

氏名（本籍）	朱 丹		
学位の種類	博 士（環境学）		
学位記番号	博 甲 第 7374 号		
学位授与年月日	平成 27 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	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		
主査	筑波大学教授	博士（農学）	張 振亜
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	内海 真生
副査	筑波大学准教授	博士（工学）	山路 恵子
副査	筑波大学准教授	博士（生物工学）	楊 英男
副査	中国天津大学環境科学与工程学院 准教授	理学博士	宋 英今

## 論 文 の 要 旨

オカラは産業廃棄物の中では、栄養が豊富で、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、食用キノコ類は、中国の伝統的な漢方薬として体力の促進及び体調の改善に利用されてきた。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、食品残渣からの新規機能性糖タンパク質及び多糖類の発現、機能性食品素材の開発を行ったものである。

オカラと米糠の乾燥重量比は 7:3、滅菌前の含水率は  $66.43 \pm 0.25\%$ 、舞茸の接種量、発酵温度、発酵時間はそれぞれ 6%、 $23 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ 、60 日間で発酵を行った。その結果、発酵後のオカラは発酵前より乾燥重量 30 g に対し含水量は 7.21 g 減少した。遊離アミノ酸の含有量は、発酵前の  $20.09 \pm 0.52\text{ nmol/mg}$  から発酵後の  $433.13 \pm 4.33\text{ nmol/mg}$  とほぼ 20 倍以上増加した。SEM の観察では発酵後オカラの表面は発酵前より緩い構造になり、発酵後オカラの比表面積の増加が観察されたことから、多糖類、糖タンパク質などの抽出に有利になると考えられる。さらに発酵前後の水溶性物質の抗ガン生理活性を比較した結果、ヒト子宮頸ガン細胞 (Hela) に対し、暴露時間が 24 時間での未発酵オカラからの水溶性物質は増殖抑制作用が見られず、発酵オカラからの水溶性物質には高い増殖抑制作用が見られ、その場合の  $\text{IC}_{50}$ 濃度は  $40.81 \pm 1.19\text{ }\mu\text{g/mL}$  であった。以上の結果により、発酵オカラは栄養分の増加及び物理化学的性質の改善が示唆された。

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の結果、抽出された水溶性物質は DPPH ラジカル、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していた。それぞれの  $\text{IC}_{50}$ 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観察され、その場合の  $\text{IC}_{50}$ 濃度は  $183.3 \pm 8.17\text{ }\mu\text{g/mL}$  であった。

抽出された糖タンパク質については、ABTS  $\cdot^+$ 、 $\cdot\text{OH}$  消去活性を有し、 $\cdot\text{OH}$  を消去する  $\text{IC}_{50}$ は  $3.50 \pm 0.29\text{ mg/mL}$  であった。48 時間の暴露時間で、Hela 細胞に対する増殖抑制作用の  $\text{IC}_{50}$ は  $16.68 \pm 0.47\text{ }\mu\text{g/mL}$  であり、

HepG2 に対する増殖抑制作用の  $IC_{50}$  は  $96.71 \pm 2.33 \mu\text{g/mL}$  であった。このように、優れた抗ガン生理活性を有することが示唆された。

抽出された多糖類は  $ABTS \cdot +$ 、 $\cdot OH$  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。

異なる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について検討した結果、発酵オカラの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得られた。AE-HA の DPPH ラジカル消去能力は AE-FE より 7.78~8.97 倍高かった。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ことが明らかとなった。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 倍高かった。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 倍高かった。また、異なる乾燥方法で抽出した糖タンパク質も特異性を示し、Gp-HA 及び Gp-FE の  $ABTS \cdot +$  消去活性はほぼ同等の値であり、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。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  $\cdot OH$  と  $ABTS^+$  消去活性には有意差がなかったが、PS-FE の 2 倍であった。

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たが、RAW264.7 に対しても増殖抑制作用があり、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る。

## 審 査 の 要 旨

本研究は、豆腐、豆乳、大豆タンパク質生産の副産物であり、農産廃棄物として処理されることの多いオカラを原料とし、舞茸を用いてオカラの固体発酵をして有効な新規機能性糖タンパク質及び多糖類を抽出することに、世界で初めて挑戦したものである。

高い生理活性物質を抽出するために、乾燥方法などの影響を明らかにし、糖タンパク質及び多糖類の生産法を構築したことが示された。それに加えて、生産された糖タンパク質及び多糖類の抗酸化作用、免疫調節作用、抗腫瘍活性についても明らかとした。本研究から得られた貴重な結果が、オリジナリティに富む研究として高く評価でき、新規性の高い実用的な有用物質生産に繋がることが期待される。農産廃棄物の再資源化分野への応用や科学的かつ技術的助言が提供できる。

平成 27 年 1 月 20 日、学位論文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）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。