があることが確認された。

3.4 まとめ

本章において、抽出された AE-DN、Gp-DN 及び PS-DN の抗酸

化生理活性、免疫生理活性及び抗ガン生理活性に対して検討を行った。

結果により、全ての抽出物は $\bullet\text{OH}$ と $\text{ABTS}^{\cdot+}$ に対して抗酸化生理活性を有することが確認された。AE-DNとPS-DNはGp-DNより最も高い抗酸化生理活性を有することも確認された。しかしながら、全部の抽出物はRAW264.7に対する増殖促進作用が確認されなかった。また、Gp-DNはRAW264.7に対して毒性があることも確認された。抗ガン生理活性に関して、HepG2とHeLaに対する増殖抑制効果を示したのはAE-DN及びGp-DNであり、濃度と時間的な依存性が確認された。しかしながら、AE-DN及びGp-DNは正常細胞のC2C12に対しても弱い毒性を有することが確認された。Gui-tang Chenたちは2012年に舞茸菌糸から高い抗酸化生理活性を有するGFP-1、GFP-2とGFP-3三種類の多糖類を抽出、単離した^[57]。Fengjie Cuiたちは2013年に舞茸菌糸から高い抗ガン生理活性を有するGFG-3aと言う糖タンパク質を抽出、精製した^[17]。従って、本研究で抽出されたAE-DNは舞茸菌糸の機能性多糖類とタンパク質両方を含有することが推断できる。PS-DNは多糖類として抽出されたが、抗酸化生理活性は報告されたGFP-1、GFP-2とGFP-3より弱かった。原因考えると、三つがある。一つ目は本研究で、抽出されたPS-DNは粗多糖類である。二つ目は、抽出過程で多糖類の活性構造は形態的な変化が発生した。三つ目は、本研究で使用した抽出原料はオカラを培地とした発酵物で純粋な菌糸体ではなかった。またGp-DNの分子量範囲は15~120kDで、既往研究でのGFG-3aの分子量は88.01 kDであるため、Gp-DNにGFG-3aが含有される可能性がある。

舞茸発酵オカラから抽出されたAE-DN、Gp-DN及びPS-DNは全て粗抽出物であった。しかしながら、生理活性物質が含有されていることが証明され、続いて純化を行えば優れる抗酸化剤、抗ガン成分を得ることが期待でき、子実体の抗ガン成分の抽出より

コストが低い。従って、舞茸を用いたオカラ発酵はオカラの新規リサイクル方法の一つとして、食品添加物、肥料、飼料等の開発に基本的な情報を提供することができたと考える。

表 3-1 AE-ND、Gp-ND、PS-ND は HeLa 及び HepG2 に対する増殖抑制作用の IC₅₀

サンプル	IC ₅₀ (μg/mL)			
	24h		48h	
	HeLa	HepG2	HeLa	HepG2
AE-ND	100.66 ± 3.01	183.30 ± 8.17	30.93 ± 1.03	>500
Gp-ND	88.85 ± 7.80	174.94 ± 4.27	16.68 ± 0.47	96.71 ± 2.33
PS-ND	>500	>500	>500	>500

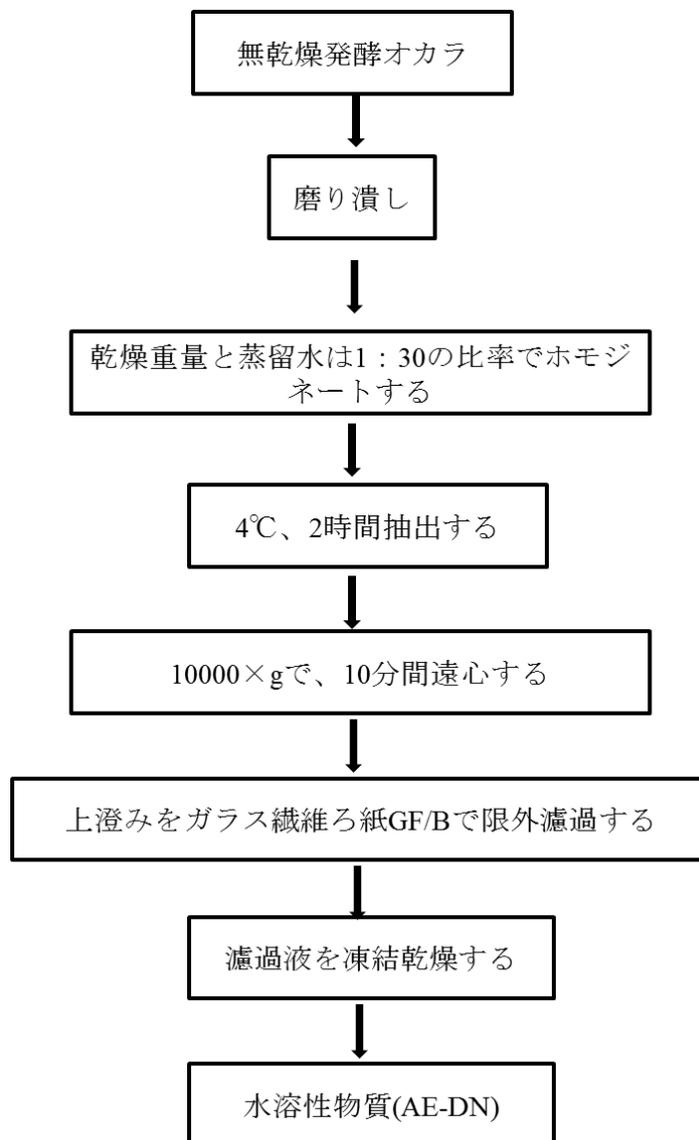


図 3-1 発酵オカラの水溶性物質の抽出ステップ

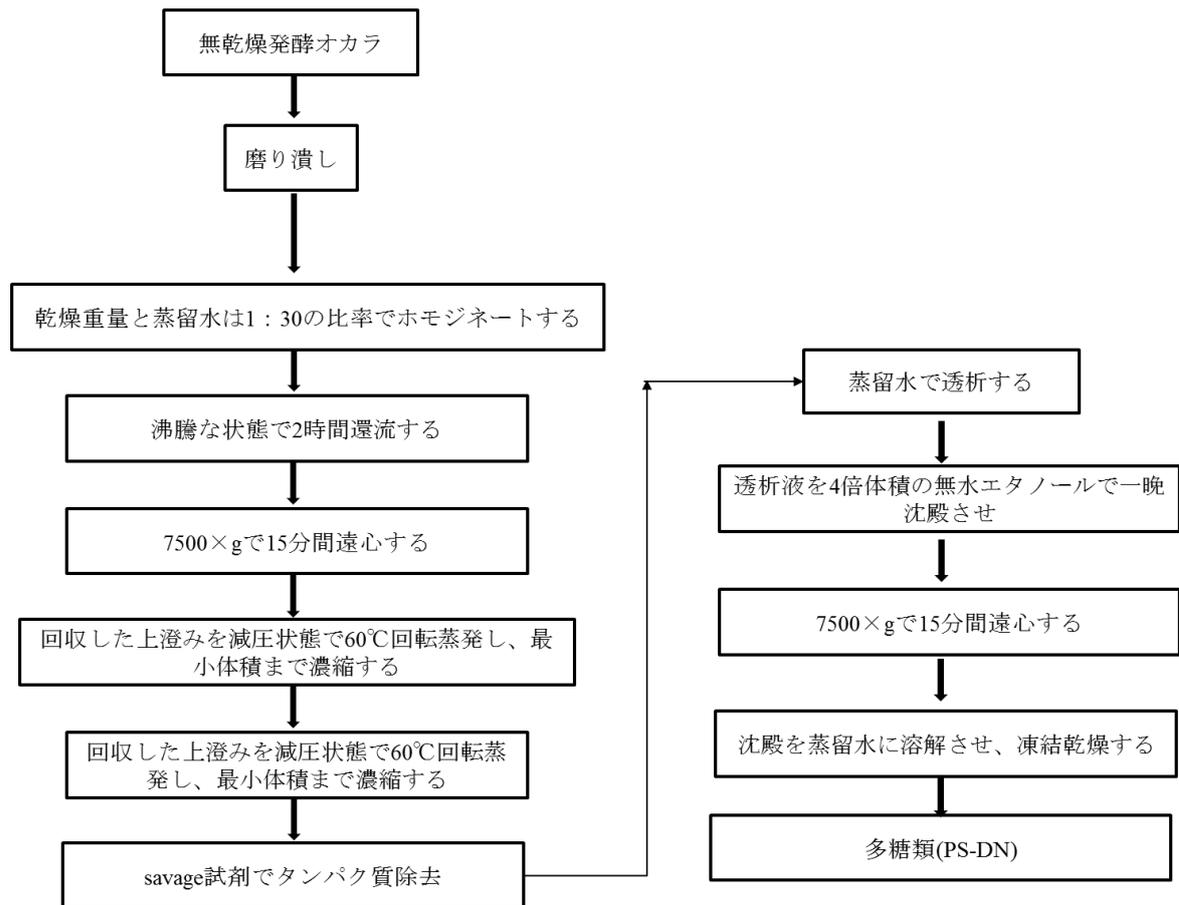


図 3-2 発酵オカラの多糖類の抽出ステップ

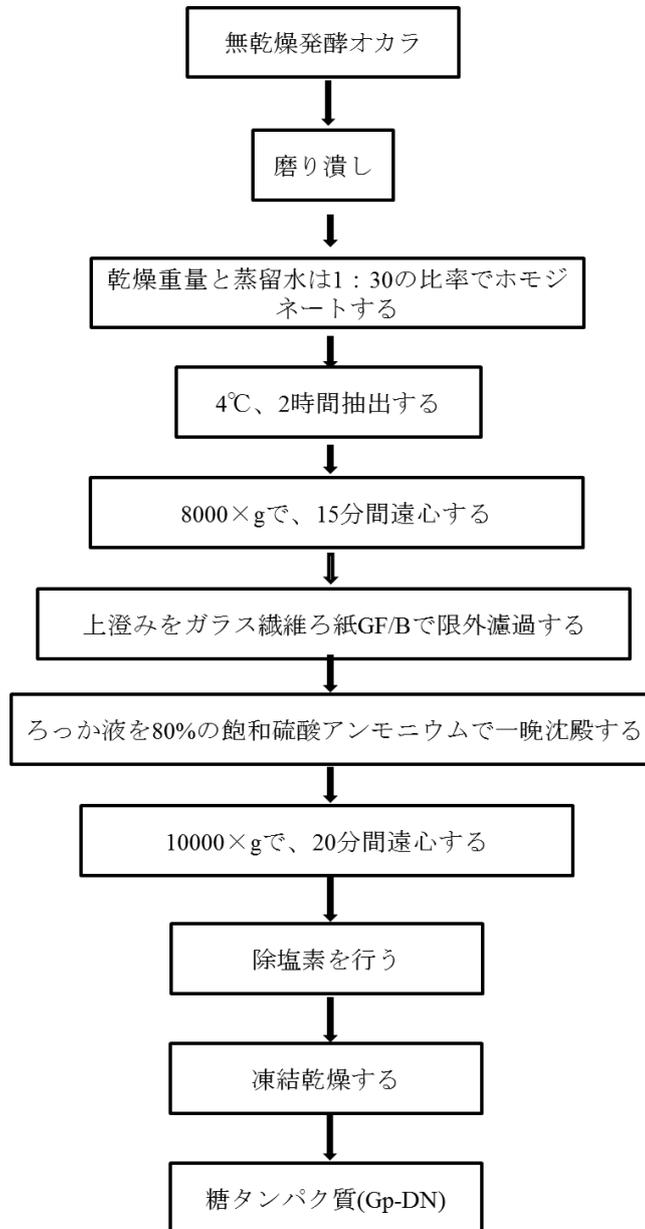


図 3-3 発酵オカラの糖タンパク質の抽出ステップ

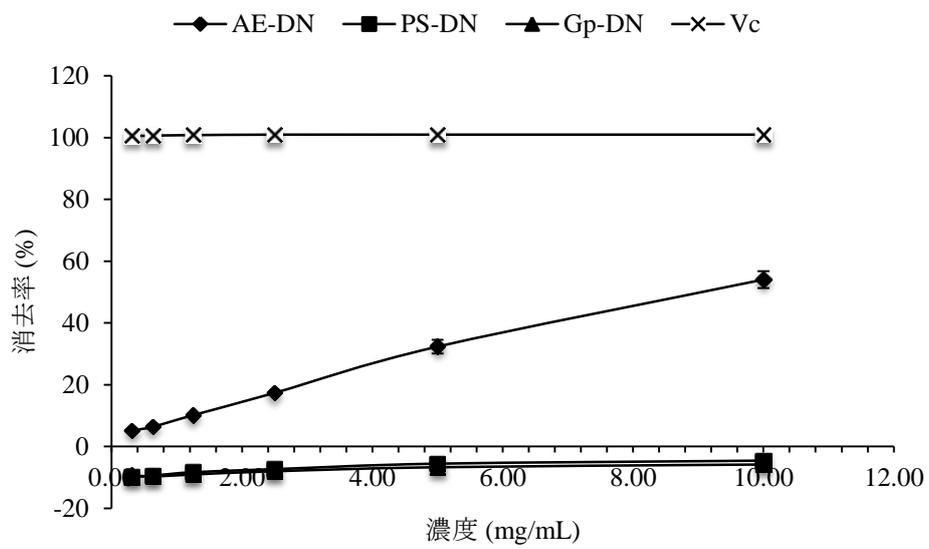


図 3-4 水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の DPPH ラジカル消去活性

サンプルの濃度を 0.31、0.63、1.25、2.50、5.00、10.00 mg/mL にし、データは平均値 ±SD により示す。

AE-DN: 水溶性物質; PS-DN: 多糖類; Gp-DN: 糖タンパク質; Vc: ビタミン C、ポジティブコントロール。

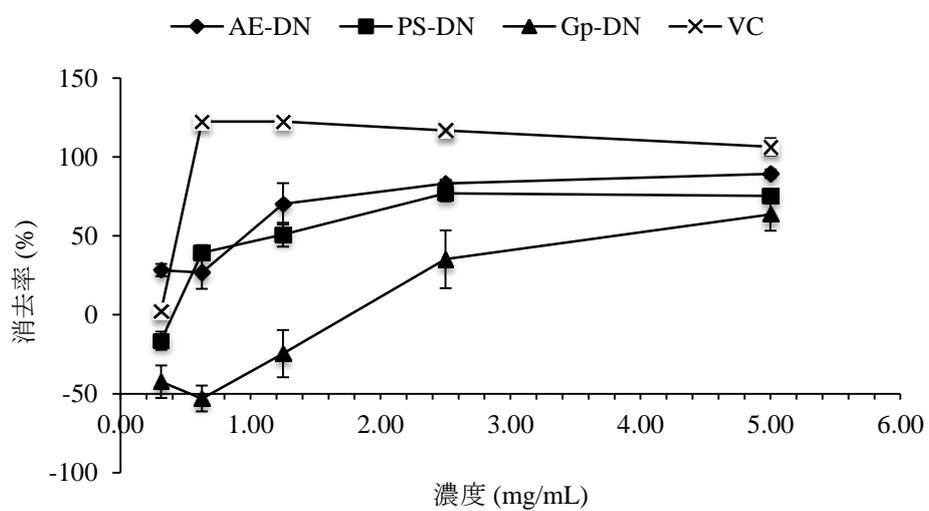


図 3-5 水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の $\cdot\text{OH}$ 消去活性

サンプルの濃度を 0.31、0.63、1.25、2.50、5.00、mg/mL にし、データは平均値 \pm SD により示す。

AE-DN: 水溶性物質; PS-DN: 多糖類; Gp-DN: 糖タンパク質; Vc: ビタミン C、ポジティブコントロール。

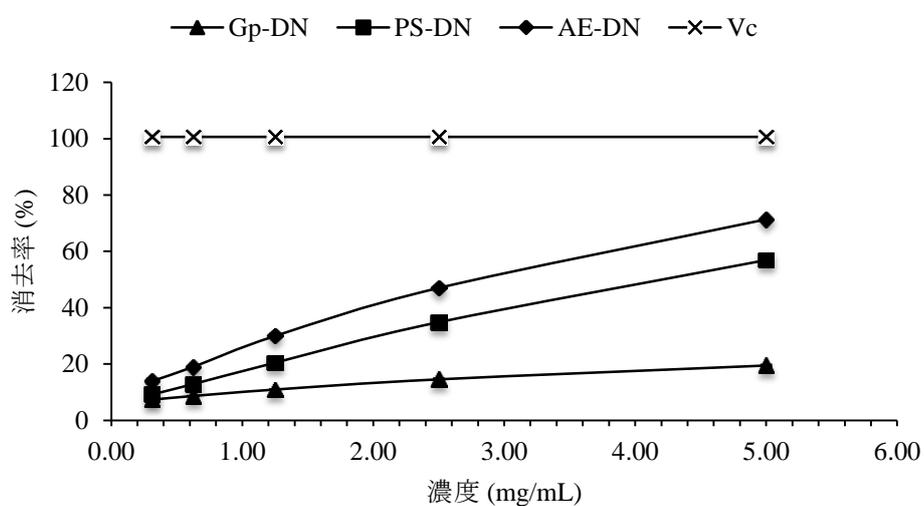
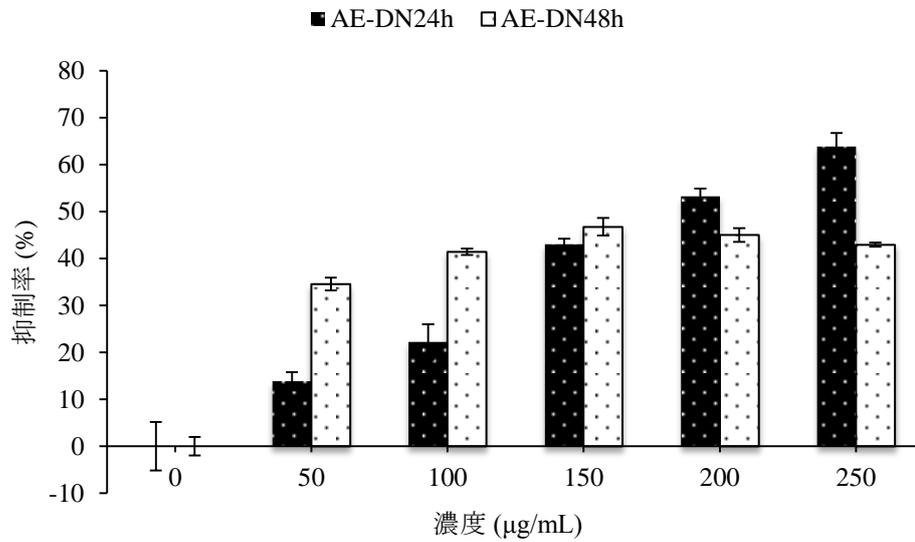


図 3-6 水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の ABTS^{·+}消去活性

サンプルの濃度を 0.31、0.63、1.25、2.50、5.00、 mg/mL にし、データは平均値 ±SD により示す。

AE-DN: 水溶性物質; PS-DN: 多糖類; Gp-DN: 糖タンパク質; Vc: ビタミン C、ポジティブコントロール。

a



b

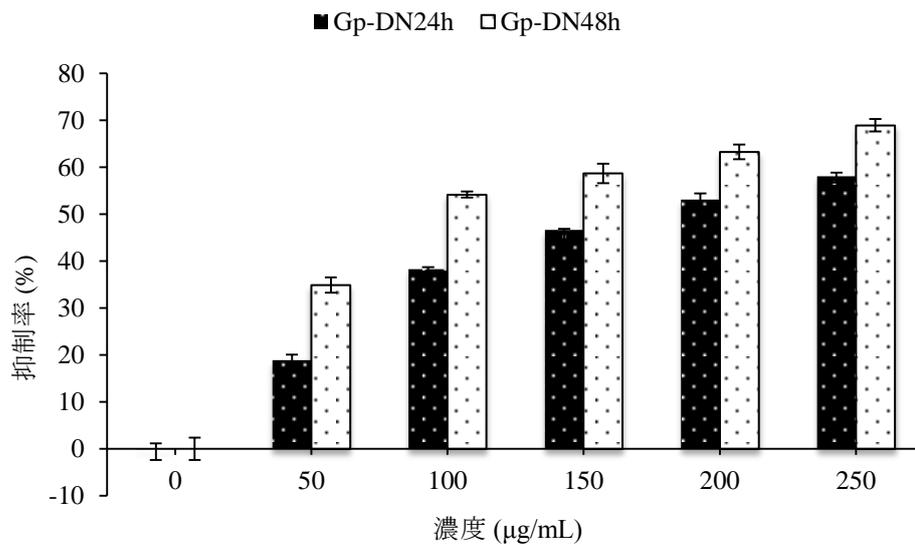


図 3-7 糖タンパク質、水溶性物質の HepG2 に対する増殖抑制作用

a. 水溶性物質の HepG2 に対する増殖抑制作用

b. 糖タンパク質の HepG2 に対する増殖抑制作用

Gp-DN: 糖タンパク質; AE-DN: 水溶性物質

サンプルの最終濃度を 50、100、150、200、250 µg/mL にし、処理時間は 24 時間と 48 時間であった。データは平均値±SD により示す。

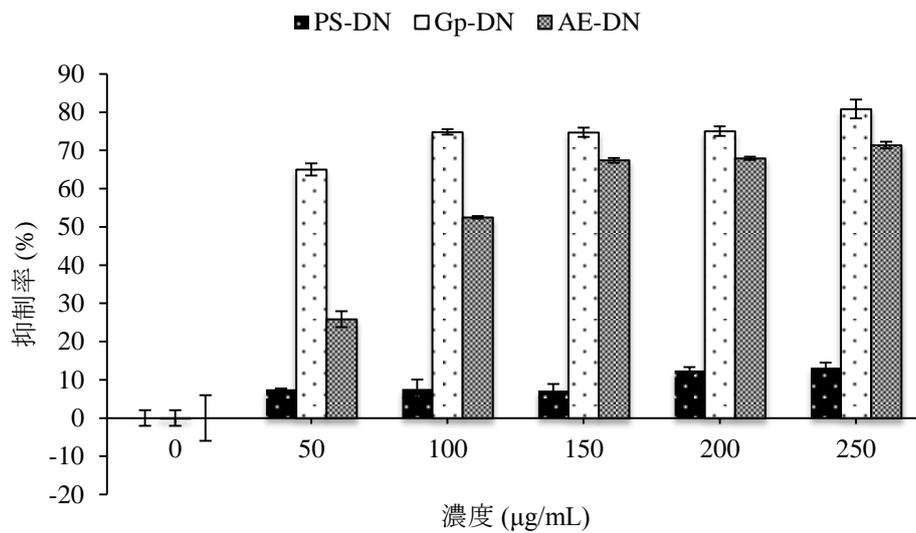
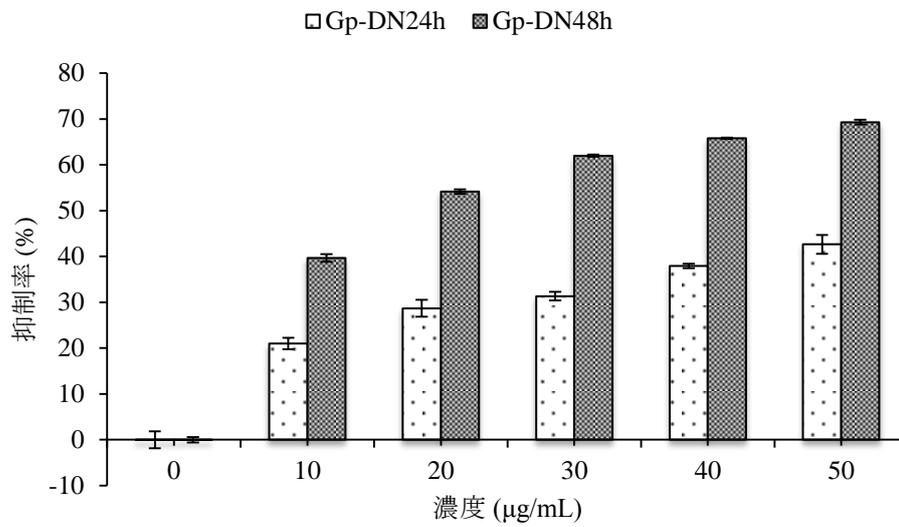


図 3-8 水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の HeLa に対する増殖抑制作用

AE-DN: 水溶性物質; PS-DN: 多糖類; Gp-DN: 糖タンパク質

サンプルの最終濃度を 50、100、150、200、250 µg/mL にし、処理時間は 24 時間であった。データは平均値±SD により示す。

a



b

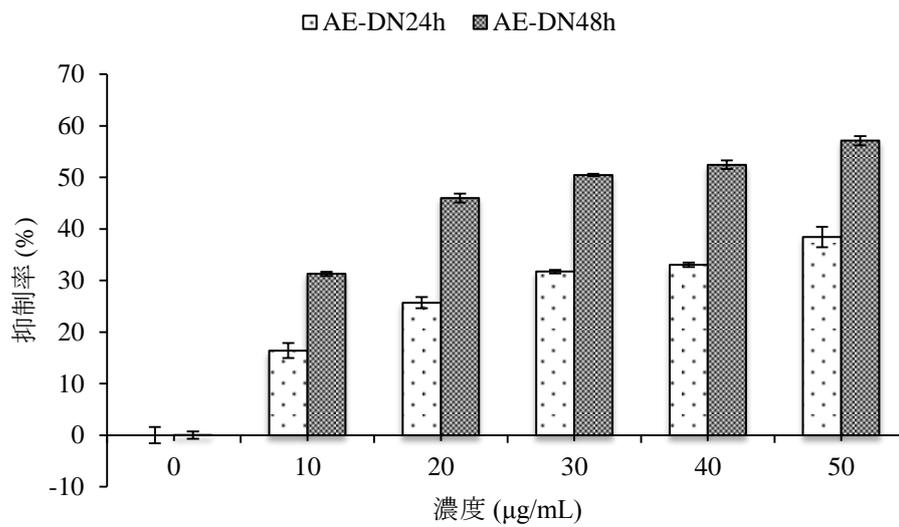


図 3-9 糖タンパク質、水溶性物質の HeLa に対する増殖抑制作用

a. 糖タンパク質の HepG2 に対する増殖抑制作用

b. 水溶性物質の HepG2 に対する増殖抑制作用

Gp-DN: 糖タンパク質; AE-DN: 水溶性物質

サンプルの最終濃度を 10、20、30、40、50 µg/mL にし、処理時間は 24 時間と 48 時間であった。データは平均値±SD により示す。

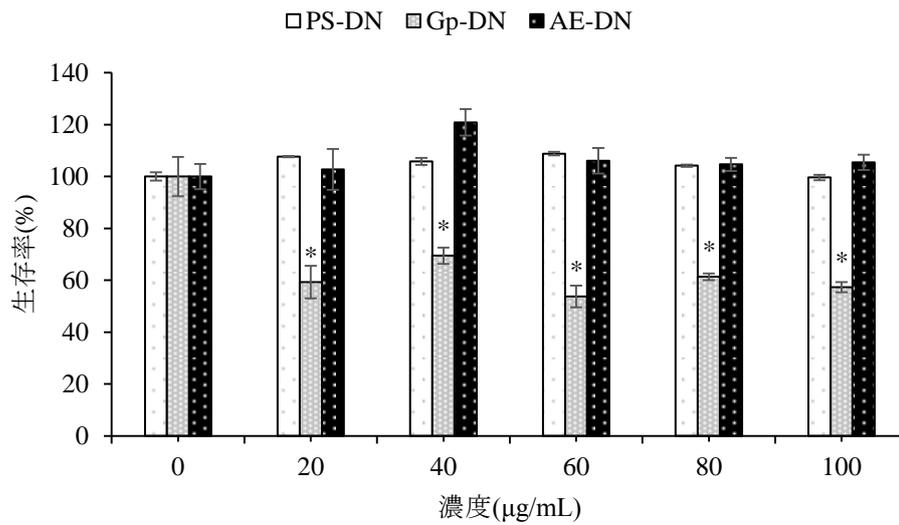


図 3-10 水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の RAW264.7 に対する増殖効果

*対照に対して有意差があることを示す(P<0.05)

AE-DN: 水溶性物質; PS-DN: 多糖類; Gp-DN: 糖タンパク質

サンプルの最終濃度を 20、40、60、80、100 µg/mL にし、処理時間は 24 時間であった。データは平均値±SD により示す。

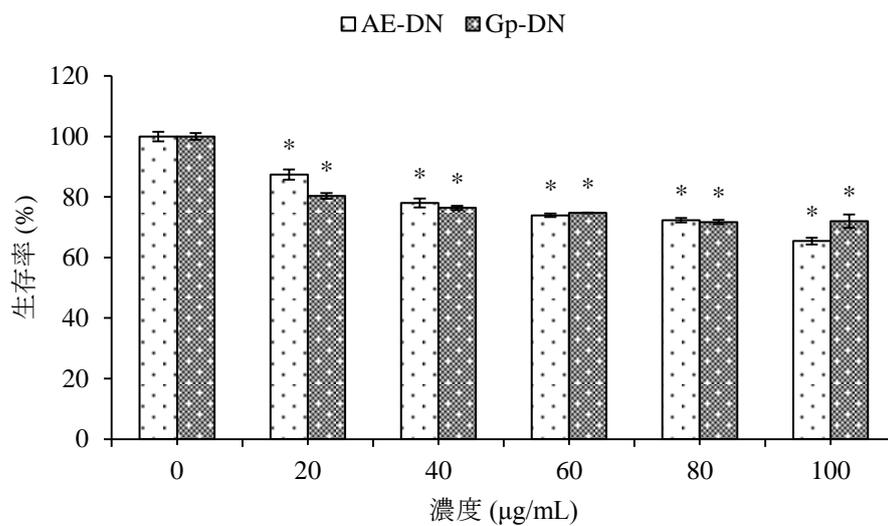


図 3-11 水溶性物質、糖タンパク質の C2C12 生存率に対する影響

*対照に対して有意差があることを示す(P<0.05)

AE-DN: 水溶性物質; Gp-DN: 糖タンパク質

サンプルの最終濃度を 20、40、60、80、100 µg/mL にし、処理時間は 24 時間であった。データは平均値±SD により示す。

第4章 発酵オカラの異なる乾燥方法における各抽出物の生理活性影響に関する評価

4.1 はじめに

食品原料は水分が含有されているため、酵素による劣化と微生物の増殖がよく発生し、品質の劣化になる。原料の品質を保つために、保存や輸送する前に原料に対する乾燥処理が必要である。乾燥後の原料は品質の長い保存だけではなく、重量も減少するため、輸送や保存のコストも低減できる^[89]。乾燥処理は食品原料^[90]、野菜の脱水処理^[91]、バイオマス副産物の乾燥^[92]によく使われている。食品原料を使って、有用物質の抽出を行う場合、一般的に抽出を行う前に原料を乾燥・粉砕し、同じ粒径になる。異なる乾燥方法は食品の栄養成分、色、香り、食品の復元性などに対する影響も違う。多くの研究は乾燥がサンプルに対する微視的な構造、マクロ構造^[93]の影響及び化学的な影響^[94]を検討した。

既往研究で、同じな抽出物に対して、異なる乾燥方法を選択すると、その抽出物の抗酸化生理活性に対して影響がある^[68]。しかしながら、実験材料に対する乾燥処理は抽出物に対する影響についてまだ報告されてない。

従って、本研究は発酵オカラの乾燥方法に対して、実験室でよく使われている2種類の乾燥方法を検討した。また抽出する前の乾燥処理は抽出率や抽出物の生理活性などに対する影響も検討した。

4.2 実験材料及び方法

4.2.1 試薬及び実験材料

硫酸アンモニウム、エタノール、水酸化ナトリウム、石油エーテル、クロロホルム、N-ブタノール、硫酸、フェノール、エチル

アルコール、アセトン、ジエチルエーテル、エタノール、 Na_2CO_3 、
ビタミン C、ビタミン E、 H_2O_2 、 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、
 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、 FeCl_3 、過硫酸カリウム、ferrozine、トリク
ロロ酢酸、サリチル酸ナトリウムおよびエチレンジアミン四酢酸
(EDTA) は和光純薬 (日本大阪) から購入した。ドデシル硫酸
ナトリウム、没食子酸、ABTS、DPPH は、シグマアルドリッチ社
(セントルイス) から購入した。DMEM 培地、ウシ胎児血清 (FBS)、
Penicillin / streptomycin 溶液、DMSO、MTT はシグマアルドリッ
チ社 (セントルイス、MO、USA) から購入した。全ての化学試
薬は特級であった。

4.2.2 発酵オカラの乾燥処理

発酵オカラの乾燥処理は以下のように行った、無乾燥(DN)：発
酵オカラを新鮮な状態で -20°C で冷凍保存した。使用する前に 4°C
で解凍して直接使用した。熱風乾燥 (HA)、発酵オカラを 60°C の
熱風乾燥器で(EYELA WFO-700、JAPAN)乾燥させ使用した。凍結
乾燥(FE)：発酵オカラを小さい塊に切って、凍結し、凍結乾燥
器(EYELA FREEZE DRYER FDU-506、JAPAN)で凍結乾燥を行った。

4.2.3 乾燥させた発酵オカラから水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の抽出

本章において、水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の抽出は第
3章の3.2.2の抽出方法を一部改善して行った。

(1) 水溶性物質の抽出

熱風乾燥、凍結乾燥された発酵オカラを取って、粉砕機で粉砕
し、目開き $250\ \mu\text{m}$ の篩を通した後、乾燥重量1に対して蒸留水
30の比率でホモジネートした。次に、3.2.2の(1)と同法を使用し
た。最終的に抽出された水溶性物質をAE-HA、AE-FEとした(図
4-1)。

(2) 多糖類の抽出

熱風乾燥、凍結乾燥された発酵オカラを取って、粉砕機で粉砕し、目開き 250 μm の篩を通した後、乾燥重量 1 に対して蒸留水 30 の比率でホモジネートした。次に、3.2.2 の(2)と同法を使用した。最終的に抽出された水溶性物質を PS-HA、PS-FE とした。(図 4-2)

(3) 糖タンパク質の抽出

熱風乾燥、凍結乾燥された発酵オカラを取って、粉砕機で粉砕し、目開き 250 μm の篩を通した後、乾燥重量 1 に対して蒸留水 30 の比率でホモジネートした。次に、3.2.2 の(3)と同法を使用した。最終的に抽出された水溶性物質を Gp-HA、Gp-FE とした(第 4-3)。

4.2.4 抽出された水溶性物質、糖タンパク質の Tricine-SDS-PAGE 電気泳動

抽出物の水溶性物質及び糖タンパク質のタンパク質分子量分布を調べるために、Tricine-SDS-PAGE 電気泳動を行った。10% の分離ゲル及び 4% の濃縮ゲルを使用した。泳動 buffer(陽極側) : 0.2 M Tris-HCl、pH 8.9 であった。泳動 buffer(陰極側) : 0.1 M Tris-0.1 M Tricine-0.1% SDS であった。サンプルを注入する前、30 V の恒圧で 10 分間の予備泳動を行った。サンプルを注入した後、90 V 恒圧で泳動した。使用されたマーカの分子量範囲は 10~200 kD であった。染色は CBB 染色で行った。すべてのサンプル注入濃度は 2.5 mg/mL であった。

4.2.5 各抽出物の抗酸化生理活性に関する評価

抗酸化生理活性を測定する実験方法は第 3 章の 3.2.4 に参照した。また、還元力の測定実験を追加した。

還元力の測定は文献^[75]に報告された方法を参照して行った。1mL の異なる濃度 (0.31、0.63、1.25、2.50、5.00、10.00 mg/mL) のサンプルに 1.0 mL の 0.2 M リン酸緩衝液 (pH6.6) 及び 1.0 mL

の $K_3[Fe(CN)_6]$ (1%、w/v) を添加し、50°C で 20 分間インキュベートした後 -20°C で 3-5 分間冷却した。次に 1.0 mL のトリクロロ酢酸 (1%、w/v) を添加し、沈殿がある場合 4000 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄を回収した。1.0 mL の上澄みに 2.0 mL の蒸留水及び 400 μ L の $FeCl_3$ を混合した後、15 分間室温でインキュベートした。陽性対照としてビタミン E を使用した。混合物の吸光度は 700 nm で測定された。還元力は吸光度と正の相関がある^[76]。

4.2.6 各抽出物の抗ガン生理活性に関する評価

抗ガン生理活性実験方法は第 3 章の 3.2.5(2)を参照した。

4.2.7 各抽出物の免疫生理活性

免疫生理活性実験方法は第 3 章の 3.2.5(3)を参照した。

4.2.8 統計分析

データは、3 回の測定の平均値±標準偏差 (SD) とした。統計分析は、スチューデントの t 検定および分散の一方方向分析を用いて行った。手段の多重比較は、最小有意差検定により行った。すべての計算は、統計ソフトウェア (SPSS、バージョン 19.0) を用いて行った。0.05 より小さい P 値は、統計学的に有意とみなした。

4.3 結果及び考察

4.3.1 発酵オカラの乾燥処理

本研究において、発酵に対する乾燥処理はそれぞれ、無乾燥 (DN)、熱風乾燥 (HA)、凍結乾燥 (FE) を行った。処理の結果 (図 4-1) により、外観の色の変化が生じた。熱風乾燥の色は凍結乾燥より深かった。長時間の熱風乾燥処理は発酵オカラのメイラード反応

が起こったことが推定できる。メイラード反応は、還元糖とアミノ化合物（アミノ酸、ペプチド及びタンパク質）を加熱したときなどに見られる、褐色物質（メラノイジン）を生み出す反応である。褐変反応（browning reaction）とも呼ばれる。既往研究により、メイラード反応は、穏やかな反応で、優れた制御性を有することが知られている。メイラード反応により水溶性キトサンの誘導体は天然キトサンより、優れた抗菌および抗酸化生理活性を有することが報告されている^[95]。

4.3.2 各抽出物の抽出率

各抽出物の抽出率は表 4-1 に示す。水溶性物質の抽出率はそれぞれ AE-DN は 37.0%であり、AE-FE は 42.2%であり、AE-HA は 39.3%であった。多糖類の抽出率はそれぞれ PS-DN は 11.9%であり、PS-FE は 10.2%であり、PS-HA は 9.1%であった。糖タンパク質の抽出率はそれぞれ Gp-DN は 5.7%であり、Gp-FE は 4.0%であり、Gp-HA は 3.8%であった。異なる乾燥方法に処理された発酵オカラを用いた各抽出物の抽出率は有意差が確認されなかった。

4.3.3 水溶性物質及び糖タンパク質の Tricine-SDS-PAGE 電気泳動

Tricine-SDS-PAGE 電気泳動は分子量の概算や精製度のチェック等、蛋白質科学の現場で最も頻繁に利用される実験手法の一つである。バンドの濃さはタンパク質の量を示し、バンドの数量はタンパク質の種類を示している。本研究において、水溶性物質及び糖タンパク質の Tricine-SDS-PAGE 電気泳動の結果により、発酵オカラから抽出された水溶性物質や糖タンパク質に含有されているタンパク質の分子量範囲はそれぞれ 10 kD~120 kD、15 kD~120 kD であった。熱風乾燥は糖タンパク質の抽出に影響を与えた。抽出量及び種類に対する影響が確認された。例えば、Gp-HA

に対する影響について、Gp-DN 及び Gp-FE と比べると、同じ分子量のタンパク質の量が減少した上で、60 kD 以上のタンパク質の種類も減少した (図 4-2A)。AE-HA に対する影響、同じ分子量のタンパク質の量が減少した上、小分子量のタンパク質の種類も減少した (図 4-2 B)。

4.3.4 発酵オカラに対する異なる乾燥方法は抽出物に対する抗酸化生理活性の影響

(1) DPPH ラジカル消去活性

水溶性物質、多糖類、及び糖タンパク質の DPPH ラジカル消去活性の結果を図 4-3 により示す。第 3 章では Gp-DN と PS-DN は DPPH ラジカルに対する消去活性がないことがすでに確認された。本章において、乾燥された発酵オカラから抽出された多糖類と糖タンパク質は DPPH ラジカルに対する消去活性も確認されなかった。水溶性物質の方は DPPH ラジカル消去活性を有することが確認された。水溶性物質 AE-DN、AE-FE、AE-HA それぞれの DPPH ラジカル消去活性の IC₅₀ は 9.86±1.03 mg/mL、108.85±3.78 mg/mL、13.03±1.47 mg/mL であり、AE-DN と AE-HA の有意差が確認されなかった (表 4-2)。つまり、DPPH ラジカルの消去活性を有する成分の抽出について、発酵物の熱風乾燥は影響が確認できず、発酵物の凍結乾燥は負の影響が確認された。

(2) •OH 消去活性

図 4-4 に各抽出物の•OH 消去活性を示す。Gp-HA と Gp-FE 以外はずべての抽出物は優れた•OH 消去活性が確認された。発酵物に対する乾燥処理は•OH 消去活性成分の抽出に対する影響が確認された。しかしながら、水溶性物質と糖タンパク質の場合、発酵物に対する乾燥処理は•OH 消去活性成分の抽出に対する影響は負の影響であった。多糖類の場合、乾燥処理は正の影響であった。また本実験で熱風乾燥と凍結乾燥は有意差が確認されなかった

(表 4-2)。

(3) ABTS⁺消去活性

図 4-5 に各抽出物の ABTS⁺消去活性を示す。全ての抽出物は ABTS⁺消去活性を有した。乾燥方法は抽出物の ABTS⁺消去活性に対する影響は抽出物により異なった。まず水溶性物質の場合、熱風乾燥の方は不乾燥より高い ABTS⁺消去活性を有することが明らかとなった。凍結乾燥は ABTS⁺消去活性を有する成分の抽出に負の影響があることが確認された。糖タンパク質の場合、二種類の乾燥方法は有意差がなく、糖タンパク質の ABTS⁺消去活性に対して正の影響が確認された。また多糖類の場合、発酵物に対する熱風乾燥処理は無乾燥と有意差が確認されなかった。凍結乾燥は負の影響があることが確認された(表 4-2)。

(4) 還元力の測定

本研究において、水溶性物質の還元力のみ測定した。図 4-6 では水溶性物質の AE-DN、AE-FE、AE-HA の還元力を比較した。発酵物に対する凍結乾燥と無乾燥は有意差がなかった。熱風乾燥は還元力を有する水溶性物質の抽出に対して正の影響があることが確認された(表 4-2)。

4.3.5 発酵オカラに対する異なる乾燥方法は抽出物に対する抗ガン生理活性の影響

(1) HepG2 に対する増殖抑制作用

本研究において、各抽出物の HepG2 に対する増殖抑制効果に関する検討を行った。結果は図 4-7 に示す。本研究で抽出された多糖類は HepG2 に対する増殖抑制作用が確認されなかった(図 4-7A)。水溶性物質及び糖タンパク質は HepG2 に対する増殖抑制作用を有し、濃度の増加と共に抑制率の上昇が確認された。水溶性物質を抽出する場合、発酵物に対する熱風乾燥と凍結乾燥処理は抽出物の抗ガン生理活性に対する影響は有意差がなかった。糖

タンパク質を抽出する場合、発酵物に対する熱風乾燥は抽出物の抗ガン生理活性に対して負の影響があった。一方、発酵物に対する凍結乾燥は抽出物の抗ガン生理活性に対して正の影響があったことが確認された(表 4-3)。

(2) HeLa に対する増殖抑制作用

図 4-8 に抽出された水溶性物質(図 4-8A)及び糖タンパク質(図 4-8B、C) の HeLa に対する増殖抑制作用を示す。発酵オカラに対する凍結乾燥及び熱風乾燥は抽出物の抗ガン生理活性に対して異なる影響があった。24 時間の暴露時間では HeLa 細胞に対する抑制作用の確認について、熱風乾燥は HeLa の抑制作用がある水溶性物質に対する負の影響が確認された。それに対して、凍結乾燥は正の影響が確認された。熱風乾燥と凍結乾燥は両方とも HeLa の抑制作用がある糖タンパク質に対する正の影響が確認された。しかしながら、暴露時間を 48 時間まで延長すると、熱風乾燥と凍結乾燥両方とも負の影響になったことも確認された(図 4-8B、C)(表 4-3)。

4.3.6 各抽出物の免疫生理活性に関する検討

マクロファージの増殖は、免疫生理活性の重要な指標の一つである。従って、抽出物は RAW264.7 細胞に対する細胞毒性効果または増殖効果の評価する必要がある。RAW264.7 に対する増殖効果を図 4-9 に示す。抽出された水溶性物質、糖タンパク質及び多糖類は RAW264.7 に対して、増殖効果がないことが確認された。また、24 時間処理する場合、糖タンパク質は RAW264.7 に濃度依存的な毒性を有することが明らかになった。水溶性物質と多糖類は RAW264.7 に対して、増殖効果がないと同時に毒性も確認されなかった。しかしながら、48 時間まで延長すると、多糖類以外、糖タンパク質と水溶性物質とも RAW264.7 に対する毒性が確認された(図 4-10)。乾燥方法の影響については、熱風乾燥の方は

抽出物の免疫生理活性に対する負の影響が一番小さいことが確認できた。すべての抽出物は粗抽出物なので、中には RAW264.7 に対して毒性がある物質を含有することが考えられる。従って更なる純化を行う必要がある。

4.4 まとめ

本章において、無乾燥、熱風乾燥、凍結乾燥により処理された発酵オカラを用い、それぞれ水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の抽出を行った。次に、水溶性物質及び糖タンパク質の Tricine-SDS-PAGE 電気泳動を行い、発酵オカラに対する異なる乾燥方法は抽出物の生理活性に対する影響を検討した。

発酵オカラに対して異なる乾燥方法では、異なる抽出物の抽出率、抗酸化生理活性、抗ガン生理活性が得られた。熱風乾燥した発酵オカラから抽出した水溶性物質に最も高い抗酸化生理活性が確認された。AE-HA の DPPH ラジカル消去能力は AE-FE より 7.78~8.97 倍高い。AE-DN は高い抗ガン生理活性があると確認され、HeLa の増殖抑制作用では AE-HA より 9.01~10.60 倍、AE-FE より 2.09~2.42 倍高い、HepG2 の増殖抑制作用は AE-HA より 1.49~2.08 倍、AE-FE より 1.48~1.66 倍高い。発酵オカラの異なる乾燥方法では、抽出された糖タンパク質は特異性を示した。Gp-HA 及び Gp-FE の ABTS⁺消去活性はほぼ同様に、Gp-DN の 20 倍程度高く、それぞれの IC50 は 6.27 ± 0.10 mg/mL と 13.77 ± 1.02 mg/mL であった。HeLa の増殖抑制作用については Gp-DN と Gp-HA はほぼ同様に、Gp-FE より高く、それぞれの IC50 は 16.68 ± 0.47 μ g/mL と 19.41 ± 1.38 μ g/mL であった (48 時間)。Gp-HA の HepG2 の増殖抑制作用は Gp-DN と Gp-FE より強い、IC50 は 32.33 ± 2.41 μ g/mL であった (48 時間)。熱風乾燥と無乾燥の発酵オカラからの多糖類は高い抗酸化生理活性を示した。に PS-HA と PS-DN の \bullet OH と ABTS⁺消去活性は有意差がないが、PS-FE の

2倍である。

抽出された糖タンパク質の Gp-DN は優れた抗ガン生理活性を持っていることが確認されたが、RAW264.7 に対しても増殖抑制作用があった。抽出物に RAW264.7 に対して毒性を示す物質が含有されていることが考えられた。

発酵物の異なる乾燥方法は抽出物の生理活性及び抽出量に対して異なる影響があることが確認された。本研究において発酵物に対して熱風乾燥の場合、抽出物の生理活性は無乾燥と相似であった。

表 4-1 異なる乾燥方法は各抽出物の抽出率に対する影響

	水溶性物質			多糖類			糖タンパク質		
	AE-DN	AE-FE	AE-HA	PS-DN	PS-FE	PS-HA	Gp-DN	Gp-FE	Gp-HA
抽出率(%)	42.20	39.30	11.90	11.90	10.20	9.10	5.70	4.00	3.80

表 4-2 各抽出物の抗酸化生理活性

サンプル	IC ₅₀ (mg/mL)				
	DPPH	・OH	ABTS ^{·+}	還元力	
水溶性物質	AE-DN	9.86±1.03 ^a	0.85±0.22 ^a	2.48±0.02 ^a	1.19 ± 0.04 ^a
	AE-HA	13.03±1.47 ^a	1.88±0.12 ^b	2.15±0.07 ^b	2.39 ± 0.01 ^b
	AE-FE	108.85±3.78 ^b	1.22±0.12 ^c	3.04±0.14 ^c	1.14 ± 0.01 ^a
糖タンパク質	Gp-DN		3.50±0.29	223.3±817.19 ^a	
	Gp-HA			6.27±0.10 ^b	
	Gp-FE			13.77±1.02 ^b	
多糖類	PS-DN		1.34±0.11 ^a	3.46±0.09 ^a	
	PS-HA		0.52±0.04 ^b	3.09±0.65 ^a	
	PS-FE		0.52±0.37 ^b	6.54±0.17 ^b	

注: ^a, ^b, ^c 同列において異なる上付き文字は有意差があることを示す (* p < 0.05、同じ抽出物内の比較結果)。

表 4-3 各抽出物の抗ガン生理活性

サンプル	IC ₅₀ (μg/mL)			
	24h		48h	
	HeLa	HepG2	HeLa	HepG2
AE-DN	100.66 ± 3.01 ^a	183.30 ± 8.17 ^a	30.93 ± 1.03	458.63 ± 49.76
AE-HA	401.03 ± 44.05 ^b	324.98 ± 40.10 ^b	未測定	未測定
AE-FE	91.74 ± 4.17 ^a	286.75 ± 3.76 ^b	68.74 ± 5.69	未測定
Gp-DN	88.85 ± 7.80 ^a	174.94 ± 4.27 ^a	16.68 ± 0.47 ^a	96.71 ± 2.33 ^a
Gp-HA	37.56 ± 1.33 ^b	>500	19.41 ± 1.38 ^a	32.33 ± 2.41 ^b
Gp-FE	58.27 ± 0.98 ^c	86.19 ± 3.15 ^b	34.11 ± 2.50 ^b	480.63 ± 25.00 ^c
PS-DN			無	
PS-HA			無	
PS-FE			無	

注: ^a, ^b, ^c 同列において異なる上付き文字は有意差があることを示す (* p < 0.05、同じ抽出物内の比較結果)。

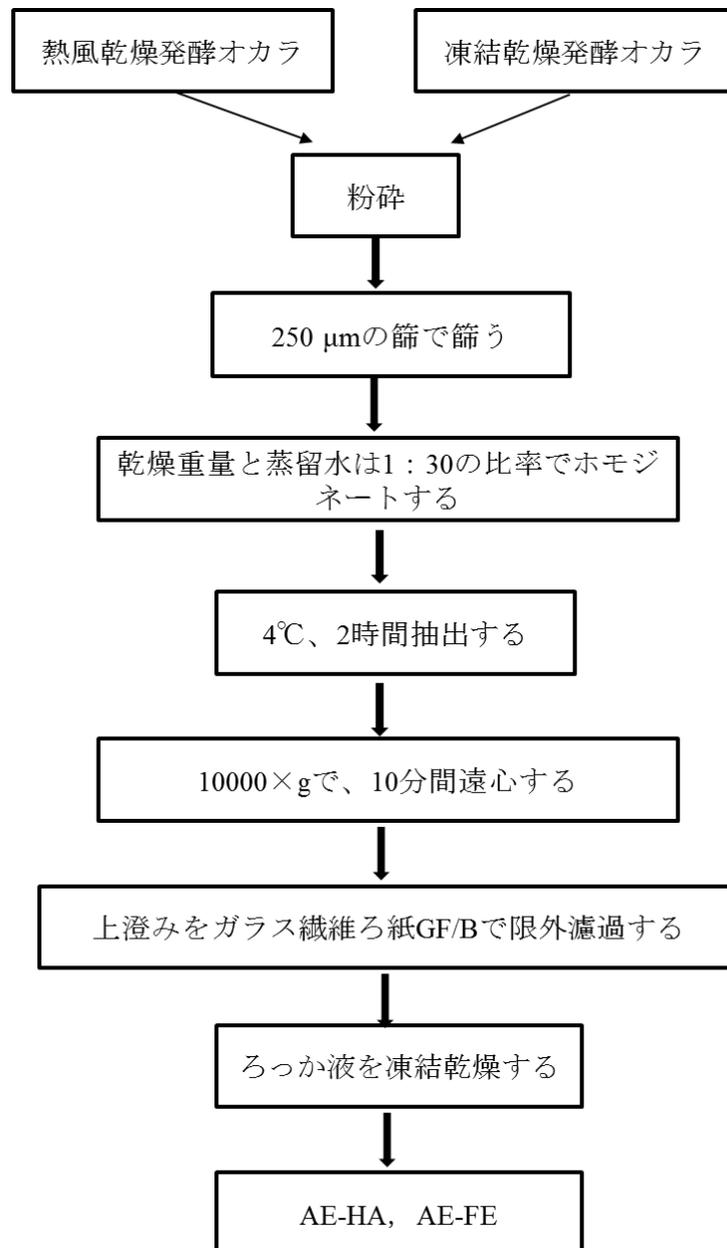


図 4-1 熱風乾燥、凍結乾燥された発酵オカラの水溶性物質の抽出ステップ

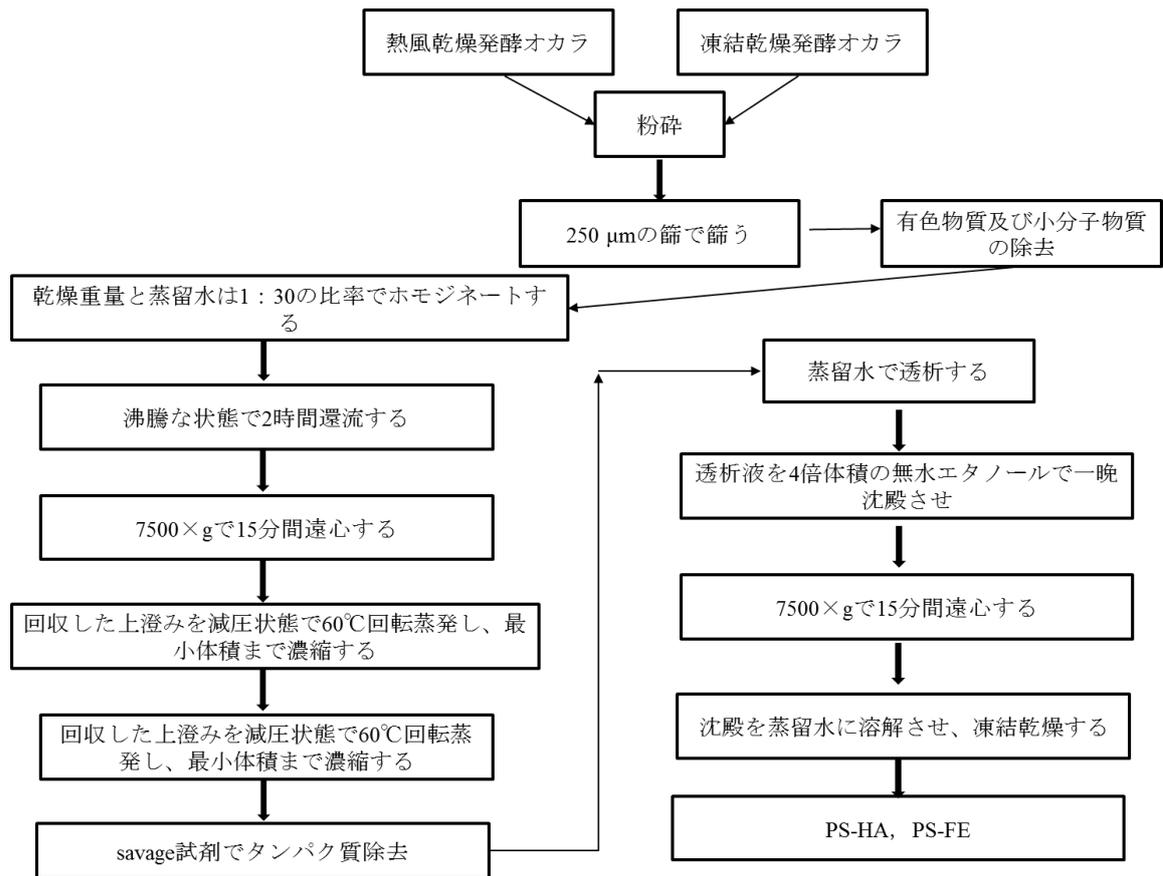


図 4-2 熱風乾燥、凍結乾燥された発酵オカラの多糖類の抽出ステップ

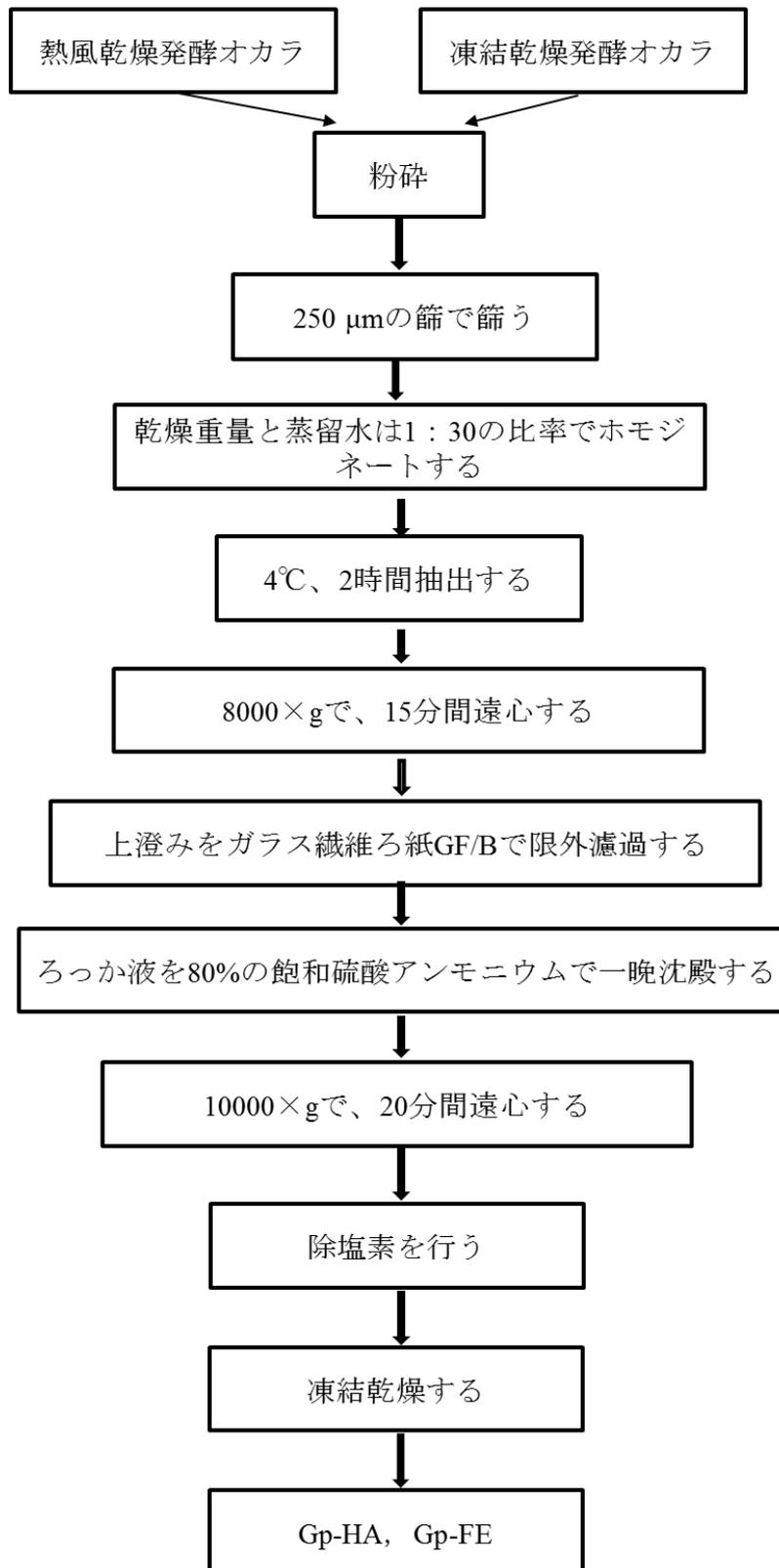


図 4-3 熱風乾燥、凍結乾燥された発酵オカラの糖タンパク質の抽出ステップ

a



b



c



図 4-4 三種類の乾燥処理を行った発酵オカラ

- a. 冷凍乾燥後粉砕された発酵オカラ;
- b. 熱風乾燥後粉砕された発酵オカラ;
- c. 無乾燥発酵オカラ

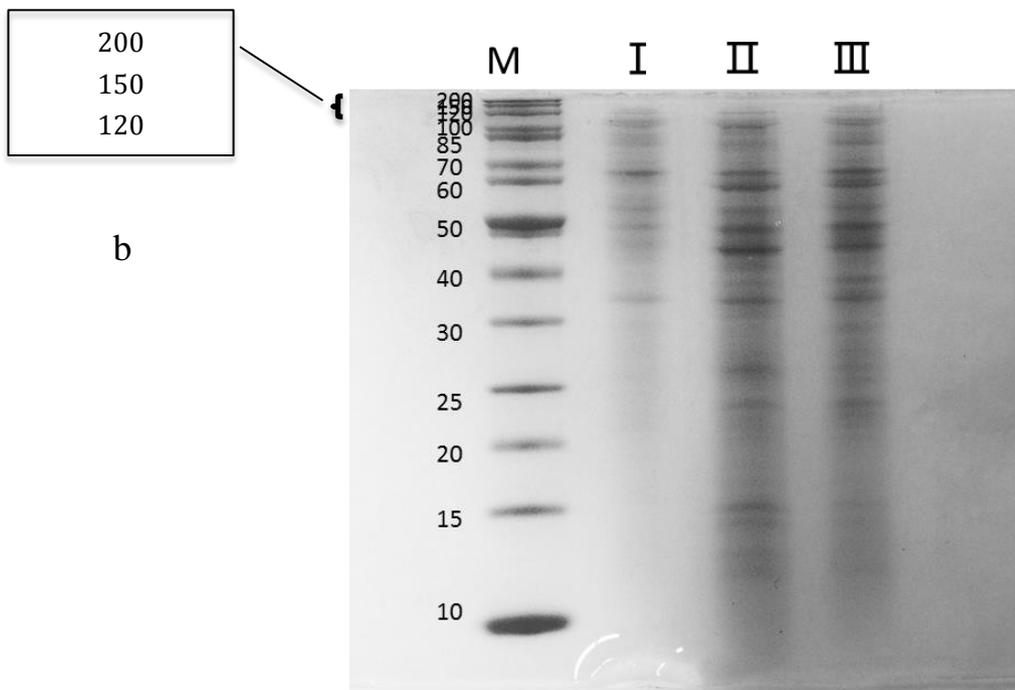
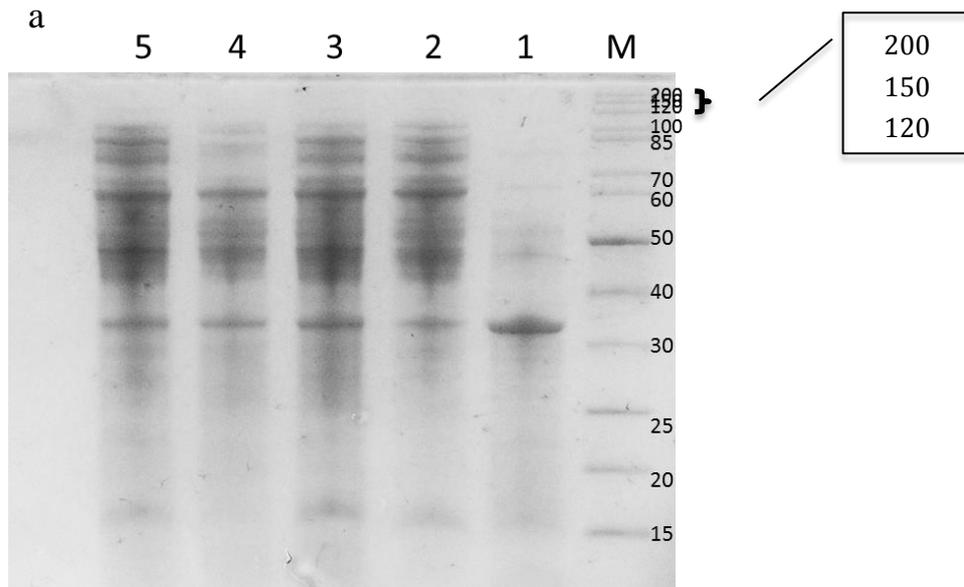


図 4-5 水溶性物質及び糖タンパク質の Tricine-SDS-PAGE 電気泳動

a に糖タンパク質の Tricine-SDS-PAGE 電気泳動の結果を示す。

(M:マーカー、単位は kD; バンド 1 :分子量 \leq 50kD の Gp-DN; バンド 2: 分子量 \geq 50 kD の Gp-DN; バンド 3 :Gp-DN; バンド 4:Gp-HA; バンド 5:Gp-FE);

b に水溶性物質の Tricine-SDS-PAGE 電気泳動の結果を示す。

(M:マーカー、単位は kD; バンド I :AE-HA; バンド II :AE-DN; バンド III:AE-FE)。

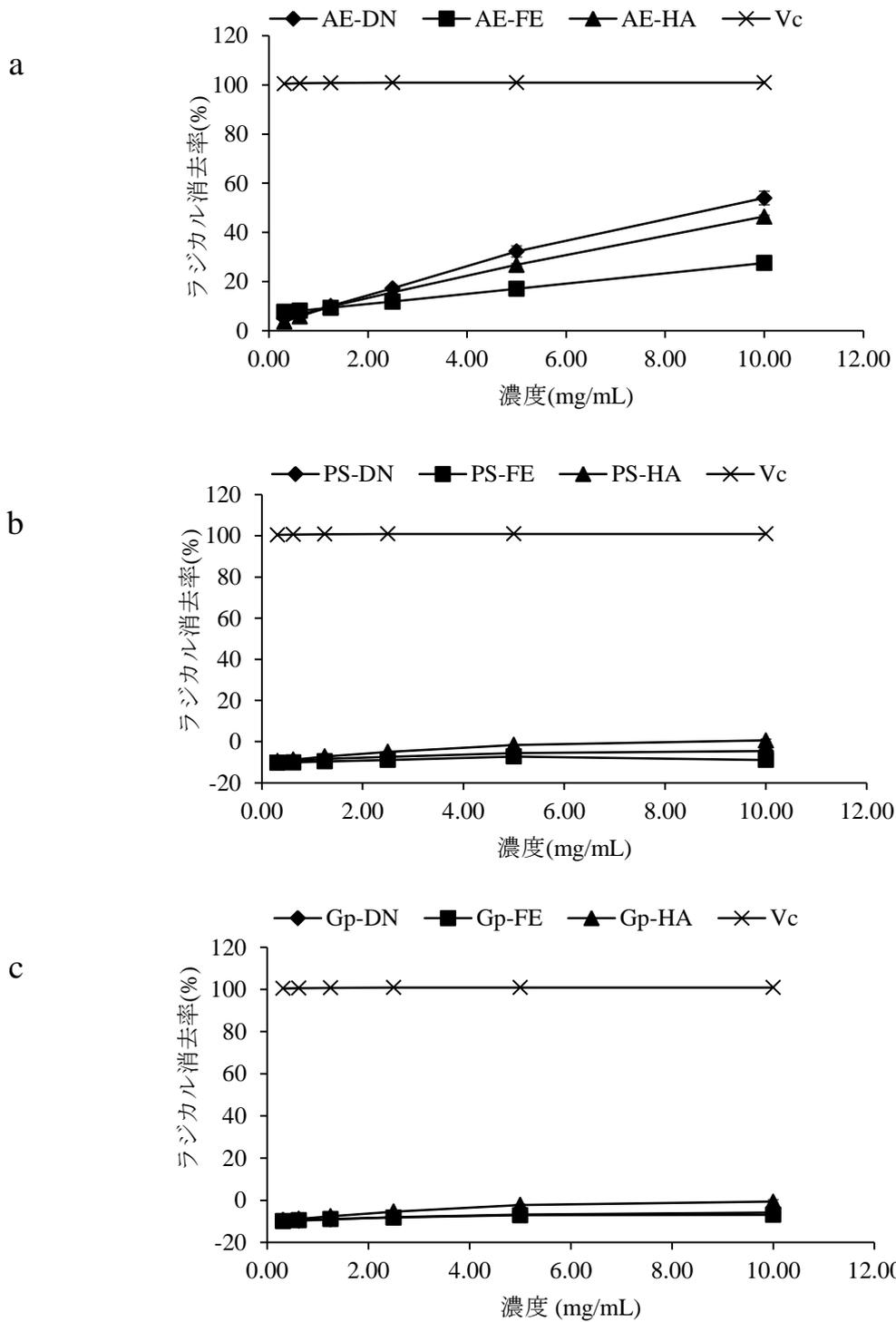


図 4-6 各抽出物の DPPH ラジカル消去活性

a: 水溶性物質; b: 多糖類; c: 糖タンパク質; Vc: ビタミン C、ポジティブコントロール

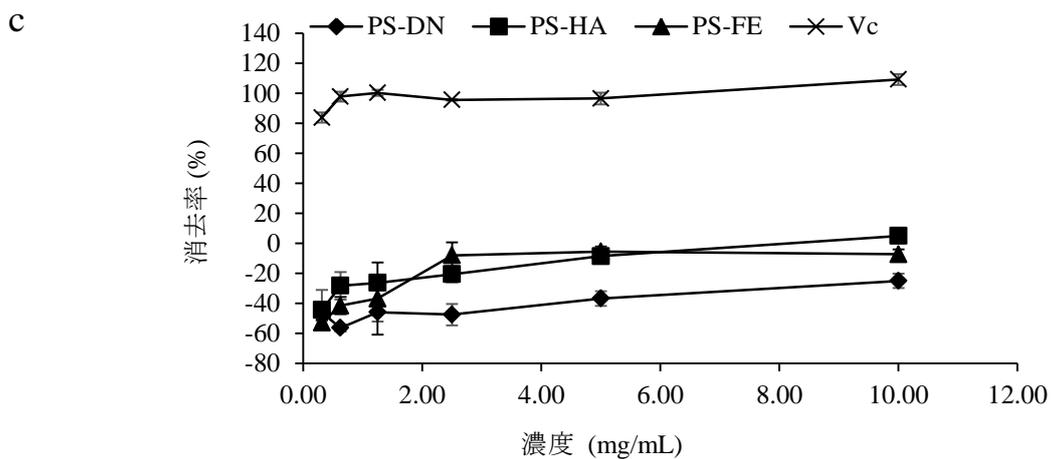
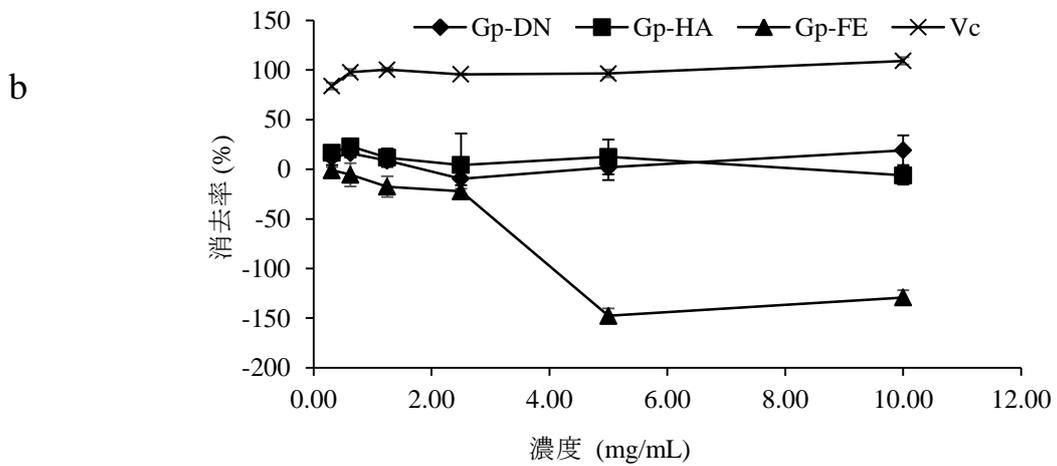
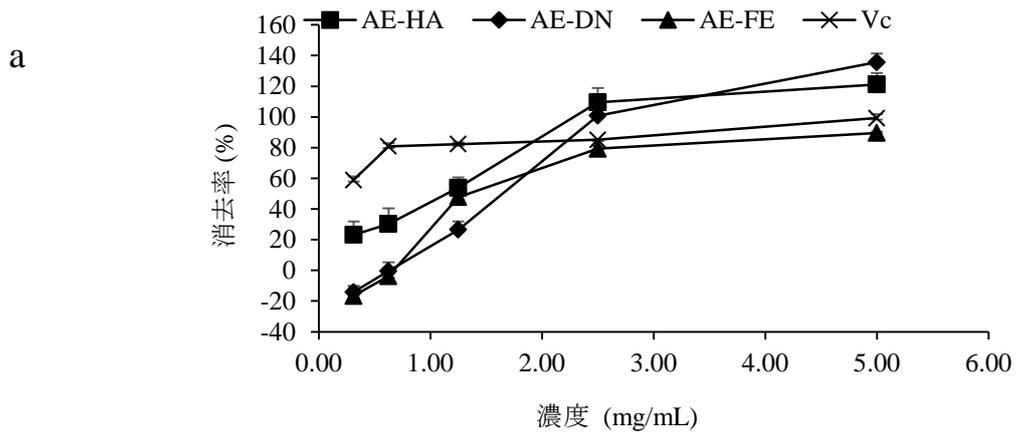


図 4-7 各抽出物の $\cdot\text{OH}$ 消去活性

a: 水溶性物質; b: 糖タンパク質; c: 多糖類; Vc: ビタミンC、ポジティブコントロール

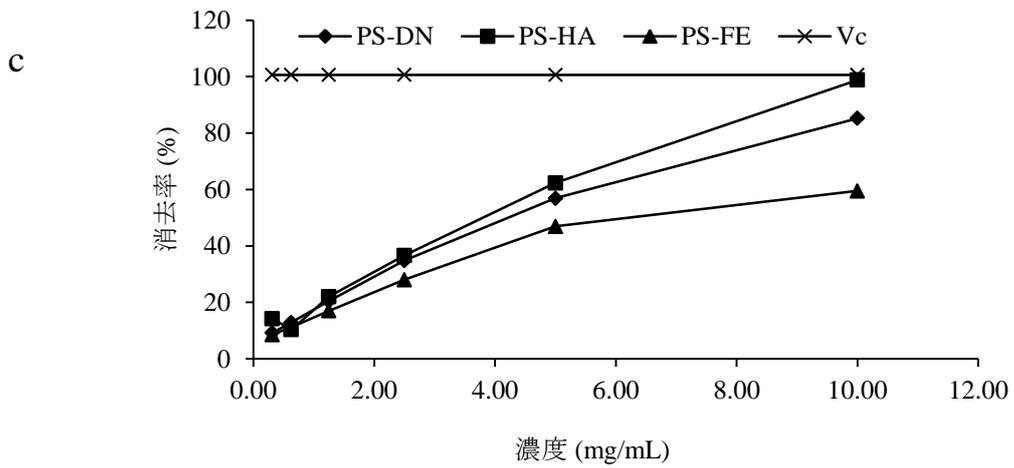
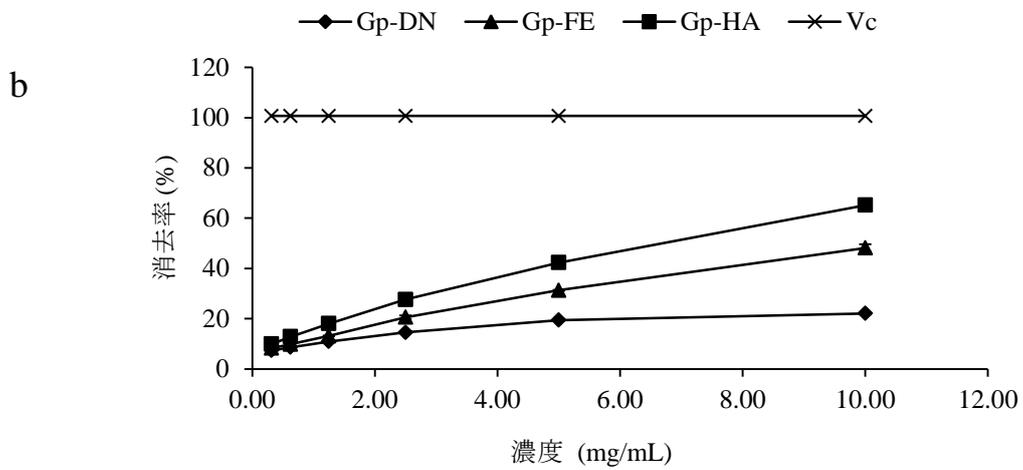
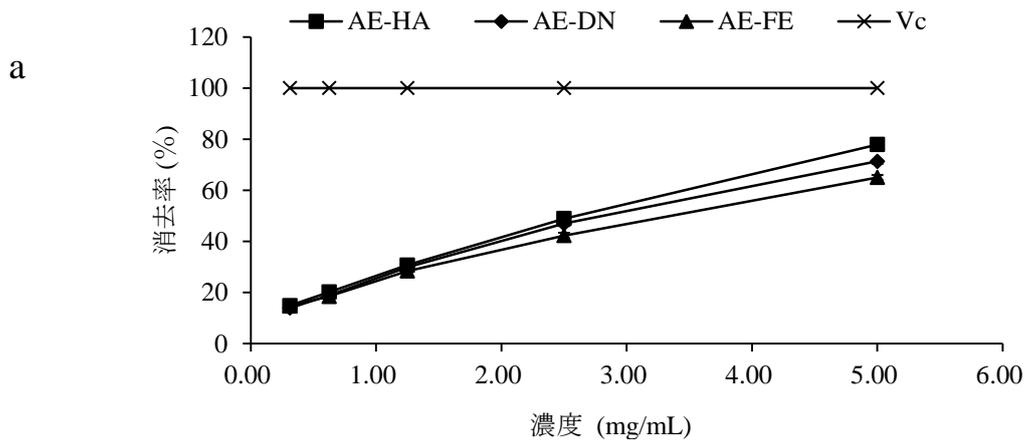


図 4-8 各抽出物の ABTS⁺消去活性

a: 水溶性物質; b: 糖タンパク質; c: 多糖類; Vc: ビタミンC、ポジティブコントロール

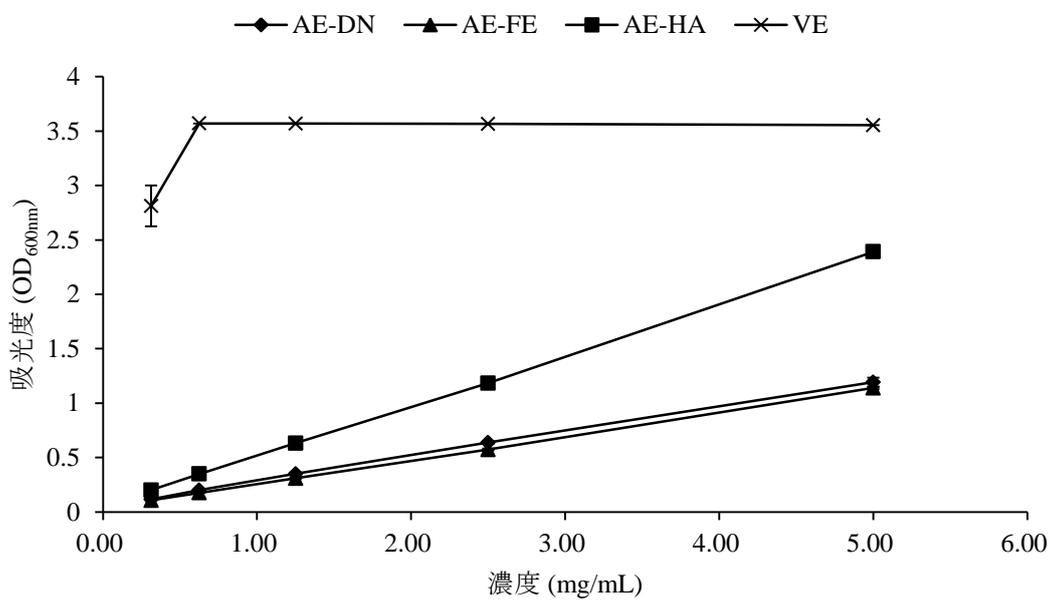


図 4-9 発酵オカラから抽出された水溶性物質の還元力

VE: ビタミンE、ポジティブコントロール

AE: 水溶性物質; DN: 無乾燥; FE: 凍結乾燥; HA: 熱風乾燥

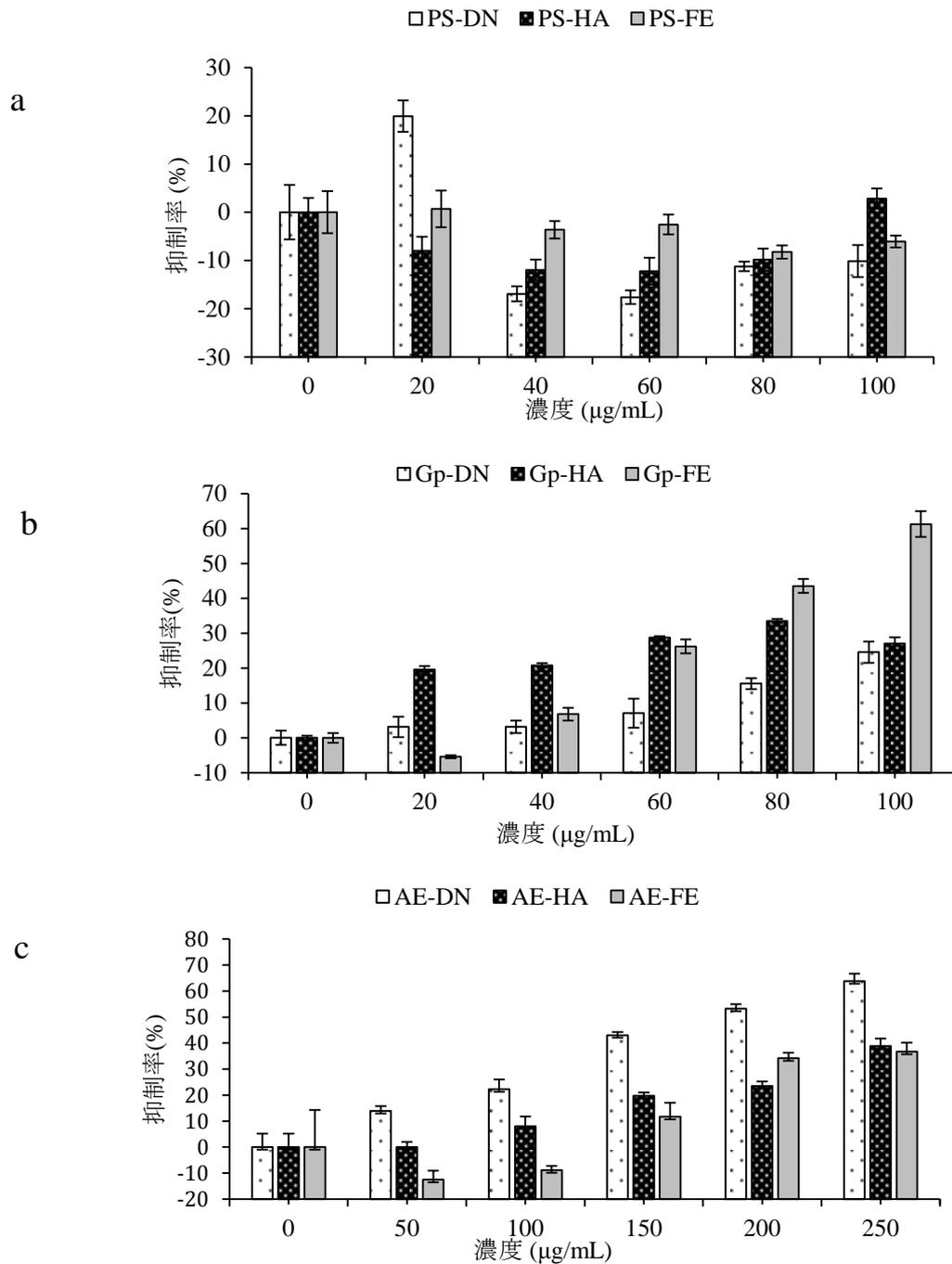


図 4-10 各抽出物の HepG2 に対する増殖抑制作用

a. 糖タンパク質; b. 多糖類

サンプルの最終濃度を 20、40、60、80、100 µg/mL にし、処理時間は 48 時間であった;

c. 水溶性物質

サンプルの最終濃度を 50、100、150、200、250 µg/mL にし、処理時間は 48 時間であった。データは平均値±SD により示す。

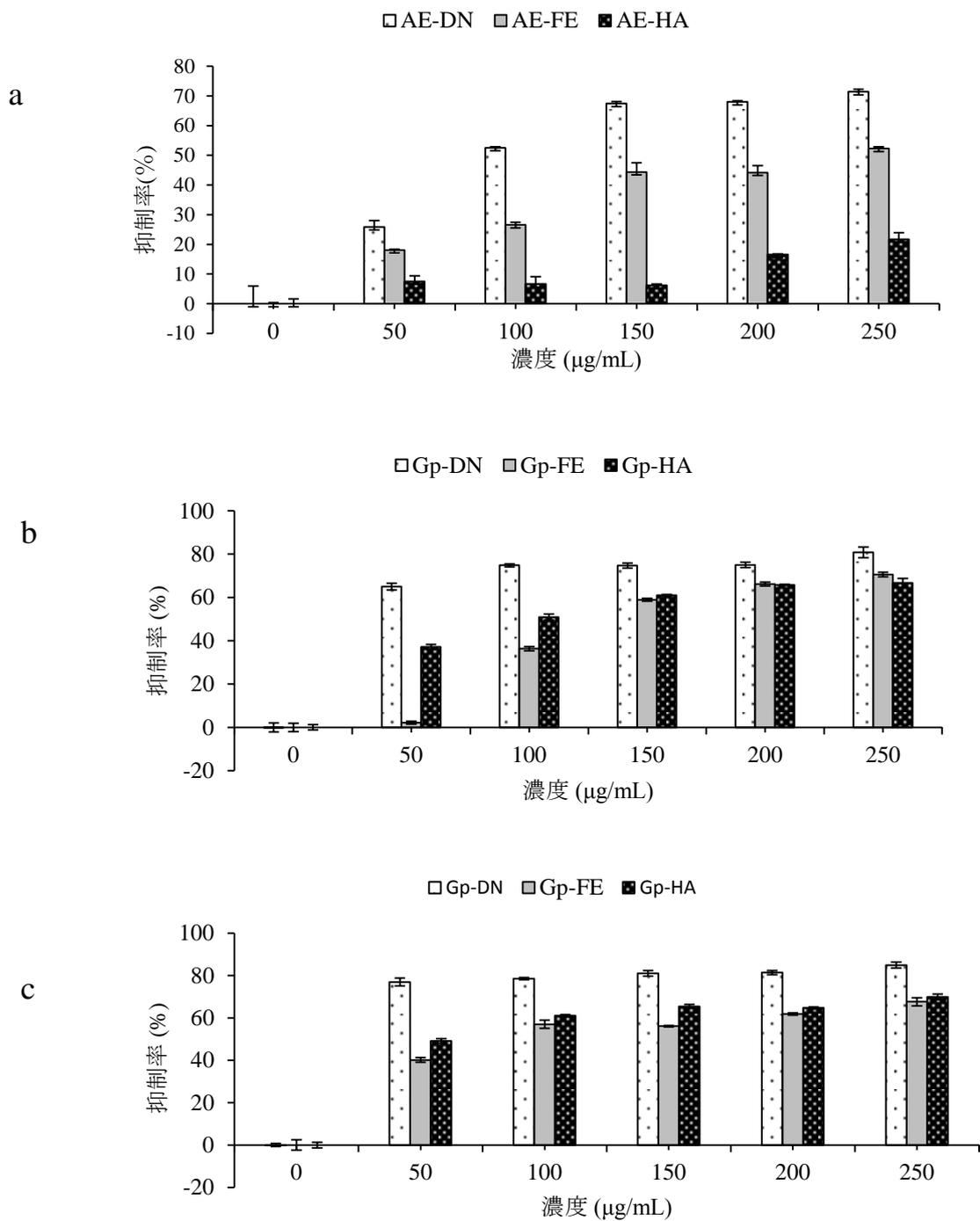


図 4-11 HeLa に対する増殖抑制作用

a. 水溶性物質; b. 多糖類糖、処理時間は 24 時間であった;

c. 糖タンパク質、処理時間は 48 時間であった;

全部のサンプルの最終濃度を 50、100、150、200、250 µg/mL にした。データは平均値±SD により示す。

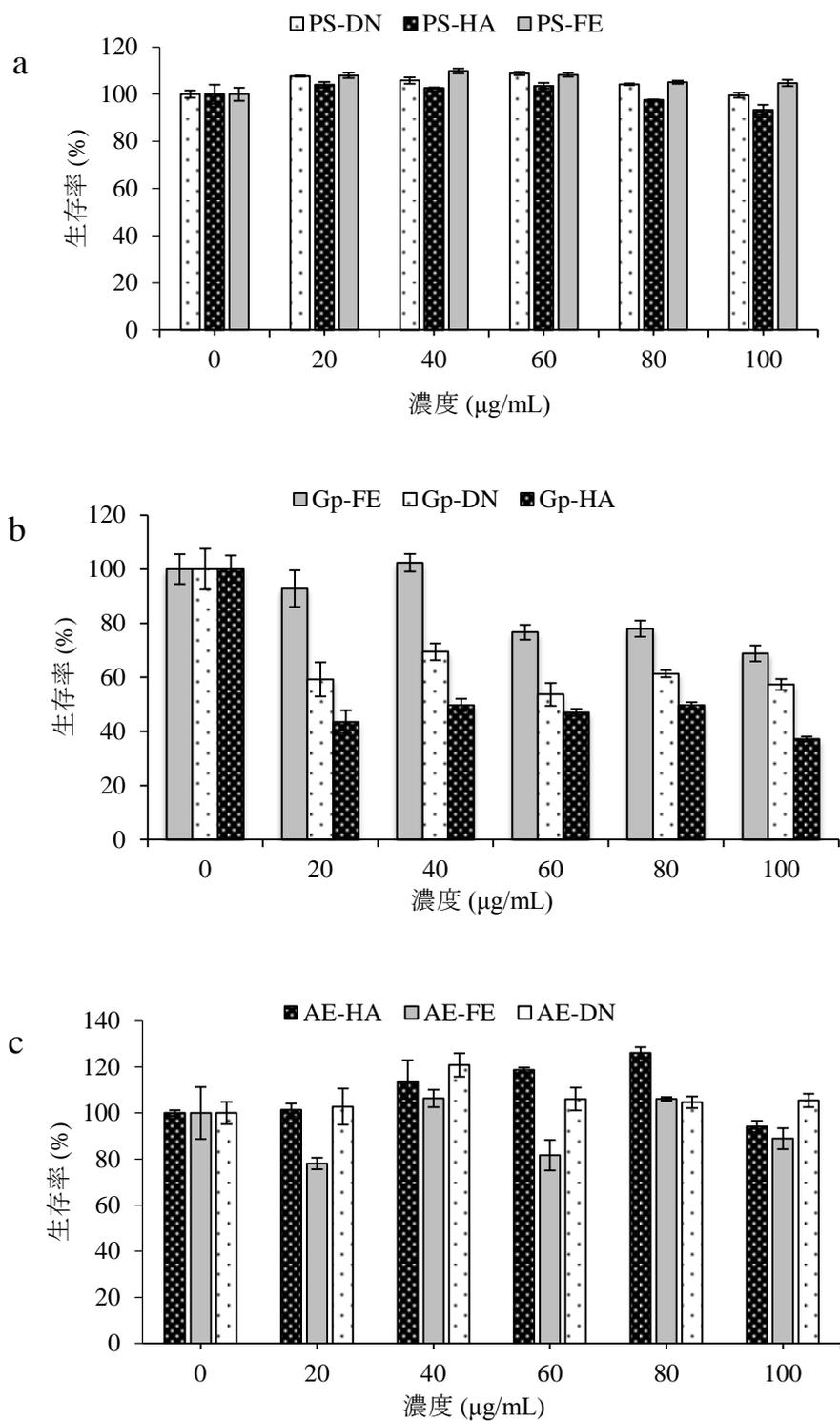


図 4-12 各抽出物は RAW264.7 の生存率に対する影響

a: 多糖類; b: 糖タンパク質; c: 水溶性物質;

サンプルの最終濃度を 20、40、60、80、100 µg/mL にし、処理時間は 24 時間であった。データは平均値 ± SD により示す。

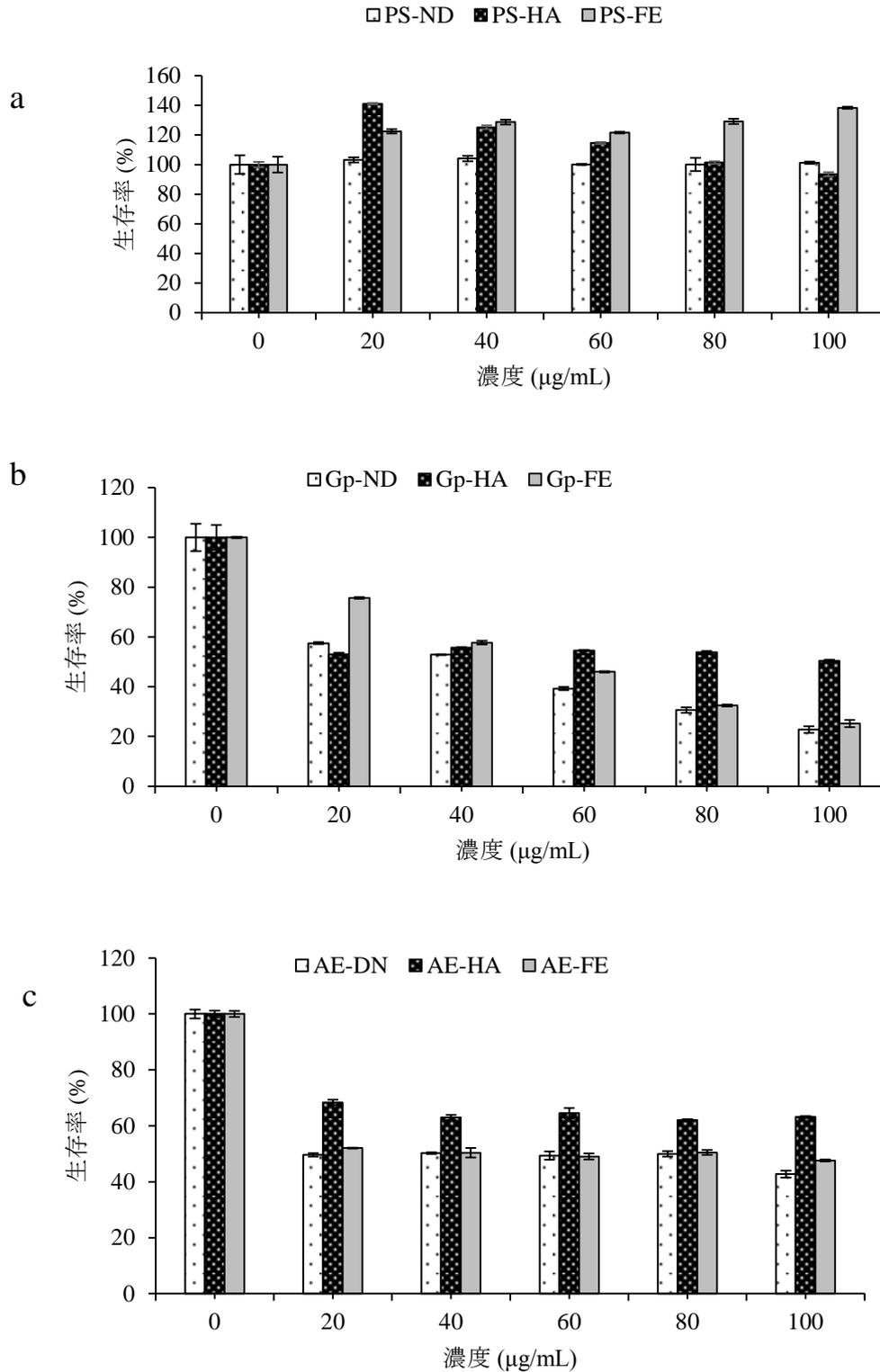


図 4-13 各抽出物は RAW264.7 の生存率に対する影響

a: 多糖類; b: 糖タンパク質; c: 水溶性物質;

サンプルの最終濃度を 20、40、60、80、100 µg/mL にし、処理時間は 48 時間であった。データは平均値 ± SD により示す。

第5章 総括

本研究では、まず舞茸菌株を用いたオカラの発酵及び発酵前後の比較を行った(第2章)。未発酵オカラより発酵オカラの方は最も高い生理活性を有することが確認された上、次に発酵オカラからの水溶性物質、多糖類、糖タンパク質の抽出及びその生理活性評価を行った(第3章)。しかしながら、現実の生産過程において、保存や運輸のコストを低減するため、発酵物に対する乾燥処理が必要で、従って本研究において、発酵物に対する乾燥処理は有用物質の抽出に対する影響を検討するため、さらに舞茸発酵オカラに対して、3種類の乾燥処理、熱風乾燥(HA)、凍結乾燥(FE)、無乾燥(DN)であった。乾燥処理した後、それぞれ水溶性物質(AE-HA、AE-FE、AE-DN)、多糖類(PS-HA、PS-FE、PS-DN)、糖タンパク質(Gp-HA、Gp-FE、Gp-DN)の抽出及び生理活性の比較を行った(第4章)。

本研究の結論を以下に示す。

(1) 舞茸菌糸を用いたオカラ発酵条件が確立された。舞茸菌糸を用いた発酵により様々な有機物の利用と共にオカラの構造、栄養成分、水溶性物質の生理活性等に関して有益な効果が確認された。また本研究で、培地としてオカラを利用した場合、オカラの利用率は高く、生産コストは低いことから、オカラのリサイクルに有用な基礎情報を提供できた。

(2) 舞茸発酵オカラから抽出された AE-DN、PS-DN 及び Gp-DN は $\cdot\text{OH}$ と $\text{ABTS}^{\cdot+}$ に対して抗酸化生理活性を有することが確認された。AE-DN と PS-DN は Gp-DN より最も高い抗酸化生理活性を有することも確認された。すべての抽出物は RAW264.7 に対する増殖促進作用が確認されなかった。また、Gp-DN は RAW264.7 に対して低い毒性があることも確認された。抗ガン生理活性に関して、HepG2 と HeLa に対する増殖抑制効果を示したのは AE-DN

及び Gp-DN であった。HepG2 と HeLa に対して濃度と時間的な依存性があることが確認された。それと同時に、AE-DN 及び Gp-DN は正常細胞の C2C12 に対して毒性を有することも確認された。AE-DN、Gp-DN 及び PS-DN は全て粗抽出物であった。しかしながら、生理活性物質が含有されていることが証明された。続いて純化を行えば優れた抗酸化剤、抗ガン成分を得ることが期待でき、子実体の抗ガン成分の抽出よりコストが低い。従って、舞茸を用いたオカラ発酵はオカラの新規リサイクル方法の一つとして、食品添加物、肥料、飼料等の開発に有用な基礎情報を提供できた。

(3) 発酵オカラの熱風乾燥と凍結乾燥は糖タンパク質抽出に対して影響があることが確認された。例えばタンパク質の含有量、タンパク質の種類に対する影響があった。又、抽出物の抗酸化生理活性と抗ガン生理活性に対しても影響があることが証明された。本研究において発酵物の熱風乾燥と無乾燥は抽出物の生理活性が相似であった。発酵物の保存・輸送等のコストを低減に有用な基礎情報を提供できた。

謝 辞

本研究は、筑波大学生命環境科学研究科の張振亜教授の懇切なご指導のもとに行われ、ご助言およびご教示をいただきましたこと、心から御礼を申し上げます。また本論文を作成するにあたり、多くの貴重なご助言をいただいた楊英男准教授に心から御礼を申し上げます。

そして、論文審査において大変お世話になり、本論文を作成するにあたり懇篤なるご指導とご高閲を承りました筑波大学生命環境科学研究科の山路恵子准教授、内海真生准教授、天津大学環境科学与工程学院の宋英今准教授に心から御礼申し上げます。

さらに、懇切なご助言と教示をいただきました筑波大学生命環境科学研究科の雷中方准教授、本論文の作成に研究活動において多大なご協力をいただきました筑波大学大学院生命環境科学研究科張研究室の皆様に対して心より深く感謝いたします。

最後に、ずっと励ましそして物質的にも及び精神的にも支えてくれた両親と夫に心から深く感謝いたします。

参考文献

1. Jing Y, Chi YJ. Effects of twin-screw extrusion on soluble dietary fibre and physicochemical properties of soybean residue. *Food Chemistry*. 2013;138:884-889.
2. Khare S, Jha K, Gandhi A. Citric acid production from okara (soy-residue) by solid-state fermentation. *Bioresource technology*. 1995;54:323-325.
3. 清水祥子. 翻刻「江戸時代料理本集成」に見るおから料理. 長野女子短期大学研究紀要. 1999;7:31-38.
4. Franzen KL, Kinsella JE. Functional properties of succinylated and acetylated soy protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1976;24:788-795.
5. Nguyen T, Ngo H, Guo W, Zhou J, Wang J, Liang H, et al. Phosphorus elimination from aqueous solution using 'zirconium loaded okara' as a biosorbent. *Bioresource Technology*. 2014;170:30-37.
6. Van der Riet W, Wight A, Cilliers J, Dattel J. Food chemical investigation of tofu and its byproduct okara. *Food Chemistry*. 1989;34:193-202.
7. Ma C-Y, Liu W-S, Kwok KC, Kwok F. Isolation and characterization of proteins from soymilk residue (okara). *Food Research International*. 1996;29:799-805.
8. Lima FSD, Kurozawa LE, Ida EI. The effects of soybean soaking on grain properties and isoflavones loss. *LWT-Food Science and Technology*. 2014;59:1274-1282.
9. Jankowiak L, Kantzas N, Boom R, van der Goot AJ. Isoflavone extraction from okara using water as extractant. *Food Chemistry*. 2014;160:371-378.
10. Lu F, Liu Y, Li B. Okara dietary fiber and hypoglycemic effect of okara foods. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 2013;2:126-132.
11. Chan W-M, Ma C-Y. Acid modification of proteins from soymilk residue (okara). *Food Research International*. 1999;32:119-127.
12. Shi M, Yang Y, Hu X, Zhang Z. Effect of ultrasonic extraction conditions on antioxidative and immunomodulatory activities of a *Ganoderma lucidum* polysaccharide originated from fermented soybean curd residue. *Food Chemistry*. 2014;155:50-56.
13. Shi M, Yang Y, Guan D, Zhang Y, Zhang Z. Bioactivity of the crude polysaccharides from fermented soybean curd residue by *Flammulina velutipes*. *Carbohydrate Polymers*.

2012;89:1268-1276.

14. Nguyen T, Ngo H, Guo W, Nguyen T, Zhang J, Liang S, et al. A comparative study on different metal loaded soybean milk by-product 'okara' for biosorption of phosphorus from aqueous solution. *Bioresource Technology*. 2014;169:291-298.
15. Fraga I, Coutinho J, Bezerra RM, Dias AA, Marques G, Nunes FM. Influence of culture medium growth variables on *Ganoderma lucidum* exopolysaccharides structural features. *Carbohydrate Polymers*. 2014;111:936-946.
16. Li N, Yan C, Hua D, Zhang D. Isolation, purification, and structural characterization of a novel polysaccharide from *Ganoderma capense*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013;57:285-290.
17. Cui F, Zan X, Li Y, Yang Y, Sun W, Zhou Q, et al. Purification and Partial Characterization of a Novel Anti-tumor Glycoprotein from Cultured Mycelia of *Grifola frondosa*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013;62:684-690.
18. Nitha B, Janardhanan K. Aqueous-ethanolic extract of morel mushroom mycelium *Morchella esculenta*, protects cisplatin and gentamicin induced nephrotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46:3193-3199.
19. Nitha B, Fijesh P, Janardhanan K. Hepatoprotective activity of cultured mycelium of Morel mushroom, *Morchella esculenta*. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2013;65:105-112.
20. Mau J-L, Chang C-N, Huang S-J, Chen C-C. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *Food Chemistry*. 2004;87:111-118.
21. Gursoy N, Sarikurkcu C, Cengiz M, Solak MH. Antioxidant activities, metal contents, total phenolics and flavonoids of seven *Morchella* species. *Food and Chemical Toxicology*. 2009;47:2381-2388.
22. Heleno SA, Stojković D, Barros L, Glamočlija J, Soković M, Martins A, et al. A comparative study of chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Morchella esculenta*(L.) Pers. from Portugal and Serbia. *Food Research International*. 2013;51:236-243.
23. Nitha B, Fijesh PV, Janardhanan KK. Hepatoprotective activity of cultured mycelium of Morel mushroom, *Morchella esculenta*. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*. 2013;65:105-112.

24. Nitha B, Janardhanan KK. Aqueous-ethanolic extract of morel mushroom mycelium *Morchella esculenta*, protects cisplatin and gentamicin induced nephrotoxicity in mice. Food and Chemical Toxicology. 2008;46:3193-199.
25. Xu H, Sun L-P, Shi Y-Z, Wu Y-H, Zhang B, Zhao D-Q. Optimization of cultivation conditions for extracellular polysaccharide and mycelium biomass by *Morchella esculenta* As51620. Biochemical Engineering Journal. 2008;39:66-73.
26. Li S, Sang Y, Zhu D, Yang Y, Lei Z, Zhang Z. Optimization of fermentation conditions for crude polysaccharides by *Morchella esculenta* using soybean curd residue. Industrial Crops and Products. 2013;50:666-672.
27. Meng F, Zhou B, Lin R, Jia L, Liu X, Deng P, et al. Extraction optimization and *in vivo* antioxidant activities of exopolysaccharide by *Morchella esculenta* SO-01. Bioresource Technology. 2010;101:4564-4569.
28. Shashidhar M, Giridhar P, Udaya Sankar K, Manohar B. Bioactive principles from *Cordyceps sinensis*: A potent food supplement—A review. Journal of Functional Foods. 2013;5:1013-1030.
29. Lu W-J, Chang N-C, Jayakumar T, Liao J-C, Lin M-J, Wang S-H, et al. Ex vivo and in vivo studies of CME-1, a novel polysaccharide purified from the mycelia of *Cordyceps sinensis* that inhibits human platelet activation by activating adenylate cyclase/cyclic AMP. Thrombosis Research. 2014;134:1301-1310.
30. Chen J, Zhang W, Lu T, Li J, Zheng Y, Kong L. Morphological and genetic characterization of a cultivated *Cordyceps sinensis* fungus and its polysaccharide component possessing antioxidant property in H22 tumor-bearing mice. Life Sciences. 2006;78:2742-2748.
31. Chiou W-F, Chang P-C, Chou C-J, Chen C-F. Protein constituent contributes to the hypotensive and vasorelaxant activities of *cordyceps sinensis*. Life Sciences. 2000;66:1369-1376.
32. Cleaver PD, Loomis-Powers M, Patel D. Analysis of Quality and Techniques for Hybridization of Medicinal Fungus *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.(Ascomycetes). International Journal of Medicinal Mushrooms. 2004;6:151-164.
33. Seto SW, Lam TY, Tam HL, Au ALS, Chan SW, Wu JH, et al. Novel hypoglycemic effects of *Ganoderma lucidum* water-extract in obese/diabetic (+db/db) mice. Phytomedicine. 2009;16:426-436.
34. Lu Q-Y, Jin Y-S, Zhang Q, Zhang Z, Heber D, Go VLW, et al. *Ganoderma lucidum* extracts

inhibit growth and induce actin polymerization in bladder cancer cells in vitro. *Cancer Letters*. 2004;216:9-20.

35. Shi M, Zhang Z, Yang Y. Antioxidant and immunoregulatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP). *Carbohydrate Polymers*. 2013;95:200-206.

36. Hobbs C. Medicinal mushrooms: an exploration of tradition, healing & culture: Botanica Press; 1995.

37. Xu H, Liu J-h, Shen Z-y, Fei Y, Chen X-D. Analysis of chemical composition, structure of *Grifola frondosa* polysaccharides and its effect on skin TNF- α levels, IgG content, T lymphocytes rate and caspase-3 mRNA. *Carbohydrate Polymers*. 2010;82:687-691.

38. Mao G, Zou Y, Feng W, Wang W, Zhao T, Ye C, et al. Extraction, preliminary characterization and antioxidant activity of Se-enriched Maitake polysaccharide. *Carbohydrate polymers*. 2014;101:213-219.

39. Shih IL, Chou BW, Chen CC, Wu JY, Hsieh C. Study of mycelial growth and bioactive polysaccharide production in batch and fed-batch culture of *Grifola frondosa*. *Bioresource Technology*. 2008;99:785-793.

40. Gu C-Q, Li J-W, Chao F, Jin M, Wang X-W, Shen Z-Q. Isolation, identification and function of a novel anti-HSV-1 protein from *Grifola frondosa*. *Antiviral Research*. 2007;75:250-257.

41. Matsui K, Kodama N, Nanba H. Effects of Maitake (*Grifola frondosa*) D-Fraction on the carcinoma angiogenesis. *Cancer Letters*. 2001;172:193-198.

42. Nonaka T, Hashimoto Y, Takiot K. Kinetic characterization of lysine-specific metalloendopeptidases from *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. *Journal of Biochemistry*. 1998;124:157-162.

43. Dey B, Bhunia SK, Maity KK, Patra S, Mandal S, Behera B, et al. Structure and immunology of a heteroglycan from somatic hybrid mushroom of *Pleurotus florida* and *Calocybe indica* var. APK2. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013;52:312-318.

44. Kamiya Y, Satoh T, Kato K. Recent advances in glycoprotein production for structural biology: toward tailored design of glycoforms. *Current Opinion in Structural Biology*. 2014;26:44-53.

45. Engelking LR. Chapter 20 – Glycoproteins and Glycolipids. Academic Press in an imprint of Elsevier.2015.

46. Ernst B, Magnani JL. From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2009;8:661-677.
47. Abou Zeid AH, Aboutabl EA, Sleem AA, El-Rafie HM. Water soluble polysaccharides extracted from *Pterocladia capillacea* and *Dictyopteris membranacea* and their biological activities. *Carbohydrate Polymers*. 2014;113:62-66.
48. Karunasena HCP, Brown RJ, Gu YT, Senadeera W. Application of meshfree methods to numerically simulate microscale deformations of different plant food materials during drying. *Journal of Food Engineering*. 2015;146:209-226.
49. Fernandes Â, Barros L, Barreira JCM, Antonio AL, Oliveira MBPP, Martins A, et al. Effects of different processing technologies on chemical and antioxidant parameters of *Macrolepiota procera* wild mushroom. *LWT - Food Science and Technology*. 2013;54:493-499.
50. Li X, Feng T, Zhou F, Zhou S, Liu Y, Li W, et al. Effects of drying methods on the tasty compounds of *Pleurotus eryngii*. *Food Chemistry*. 2015;166:358-364.
51. Haiying W, Shaozhi Z, Guangming C. Experimental study on the freezing characteristics of four kinds of vegetables. *LWT - Food Science and Technology*. 2007;40:1112-1116.
52. Tsai S-Y, Weng C-C, Huang S-J, Chen C-C, Mau J-L. Nonvolatile taste components of *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *LWT-Food Science and Technology*. 2006;39:1066-1071.
53. Yang B-K, Gu Y-A, Jeong Y-T, Jeong H, Song C-H. Chemical characteristics and immuno-modulating activities of exo-biopolymers produced by *Grifola frondosa* during submerged fermentation process. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2007;41:227-233.
54. Kubo K, Aoki H, Nanba H. Anti-diabetic activity present in the fruit body of *Grifola frondosa* (Maitake). I. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 1994;17:1106-1110.
55. Cui FJ, Tao WY, Xu ZH, Guo WJ, Xu HY, Ao ZH, et al. Structural analysis of anti-tumor heteropolysaccharide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801. *Bioresource Technology*. 2007;98:395-401.
56. Miyake N, Masuda Y, Munechika Inoue YM, Matuda K, Okamoto K, Nanba H, et al. Low molecular weight maitake MD-Fraction (Klasma-MD) hydrolyzed with endo- β -1,6-gluconase of *Trichoderma harzianum* induces antitumor activities. *Mycoscience*. 2006;47:78-83.

57. Chen G-t, Ma X-M, Liu S-T, Liao Y-L, Zhao G-Q. Isolation, purification and antioxidant activities of polysaccharides from *Grifola frondosa*. *Carbohydrate Polymers*. 2012;89:61-66.
58. Nanba H, Kodama N, Schar D, Turner D. Effects of Maitake (*Grifola frondosa*) glucan in HIV-infected patients. *Mycoscience*. 2000;41:293-295.
59. Lin H, She Y-H, Cassileth BR, Sirotiak F, Cunningham Rundles S. Maitake beta-glucan MD-fraction enhances bone marrow colony formation and reduces doxorubicin toxicity in vitro. *International Immunopharmacology*. 2004;4:91-99.
60. Kabir Y, Yamaguchi M, Kimura S. Effect of shiitake (*Lentinus edodes*) and maitake (*Grifola frondosa*) mushrooms on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 1987;33:341-346.
61. Shi M, Zhang Z, Yang Y. Antioxidant and immunoregulatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP). *Carbohydrate Polymers*. 2013;95:200-206.
62. Li S, Zhu D, Li K, Yang Y, Lei Z, Zhang Z. Soybean Curd Residue: Composition, Utilization, and Related Limiting Factors. *International Scholarly Research Notices*. 2013.
63. Bizukojc M, Ledakowicz S. The morphological and physiological evolution of *Aspergillus terreus* mycelium in the submerged culture and its relation to the formation of secondary metabolites. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010;26:41-54.
64. Cui FJ, Li Y, Xu ZH, Xu HY, Sun K, Tao WY. Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and exo-polymer by *Grifola frondosa* GF9801 using response surface methodology. *Bioresource Technology*. 2006;97:1209-1216.
65. Chou C-C, Ling M-Y. Biochemical changes in soy sauce prepared with extruded and traditional raw materials. *Food Research International*. 1998;31:487-492.
66. TAKUYA NISHI KT. Accumulation of L-Cystathionine by an *Escherichia coli* Mutant Deficient in Cystathionine Beta-Lyase *Bioscience and Bioengineering*. 2002;94:178-181.
67. de Araújo AA, Soares LAL, Assunção Ferreira MR, de Souza Neto MA, da Silva GR, de Araújo Jr RF, et al. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014;156:88-96.
68. Fan L, Li J, Deng K, Ai L. Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*.

2012;87:1849-1854.

69. Zhao T, Mao G, Mao R, Zou Y, Zheng D, Feng W, et al. Antitumor and immunomodulatory activity of a water-soluble low molecular weight polysaccharide from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. Food and Chemical Toxicology. 2013;55:609-616.

70. Song G, Du Q. Structure characterization and antitumor activity of an α β -glucan polysaccharide from *Auricularia polytricha*. Food Research International. 2012;45:381-387.

71. Staub A. Removal of protein-Sevag method. Methods in Carbohydrate Chemistry. 1965;5:5-6.

72. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology. 1995;28:25-30.

73. Liu W, Wang H, Pang X, Yao W, Gao X. Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. International Journal of Biological Macromolecules. 2010;46:451-457.

74. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine. 1999;26:1231-1237.

75. Yuan J-F, Zhang Z-Q, Fan Z-C, Yang J-X. Antioxidant effects and cytotoxicity of three purified polysaccharides from *Ligusticum chuanxiong* Hort. Carbohydrate polymers. 2008;74:822-827.

76. Tehranifar A, Selahvarzi Y, Kharrazi M, Bakhsh VJ. High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. Industrial Crops and Products. 2011;34:1523-1527.

77. Fenglin H, Ruili L, bao H, Liang M. Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. Fitoterapia. 2004;75:14-23.

78. Chen H, Zhang M, Qu Z, Xie B. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia Sinensis*). Food Chemistry. 2008;106:559-563.

79. Gülçin İ. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. Life Sciences. 2006;78:803-811.

80. Ke C, Qiao D, Gan D, Sun Y, Ye H, Zeng X. Antioxidant activity in vitro and in vivo of the

capsule polysaccharides from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Carbohydrate polymers. 2009;75:677-682.

81. Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chemistry. 2006;94:550-557.

82. Knasmüller S, Parzefall W, Sanyal R, Ecker S, Schwab C, Uhl M, et al. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 1998;402:185-202.

83. Luo M, Liu X, Zu Y, Fu Y, Zhang S, Yao L, et al. Cajanol, a novel anticancer agent from Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] roots, induces apoptosis in human breast cancer cells through a ROS-mediated mitochondrial pathway. Chemico-Biological Interactions. 2010;188:151-160.

84. Hilmi F, Gertsch J, Bremner P, Valovic S, Heinrich M, Sticher O, et al. Cytotoxic versus anti-inflammatory effects in HeLa, Jurkat and human peripheral blood cells caused by guaianolide-Type sesquiterpene lactones. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2003;11:3659-3663.

85. Parthiban P, Pallela R, Kim S-K, Park DH, Jeong YT. Synthesis of polyfunctionalized piperidone oxime ethers and their cytotoxicity on HeLa cells. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2011;21:6678-6686.

86. Chen L, Zhang X, Chen J, Zhang X, Fan H, Li S, et al. NF- κ B plays a key role in microcystin-RR-induced HeLa cell proliferation and apoptosis. Toxicon. 2014;87:120-130.

87. Areta JL, Hawley JA, Ye J-M, Chan MHS, Coffey VG. Increasing leucine concentration stimulates mechanistic target of rapamycin signaling and cell growth in C2C12 skeletal muscle cells. Nutrition Research. 2014;34:1000-1007.

88. Wahab R, Dwivedi S, Khan F, Mishra YK, Hwang IH, Shin H-S, et al. Statistical analysis of gold nanoparticle-induced oxidative stress and apoptosis in myoblast (C2C12) cells. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2014;123:664-672.

89. Martínez-Las Heras R, Heredia A, Castelló ML, Andrés A. Influence of drying method and extraction variables on the antioxidant properties of persimmon leaves. Food Bioscience. 2014;6:1-8.

90. Doymaz İ. Drying behaviour of green beans. Journal of Food Engineering. 2005;69:161-165.

91. Larrosa APQ, Cadaval Jr TRS, Pinto LAA. Influence of drying methods on the characteristics

of a vegetable paste formulated by linear programming maximizing antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. 2015;60:178-185.

92. Garau MC, Simal S, Rosselló C, Femenia A. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. *Canoneta*) by-products. *Food Chemistry*. 2007;104:1014-1024.

93. Hills BP, Remigereau B. NMR studies of changes in subcellular water compartmentation in parenchyma apple tissue during drying and freezing. *International Journal of Food Science & Technology*. 1997;32:51-61.

94. Gümüşay ÖA, Borazan AA, Ercal N, Demirkol O. Drying effects on the antioxidant properties of tomatoes and ginger. *Food Chemistry*. 2015;173:156-162.

95. Chung YC, Kuo CL, Chen CC. Preparation and important functional properties of water-soluble chitosan produced through Maillard reaction. *Bioresource Technology*. 2005;96:1473-1482.

付 録

業績リスト

誌上発表

1. **Dan Zhu**, Hongyi Sun, Shuhong Li, Xuansheng Hu, Xi Yuan, Chao Han, Zhenya Zhang. Influence of Drying Methods on Antioxidant Activities and Immunomodulatory of Aqueous Extract From Soybean Curd Residue Fermentated by *Grifola frondosa*. *International Journal of Biology*, 2015;1:82-92.
2. Shuhong Li, **Dan Zhu**, Kejuan Li, Yingnan Yang, Zhongfang Lei, and Zhenya Zhang. Soybean Curd Residue: Composition, Utilization, and Related Limiting Factors. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/423590>.
3. Shuhong Li, Yaxin Sang, **Dan Zhu**, Yingnan Yang, Zhongfang Lei, Zhenya Zhang. Optimization of fermentation conditions for crude polysaccharides by *Morchella esculenta* using soybean curd residue. *Industrial Crops and Products*, 2013;50: 666-672.
4. Xuansheng Hu, Shuhong Li, Linbo Wang, **Dan Zhu**, Yuepeng Wang, Yiting Li, Yingnan Yang, Zhenya Zhang, Delin Cheng. Anti-diabetic activities of aqueous extract from *Actinidia kolomikta* root against α -glucosidase. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2013;2 : 53-57.
5. Hongjun Li, **Dan Zhu**, Xianggang Gao, Yun-feng Li, Jian Wang , Chongbo He. Mining single nucleotide polymorphisms from EST data of hard clam *Meretrix meretrix*. *Conservation Genet*, 2010;1:69-72.
6. Xianggang Gao, Chongbo He, Hong Liu, Hongjun Li, **Dan Zhu**, Shengli Cai, Ying Xia, Ying Wang, Zhe Yu. Intracellular Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) from hard clam *Meretrix meretrix*: its cDNA cloning, mRNA expression and enzyme activity. *Molecular Biology Reports*, 2012;12: 10713-10722.

学会発表

1. 朱丹, 胡選生, 李書紅, 王淋渤, 張振亜, 楊英男. 有用カビ類菌を用いた発酵オカラの機能性ペプチドの精製及びその生理活性評価日本生物工学会第65回大会, 広島国際会議場, (2013年9月).