

氏名(本籍)	李 奕 葦 (中 国)
学位の種類	博士(環境学)
学位記番号	博 甲 第 6540 号
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	<b>Optimal Fermentation Condition of Food Residues by <i>Preussia aemulans</i> and the Bioactivity Evaluation</b> (食品残渣を利用した冬虫夏草発酵の最適条件とその生理活性評価)
主 査	筑波大学教授 博士(農学) 張 振 亜
副 査	筑波大学教授 農学博士 杉 浦 則 夫
副 査	筑波大学准教授 工学博士 雷 中 方
副 査	筑波大学准教授 博士(生物工学) 楊 英 男

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

近年、農産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。豆腐、豆乳、大豆タンパク質生産の副産物であるオカラ(SCR)は農産廃棄物として日本で毎年約70万トンも排出されている。そのうち、多くのオカラ(SCR)が焼却され環境汚染の原因ともなっている。その一方でオカラは栄養豊富で、タンパク質、脂肪、澱粉、糖類に富み、高品質の微生物発酵基質として利用が可能である。一方、子囊菌門核菌綱ボタタケ目バツカクキン科冬虫夏草属の菌類の一種である冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)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。本研究では、廃棄物バイオマスの利・活用やりサイクルシステム構築の観点から、オカラ及び米糠をそれぞれ主成分とする培養基質を用いた場合の冬虫夏草菌糸体の発酵条件を検討し、より高い生理活性物質生産性と効率をもつオカラ及び米糠の処理法の確立を目的とした。そして、最適な条件で発酵したオカラ及び米糠からいくつかの異なる溶媒で有効生理活性物質を抽出し、その生物活性を検討した。なお、本研究では冬虫夏草子実体から分離した *Preussia aemulans* 菌類を菌種として使用した。

得られた結果は以下の通りである。

- 1) 直交表実験計画法及びダンカン(DUNCAN)多重比較分析法を用い、固体発酵の最適条件として基質と菌糸を以下のように設定した。すなわち、基質と菌糸を合わせた発酵開始時の総重量に対して、オカラの場合、グルコースが10%(W/W)、牛肉エキスが3%(W/W)、液体種菌の接種量が20%、かつ含水率が80%(W/W)となるよう調整した。米糠の場合は、同様に、スクロースが5%(W/W)、牛肉エキスが5%(W/W)、種菌の接種量が20%、かつ含水率が90%(W/W)となるよう調整した。また、発酵期間はいずれも15日間である。
- 2) 上記最適条件で発酵したオカラ及び米糠の乾燥発酵物に含まれる生理活性物質の量を測定した。発酵したオカラの多糖類、エルゴステロール、アデノシン及びポリフェノールの含有量はそれぞれ  $39.18 \pm 1.06$  mg/g、 $37.53 \pm 1.34$  mg/100g、 $148.32 \pm 1.61$  mg/100g 及び  $48.44 \pm 1.29$  mg/g であり、発酵前のオカラより大

幅に上昇した。また、遊離アミノ酸とヌクレオシドの含有量も著しく増加したことが分かった。発酵した米糠の多糖類は  $71.16 \pm 2.63$  mg/g であり、4 倍程に上昇した。エルゴステロール、アデノシン及びポリフェノールの含有量はそれぞれ  $88.04 \pm 0.36$  mg/100g、 $282.25 \pm 1.83$  mg/100g 及び  $89.83 \pm 4.26$  mg/g であり、遊離アミノ酸とヌクレオシドの総含有量は、発酵前の米糠に比べ 10 倍以上に増加したことが分かった。

3) 発酵したオカラ及び米糠に対し、石油エーテル、酢酸エチル、ブタノール、蒸留水の分画及び粗多糖類エキスの分離を行った。各画分の DPPH、ABTS とヒドロキシルラジカルのラジカル消去活性及び二価鉄のキレート活性を評価した結果、粗多糖類エキス及び酢酸エチル画分は優れた抗酸化活性を持つことが明らかになった。さらに、粗多糖類エキス及び酢酸エチル画分の抗酸化活性のメカニズムを解明するため、多糖類、タンパク質、ポリフェノール類及び SOD 様物質の活性を測定した。その結果粗多糖類エキス中に多糖類が約 6 割以上含有し、多糖類は高い抗酸化活性を持つことが分かった。また、酢酸エチル画分の疎水性により多糖類とタンパク質を測定することが出来なかったことから酢酸エチル画分の良好な抗酸化活性はポリフェノール類及び SOD 様物質に由来すると推測できる。

4) 粗多糖類エキスの赤外線スペクトルを測定した。その結果、主要な官能基はヒドロキシル基、カルボニル結合、N-H ボンドと C-O ボンドであり、粗多糖類エキスの優れた抗酸化能はヒドロキシル基の数に依存すると考えられた。免疫調節活性について、マウスの RAW264.7 細胞を用いて実験を行い、粗多糖類エキスはマクロファージ細胞増殖に顕著な促進効果があることが判明した。また、人の大腸がん細胞 DLD-1 を用いて実験した結果、酢酸エチル画分は弱い抗ガン作用があることも明らかになった。

## 審査の結果の要旨

本研究は、農産廃棄物から生理活性物質生産法の開発やオカラ及び米糠の再資源化技術の確立を目的として、オカラ及び米糠を使用して、世界で初めて冬虫夏草菌糸体の固体発酵を試みたものである。発酵条件の最適化を検討し、得られた最適条件で発酵したオカラ及び米糠から各種生理活性物質を異なる溶媒で抽出し、発酵物の抗酸化作用、免疫調節作用、抗腫瘍活性についての検討を行った。その結果、オカラ、米糠を冬虫夏草の固体培地として利用することができること、発酵したオカラと米糠は生理活性物質が豊富で、機能的食品素材や動物餌の添加剤として利用できることが示された。本研究で得られた知見は生理活性物質の生産及び農産廃棄物の再資源化技術の開発に重要である。加えて、生産された多糖類やフェノール化合物の抗酸化作用、免疫調節作用、抗腫瘍活性に関する評価は、新規性の高い実用的な有用物質生産につながる貴重な成果である。本研究で得られた実験データは客観性、普遍性が高く貴重であり、農産廃棄物再資源化分野への応用が期待され、オリジナリティに富む研究として高く評価できる。

平成 25 年 1 月 21 日、学位審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査および最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判断された。

よって、著者は博士（環境学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。