

# 薬用キノコ多糖類の超音波破碎抽出とその生理活性評価

平成 28 年 1 月

馬 堅

薬用キノコ多糖類の超音波破碎抽出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

馬 堅

## 概要

オカラとは豆腐、豆乳などの生産過程により排出される残渣である。オカラは水不溶性の炭水化物、蛋白質、脂質を含む様々な栄養素を豊富に有するにもかかわらず、主に食材の代わりに飼料、肥料として使用され、更に有機産業廃棄物として処分されている。

先行研究によれば、オカラを基質とした食用キノコ(椎茸、エノキタケ、アミガサタケと舞茸)及び薬用キノコ(冬虫夏草と霊芝)の発酵技術が開発され、発酵したオカラに顕著な抗酸化活性、免疫調節活性及び抗がん活性が確認された。これらの研究成果から、微生物発酵法を用いることで、オカラの再資源化が可能になり、発酵産物を抗酸化作用を有する食品及び機能性食品素材として利用する可能性もあると考えられる。

本研究は冬虫夏草子実体及び霊芝菌糸体発酵物の有効成分の一つである多糖類に着目し、抗酸化活性及び免疫調節活性を評価し、より優れた抽出法を確立することで、オカラの再資源化の効率向上や機能性食品素材の開発を目的とした。

まずはじめに、発酵産物である冬虫夏草子実体を用いて、超音波破碎抽出条件の最適化及び熱水抽出法との比較を行い(第 2 章)、抽出された冬虫夏草子実体由来の多糖類の抗酸化活性及び免疫調節活性を検討した(第 3 章)。更にオカラの霊芝菌糸体発酵物を用いて、超音波破碎抽出条件の最適化及び従来法(低出力超音波抽出法と熱水抽出法)との比較を行い(第 4 章)、抽出された霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類の抗酸化活性及び免疫調節活性を検討した(第 5 章)。最後に、超音波破碎抽出法における抽出促進効果及びメカニズムを検討した(第 6 章)。

これまでの研究成果は下記の通りである。

1. 冬虫夏草子実体の多糖類抽出過程を応答曲面分析法で解析した結果、38.53 min、604.61 W 及び 4 mL/g といった最適条件が得られ、抽

出率の予測値は 7.35%であった。39 min、603 W 及び 4 mL/g といった類似条件を用いて得られた抽出率の実測値は 7.29%であり、予測値に合致した。超音波破碎抽出法を用いた場合は熱水抽出法の場合より、抽出率が 142%向上しとともに、抽出時間が 67.5%短縮し、溶媒が 86.7%節約でき、エネルギーコストを 63.4%節約することができた。

2. 超音波破碎抽出法及び熱水抽出法により得られた冬虫夏草子実体由来の多糖類は、同程度の抗酸化活性を示した。更にマウスマクロファージ細胞に対する顕著な保護作用を示し、細胞毒性は示さなかった。
3. 霊芝菌糸体発酵物の多糖類抽出過程に対して応答曲面分析法で解析した結果、43.72 min、496.90 W 及び 13.21 mL/g といった最適条件が得られ、抽出率の予測値は 10.13%であった。44 min、495 W 及び 13.21 mL/g といった類似条件を用いて得られた抽出率の実測値は 10.01%であり、予測値に合致した。報告された低出力超音波抽出法および熱水抽出法の抽出率は、それぞれ 8.90%および 7.19%であったため、本研究によって最適化された超音波破碎抽出法による抽出率がそれぞれ 12.5%及び 39%向上させた。また、熱水抽出法により、抽出時間が 63.3%短縮し、溶媒を 56%節約でき、エネルギーコストを 58.7%節約することができた。
4. 最適化された超音波破碎抽出法、低出力超音波抽出法および熱水抽出法により得られた霊芝菌糸発酵物由来の多糖類は同程度の高い抗酸化活性、マウスマクロファージ細胞に対する顕著な保護作用を示したとともに、マウスマクロファージ細胞に対する増殖促進効果を示した。特に、最適化された超音波破碎抽出法で抽出された多糖類の場合、39%の最も高い増殖促進効果が観察された。
5. 超音波破碎抽出法を用いた場合、霊芝菌糸体発酵物及び霊芝子実体由来の多糖類にセルロース、キチン及びキトサンが検出されたため、

本抽出法は素材の細胞壁を破壊し、その組成成分である多糖類を抽出することによって多糖類の抽出率を向上すると考えられる。また、セルロース、キチン及びキトサンがマクロファージを活性化できるため、超音波破碎抽出法によって得られた霊芝菌糸体発酵物由来多糖類のマウスマクロファージに対する高い増殖促進効果があることが解釈できた。

以上の研究成果により、超音波破碎抽出法は多糖類の抗酸化活性及び免疫調節活性を保持或いは向上することが出来、且つ省エネルギー的・効率的な抽出法である。また、オカラを再資源化した産物である冬虫夏草子実体、および霊芝菌糸体発酵物を機能性食品素材及び癌治療回復期の補助治療食品となりうる価値がある。

## 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.....	2
1.3 冬虫夏草について.....	3
1.4 霊芝について.....	4
1.5 天然物からの有効成分の抽出法について.....	6
1.5.1 従来抽出法について.....	6
1.5.2 超音波破碎抽出法について.....	6
1.6 研究の目的.....	7
1.7 論文の構成.....	7
第2章 冬虫夏草子実体に対する超音波破碎抽出.....	17
2.1 はじめに.....	17
2.2 材料及び方法.....	17
2.2.1 素材及び試薬.....	17
2.2.2 装置.....	17
2.2.3 冬虫夏草子実体多糖類の抽出.....	18

2.2.4 応答曲面分析.....	19
2.2.5 従来法との抽出率比較.....	20
2.2.6 統計解析.....	20
2.3 結果及び考察.....	21
2.3.1 単一要素分析.....	21
2.3.2 応答曲面分析.....	22
2.3.3 従来法との抽出率比較.....	25
2.4 まとめ.....	25
第3章 冬虫夏草子実体より多糖類抽出法の比較.....	37
3.1 はじめに.....	37
3.2 材料及び方法.....	37
3.2.1 素材及び試薬.....	37
3.2.2 抗酸化活性の測定.....	38
3.2.3 免疫調節活性の検討.....	42
3.2.4 統計解析.....	46
3.3 結果及び考察.....	46
3.3.1 抗酸化活性.....	46
3.3.2 免疫調節活性.....	48
3.4 まとめ.....	49
第4章 霊芝菌糸体発酵物に対する最超音波破碎抽出.....	56

4.1 はじめに .....	56
4.2 材料及び方法 .....	56
4.2.1 素材及び試薬.....	56
4.2.2 装置.....	57
4.2.3 霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出.....	57
4.2.4 応答曲面分析.....	59
4.2.5 従来法との抽出率比較.....	59
4.2.6 統計解析.....	59
4.3 結果及び考察 .....	60
4.3.1 単一要素分析.....	60
4.3.2 応答曲面分析.....	61
4.3.3 従来法との抽出率比較.....	63
4.4 まとめ .....	64
第5章 霊芝菌糸体発酵物に対する各抽出法の比較.....	76
5.1 はじめに .....	76
5.2 材料及び方法 .....	77
5.2.1 素材及び試薬.....	77
5.2.2 抗酸化活性の測定.....	78
5.2.3 免疫調節活性の検討.....	78
5.2.4 統計解析.....	79

5.3 結果及び考察 .....	80
5.3.1 抗酸化活性.....	80
5.3.2 免疫調節活性.....	81
5.4 まとめ .....	82
第6章 超音波破砕抽出法における抽出促進効果及びメカニズム.....	89
6.1 はじめに .....	89
6.2 材料および方法 .....	89
6.2.1 研究素材.....	89
6.2.2 試薬.....	89
6.2.3 多糖類の二段抽出.....	90
6.2.4 二段抽出による多糖類の組成分析.....	90
6.2.5 素材に基づく多糖類の比較抽出.....	91
6.2.6 統計解析.....	91
6.3 結果および考察 .....	92
6.3.1 二段抽出による多糖類の組成分析.....	92
6.3.2 超音波による抽出促進効果の差異.....	93
6.4 まとめ .....	94
第7章 総括.....	98
7.1 結論.....	98
7.2 今後の課題及び展望 .....	99

7.2.1 課題.....	99
7.2.2 展望.....	99
謝 辞.....	100
参考文献.....	101

## 目 録

図 1-1 オカラ .....	13
図 1-2 オカラの利用割合(出典：日本豆腐協会 2012 年データ).....	14
図 1-3 野生冬虫夏草子実体(a)及び培養した冬虫夏草子実体(b).....	15
図 1-4 野生霊芝子実体(a)及び培養した霊芝菌糸体発酵物(b).....	16
図 2-1 超音波処理時間に関する単一要素分析結果 .....	31
図 2-2 超音波出力に関する単一要素分析結果 .....	32
図 2-3 溶媒量に関する単一要素分析結果 .....	33
図 2-4 超音波処理時間及び超音波出力に関する 3D(a)及び 2D(b)グラフ .	34
図 2-5 超音波処理時間及び溶媒量に関する 3D(a)及び 2D(b)グラフ .....	35
図 2-6 超音波出力及び溶媒量に関する 3D(a)及び 2D(b)グラフ .....	36
図 3-1 2 種類の冬虫夏草子実体由来多糖類の DPPH ラジカル消去活性 ...	50
図 3-2 2 種類の冬虫夏草子実体由来多糖類の ABTS ラジカル消去活性 ...	51
図 3-3 2 種類の冬虫夏草子実体由来多糖類の水酸基ラジカル消去活性 ...	52
図 3-4 2 種類の冬虫夏草子実体由来多糖類の SOD 様活性.....	53
図 3-5 2 種類の冬虫夏草子実体由来の多糖類におけるマウスマクロファージ細胞に対する細胞毒性.....	54
図 3-6 2 種類の冬虫夏草子実体由来の多糖類におけるマウスマクロファージ細胞に対する保護作用.....	55

図 4-1 超音波処理時間に関する単一要素分析結果 .....	70
図 4-2 超音波出力に関する単一要素分析結果 .....	71
図 4-3 溶媒量に関する単一要素分析結果 .....	72
図 4-4 超音波処理時間及び超音波出力に関する 3D(a)及び 2D(b)グラフ .73	
図 4-5 超音波処理時間及び溶媒量に関する 3D(a)及び 2D(b)グラフ .....	74
図 4-6 超音波出力及び溶媒量に関する 3D(a)及び 2D(b)グラフ .....	75
図 5-1 3 種類の霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類の DPPH ラジカル消去活性 .....	83
図 5-2 3 種類の霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類の ABTS ラジカル消去活性 .....	84
図 5-3 3 種類の霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類の水酸基ラジカル消去活性 .....	85
図 5-4 3 種類の霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類の SOD 様活性.....	86
図 5-5 3 種類の霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類におけるマウスマクロファ ージ細胞に対する細胞毒性.....	87
図 5-6 3 種類の霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類におけるマウスマクロファ ージ細胞に対する保護作用.....	88
図 6-1 霊芝菌糸体発酵物由来の熱水抽出多糖類(a)及び超音波破碎抽出多 糖類(b)の赤外吸収スペクトル .....	96
図 6-2 霊芝子実体由来の熱水抽出多糖類(a)及び超音波破碎抽出多糖類(b) の赤外吸収スペクトル.....	96

## 表 目 録

表 1-1 オカラの主な栄養素割合 .....	9
表 1-2 各種大豆及び大豆製品の多量栄養素 .....	10
表 1-3 各種大豆及び大豆製品の微量栄養素 .....	11
表 1-4 各種大豆及び大豆製品の炭水化物含有量.....	12
表 2-1 単一要素分析の条件 .....	26
表 2-2 応答曲面分析条件(a)及び <b>Box-Behnken</b> による実験区結果(b) .....	27
表 2-3 各要素に基づく抽出率の方程式の分散分析 .....	28
表 2-4 回帰係数の推定及び二次方程式の有意差分析 .....	29
表 2-5 超音波破碎抽出法と熱水抽出法の比較 .....	30
表 4-1 単一要素分析の条件 .....	65
表 4-2 応答曲面分析条件(a)及び <b>Box-Behnken</b> による実験区結果(b) .....	66
表 4-3 各要素に基づく抽出率の方程式の分散分析 .....	67
表 4-4 回帰係数の推定及び二次方程式の有意差分析 .....	68
表 4-5 3 種類の抽出法における比較 .....	69
表 6-1 4 種類研究素材の多糖類抽出率および向上率 .....	95

## 用 語 集

略称	表示
BBD	Box-Behnken デザイン
C.V.	変異係数
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
ABTS	2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt
Trolox	水溶性ビタミン E
FBS	ウシ胎仔血清
PBS	リン酸緩衝生理食塩水
TCA	トリクロロ酢酸
Dox	ドキソルビシン(抗癌剤)
ADME	薬品などの吸収、分布、代謝および排出
UAEP	超音波破碎抽出法により抽出された冬虫夏草子実体由来の多糖類(Ultrasonic-assisted extracted polysaccharides)
HWEP	熱水抽出法により抽出された冬虫夏草子実体由来の多糖類(Hot-water extracted polysaccharides)
HUGLP	最適化された超音波破碎抽出法により抽出された靈芝菌糸体発酵物由来の多糖類(High-power ultrasonic extracted <i>Ganoderma lucidum</i> polysaccharides)
LUGLP	低出力超音波破碎抽出法により抽出された靈芝菌糸体発酵物由来の多糖類(Low-power ultrasonic extracted <i>Ganoderma lucidum</i> polysaccharides)
HWGLP	熱水抽出法により抽出された靈芝菌糸体発酵物由来の多糖類(Hot-water extracted <i>Ganoderma lucidum</i> polysaccharides)
FTIR	フーリエ変換赤外分光法



# 第 1 章 緒論

## 1.1 背景

近年、世界中の環境問題が深刻化してくるとともに、環境改善及び環境保護の意識も高まってきた。その中で、資源の過剰開発、浪費、低効率利用などにより、資源不足が顕在化してきている。このため、近年、資源の再生化及び廃棄物の再利用はますます注目されている。金属、ガラス、プラスチック、古紙などの資源はゴミの分類、再製品化により、一部の再利用がすでに実現された。一方、農林水産省統計部の「平成 17 年食品循環資源の再生利用等実態調査結果の概要」により、食品製造業、食品卸売業、食品小売業と外食産業を合わせて食品廃棄物は年間約 1136 万トン産出されている。その中でも、食品製造業は 490 万トンの年間産出量で総量の約 43%を占める。年間産出量が 66 万トンであるオカラは豆腐、豆乳などの食品製造業により産出される廃棄物であり、食品廃棄物の一種である。大量の蛋白質、脂質、炭水化物及び灰分が大豆製品の製造過程で取り除かれるが、大豆の約三分の一の栄養素は残存している。残存する各種栄養素の中で、主な炭水化物はセルロースのため、人体に直接に吸収ができないが、食物繊維として人体の消化器系に良いと考えられる。

食品廃棄物の総合的再生利用率は 45%であり、残りは産業廃棄物及び一般廃棄物として処分され、その処分費用は高額である。オカラは飼料及び肥料として利用されているが、食用の利用分は 1%未満であり、残りは有機産業廃棄物として処分されている。オカラの栄養素は殆ど水不溶性であるため、飼料や肥料として利用されても、残存する栄養素の利用効率は非常に低く、十分に利用されていないと考えられる。

所属研究室のこれまでの研究から、オカラを基質とした食用キノコ(椎茸、エノキタケ、アミガサタケと舞茸)<sup>[1-3]</sup>及び薬用キノコ(冬虫夏草と霊芝)<sup>[4-6]</sup>の人工培養は可能になった。食用キノコにより発酵させたオカラには、顕著な抗酸化活性、免疫調節活性及び抗がん活性が確

認められ、微生物発酵法を用いることで、オカラの再利用が可能となった他、一般食品や機能性食品、更に医薬品としての利用可能性も考えられるようになった。しかし、発酵物から有効成分の抽出過程は殆ど従来法である熱水抽出法などにより行われていたため、長時間、高溶媒消費、低抽出率などのデメリットが存在した。

## 1.2 オカラについて

アジア諸国、特に中国、日本及び韓国において、豆腐、豆乳、醤油、豆板醤、テンペ、大豆油などの大豆製品を食用する習慣及び歴史がある。そのなか、豆腐、豆乳製造過程で、産出される主な残渣がオカラ(図 1-1)である。豆腐生産の場合、1 kg の大豆により、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)が産出される。江戸時代、日本ではオカラを庶民的な食品として利用されていた時期がある<sup>[7]</sup>。しがしながら、食物が豊富である現在、オカラは殆ど食品のかわりに飼料や肥料などとして使用され、更に一部は有機産業廃棄物として処分されている<sup>[8]</sup>。日本では、平均的に 1 トンのオカラを処理するために 20,000 円程度の費用がかかる<sup>[9]</sup>。

日本豆腐協会 2012 年データ(図 1-2)によれば、オカラの利用について、飼料用、肥料用及びその他はそれぞれ 65%、25%及び 10%の割合を占めている。その他の部分については 50-90%は有機産業廃棄物として処分され、食品用は 1%未満である。焼却処理は 3.3-5.94 万トンほどであり、環境汚染の原因ともなっている。

近年、産業廃棄物の再利用が直接に環境負荷の低減、資源保護などに関係するため、様々な産業廃棄物に対応する利用法の開発が注目されてきた。豊富な栄養素(表 1-2、表 1-3、表 1-4)<sup>[10]</sup>を含むオカラも再び食材として少しずつ人々の注目を浴びてきた。豊富な栄養素が含まれているため、微生物発酵基質としての利用も可能であろうと考えられる<sup>[11]</sup>。

また、機能性食品の開発分野にて、オカラはイソフラボン<sup>[12-13]</sup>、食物繊維、血糖降下物質<sup>[14]</sup>、タンパク質<sup>[15]</sup>、多糖類<sup>[1, 4]</sup>などの生理活性物質の抽出によく利用されている。これらの生理活性物質の存在こそ、有機産業廃棄物であるオカラに想像以上の付加価値を与え、食品工学の研究素材とされることも多くなってきた。

### 1.3 冬虫夏草について

冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)(図 1-3)は子囊菌門核菌綱ボタntax目バツカクキン科冬虫夏草属菌類の総称である。現在 500 種類程度の存在が確認されている。野生冬虫夏草は海拔 3,000-4,000 m の高地に棲息するコウモリガ科の蛾の幼虫に寄生し、夏になるとともに、宿主体内の栄養分を吸収しながら成長する。宿主が死んだ後、菌糸体は外に出て、子実体を形成する。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重宝されてきた。1964 年以降、冬虫夏草は漢方薬として分類されている<sup>[16]</sup>。

近年、漢方薬、特に冬虫夏草の効能が実証されつつあり、多く研究者が着目するようになってきた。掲載された論文や報告などによれば、冬虫夏草の主な有効成分は多糖類、ポリフェノール、タンパク質<sup>[17-19]</sup>などであり、抗腫瘍<sup>[20, 21]</sup>、抗炎症<sup>[22, 23]</sup>、抗酸化<sup>[24-26]</sup>、抗白血病<sup>[27, 28]</sup>、抗菌<sup>[29]</sup>などの効果が確認されてきた。野生冬虫夏草の生育には過酷な環境が必要とされている。更に市場需要量が年年増えてきたため、野生の冬虫夏草の生物量が激減している<sup>[30]</sup>。このため、1999 年に実施された中国国家林業局農業部令により冬虫夏草は中国 2 級保護野生植物に認定され、無許可の採集及び過剰採集が禁止されることとなった。こうした状況の下、冬虫夏草子実体の人工培養及び菌糸発酵の研究が市場需要量に応じながら発展してきた。殆どの培養技術は蛾の幼虫を利用しているが、日本では稲やトウモロコシなどを利用する培養技術も

開発された<sup>[31, 32]</sup>。各栄養素の含有量および生理活性は野生冬虫夏草のものより、高い場合、低い場合がある<sup>[33-36]</sup>。

オカラのような有機産業廃棄物を利用する培養技術は珍しいものであり、本研究室独自の技術である。先行研究によれば、オカラを基質の主要成分とした培地を用い、冬虫夏草の子実体までの成長が可能であることが判明している。一般的に宿主であるコウモリガ科の蛾は幼虫期まで成長するに2-3年間が必要とされるため、野生冬虫夏草の成長期間も2-3年間であると考えられる。一方、本研究室の技術は8週間以内に成熟した冬虫夏草を収穫できるため、培養効率は非常に高いと考えられる。また、培養した冬虫夏草の栄養分及び生理活性を調査した<sup>[4,37]</sup>結果、抗酸化活性、免疫調節活性などが確認されている。このため、実用性と利用価値を合わせて検討した上、本研究室の冬虫夏草培養技術は大変優れており、オカラの有効的な利用法の一つであると考えられる。

冬虫夏草には様々な生理活性物質が含まれているが、多糖類は最も重要な有効成分の一つとして、すでに多くの研究者により、研究されてきた。これまでに、抗腫瘍、抗炎症、抗酸化、抗白血病、抗菌効果のほか、シクロホスファミド誘発性の免疫抑制を克服することが確認されている<sup>[38]</sup>。特に免疫抑制されたマウスに対し、脾臓および胸腺指数(spleen and thymus indices)の増加、脾臓リンパ球活性およびマクロファージ機能の強化が顕著に確認されている<sup>[33]</sup>。

#### 1.4 霊芝について

霊芝(レイシ、*Ganoderma lucidum*)(図 1-4)はマンネンタケ科の一年生キノコであり、形態は種類により異なる。後漢時代(25-220年)にまとめられた『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。日本でも民間で同様に用いられてきたが、伝統的な漢方には霊芝を含む処方はない。

野生靈芝の最適成長には 25-30℃ の温度、80%以上の湿度、適切な照度が必要とされる<sup>[4, 5]</sup>。特に太陽光は靈芝菌糸体の成長を阻害するが、子実体の成長には不可欠である。このため、野生靈芝の早期菌糸増殖は相当に抑制され、成長期間は長いと考えられる。一般的に、成長期間が長いほど、靈芝の薬効効果がよいと言われている。中国では 10 年以上の野生靈芝であれば、値段は成長年数分に比例して高騰する。更に 50 年以上の野生靈芝は仙草とも呼ばれ、非常に貴重な漢方薬とされている。

近年、靈芝の効能が実証されつつあるため、靈芝はより広く知られ、研究者に注目されている。掲載された論文や報告などによれば、多糖類、トリテルペノイド、タンパク質<sup>[39, 40]</sup>など生理活性物質は靈芝の主な有効成分である。その中、多糖類は最も重要な有効成分として、詳しく研究されてきた。掲載された論文や報告などによれば、靈芝多糖類に強い抗酸化活性<sup>[41-43]</sup>、抗腫瘍<sup>[44]</sup>、免疫調節<sup>[45]</sup>などの効果を有することは確認された。

一方、過剰採集及び成長環境の破壊などにより、野生靈芝の産出量は激減してきた。それにとまなう人工培養技術はすでに開発され、アジア諸国、特に中国でよく使用されている。殆どの人工靈芝培養は腐敗した木質や麩などを用い、培養室にて行われている。現在、腐敗した木質や麩などを使用して靈芝の成長環境を模擬した培養技術により、靈芝の成長期間が 3 ヶ月ほどに短縮されることは可能になった<sup>[46]</sup>。

しかし、短期間で成熟させられた靈芝子実体に含まれる栄養素は野生靈芝より明らかに少ないことが知られている<sup>[46, 47]</sup>。その要因として、靈芝子実体が形成されるためには、子実体量の数倍に相当する菌糸体が必要とされ、栄養素も相応に濃縮されるため、短時間内にできた子実体に含まれる栄養素は少ない傾向がある。野生靈芝の場合は、成長期間が長くなるとともに、栄養素が多くなり、表面の色も深くなると言われている<sup>[46]</sup>。

本研究室のオカラを利用した培養技術により、5週間以内に霊芝菌糸体を大量に培養することが可能となった。培養された菌糸体発酵物が優れている抗酸化活性や免疫調節活性を有することは確認された<sup>[4-5]</sup>。

## 1.5 天然物からの有効成分の抽出法について

植物や真菌類を含む天然物から有効成分を抽出する際には、有効成分の特徴に基づき温和な条件で抽出法を選択することが必要とされる。抽出法は直接に効率及び有効成分の生理活性に影響するため、これまでに様々な改良がなされてきた。

### 1.5.1 従来抽出法について

多糖類の一般的な抽出法は熱水抽出法である。具体的には、粉碎した素材を多糖類の溶媒である蒸留水に分散し、攪拌しながら 100 °C で 2 時間に渡って抽出する方法である。ただし、熱水抽出法には長時間、高溶媒消費、低抽出率などのデメリットが存在するため、大量素材の抽出は困難になると考えられる。

近年、超音波、マイクロ波<sup>[48-50]</sup>などが様々な抽出過程に広く応用されてきた。但し、マイクロ波が化学結合を破壊するため、生理活性のある有効成分には不適切であると考えられる。

### 1.5.2 超音波破碎抽出法について

超音波には熱効果、物理的な攪拌に類似する効果及び空洞化作用といった 3 つの特徴がある。熱効果とは、媒質中の超音波の伝播により、一部のエネルギーが熱に変わり、標的溶質の溶解を促進する作用を言う。物理的な攪拌に類似する効果とは、超音波の放出とともに、一部のエネルギーが力学的エネルギーに変わり、溶質の分散及び移動を促進することにより、攪拌に類似する現象を言う。空洞化作用とは、超音波が液体に作用する場合、液体内部に瞬間的な引っ張り応力が発生

し、真空状態と近似する泡が形成する現象を言う。引っ張り応力により、細胞壁の破壊が可能となる考えられる。

上記の効果により、超音波は天然物の有効成分抽出過程に対する促進効果があると十分考えられる。例えば、超音波破碎抽出法により、セージのアルコール不溶性残渣から抽出した水溶性多糖類の抽出率が高められた<sup>[51]</sup>。また、低頻度超音波の非混和性相の間の物質移動促進効果により、すでに様々な標的成分の抽出に使用されている<sup>[52]</sup>。20-100 KHz の超音波により、多糖類の構造変化及び分解は避けられることが報告されている<sup>[53, 54]</sup>。

これまでの研究から、超音波破碎抽出法が短処理時間、簡単な操作、低溶媒消費、高抽出率などのメリットを有することが明らかになってきた<sup>[55]</sup>。ただし、今まで多数の多糖類抽出に対する超音波破碎抽出法の研究には低出力(400 W 以下)の超音波を用い、抽出促進効果を確認するものであった。本研究では 20 KHz であり、9 W から 900 W までの超音波を選択し、多糖類抽出に及ぼす影響を検討した。

## 1.6 研究の目的

本研究は靈芝菌糸体発酵物及び冬虫夏草子実体を主要な研究素材とし、その有効成分の一つである多糖類に着目し、抗酸化活性及び免疫調節活性を維持或いは向上出来る且つ効率的な抽出法の確立により、有機産業廃棄物であるオカラの再資源化効率の向上を研究目的の一つとした。

一方、抽出物の各生理活性評価により、オカラに基づく機能性食品開発の可能性及び価値の検討も研究目的とした。

## 1.7 論文の構成

本論文は合計 7 章により構成されている。各章の内容は下記通りである。

第 1 章に、研究背景、研究目的及び論文の構成を記述した。

第 2 章に、冬虫夏草子実体に対する超音波破碎抽出法最適条件の確立および従来法との抽出率比較を記述した。

第 3 章に、抽出された冬虫夏草子実体由来の多糖類に基づく抗酸化活性、免疫調節活性により、超音波破碎抽出法と熱水抽出法の比較について記述した。

第 4 章に、もう一つの研究素材である靈芝菌糸体発酵物に対する超音波破碎抽出法最適条件の確立および低出力超音波破碎抽出法、熱水抽出法との抽出率比較を記述した。

第 5 章に、抽出された靈芝菌糸体発酵物由来の多糖類に基づく抗酸化活性、免疫調節活性により、最適化された超音波破碎抽出法、低出力超音波破碎抽出法および熱水抽出法の比較を記述した。

第 6 章に、冬虫夏草菌糸発酵物及び靈芝子実体を用い、超音波による抽出促進効果の差異検定及び抽出促進効果のより詳しい検討について記述した。

第 7 章に、第 2、3、4、5、6 章の研究結果に基づく総合的な考察、残った課題及び今後の展望を示した。

表 1-1 オカラの主な栄養素割合(単位：％／五訂栄養素表<sup>[56]</sup>による)

大豆製品／栄養素	水分	タンパク質	脂質	炭水化物	灰分
新鮮オカラ	75.5	6.1	3.6	13.8	1.0
無水オカラ	0.0	24.9	14.7	56.3	4.1
大豆(米国産、無水)	0.0	37.4	24.6	32.6	5.4
豆乳(無水)	0.0	39.1	21.7	33.7	5.4

表 1-2 各種大豆及び大豆製品の多量栄養素<sup>[10]</sup>

大豆品種	製品	多量 <sup>a</sup> (g/100g)栄養素							
		タンパク質	脂質	炭水化物	フィチン酸	不溶性繊維	水溶性繊維	総繊維	灰分
	大豆	40	18.2	19	1.2	18.4	4.8	23.2	4.7
Edgar	豆腐	53.9	30.2	3.4	1.5	4.7	0.7	5.4	7.2
	オカラ	28.4	9.6	5.3	0.5	42	14.6	56.6	3.2
	大豆	40.1	21	15.2	1.6	16.4	5.3	21.7	5.3
Hutton	豆腐	53	35	2.5	1.9	5.4	2.3	7.7	6.3
	オカラ	25.4	10.9	3.8	1.2	43.6	14.5	58.1	3.7
	大豆	39.5	20.4	17.7	1.7	15.5	5.6	21.1	5.4
Prima	豆腐	52.4	32.4	3.7	2.5	4.8	2.8	7.6	6.8
	オカラ	26.2	9.3	4.6	0.9	40.2	12.6	52.8	3

a すべては水分を含まず、全脂肪ベースの状態です。

表 1-3 各種大豆及び大豆製品の微量栄養素<sup>[10]</sup>

大豆品種	サンプル分析	微量 <sup>a</sup> (mg/100g) 栄養素											
		Ca	Mg	Fe	Na	K	Cu	Zn	Mn	P	ビタミン B <sub>1</sub>	ビタミン B <sub>2</sub>	ニコチン酸
	大豆	155	262	9.3	11.7	1609	1.7	5.5	3.2	715	0.44	0.06	2.71
Edgar	豆腐	1849	188	11.1	7.7	206	1.4	6	4.4	926	0.19	0.05	0.76
	オカラ	260	163	6.2	16.2	1046	1.1	3.8	2.5	396	0.59	0.04	1.01
	大豆	275	282	11.7	9.3	1739	1.7	4.6	4.1	635	0.54	0.06	2.65
Hutton	豆腐	2092	179	9.4	4.9	171	1.5	5.5	5.9	971	0.13	0.04	0.54
	オカラ	428	158	7.2	19.1	1094	1.1	3.5	3.1	444	0.49	0.03	0.82
	大豆	187	247	11.6	3.5	1693	1.8	6	2.8	830	0.45	0.06	2.9
Prima	豆腐	1939	207	9.5	6.1	256	1.4	6.9	3.8	1014	0.23	0.05	0.86
	オカラ	286	165	8.2	18.4	1233	1.2	6.4	2.3	407	0.48	0.03	1.04

a すべては水分を含まず、全脂肪ベースの状態です。

表 1-4 各種大豆及び大豆製品の炭水化物含有量<sup>[10]</sup> (g/100 g<sup>(a)</sup>)

大豆品 種	サンプル 分析	総単糖	オリゴ糖			澱粉
			スタキオース	ラフィノース	スクロース	
	大豆	2.5	6.3	1.2	8.0	0.95
Edgar	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
	大豆	2.3	4.9	1.7	5.6	0.74
Hutton	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
	大豆	3.0	5.1	1.6	7.2	0.78
Prima	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

a すべては水分を含まず、全脂肪ベースの状態にて測定された数値である。



図 1-1 オカラ

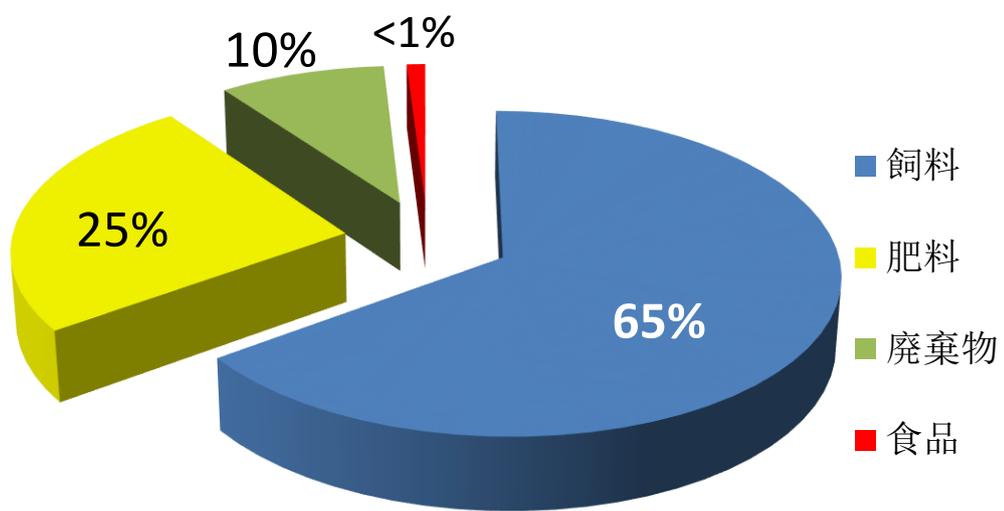


図 1-2 オカラの利用割合

出典：日本豆腐協会 2012 年データ

(a)



(b)



図 1-3 野生冬虫夏草子実体(a)及び培養した冬虫夏草子実体(b)

(a)



(b)



図 1-4 野生霊芝子実体(a)及び培養した霊芝菌糸体発酵物(b)

## 第2章 冬虫夏草子実体に対する超音波破碎抽出

### 2.1 はじめに

所属研究室においてオカラを用いた冬虫夏草子実体培養技術はすでに開発されているため、培養した冬虫夏草子実体を本研究の研究素材とし、多糖類を研究対象とした。培養した冬虫夏草から、主な有効成分である多糖類を抽出する際に、これまで熱水抽出法が多く選択されている。本法は長時間、高溶媒消費、低抽出率などのデメリットにより、得られる有効成分が少ないため、間接的に冬虫夏草及びオカラの利用効率は低くなると考えられる。

本章では、超音波を用いてより多くの有効成分を獲得できるような抽出条件の最適化を行った。最適化の検討に応答曲面分析法を用いた。応答曲面分析法とは効率的、論理的且つ数学的であり、複数回の実験結果により、各要素の独自の影響及び各要素間の相互作用を系統的に分析できる統計解析法である<sup>[22]</sup>。

### 2.2 材料及び方法

#### 2.2.1 素材及び試薬

冬虫夏草子実体は生物資源プロセス工学研究室(筑波大学)より譲渡された<sup>[6]</sup>。

エタノール、フェノール、D-グルコース、濃硫酸は和光純薬(大阪、日本)より購入した。他の化学試薬は全て分析グレードであった。

#### 2.2.2 装置

超音波細胞破碎機(JY92 - IIDN)は杭州 Chincan 貿易有限公司(杭州、中国)より購入した。超音波(周波数は 20 kHz に設定)の最大出力は 900 W であり、1%から 99%まで 1%ごとに調整できる。反応系の温度は、温度警報システムにより、50 °C 以下に制御した。

### 2.2.3 冬虫夏草子実体多糖類の抽出

#### サンプルの用意

冬虫夏草子実体は、40 °C で 2 日間乾燥し、粒径 150  $\mu\text{m}$  まで粉砕した。その後、単糖類、脂質などを除去するために、サンプル粉末を 1 g あたり 5 mL の 80% エタノールで還流した(質量の損失率は 1% 未満)。濾過及び洗浄を繰り返した残渣は 40 °C で再び 24 時間乾燥した。乾燥後、サンプルを粒径 150  $\mu\text{m}$  まで再度粉砕し、最終的には 4 °C で保存した。

#### 超音波破碎抽出法の高糖類抽出

サンプル粉末を蒸留水に混合し懸濁液にした上、異なる条件(図 2-1)の下で、高糖類を抽出した。

処理された懸濁液を 8000 rpm、15 分間、4 °C で遠心分離した。上清を孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルター(NY013045、アズワン株式会社)に通過させ、固形物を除去した上、抽出液を得た。更に、1 mL の抽出液に 4 mL の 99.5% エタノールを添加し、抽出液中の高糖類を 4 °C で 8 時間以上かけて沈殿させた。その後、8000 rpm、15 分間、4 °C の遠心分離により、沈殿した高糖類を分離し、10 mL 蒸留水で再び溶解することで、高糖類水溶液とした。

#### 熱水抽出法の高糖類抽出

サンプル粉末を 1 g あたり 30 mL の蒸留水に混合し懸濁液にした。100 °C の水浴で 30 min に一回攪拌し、合計 2 時間抽出した。

抽出液を 8000 rpm、15 分間、4 °C で遠心分離した。上清を孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルター(NY013045、アズワン株式会社)に通過させ、固形物を除去した。更に、1 mL の抽出液に 4 mL の 99.5% エタノールを添加し、抽出液中の高糖類を 4 °C で 8 時間以上かけて沈殿させた。そ

の後、8000 rpm、15 分間、4 °C の遠心分離により、沈殿した多糖類を分離し、10 mL 蒸留水で再び溶解することで、多糖類水溶液とした。

### 抽出率の計算

多糖類水溶液中の多糖類含有量は硫酸フェノール法により、定量した<sup>[57, 58]</sup>。吸光度を 0.2-0.8 の範囲内に合わせるために、多糖類水溶液を適切に希釈した。そして、1 mL の多糖類水溶液を 0.5 mL のフェノール、更に 2.5 mL の濃硫酸と混合し、100 °C の水浴で 15 min に変色反応させた。4 °C の冷水により、室温(25 °C)まで急速的に冷却し、波長 490 nm での吸光度を測定した。

グルコースによる検量線に照らし合わせ、多糖類水溶液の多糖類濃度を計算した上、抽出過程の各数値及び実験中の各希釈倍数により、多糖類の抽出率を計算した。方程式は下記通りである。

$$\text{多糖類抽出率 (\%)} = A(\text{mg/mL}) \times B(\text{mL}) \times C/D(\text{mg}) \times 100 \quad (1)$$

その中、A、B、C 及び D はそれぞれ多糖類水溶液濃度、多糖類水溶液総体積、希釈倍数及びサンプル量を表す。

### 2.2.4 応答曲面分析

#### 単一要素分析

本研究の標的抽出物は多糖類であり、100 °C 以下であれば安定している。また、超音波の熱効果や高温の水浴での処理は多糖類の溶解を促進する。ただし、温度の上昇とともに、溶媒である蒸留水の蒸発も激しくなる。このため、抽出温度は溶媒の蒸発を抑えるために常に 50 °C 以下に設定したことから、単一要素分析から外した。

超音波処理時間(3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33 及び 36 min)、超音波出力(90、180、270、360、450、540、630、720 及び 810 W)及び溶媒量(4、5、6、7、10、15、20、25、30、35 及び 40 mL/g)といった 3 つの要素

が分析対象として選択された。選定した値に対応する抽出率を検討した上、最適値を応答曲面分析に使用した。

## 応答曲面分析

単一要素分析の結果により、応答曲面分析に使用した各要素の値は表 2-2a の示している通り、Box-Behnken デザインにより、表 2-2b の示している 17 組の分析実験が設計された。表 2-2 の条件組み合わせに従い、冬虫夏草子実体多糖類の抽出を再度行い、対応する抽出率を計算した。

分析実験の結果を入力した上、Design-Expert(9、Stat-Ease, Inc.)といったソフトにより、総合的な超音波破碎抽出の最適条件が解析され、各要素に基づく抽出率の方程式も解析された。方程式は下記通りである。

$$Y = A_0 + \sum_{i=1}^3 A_i X_i + \sum_{i=1}^3 A_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 A_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

その中、A 及び X は自然数及び要素を表す。

ただし、解析された最適条件はあくまで理論値であり、整数とならない場合が一般的であるため、近似する条件を採用し、実際に可能な条件による検証実験を行い、最終的には検証実験による実際の抽出率は理論上の抽出率と一致しているかどうかを検討した。

### 2.2.5 従来法との抽出率比較

従来法である熱水抽出法による冬虫夏草多糖類の抽出率を測定した上、得られた最適超音波破碎抽出条件による冬虫夏草多糖類の抽出率と比較した。

### 2.2.6 統計解析

すべての実験は 3 回実施し、データは平均値及び標準偏差値で表した。統計解析は IBM の統計解析ソフトウェア SPSS Statistics 19.0 で行った。P 値が 0.01 より小さい場合に限り、統計学的に有意とみなした。

## 2.3 結果及び考察

### 2.3.1 単一要素分析

#### 超音波処理時間

単一要素分析において、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33 及び 36 min の超音波処理時間における冬虫夏草子実体多糖類の抽出率を検討した。他に設定された条件は 450 W の超音波出力及び 20 mL/g の溶媒量であった。

超音波処理時間による冬虫夏草子実体多糖類抽出率の変化を図 2-1 に示している。抽出率は超音波処理時間の延長とともに上昇し、30 min で最大値に達した。時間がそれ以上長くなると、抽出率はわずかに減少した。この原因は超音波の過剰処理にともなう高温による多糖類の構造破壊であると考えられる<sup>[59-62]</sup>。

#### 超音波出力

単一要素分析において、90、180、270、360、450、540、630、720 及び 810 W の超音波出力における冬虫夏草子実体多糖類の抽出率を検討した。他に設定された条件は 30 min の超音波処理時間及び 20 mL/g の溶媒量であった。

超音波出力による冬虫夏草子実体多糖類抽出率の変化を図 2-2 に示している。抽出率は超音波出力の増加とともに上昇し、450 W で最大値に達した。超音波出力がそれ以上増加しても、抽出率は殆ど変化してなかった。以上の結果より、20 mL/g の溶媒量で 30 min、450 W での超音波処理により、十分な多糖類抽出がなされた<sup>[62, 63]</sup>。

#### 溶媒量

単一要素分析において、4、5、6、7、10、15、20、25、30、35 及び 40 mL/g の溶媒量における冬虫夏草子実体多糖類の抽出率を検討した。他に設定された条件は 30 min の超音波処理時間及び 450 W の超音波出力であった。

超音波出力による冬虫夏草子実体多糖類抽出率の変化を図 2-3 に示している。溶媒が少ないほど、冬虫夏草子実体多糖類の抽出率が高いといった傾向がみられた。この原因として、溶媒が過剰な場合、粒子間の空隙が多いため、超音波による粒子の動きがより強くなり、サンプルに与えた超音波のエネルギーがより多くの運動エネルギーに変化することで、抽出促進効果は弱まると考えられる。また、溶媒が少ない場合、サンプル顆粒分布の密度差がより激しく、超音波による移動促進がより顕著となり、超音波が溶媒を通過する際に、消耗されるエネルギーもより少なくなるためと推察される<sup>[62-64]</sup>。

### 2.3.2 応答曲面分析

#### 冬虫夏草子実体多糖類の抽出率に対応する方程式の確定

表 2-2 に示している通り、5 回の並行検査(各要素が全部 0 レベルである)を含む 17 回の冬虫夏草子実体多糖類の抽出を行った。ANOVA 分析により、各要素に基づく抽出率の方程式は下記通りである。

$$Y = 5.56 + 7.17 \times 10^{-2} X_1 + 6.80 \times 10^{-3} X_2 - 0.444 X_3 - 3.82 \times 10^{-6} X_1 X_2 - 3.75 \times 10^{-4} X_1 X_3 + 1.22 \times 10^{-4} X_2 X_3 - 8.81 \times 10^{-4} X_1^2 - 5.90 \times 10^{-6} X_2^2 + 6.25 \times 10^{-4} X_3^2 \quad (3)$$

上記方程式に関する分散分析結果を表 2-3 に示した。相関係数が 0.9975 であったため、冬虫夏草子実体多糖類の抽出率が方程式 3 により推算できると考えられる。調整相関係数と予測相関係数の差( $R^2_{\text{Adj}} - R^2_{\text{Pred}}$ )は 0.0243 であり、0.2 より小さく且つ変異係数(C.V.)は 1.2%であり、10%より小さい値であったため、上記方程式の信憑性が高いと考えられる。また、不適合度は 0.024 であり、純粹誤差に対しては顕著でなかったため、上記方程式は冬虫夏草子実体多糖類の抽出過程を十分に解釈できると考えられる。最後に、高精度(Adequate precision)は 58.660 であり、4 以上でなければならないといった基準に合致した<sup>[65]</sup>。

このため、上記超音波処理時間、超音波出力、溶媒量といった要素に基づく方程式は冬虫夏草子実体多糖類抽出率を検討する際に使用できると考えられる。

## 回帰係数の推定及びモデルの有意差分析

表 2-4 により、モデル及び各要素が有意であるかどうかについて、F 値及び P 値で判断した。F 値と P 値は小さいほど、モデル及び各要素は有意であると考えられ、P 値は 0.001 以下の場合には有意であり、0.0001 以下の場合には非常に有意であることを示す。特に要素の場合、2 乗因子の P 値(例えば  $X_1^2$  の P 値)は 1 乗因子の P 値(例えば  $X_1$  の P 値)より、優先的に採用するといった基準がある。

モデルの P 値は 0.0001 以下であったため、モデル(方程式 3)自身は有意であると考えられる。更に、超音波処理時間、超音波出力及び溶媒量の P 値は全て 0.0001 以下であったため、各要素は単独的に冬虫夏草子実体多糖類の抽出率に対し、有意に影響していると考えられる。

一方、各要素の共同因子( $X_1X_2$ 、 $X_1X_3$  及び  $X_2X_3$ )の P 値は全て 0.01 以上であったため、各要素の相互作用は冬虫夏草子実体多糖類の抽出率に対し、有意に影響していないと考えられる。

## 応答曲面

応答曲面は回帰係数のほかに、各要素の相互作用を直観的に示すものであり、回帰係数と一致するはずである。応答曲面の等高線の形により、各要素互の相互作用は標的変量(本章の場合は冬虫夏草子実体多糖類の抽出率)に対し、有意かどうかが表示される。安定で緩やかな円形等高線の場合、相互作用は有意でなく、無視しても構わないと表示する。一方、明らかな楕円形等高線の場合、相互作用は有意であり、無視できないといったことを表示する<sup>[66]</sup>。

図 2-4 に、超音波処理時間及び超音波出力に関する曲面を示している。超音波処理時間及び超音波出力が 10-38.53 min 及び 90-604.61 W といった範囲内における増加とともに、冬虫夏草子実体多糖類の抽出率も上昇した。ただし、超音波処理時間及び超音波出力の過剰増加により、冬虫夏草子実体多糖類の抽出率は逆に減少した。

図 2-5 及び図 2-6 により、溶媒量が固定値であれば、冬虫夏草子実体多糖類の抽出率は 38.53 min 及び 604.61 W の場合に最大値に達することが確認され、図 2-1 の結果に合致した。溶媒量の上昇とともに、冬虫夏草子実体多糖類の抽出率は減少する一方であり、その結果は図 2-3 に合致した。ただし、懸濁液を作製する際に、4 mL/g の溶媒量は最低限必要量であったため、4 mL/g 以下の場合には検討出来なかった。

更に、図 2-4、図 2-5 及び図 2-6 により、曲面は緩やかであり、等高線は安定している円形或いは円形の一部であるため、超音波処理時間、超音波出力及び溶媒量といった 3 つの要素の相互作用は冬虫夏草子実体多糖類の抽出率に対し、有意に影響してはならず、表 2-4 に合致することが明らかとなった<sup>[52]</sup>。

### 最適条件の確立

Design-Expert(9, Stat-Ease, Inc.)といったソフトにより、理論上の冬虫夏草子実体の多糖類抽出に対応する最適抽出条件は 38.53 min の超音波処理時間、604.61 W の超音波出力及び 4 mL/g であるように推測された。その最適条件により、冬虫夏草子実体多糖類の最高抽出率の予測値は 7.35%であった。

超音波細胞粉碎機の調節機能により、調節可能な最小時間単位は 1 min であったほか、超音波処理時間の単一要素分析結果により、最適時間未満の場合、抽出率は低く、最適時間を超えた場合、抽出率は最高抽出率と近似したため、39 min が検証実験の超音波処理時間として採用された。

また、調節可能な最小超音波出力単位は最大値の 1%すなわち 9 W であったため、最も近似する 603 W が検証実験の超音波出力として採用された。

最後に、4 mL/g はピークの頂点ではなかったが、それ以下の量でサンプル懸濁液が作製できなかつたため、やむを得ず検証実験の溶媒量として採用した。

上記の最適条件により、冬虫夏草子実体多糖類の抽出を 3 回行った結果、最高抽出率の実測値は  $7.29 \pm 0.07\%$  であり、予測値に合致した。応答曲面分析法で算出された方程式が冬虫夏草子実体多糖類の抽出率の解析に妥当であるといった知見を示唆するものである。

### 2.3.3 従来法との抽出率比較

表 2-5 に示した通り、熱水抽出法による冬虫夏草子実体多糖類の抽出率は  $3.01 \pm 0.10\%$  であり、超音波破碎抽出法による冬虫夏草子実体多糖類の抽出率は  $7.29 \pm 0.07\%$  であった。以上のことから、熱水抽出法と比べて、超音波破碎抽出法が抽出率を 142% 向上させたことは明らかとなった。

また、熱水抽出法と比べて、超音波破碎抽出法が時間を 67.5% 短縮し、溶媒消費量を 86.7% 節約し、消費電力を 63.4% 節約したことは確認された。抽出率及び抽出コストから、超音波破碎抽出法は優れている抽出法である。

## 2.4 まとめ

本章により、冬虫夏草子実体多糖類に対する超音波破碎抽出条件が最適化された。熱水抽出法と比べて、超音波破碎抽出法は抽出率を 142% 向上させたため、冬虫夏草子実体多糖類に対してより効率的な抽出法であると考えられる。

更に、超音波破碎抽出法にて抽出率の向上、抽出時間の短縮、溶媒の節約、エネルギーの節約といった利点を確認された。

表 2-1 単一要素分析の条件

要素 (単位)	値
超音波処理時間 (min)	3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33、36
超音波出力 (W)	90、180、270、360、450、540、630、720、810
溶媒量 (mL/g)	4、5、6、7、10、15、20、25、30、35、40

表 2-2 応答曲面分析条件(a)及び Box-Behnken による実験区結果(b)

(a)

要素 (単位)	記号	レベル		
		-1	0	1
超音波処理時間 (min)	$X_1$	10	30	50
超音波出力 (W)	$X_2$	90	450	810
溶媒量 (mL/g)	$X_3$	4	6	8

(b)

回数	$X_1$ (min)	$X_2$ (W)	$X_3$ (mL/g)	$Y$ (%)
1	0	0	0	6.41
2	-1	1	0	5.75
3	0	0	0	6.39
4	0	1	-1	7.04
5	1	0	1	5.52
6	1	-1	0	4.77
7	0	-1	1	3.96
8	0	0	0	6.29
9	-1	-1	0	4.10
10	0	-1	-1	5.78
11	0	0	0	6.32
12	-1	0	-1	6.45
13	1	1	0	6.31
14	0	0	0	6.34
15	0	1	1	5.57
16	-1	0	1	4.98
17	1	0	-1	7.05

$X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  及び  $Y$  は超音波処理時間、超音波出力、溶媒量及び抽出率を表示する。

表 2-3 各要素に基づく抽出率の方程式の分散分析

	二乗和	自由度	平均平方	F 値	P 値(prob. >F)
残留	0.034	7	$4.875 \times 10^{-3}$		
不適合度	0.024	3	$8.108 \times 10^{-3}$	3.31	0.1389
純粹誤差	$9.800 \times 10^{-3}$	4	$2.450 \times 10^{-3}$		
$R^2$				0.9975	
$R^2_{\text{adj}}$				0.9942	
$R^2_{\text{pred}}$				0.9699	
C.V.%				1.20	
Adequate precision				58.660	

表 2-4 回帰係数の推定及び二次方程式の有意差分析

	二乗和	自由度	平均平方	F 値	P 値(prob. >F)
Model	13.40	9	1.49	305.48	<0.0001
$X_1$	0.70	1	0.70	144.02	<0.0001
$X_2$	4.59	1	4.59	941.63	<0.0001
$X_3$	4.95	1	4.95	1014.46	<0.0001
$X_1X_2$	$3.025 \times 10^{-3}$	1	$3.025 \times 10^{-3}$	0.62	0.4567
$X_1X_3$	$9.000 \times 10^{-4}$	1	$9.000 \times 10^{-4}$	0.18	0.6804
$X_2X_3$	0.031	1	0.031	6.28	0.0406
$X_1^2$	0.52	1	0.52	107.32	<0.0001
$X_2^2$	2.46	1	2.46	505.46	<0.0001
$X_3^2$	$2.632 \times 10^{-5}$	1	$2.632 \times 10^{-5}$	$5.398 \times 10^{-3}$	0.9435

表 2-5 超音波破碎抽出法と熱水抽出法の比較

抽出法	超音波破碎抽出法	熱水抽出法
抽出率の予測値 (%)	7.35	—
抽出率の実測値 (%)	7.29 ±0.07	3.01 ±0.10
装置出力 (W)	900	800
消費電力 (kWh)	0.585	1.6

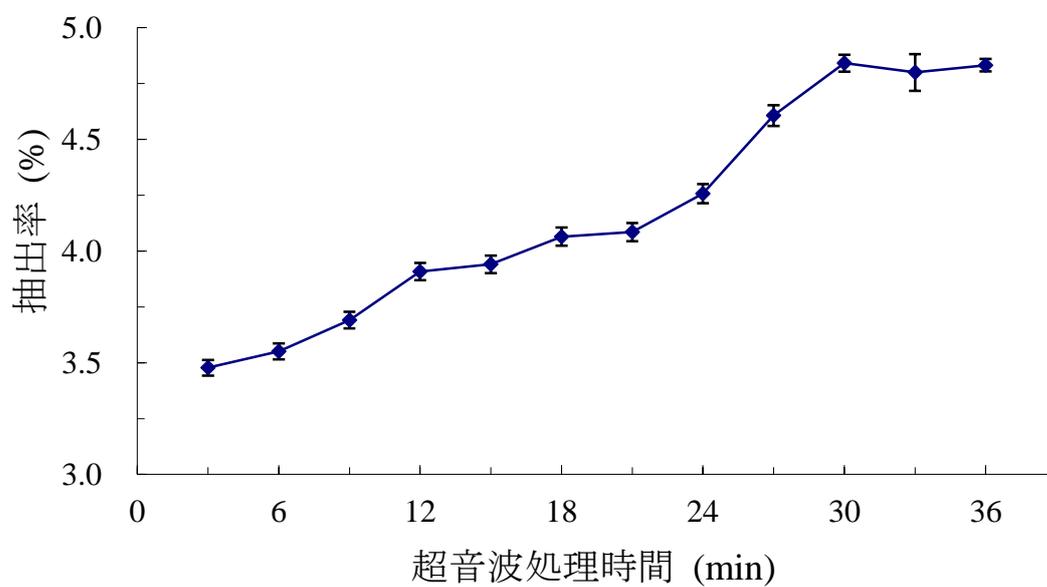


図 2-1 超音波処理時間に関する単一要素分析結果

超音波出力及び溶媒量は 450 W 及び 20 mL/g 設定した。

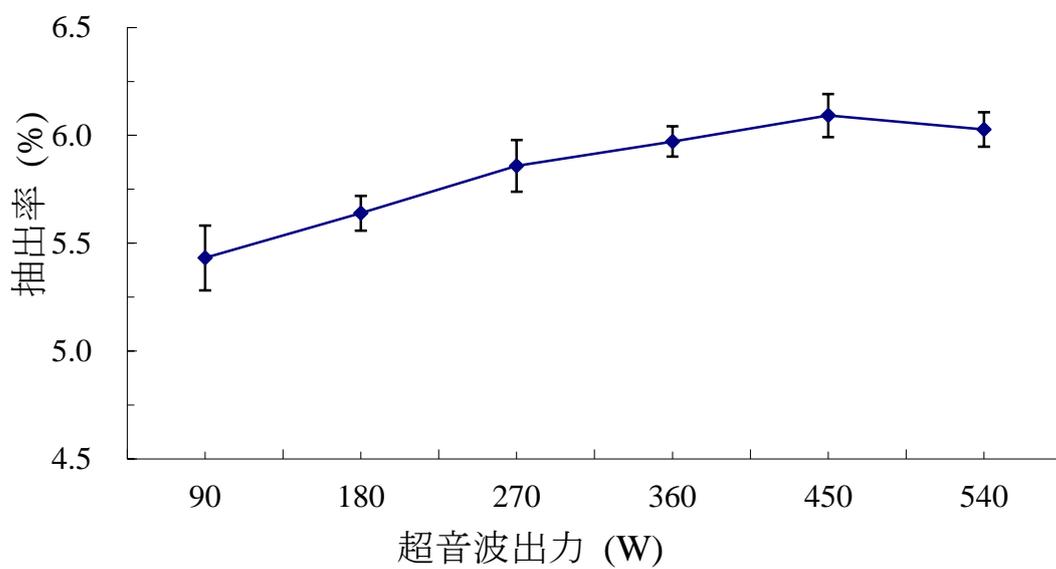


図 2-2 超音波出力に関する単一要素分析結果

超音波処理時間及び溶媒量は 30 min 及び 20 mL/g に設定した。

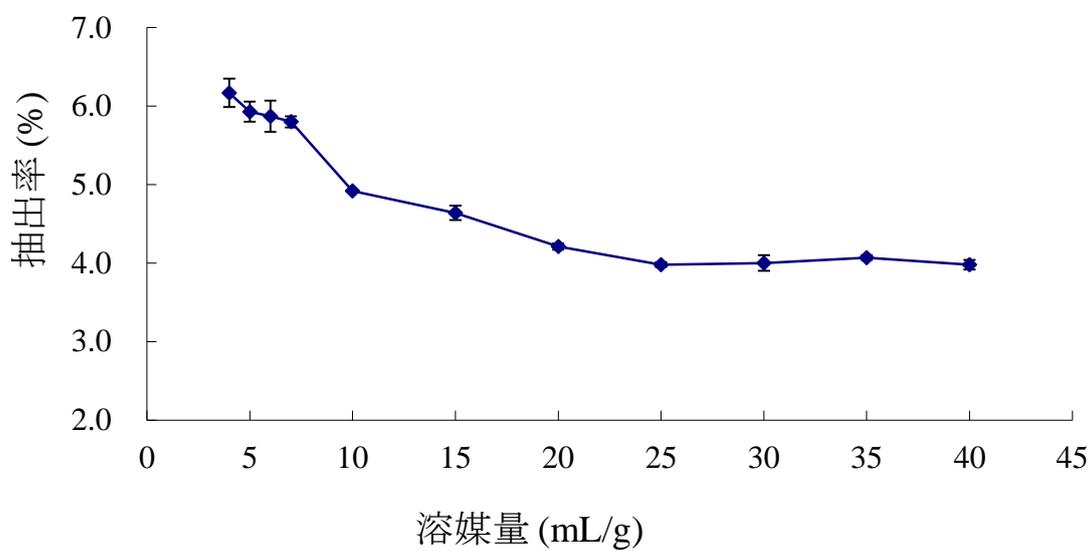
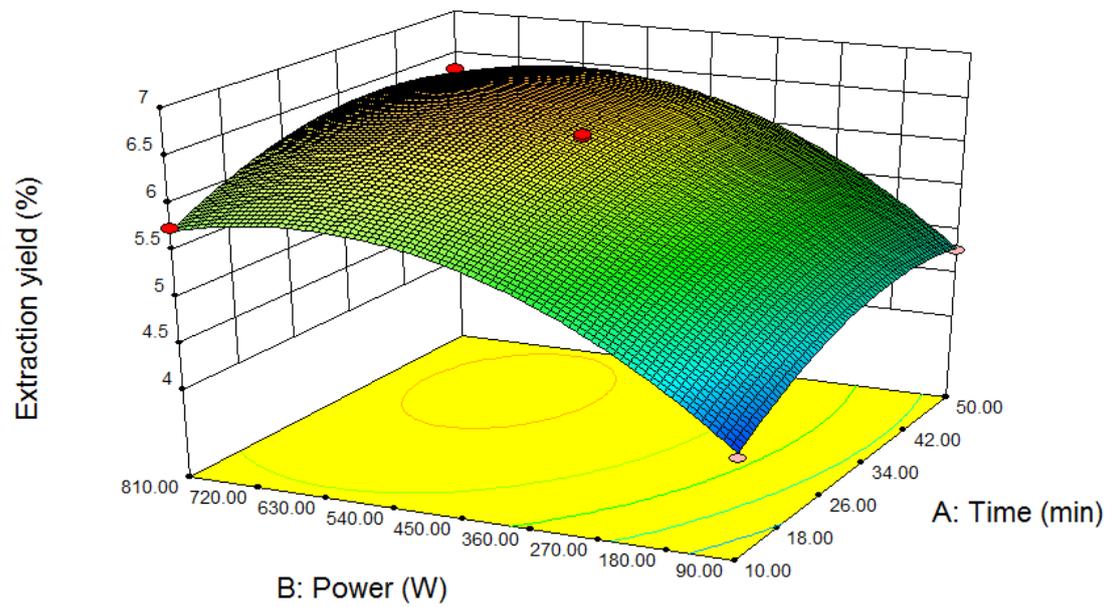


図 2-3 溶媒量に関する単一要素分析結果

超音波処理時間及び超音波出力は 30 min 及び 450 W に設定した。

(a)



(b)

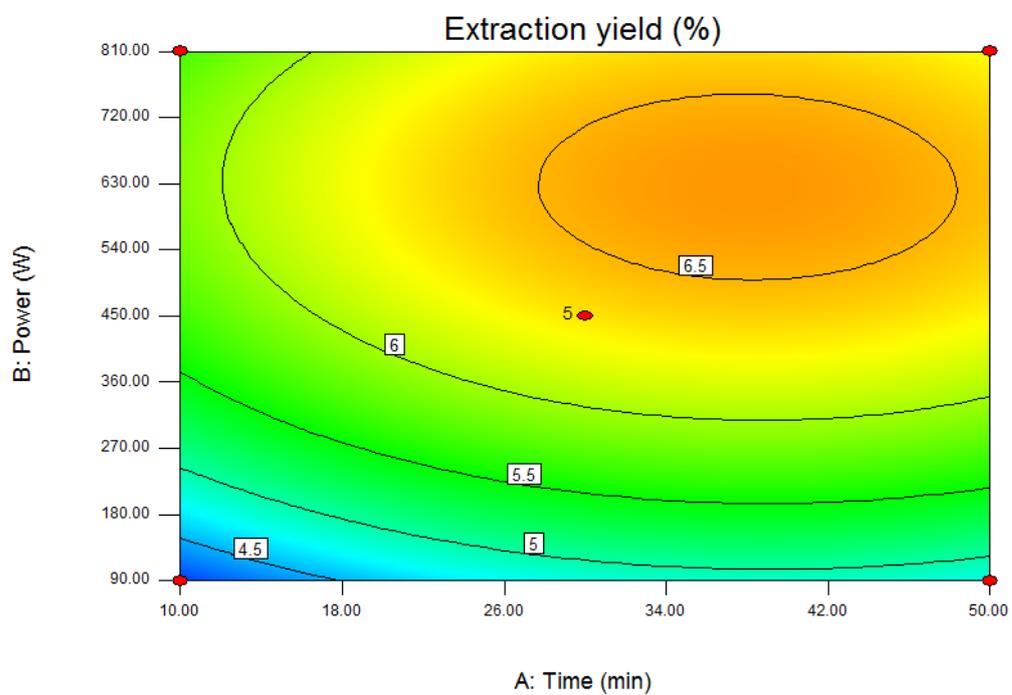
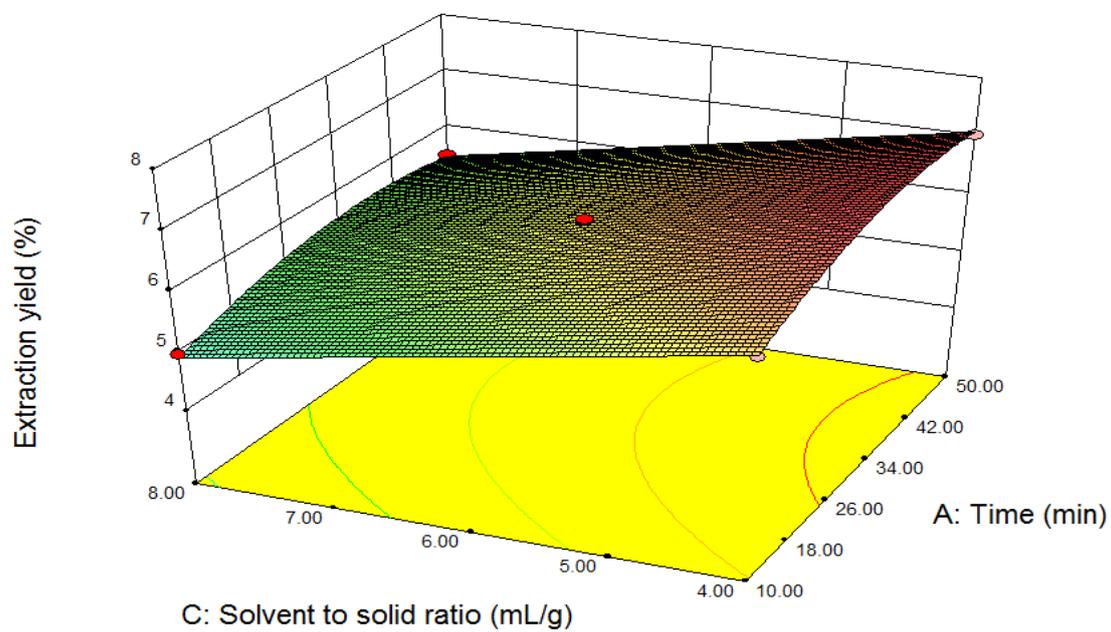


図 2-4 超音波処理時間及び超音波出力に関する 3D(a)及び 2D(b)グラフ

(a)



(b)

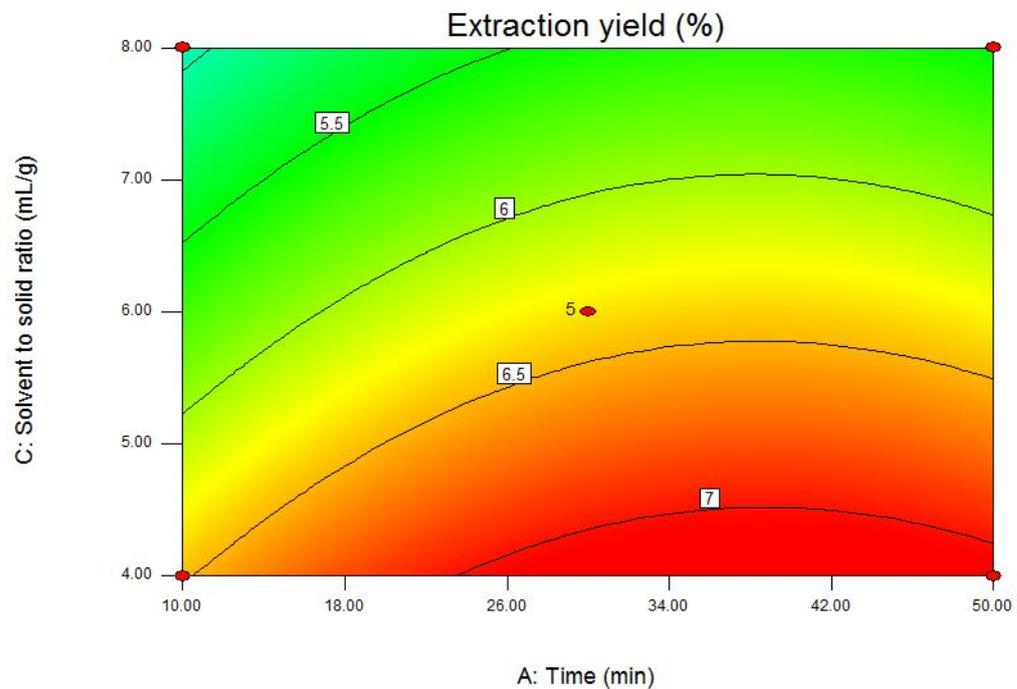
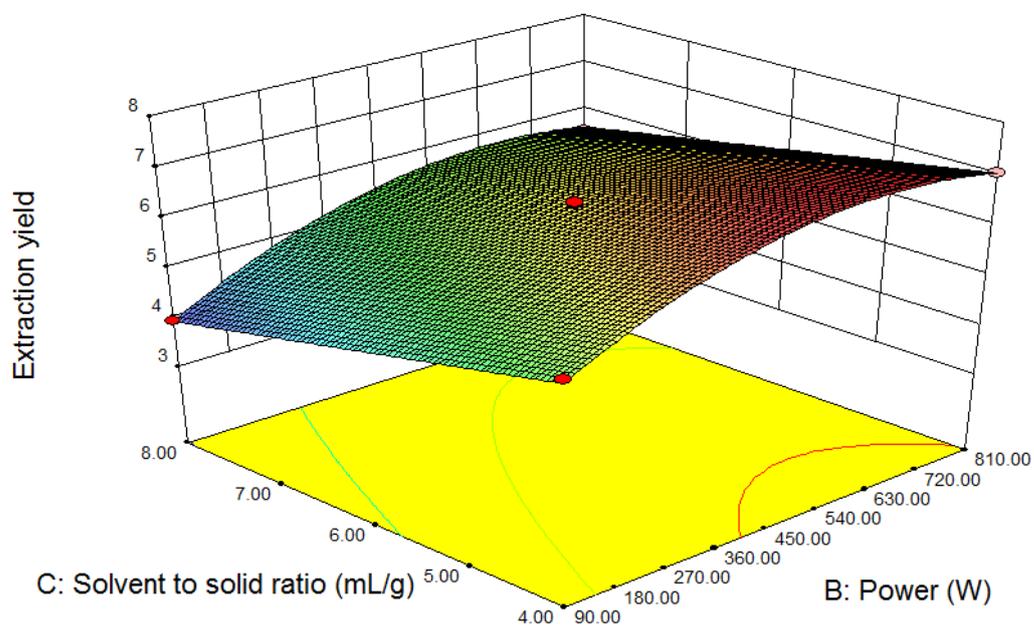


図 2-5 超音波処理時間及び溶媒量に関する 3D(a)及び 2D(b)グラフ

(a)



(b)

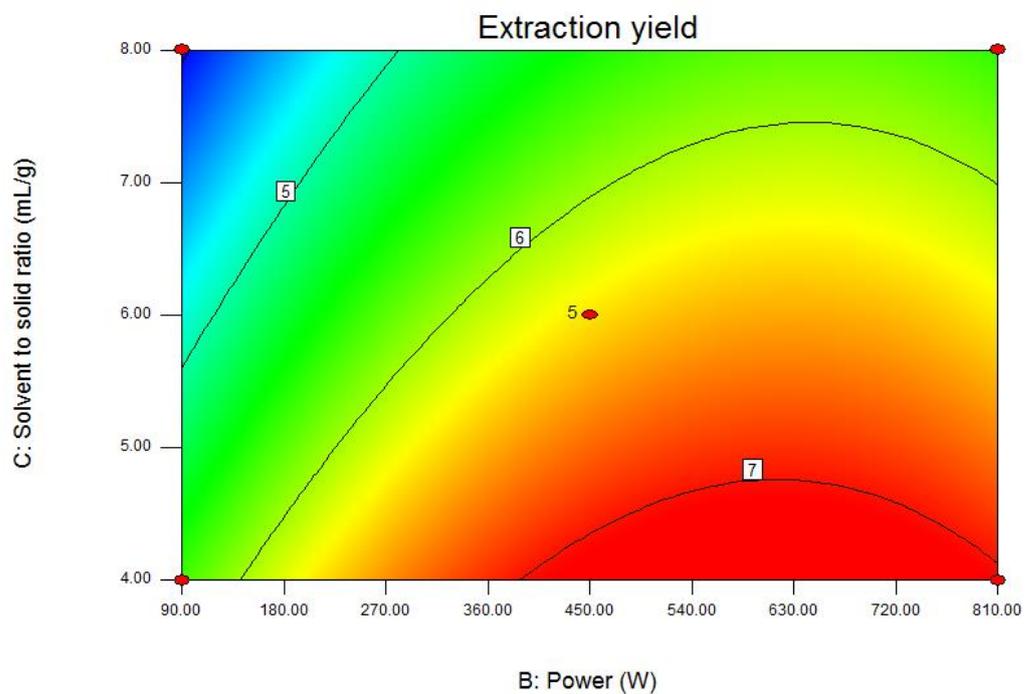


図 2-6 超音波出力及び溶媒量に関する 3D(a)及び 2D(b)グラフ

## 第3章 冬虫夏草子実体より多糖類抽出法の比較

### 3.1 はじめに

近年、超音波は天然物由来の各標的有効成分の抽出過程に広く応用されてきた。先行研究によれば、超音波破碎抽出法には短処理時間、簡単な操作、低溶媒消費、高抽出率などのメリットを有することが報告された。

一方、天然物由来の有効成分に基づき、超音波破碎抽出法の抽出率に関する比較研究はあったが、その有効成分の各生理活性は比較せずに測定されることが殆どであった。

このため、本章の研究は超音波破碎抽出法及び熱水抽出法により、冬虫夏草子実体由来の多糖類の抗酸化活性(DPPH ラジカル消去活性、ABTS ラジカル消去活性、水酸基ラジカル消去活性及び SOD 様活性)を測定した。更に、免疫調節活性(マウスマクロファージ細胞に対する細胞毒性及び保護作用)を測定することで2つの抽出法を比較した。

### 3.2 材料及び方法

#### 3.2.1 素材及び試薬

##### 生理活性測定用サンプルの用意

冬虫夏草子実体粉末を用い、超音波破碎抽出法及び熱水抽出法により、多糖類抽出を行った後、処理された懸濁液を 8000 rpm、15 分間、4 °C で遠心分離した。得られた上清を孔径 0.45 µm のフィルター(NY013045、アズワン株式会社)に通過させ、固形物を除去した。エタノールの使用量を節約するために、抽出液を減圧濃縮した。その後、濃縮された抽出液に対して 4 倍の体積に相当するエタノールを添加し、多糖類を 4 °C で 8 時間以上かけて沈殿させた。

8000 rpm、15 分間、4 °C の遠心分離により、沈殿した多糖類を分離し、適量の蒸留水で再び溶解し、多糖類水溶液とした。この多糖類水

溶液に 1/5 体積の SEVAGE 試薬(クロロホルム：ブタノール=4：1)を添加し、10 分間ほど攪拌させた後、有機相を除去し、水相を得た。水相の各イオンを除去するために、超純水による透析を 72 時間ほど行った。

透析した多糖類水溶液は減圧濃縮し、凍結乾燥した。得られた多糖類は 4 ℃ で密封保存した。

## 試薬

MEM 細胞培地、DPPH、ABTS、ウシ胎仔血清(FBS)、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、トリクロロ酢酸(TC(A))などは株式会社シグマ(神奈川、日本)より購入した。エタノールは和光純薬(大阪、日本)より、購入した。SOD キットは同仁化学分子テクノロジーズ株式会社(Dojindo Molecular Technologies, Inc.)より購入した。他の化学試薬は全て分析グレードのものを使用した。

### 3.2.2 抗酸化活性の測定

生体の酸化的代謝により、フリーラジカルは常に生成している。生命活動の衰弱により、フリーラジカルは DNA、タンパク質及び脂質膜を含む多くの生体物質を損傷し、様々な疾患および障害の原因ともなる。このため、栄養補助或いは特定の治療効果のある薬草、微生物及び真菌類に対するメカニズム解明の研究分野において、抗酸化活性はすでに研究の焦点の一つとなってきた。

多糖類は動物、植物及び微生物に多く発見され、抗腫瘍、抗がん、抗ウイルス、抗凝固更に免疫活性などの生理活性を示すことが知られている。

近年、食用キノコ由来の多糖類が抗酸化活性を有することが多く報告されてきた。本章により、冬虫夏草子実体由来の多糖類の抗酸化活性は比較研究の評価基準の一つとして選択され、測定された。特に抗酸化活性結果を示す

グラフの横軸に表示されている濃度は反応系中冬虫夏草子実体由来の多糖類の濃度である。

### DPPH ラジカル消去活性の測定

DPPH ラジカル消去活性は Blois が確立した方法<sup>[67]</sup>により、測定した。5 mg の DPPH 試薬を量りとり、99.5%エタノールにより、濃度が 25 mg/L になるように調製した。測定する前に、各サンプル粉末を蒸留水により、濃度が 10 mg/mL になるように調製した。更に、2 倍希釈の繰り返しにより、濃度が 5、2.5、1.25、0.625、0.313 及び 0.156 mg/mL である一連のサンプル溶液を調製した。

0.5 mL 上記各濃度のサンプル溶液に 3 mL の DPPH 標準液を添加し、十分混ぜた上、室温暗所にて 30 分間変色反応した。水溶性ビタミン E(Trolox)を陽性対照試薬として同様の変色反応を行った。サンプル溶液の代わりに等積の蒸留水を DPPH 標準液と混ぜたものを空白対照区(サンプル無し)とした。サンプル自身による吸光度の影響を排除するために、DPPH 標準液の代わりに、等積の 99.5%エタノールを添加したサンプル対照区(試薬無し)も設定した。

十分反応した後、517 nm での吸光度を測定し、DPPH ラジカル消去活性を方程式 4 計算した。

$$\text{DPPH ラジカル消去活性 (\%)} = \{1 - (B - C)/A\} \times 100 \quad (4)$$

その中、A、B 及び C はそれぞれ空白対照区、実験区或いは陽性対照区及びサンプル対照区の吸光度を表す。

### ABTS ラジカル消去活性の測定

ABTS 試薬を蒸留水で濃度が 7 mM になるように調整した。5 mL の ABTS 溶液を 88 µL の濃度が 2.45 mM である過硫酸カリウムと十分に混ぜ、室温暗所で 12-16 時間変色した後、標準液として室温暗所に保存されていた<sup>[68]</sup>。

使用する前、ABTS 標準液の 734 nm での吸光度が  $0.7 \pm 0.02$  になるように 99.5%エタノールによって希釈した。

測定する前に、各サンプル粉末を蒸留水により、濃度が 10 mg/mL になるように調製した。更に、2 倍希釈の繰り返しにより、濃度が 5、2.5、1.25、0.625、0.313 及び 0.156 mg/mL である一連のサンプル溶液を調製した。

0.15 mL の上記各濃度のサンプル溶液に 2.85 mL の ABTS 標準液を添加し、十分混ぜた上、室温暗所にて 10 分間変色反応した。水溶性ビタミン E(Trolox)を陽性対照試薬として同様の変色反応を行った。サンプル溶液の代わりに等積の蒸留水を ABTS 標準液と混ぜたものを空白対照区とした。サンプル自身による吸光度の影響を排除するために、ABTS 標準液の代わりに、等積の 99.5%エタノールを添加したサンプル対照区も設定した。

十分反応した後、734 nm での吸光度を測定し、方程式 5 により、ABTS ラジカル消去活性を計算した。

$$\text{ABTS ラジカル消去活性 (\%)} = \{1 - (A - B)/C\} \times 100 \quad (5)$$

その中、A、B 及び C はそれぞれ実験区或いは陽性対照区、サンプル対照区及び空白対照区の吸光度を表す。

### 水酸基ラジカル消去活性の測定

水酸基ラジカル消去活性は論文に掲載された方法により、測定した<sup>[69]</sup>。水酸基ラジカルは硫酸鉄(II)と過酸化水素の反応により生成され、水酸基サリチレートにより定量的に検出される。

試薬として、硫酸鉄(II)、過酸化水素及びサリチル酸ナトリウムを濃度が 1.5 mM、6 mM、20 mM になるように調製した。

測定する前に、各サンプル粉末を蒸留水により、濃度が 10 mg/mL になるように調製した。更に、2 倍希釈の繰り返しにより、濃度が 5、2.5、1.25、0.625、0.313 及び 0.156 mg/mL である一連のサンプル溶液を調製した。

2 mL の上記各濃度のサンプル溶液に 1 mL の硫酸鉄(II)溶液、0.7 mL の過酸化水素溶液及び 0.3 mL のサリチル酸ナトリウム溶液を添加し、十分混ぜた上、37 °C で 1 時間の変色反応をした。水溶性ビタミン E(Trolox)を陽性対照試薬として同様の変色反応を行った。サンプル溶液の代わりに等積の蒸留水を各試薬と混ぜたものを空白対照区とした。サンプル自身による吸光度の影響を

排除するために、サリチル酸ナトリウム溶液の代わりに、等積の蒸留水を添加したサンプル対照区も設定した。

十分反応した後、562 nm での吸光度を量り、方程式 6 により、水酸基ラジカル消去活性を計算した。

$$\text{水酸基ラジカル消去活性 (\%)} = \{1 - (A - B)/C\} \times 100 \quad (6)$$

その中、A、B 及び C はそれぞれ実験区或いは陽性対照区、サンプル対照区及び空白対照区の吸光度を表す。

## SOD 様活性の測定

スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)は細胞内に発生した活性酸素を分解する酵素である。酸素消費量に対する SOD の活性の強さは、寿命に関係すると言われる。体重に対して消費する酸素の量が多い動物種ほど寿命が短くなるはずといった理論に基づき、SOD が活性酸素を分解することが、寿命延長に関与していると考えられている。動物の中でも霊長類、特にヒトは SOD の活性が際立って高いため、ヒトが長寿である原因のひとつとされている。

SOD 活性の測定方法により、他の物質の SOD に類似する活性酸素を分解する能力の強さは測定される。そういった活性は SOD 様活性といった<sup>[70]</sup>。スーパーオキシドディスムターゼでなく、SOD 様活性を持っている物質が食品や医薬品といったより広い分野で応用するためには更なる検討が必要であると考えられる。本章では、冬虫夏草子実体由来の多糖類の SOD 様活性を評価することにした。

SOD 様活性は SOD キットにより、簡易的に測定した。測定する前に、各サンプル粉末を蒸留水により、濃度が 10 mg/mL になるように調製した。更に、2 倍希釈の繰り返しにより、濃度が 5、2.5、1.25、0.625、0.313 及び 0.156 mg/mL である一連のサンプル溶液を調製した。

96 ウェルプレートはまずサンプル(サンプル溶液及び陽性対照試薬用ウェル)、ブランク 1、ブランク 2 及びブランク 3 のようにゾーニングする。WST 溶液と緩衝液は 1 : 19 の割合で混合して調製したものを WST ワーキング溶液

と言う。15  $\mu\text{L}$  の酵素溶液を 2.5 mL の希釈液で希釈したものを酵素ワーキング溶液といった。

反応系及び手順は下記の通りであった。

ステップ 1：各サンプル及びブランク 2 ウェルに、各濃度サンプル溶液或いは陽性対照溶液を 20  $\mu\text{L}$  ずつ添加した。各ブランク 1 及びブランク 3 ウェルに、蒸留水を 20  $\mu\text{L}$  ずつ添加した。

ステップ 2：全てのウェルに WST ワーキング溶液を 200  $\mu\text{L}$  ずつ添加し、十分に混ぜた。

ステップ 3：各ブランク 2 及びブランク 3 ウェルに、希釈液を 20  $\mu\text{L}$  ずつ添加した。

ステップ 4：各サンプル及びブランク 1 ウェルに、酵素ワーキング溶液を 20  $\mu\text{L}$  ずつ添加し、完全に攪拌した。

ステップ 5：37  $^{\circ}\text{C}$  で 20 分間変色反応させた。

最終的には反応した 96 ウェルプレートの 450 nm での吸光度を測定し、方程式 7 により、SOD 様活性を計算した。

$$\text{SOD 様活性 (\%)} = \{ (B - D) - (A - C) \} / (B - D) \times 100 \quad (7)$$

その中、A、B、C 及び D はそれぞれサンプル、ブランク 1、ブランク 2 及びブランク 3 の吸光度を表示している。

### 3.2.3 免疫調節活性の検討

マクロファージ細胞(Macrophage)は白血球の 1 種である。生体内をアメーバ様運動する遊走性の食細胞であり、死んだ細胞やその破片、体内に生じた変性物質や侵入した細菌などの異物を捕食して消化し、清掃の役割を果たす。とくに、外傷や炎症の際に活発である。また、抗原提示細胞でもある。免疫系の一部を担い、免疫機能の中心的役割を担っている。

具体的に、マクロファージ細胞は血液中の白血球の 5% を占める単核白血球から分化した細胞である。造血幹細胞から分化した単核白血球は骨髄で成熟し、血液に入ると炎症の化学仲介に関わる。単核白血球は約 2 日間血中に存在した後、血管壁を通り抜けて組織内に入り、マクロファージ細胞になる。

組織に入ると、マクロファージ細胞は細胞内にリソソームをはじめとした顆粒を増やし、消化酵素を蓄積する。マクロファージ細胞は分裂によっても増殖することができ、寿命は数ヶ月である。

マクロファージ細胞の免疫機能は活性化、増殖および抗原への攻撃により果たされている。まずマクロファージ細胞は T 細胞の生産するサイトカインを受け取ることにより活性する。サイトカインとは抗原と接触した T 細胞及び一部の他の白血球が生産する物質であり、主な標的はマクロファージ細胞である。サイトカインは様々なタンパク質より構成され、大食細胞起動要素、大食細胞遊走阻止因子、免疫複合物、様々なペプチド、多糖類、免疫補助物質等が存在している。ある種類のサイトカインは単球の成熟を促進し、マクロファージ細胞を増殖させ、食作用を活性化する。また、マクロファージ細胞を集め、抗原を攻撃させる。これらの働きにより炎症反応が強くなる。

マウスマクロファージ細胞は上記の特徴および機能を有するため、免疫機能の代表的な細胞の一種である。本節では、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 をモデルとして選択し、冬虫夏草子実体由来の多糖類の免疫調節活性を検討した。

### マウスマクロファージ細胞の培養

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 は理研細胞バンク(筑波、日本)より、購入した。10%ウシ胎仔血清を含む MEM 細胞培地に基づき、100 U/mL のペニシリンおよび 100 µg/mL のストレプトマイシンを添加した上、二酸化炭素濃度が 5%である細胞培養装置(ESPEC CO<sub>2</sub> Incubator)により、37 °C で培養していた<sup>[4]</sup>。細胞の成長状態により、対数期に達するまで、48-72 時間の培養が必要であると予測される。

### マウスマクロファージ細胞に対する細胞毒性の検討

細胞毒性(Cytotoxicity)とは、細胞に対して死、もしくは機能障害や増殖阻害の影響を与える物質や物理作用などの性質をいう。細胞毒性の要因としては、細胞を形作る物質や構造の破壊、細胞の生存に必須な活動(呼吸、基本

的代謝、DNA 複製、転写、翻訳等)の阻害、細胞周期や細胞内シグナル伝達への影響など、様々なものが考えられる<sup>[71-73]</sup>。

細胞毒性試験とは、体内組織や血液に直接接触れる医療機器の安全性試験に必須とされる他、医薬品等の安全性試験でも遺伝毒性試験などの補助的試験として用いられている。個体および器官レベルの毒性は必ずしも細胞毒性に由来のするものとは限らないが、細胞毒性は潜在的に個体および器官レベルの毒性につながる可能性がある。ADME(薬品などの吸収、分布、代謝および排出)による毒性につながらないことも多く、逆に代謝産物が細胞毒性を示すこともある。このため、培養細胞による細胞毒性試験を毒性の初期スクリーニングまたは動物実験の代替法として用いることも試みられている。皮膚などに対する刺激性に関しては、培養細胞から作った皮膚モデルにおける細胞毒性との高い関連性が示されており、特に化粧品に関しては動物実験が行われにくいといった近年の社会状況或いは規制もあるため、皮膚モデル細胞毒性試験がよく用いられている。

一方、細胞毒性は細胞の種類により大きく異なることがある。特に抗癌剤は癌細胞に対して選択的に細胞毒性を示し、正常細胞にはなるべく細胞毒性を示さないことが求められるため、初期スクリーニングとして細胞毒性試験が用いられる。

本研究の最大の目標は、冬虫夏草子実体および霊芝菌糸体発酵物を機能性食品のみならず補助医薬品とすることであるため、細胞毒性の有無の検討は重要である。

培地に最終濃度が 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及び 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるように超音波破碎抽出法及び熱水抽出法による冬虫夏草子実体由来の多糖類を添加した。また、冬虫夏草子実体由来の多糖類の代わりに等積の MEM 細胞培地を添加した対照区(多糖類無し)を設定した。対数期に達したマウスマクロファージ細胞を上記のように作製した培地に移し、24 時間の培養を行った。

培養した後、570 nm での吸光度を測定し、マウスマクロファージ細胞の細胞数を算出した。対照区の細胞数を 100%として各区の細胞数を算出した。

## マウスマクロファージ細胞に対する保護作用の検討

現在、各種の腫瘍、特に癌は世界で増加傾向にある。末期癌以外の場合、基本的に切除手術を受けた上、補助治療および再発予防治療を受けることが推奨される。このため、補助治療法である放射線療法および化学療法がよく利用されている。

ただし、使用されている殆どの放射線および化学薬品はがん細胞に対する殺傷効果を示すのみならず、免疫細胞を含む正常な生体細胞に対しても殺傷効果を示すことが問題点としてあげられる。

本研究は冬虫夏草子実体および霊芝菌糸体発酵物が癌治療期の患者に対する補助食品となる価値があるかどうかを検討し、その可能性を探求する。もし冬虫夏草子実体および霊芝菌糸体発酵物の摂取により、放射線および化学薬品によって引き起こされる免疫細胞に対する殺傷効果が軽減できれば、補助食品としての価値が高いと考えられる。

ドキソルビシン(Dox)は抗悪性腫瘍剤(抗がん剤)の一種であり、1967年にイタリアの Farmitalia 研究所の Arcamone らにより、*Streptomyces peucetius var. caesius* の培養濾液中から発見されたアントラサイクリン系の抗腫瘍性抗生物質である<sup>[74]</sup>。悪性リンパ腫(細網肉腫、リンパ肉腫、ホジキン病)、肺癌、消化器癌(胃癌、胆嚢・胆管癌、膵臓癌、肝癌、結腸・直腸癌等)、乳癌、膀胱腫瘍、骨肉腫に対する治療効果を有すると考えられ、臨床治療によく使用されている<sup>[75-78]</sup>。

メカニズムとして、ドキソルビシンは腫瘍細胞の DNA の塩基対間に挿入し、DNA ポリメラーゼ、RNA ポリメラーゼ及びトポイソメラーゼ II による反応を阻害し、DNA、RNA 両方の合成を抑制することにより、抗腫瘍効果を示すことが考えられる。同様な阻害現象は正常な生体細胞にもあると思われる。

本節では、ドキソルビシンを用い、マウスマクロファージ細胞に対する殺傷効果を確認した。その後、抽出された多糖類及びドキソルビシンを同時に

投与した場合のマウスマクロファージ細胞数によって保護作用の有無に関する検討した。

対数期に達したマウスマクロファージ細胞に、培地に最終濃度が 5.00  $\mu\text{mol/L}$  になるように、ドキシソルビシンを添加した。

そして、超音波破碎抽出法による冬虫夏草子実体由来の多糖類、熱水抽出法による冬虫夏草子実体由来の多糖類及び等積の MEM 細胞培地を添加した実験区を設定し、24 時間の培養を行った。ドキシソルビシン及び MEM 細胞培地を添加したマウスマクロファージ細胞は対照区とした。ドキシソルビシン及び冬虫夏草子実体由来の多糖類の代わりに等積の MEM 細胞培地を添加したマウスマクロファージ細胞は陰性対照区とした。

培養後、570 nm での吸光度を量り、マウスマクロファージ細胞の生存率を計算した。陰性対照区の細胞数を 100% として各区の細胞数を算出する。

### 3.2.4 統計解析

すべての実験は 3 回実施し、データは平均値及び標準偏差値で表した。統計解析は IBM の統計解析ソフトウェア SPSS Statistics 19.0 で行った。P 値が 0.01 より小さい場合に限り、統計学的に有意とみなした。

## 3.3 結果及び考察

### 3.3.1 抗酸化活性

図 3-1 は 2 種類の冬虫夏草子実体由来の多糖類の DPPH ラジカル消去活性を示している。冬虫夏草子実体由来の多糖類の濃度が低い場合、DPPH ラジカル消去活性は多糖類濃度の上昇とともに高くなり、濃度が 0.357 mg/mL 以上で 90% 以上といった活性を示した。以上の結果より、明らかな濃度依存性が確認された。

低濃度の場合、超音波破碎抽出法の多糖類の DPPH ラジカル消去活性は熱水抽出法の多糖類より、わずかに低かったが、高濃度の場合、僅かに高い傾向がみられた。

図 3-2 は 2 種類の冬虫夏草子実体由来の多糖類の ABTS ラジカル消去活性を示している。冬虫夏草子実体由来の多糖類の濃度が低い場合、ABTS ラジカル消去活性は多糖類濃度の上昇とともに強くなり、濃度が 0.125 mg/mL で 95% の最高消去率がみられた。それ以上になると、消去率は逆に少々低下した。その原因として、濃度が高すぎる場合、変色反応の際に余剰の多糖類が溶媒であるエタノールによって沈殿したことにより、沈殿物が吸光度に影響を及ぼしたと考えられる。

低濃度の場合、超音波破碎抽出法の多糖類の ABTS ラジカル消去活性は熱水抽出法の多糖類より、わずかに低かったが、高濃度の場合は同程度の活性が見られた。

図 3-3 は 2 種類の冬虫夏草子実体由来の多糖類の水酸基ラジカル消去活性を示している。冬虫夏草子実体由来の多糖類の濃度が低い場合、水酸基ラジカル消去活性は多糖類濃度の上昇とともに高くなり、濃度が 0.63 mg/mL 以上になると、97% 以上の高消去率に達した。このため、明らかな濃度依存性がみられた。

総合的に解析した結果、超音波破碎抽出法の多糖類と熱水抽出法の多糖類の水酸基ラジカル消去活性は同程度であると考えられる。特に、濃度が 0.63 mg/mL 以上である場合、2 種類の冬虫夏草子実体由来の多糖類の水酸基ラジカル消去活性は水溶性ビタミン E より高かった。

図 3-4 は 2 種類の冬虫夏草子実体由来の多糖類の SOD 様活性を示している。超音波破碎抽出法の多糖類の活性は熱水抽出法の多糖類より低かったが、SOD 様活性は多糖類の濃度上昇とともに高くなる傾向が確認され、濃度が 0.833 mg/mL で 70% 以上の SOD 様活性がみられたことから、明らかな濃度依存性がみられた。Shi らの論文<sup>[1]</sup>により、濃度が 2.5 mg/mL の場合、エノキタケ由来の多糖類の SOD 様活性は 30% 未満であったため、冬虫夏草子実体由来の多糖類はそれより高い SOD 活性を持っていると考えられる。

上記のとおり、冬虫夏草子実体由来の多糖類は高い抗酸化活性を示し、抗酸化作用を有する食品として利用する可能性が見られた。

### 3.3.2 免疫調節活性

#### マウスマクロファージ細胞に対する細胞毒性

図 3-5 は 2 種類の冬虫夏草子実体由来の多糖類のマウスマクロファージ細胞に対する細胞毒性試験の結果を示している。2 種類の冬虫夏草子実体由来の多糖類を添加した組のマウスマクロファージ細胞生存率は 100%に極めて近い値を示し、顕著な差が見られなかった。また、投与量の増加した場合にも細胞毒性は確認されなかった。

このため、冬虫夏草子実体由来の多糖類はマウスマクロファージ細胞に対する細胞毒性がなく、機能性食品或いは医療での活用としても利用可能であると考えられる。

#### マウスマクロファージ細胞に対する保護作用

図 3-6 は 2 種類の冬虫夏草子実体由来の多糖類を使用したマウスマクロファージ細胞に対する保護作用の結果を示している。

陰性対照区のマウスマクロファージ細胞数を 100%とすると、対照区のマウスマクロファージ細胞数は 52.5%となり、約半分のマウスマクロファージ細胞はドキソルビシンの毒性により、増殖が抑制されたと考えられる。

ドキソルビシンに加えて 2 種類の冬虫夏草子実体由来の多糖類を同時に添加した場合、マウスマクロファージ細胞の細胞数は 100%に極めて近い値をしめし、顕著な差は見られなかった。

また、濃度が非常に低い場合(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )においても、十分な保護作用がみられ、少量摂取に際しても、その効果は十分であると推察される。

メカニズムとしては、多糖類がマクロファージ細胞の Toll 様受容体 2、Toll 様受容体 4 及びデクチン-1 を経由した MAPKs 及び NF- $\kappa$ B 伝達経路を介してマクロファージ細胞を活性化することである<sup>[79-81]</sup>。

以上のことから、冬虫夏草子実体由来の多糖類は、マウスマクロファージ細胞に対する保護作用を有し、抗がん治療を受診する患者における回復期補助食品としての利用価値があると予想された。

### 3.4 まとめ

本章により、超音波破碎抽出法は従来法と比べ、冬虫夏草子実体由来の多糖類の各生理活性を保持することが確認できた。第 2 章の結果と合わせると、超音波破碎抽出法は冬虫夏草子実体に対してより優れている多糖類抽出法であると考えられる。

更に、冬虫夏草子実体由来の多糖類は高い抗酸化活性およびマウスマクロファージ細胞に対する顕著な保護作用を示しながら、細胞毒性を示してなかったため、抗酸化作用を有する食品及び癌治療回復期の補助治療食品とする可能性があるかと予想される。

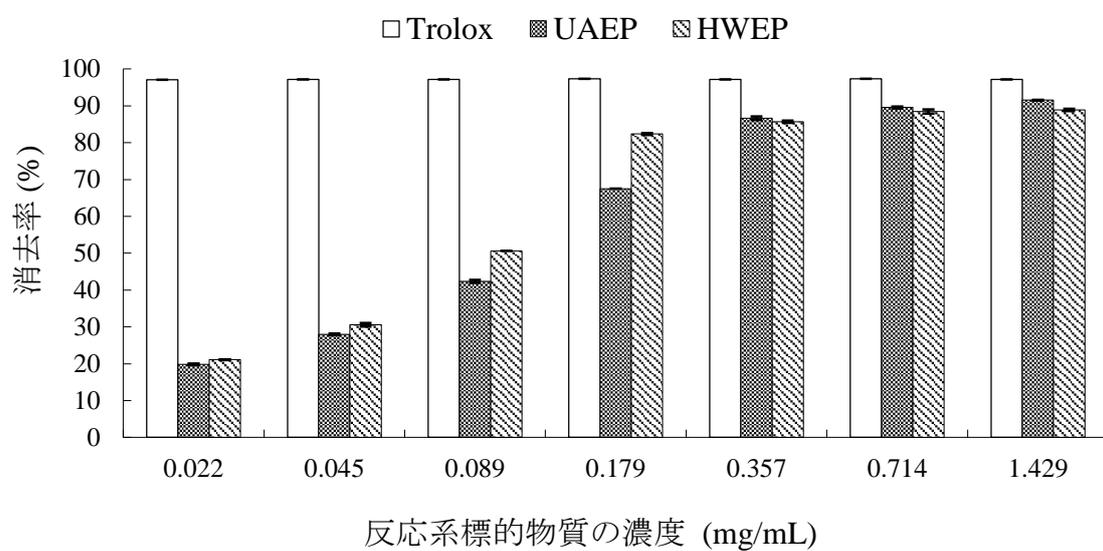


図 3-1 2 種類の冬虫夏草子実体由来多糖類の DPPH ラジカル消去活性  
 UAEP 及び HWPB は超音波破碎抽出法により抽出された多糖類および熱水抽出法により抽出された多糖類を表示した。

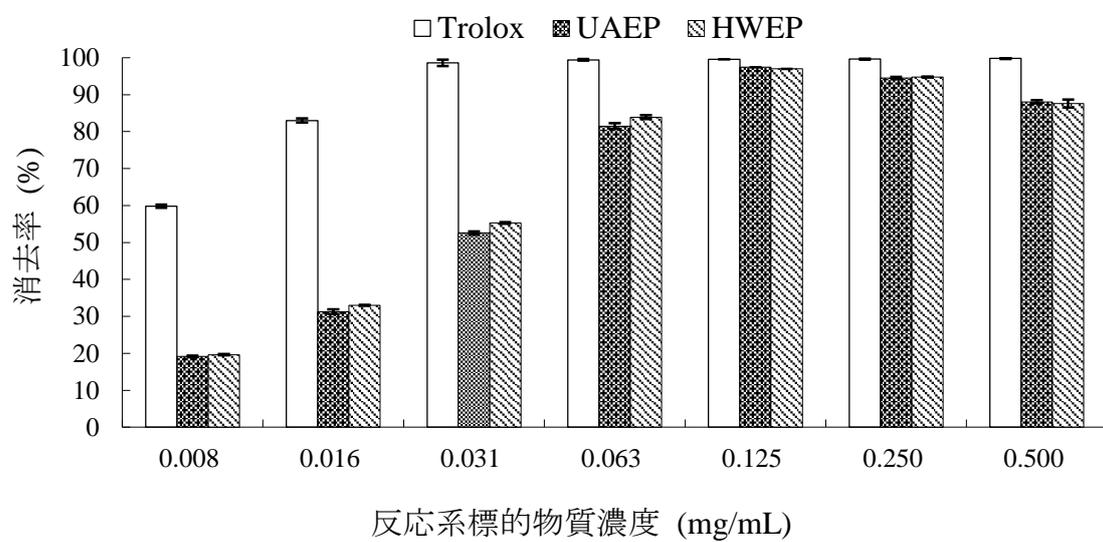


図 3-2 2 種類の冬虫夏草子実体由来多糖類の ABTS ラジカル消去活性  
 UAEP 及び HWEP は超音波破碎抽出法により抽出された多糖類および熱水抽出法により抽出された多糖類を表示した。

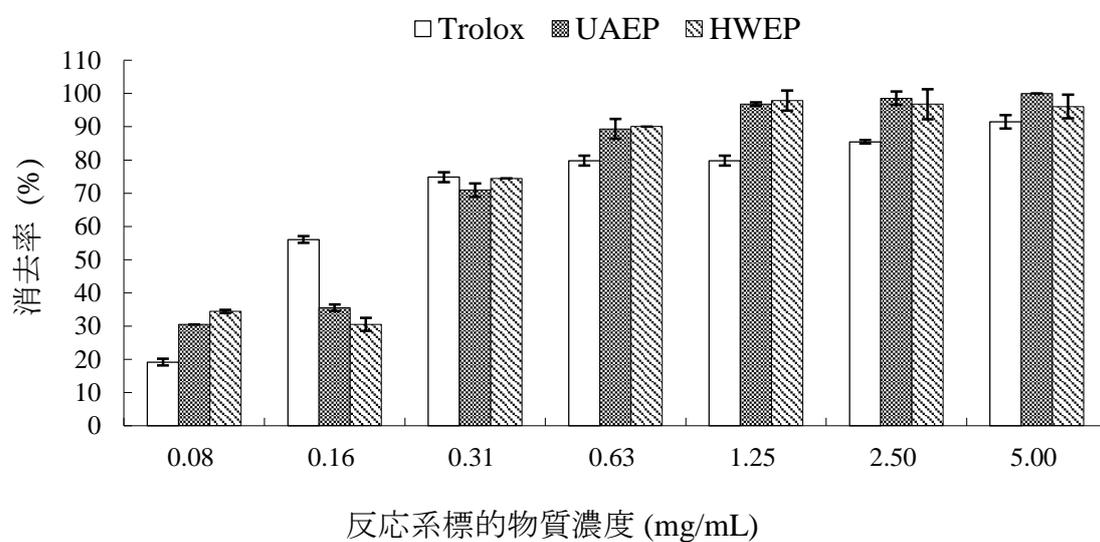


図 3-3 2 種類の冬虫夏草子実体由来多糖類の水酸基ラジカル消去活性  
 UAEP 及び HWEP は超音波破碎抽出法により抽出された多糖類および熱水抽出法により抽出された多糖類を表示した。

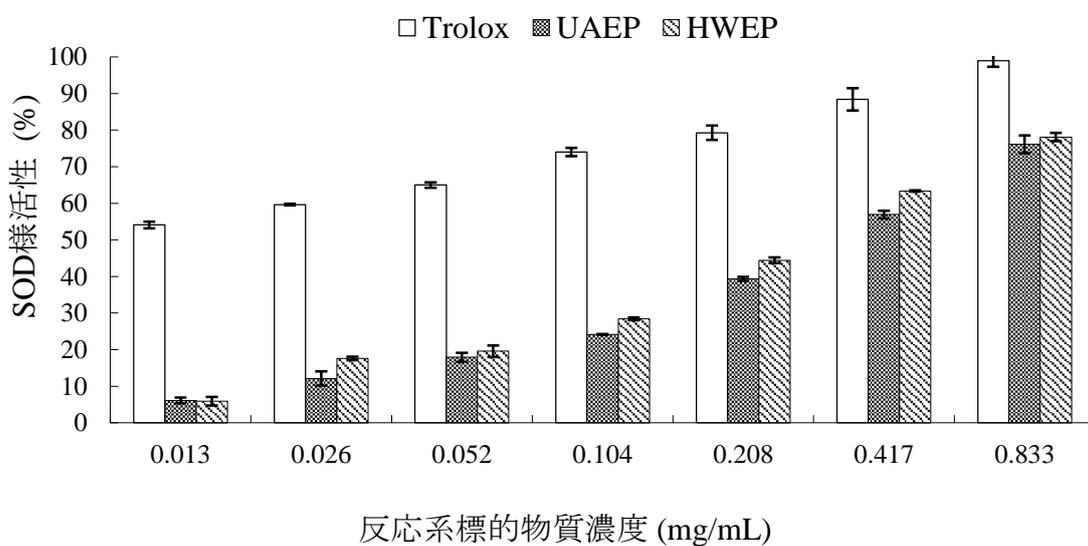


図 3-4 2 種類の冬虫夏草子実体由来多糖類の SOD 様活性

UAEP 及び HWP は超音波破碎抽出法により抽出された多糖類および熱水抽出法により抽出された多糖類を表示した。

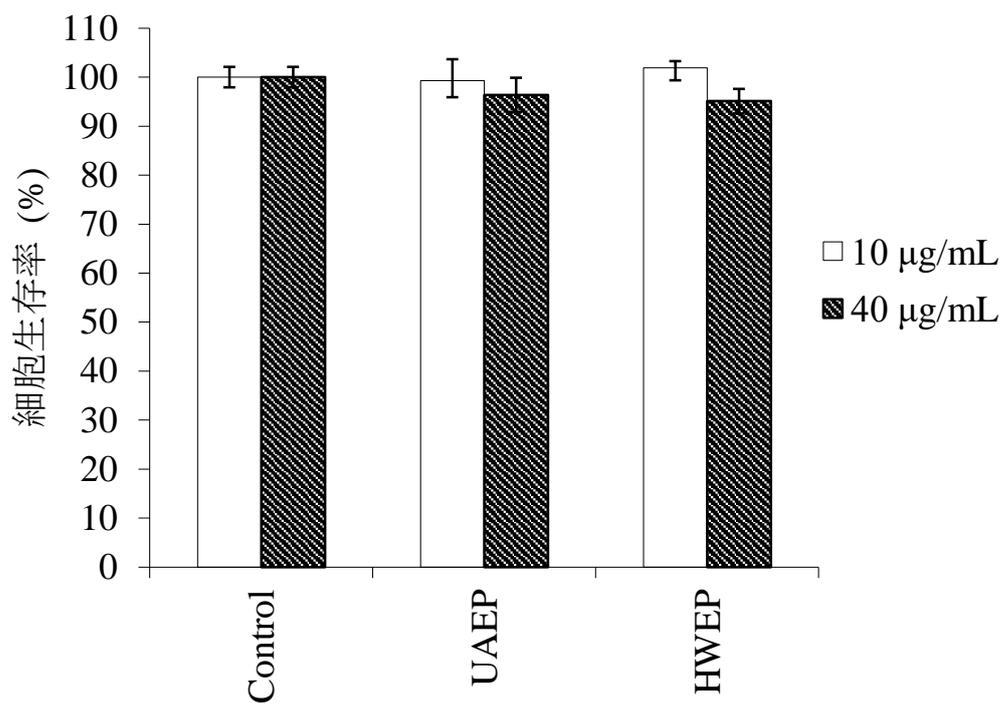


図 3-5 2 種類の冬虫夏草子実体由来の多糖類におけるマウスマクロファージ細胞に対する細胞毒性

Control、UAEP 及び HWEP は対照区、超音波破碎抽出法の子多糖類及び熱水抽出法の子多糖類を表示した。

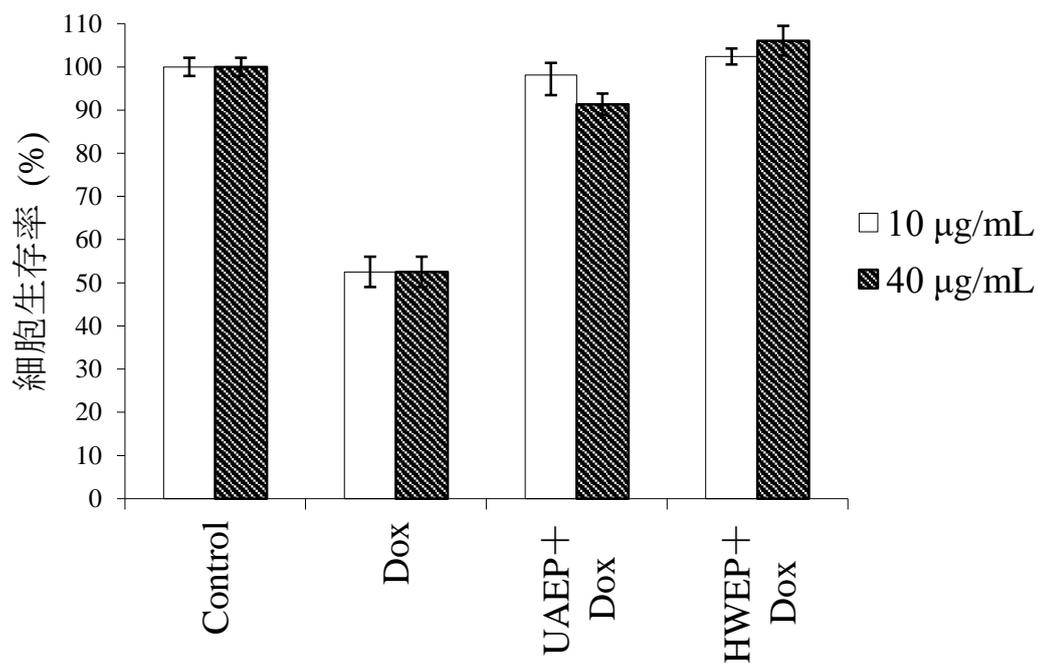


図 3-6 2 種類の冬虫夏草子実体由来の多糖類におけるマウスマクロファージ細胞に対する保護作用

Control、Dox、UAEP 及び HWEP は陰性対照区、対照区(ドキソルビシン添加組)、超音波破碎抽出法 of 多糖類及び熱水抽出法 of 多糖類を表示した。

## 第4章 霊芝菌糸体発酵物に対する最超音波破碎抽出

### 4.1 はじめに

本研究室では、冬虫夏草以外に、オカラを基質とした霊芝菌糸体培養技術を開発できた。しかし、霊芝菌糸体発酵物から、主な有効成分である多糖類を抽出する際に、熱水抽出法が選択されていた<sup>[2, 3, 6]</sup>。長時間、高溶媒消費および低抽出率といったデメリットがあり、得られる有効成分が少ないため、霊芝菌糸体発酵物やオカラの利用効率は低いと考えられる。このため、霊芝菌糸体発酵物を研究素材の一つとして選択し、多糖類を研究対象とした

本章では、より多くの有効成分を抽出することが可能な超音波を用いた抽出法において各条件の最適化を行った。最適化に用いられた分析法は応答曲面分析法であった。また、超音波を使用した抽出法を示した報告<sup>[4]</sup>に基づき、本章の抽出法の結果と比較した。更に、報告に記載された超音波を使用した抽出法及び本研究で確立された超音波破碎抽出法はそれぞれ「低出力超音波抽出法」及び「最適化された超音波破碎抽出法」にした。

### 4.2 材料及び方法

#### 4.2.1 素材及び試薬

##### 霊芝菌糸体発酵物

霊芝菌株 NBRC31863 は独立行政法人製品評価技術基盤機構により購入した。この菌株はジャガイモ-スクロース寒天培地(PS(A)の上で、4℃で保存されていた。保存株の霊芝菌は、ジャガイモ-スクロース寒天培地を用いて25℃で約1週間培養した。

その後、100gに0.2gの酵母エキス、0.8gのマルトース、2gのスクロース、0.5gのフルクトース、0.1gのリン酸二水素カリウムおよび

0.1 g の硫酸マグネシウムを含有する液体培地を調製した。そして、ジャガイモ-スクロース寒天培地に増殖した霊芝菌糸を辺の長さが 0.5 cm である正方形に切り、100 mL 液体培地当たり 10 個程接種し、緩やかに攪拌しながら液体培養を 5 日間行った。

最後に、固体培地(オカラ:スクロール=10:1)に培養した霊芝菌液を 10 g 当たり 1 mL 程接種し、28 °C の暗所で 20 日間培養した。

## 試薬

エタノール、フェノール、D-グルコース、濃硫酸、酵母エキス、マルトース、スクロース、フルクトース、りん酸二水素カリウムおよび硫酸マグネシウムは和光純薬(大阪、日本)より、購入した。全ての化学試薬は分析グレードのものを用いた。

### 4.2.2 装置

超音波細胞破碎機(JY92 - IIDN)は杭州 Chincan 貿易有限公司(杭州、中国)より、購入した。超音波(周波数は 20 kHz に設定しておいた)の最大出力は 900 W であり、1%から 99%まで 1%ごとに調整できる。反応系の温度は、温度警報システムにより、50 °C 以下に制御した。

### 4.2.3 霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出

#### サンプルの用意

霊芝菌糸体発酵物は、40 °C で 2 日間乾燥し、粒径 150 μm までに粉砕した。その後、単糖類、脂質などを除去するために、サンプル粉末は 1 g あたり 5 mL の 80%エタノールで還流した(質量の損失率は 3%未満であった)。濾過及び洗浄を繰り返した残渣は 40 °C で再び乾燥した。乾燥後、サンプルを粒径 150 μm までに再度粉砕し、最終的には 4 °C で保存した。

## 最適化された超音波破碎抽出法が多糖類抽出

最適化された超音波破碎抽出法により、霊芝菌糸体発酵物からの多糖類抽出は、第2章(2.2.3.2)に記述された流れに従って行った。

## 低出力超音波破碎抽出法が多糖類抽出

既往論文<sup>[4]</sup>により、超音波処理時間が 30 min であり、超音波出力が 80 W、抽出温度は 80 °C、溶媒量は 10 mL/g である低出力超音波破碎抽出法を採用した。

サンプル粉末を上記溶媒量に従い、蒸留水に混合し懸濁液にした後、上記の特定条件である超音波で処理し、80 °C で 30 分間抽出した。

抽出液は 8000 rpm、15 分間、4 °C で遠心分離した。上清を孔径 0.45 μm のフィルター(NY013045、アズワン株式会社)に通過させ、固形物を除去した。更に、1 mL の抽出液に 4 mL の 99.5%エタノールを添加し、抽出液中の多糖類を 4 °C で 8 時間以上かけて沈殿させた。

8000 rpm、15 分間、4 °C の遠心分離により、沈殿した多糖類を分離し、10 mL 蒸留水で再び溶解することで多糖類水溶液とした。

## 熱水抽出法が多糖類抽出

熱水抽出法による霊芝菌糸体発酵物多糖類抽出は第2章(2.2.3.3.)に記述された流れに従い、行われた。

## 抽出率の計算

霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出率は第2章に記述された方法に従い、方程式1により算出した。

#### 4.2.4 応答曲面分析

##### 単一要素分析

第 2 章と同様、超音波処理時間、超音波出力及び溶媒量といった 3 つの要素が分析対象として選択された。選定した範囲内で変化する各要素に対応する抽出率によって検討した後、最適値を応答曲面分析に使用する。

##### 応答曲面分析

第 2 章に記述された応答曲面分析法(2.2.4.2)の流れに従い、霊芝菌糸体発酵物多糖類に対する超音波破碎抽出法の条件が最適化された。理論値に最も近い条件で検証実験を行った上、最適化の信憑性を確認する。

#### 4.2.5 従来法との抽出率比較

従来法である熱水抽出法による霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出率を測定した後、最適超音波破碎抽出条件による霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出率と比較し、より優れている抽出法を確定する。

#### 4.2.6 統計解析

すべての実験は 3 回実施し、データは平均値及び標準偏差値で表した。統計解析は IBM の統計解析ソフトウェア SPSS Statistics 19.0 で行った。P 値が 0.01 より小さい場合に限り、統計学的に有意とみなした。

## 4.3 結果及び考察

### 4.3.1 単一要素分析

#### 超音波処理時間

単一要素分析において 6、12、18、24、30、36、42 及び 48 min といった超音波処理時間における霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出率を検討した。他に設定された条件は 450 W の超音波出力及び 20 mL/g の溶媒量であった。

超音波処理時間による霊芝菌糸体発酵物多糖類抽出率の変化を図 4-1 に示した。

抽出率は最初に超音波処理時間の延長とともに上昇し、36 min で最大値に達した。時間がそれ以上長くなると、抽出率が少々減少した。この原因は超音波の過剰処理とともに高温による多糖類の構造破壊であると考えられる。

#### 超音波出力

単一要素分析において 150、300、450、600、750 及び 900 W といった超音波出力における霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出率を検討した。他に設定された条件は 36 min の超音波処理時間及び 20 mL/g の溶媒量であった。

超音波出力による霊芝菌糸体発酵物多糖類抽出率の変化を図 4-2 に示した。

抽出率は最初に超音波出力の増加とともに上昇し、450 W で最大値に達した。超音波出力がそれ以上増加した場合、抽出率が少々低下した現象はみられた。以上のことより、出力の強い超音波で生じた高温により、一部の多糖類は分解したと考えられる。

#### 溶媒量

単一要素分析において 5、7.5、10、15、20 及び 25 mL/g といった溶媒量における霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出率を検討した。他に設定された条件は 36 min の超音波処理時間及び 450 W の超音波出力であった。

超音波出力による霊芝菌糸体発酵物多糖類抽出率の変化は図 4-3 に示した。

抽出率は最初に超音波出力の増加とともに上昇し、10 mL/g で最大値に達した。溶媒量が 10 mL/g 以上になると、抽出率が明らかに降下した。この原因として、溶媒が不足な場合、粒子の密度が高いため、単位粒子に受ける超音波の照射量が少ない。溶媒が過剰な場合、粒子間の空隙が多いため、超音波による粒子の動きはより激しいため、サンプルに与えた超音波のエネルギーがより多く運動エネルギーに変化することで、抽出促進効果は弱まると考えられる。

### 4.3.2 応答曲面分析

#### 霊芝菌糸体発酵物多糖類抽出率に対する方程式の確定

表 4-2 に示した通り、5 回の平行検査(各要素が全部 0 レベルである)を含む 17 回の霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出が行われた。ANOVA 分析により、各要素に基づく抽出率の方程式は下記通りである。

$$Y = -0.36 + 0.17X_1 + 1.64 \times 10^{-2}X_2 + 0.41X_3 + 3.8 \times 10^{-5}X_1X_2 + 1.57 \times 10^{-3}X_1X_3 - 1.89 \times 10^{-5}X_2X_3 - 2.39 \times 10^{-3}X_1^2 - 1.80 \times 10^{-5}X_2^2 - 1.77 \times 10^{-2}X_3^2 \quad (8)$$

上記方程式に関する分散分析結果は表 4-3 に示した。相関係数が 0.9836 であったため、霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出率が方程式 8 に適合すると考えられる。調整相関係数と予測相関係数の差( $R^2_{\text{Adj}} - R^2_{\text{Pred}}$ )は 0.0868 であり、0.2 より小さく且つ変異係数(C.V.)は 2.88%であり、10%より小さい値であったため、上記方程式の信憑性が高いと考えられる。また、不適合度は 0.17 であり、純粹誤差に対しては顕著でなかったため、上記方程式は霊芝菌糸体発酵物多糖類抽出過程を十分に解釈できると考えられる。最後に、高精度(Adequate precision)は 17.419 であり、4 以上でなければならないといった基準に合致した。

このため、上記超音波処理時間、超音波出力、溶媒量といった要素に基づく方程式は霊芝菌糸体発酵物多糖類抽出率の検討に使用できると考えられる。

## 回帰係数の推定及びモデルの有意差分析

表 2-4 により、モデル及び各要素が有意であるかどうかについて、F 値及び P 値で判断した。

モデルの P 値は 0.0001 以下であったため、モデル(方程式 8)自身は有意であると考えられる。更に、超音波処理時間の P 値は 0.0002 であり、0.001 より低く、超音波出力 2 乗及び溶媒量 2 乗の P 値は 0.0001 以下であったため、各要素は単独的に霊芝菌糸体発酵物多糖類抽出率に対し、有意に影響していると考えられる。

一方、各要素の共同因子( $X_1X_2$ 、 $X_1X_3$  及び  $X_2X_3$ )は全て 0.01 以上であったため、各要素の相互作用は霊芝菌糸体発酵物多糖類抽出率に対し、有意に影響していないと考えられる。

## 応答曲面

図 4-4 に、超音波処理時間及び超音波出力に関する曲面を示した。超音波処理時間及び超音波出力が 10-43.72 min 及び 150-496.90 W といった範囲内における増加とともに、霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出率も上昇した。ただし、超音波処理時間及び超音波出力の過剰増加により、霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出率は逆に減少した。

図 4-5 に、超音波処理時間及び溶媒量に関する曲面を示した。超音波処理時間及び溶媒量が 10-43.72 min 及び 5-13.21 mL/g といった範囲内における増加とともに、霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出率も上昇した。ただし、超音波処理時間及び溶媒量の過剰増加により、霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出率は逆に減少した。

図 4-6 に、超音波出力及び溶媒量に関する曲面を示した。超音波出力及び溶媒量が 150-496.90 W 及び 5-13.21 mL/g といった範囲内における増加とともに、霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出率も上昇した。ただし、超音波処理時間及び溶媒量の過剰増加により、霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出率は逆に減少した。

更に、図 4-4、図 4-5 及び図 4-6 により、曲面は緩やかであり、等高線は安定している円形であるため、超音波処理時間、超音波出力及び溶媒量といった 3 つの要素の相互作用は霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出率に対し、有意に影響してはならず、表 4-4 に合致した。

### 最適条件の確立

Design-Expert により、理論上の霊芝菌糸体発酵物の多糖類抽出に対応する最適抽出条件は 43.72 min の超音波処理時間、496.90 W の超音波出力及び 13.21 mL/g であると推測された<sup>[82]</sup>。その最適条件により、霊芝菌糸体発酵物多糖類の最高抽出率の予測値は 10.13%であった。

超音波細胞粉碎機の調節機能により、調節可能な最小時間単位は 1 min であったため、44 min が検証実験の超音波処理時間として採用された。

また、調節可能な最小超音波出力単位は最大値の 1%すなわち 9 W であったため、最も近似する 495 W が検証実験の超音波出力として採用された。

最後に、13.21 mL/g を検証実験の溶媒量として採用した。

上記の最適条件により、霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出を 3 回行った結果、最高抽出率の実測値は  $10.01 \pm 0.08\%$  であり、予測値に合致した。応答曲面分析法で算出された方程式が霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出率の解析に妥当であるといった知見を示唆するものである。

### 4.3.3 従来法との抽出率比較

表 4-5 に示した通り、低出力超音波破碎抽出法および熱水抽出法による霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出率は  $8.90 \pm 0.29\%$  および  $7.19 \pm 0.01\%$  であり、最適化された超音波破碎抽出法による霊芝菌糸体発酵物多糖類の抽出率は  $10.01 \pm 0.08\%$  であった。

以上のことから、低出力超音波破碎抽出法および熱水抽出法と比べて、最適化された超音波破碎抽出法の抽出率はそれぞれ 12.5%及び 39.3%ほど高かった。抽出率の点から考えると、霊芝菌糸体発酵物多糖類に対し、最適化された超音波破碎抽出法はより優れている抽出法であると考えられる。

#### 4.4 まとめ

本章により、霊芝菌糸体発酵物多糖類に対する超音波破碎抽出条件が最適化された。低出力超音波破碎抽出法および熱水抽出法と比べ、抽出率を向上させたため、最適化された超音波破碎抽出法は霊芝菌糸体発酵物多糖類に対してより効率的な抽出法であると考えられる。

更に、超音波破碎抽出法に抽出率の向上、抽出時間の短縮、溶媒の節約といった利点を確認された。

表 4-1 単一要素分析の条件

要素 (単位)	値
超音波処理時間 (min)	6、12、18、24、30、36、42、48
超音波出力 (W)	150、300、450、600、750、900
溶媒量 (mL/g)	5、7.5、10、15、20、25

表 4-1 応答曲面分析条件(a)及び Box-Behnken による実験区結果(b)

(a)

要素(単位)	記号	レベル		
		-1	0	1
超音波処理時間 (min)	$X_1$	18	36	54
超音波出力 (W)	$X_2$	150	450	750
溶媒量 (mL/g)	$X_3$	5	12.5	20

(b)

回数	$X_1$ (min)	$X_2$ (W)	$X_3$ (mL/g)	$Y$ (%)
1	0	0	0	9.86
2	1	1	0	9.00
3	0	0	0	9.93
4	-1	0	1	7.49
5	1	-1	0	7.49
6	-1	-1	0	6.56
7	0	0	0	10.28
8	0	0	0	9.63
9	0	1	1	7.75
10	0	0	0	10.10
11	0	-1	-1	6.86
12	0	-1	1	7.24
13	-1	1	0	7.24
14	1	0	1	9.01
15	1	0	-1	8.47
16	-1	0	-1	7.79
17	0	1	-1	7.54

$X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  及び  $Y$  は超音波処理時間、超音波出力、溶媒量及び抽出率を表示する。

表 4-2 各要素に基づく抽出率の方程式の分散分析

	二乗和	自由度	平均平方	F 値	P 値(prob. >F)
残留	0.41	7	0.058		
不適合度	0.17	3	0.056	0.95	0.4953
純粹誤差	0.24	4	0.059		
$R^2$				0.9836	
$R^2_{adj}$				0.9626	
$R^2_{pred}$				0.8758	
C.V.%				2.88	
Adequate precision				17.419	

表 4-3 回帰係数の推定及び二次方程式の有意差分析

	二乗和	自由度	平均平方	F 値	P 値(prob. >F)
Model	24.40	9	2.71	46.70	<0.0001
$X_1$	3.00	1	3.00	51.59	0.0002
$X_2$	1.42	1	1.42	24.51	0.0017
$X_3$	0.085	1	0.085	1.47	0.2654
$X_1X_2$	0.17	1	0.17	2.94	0.1299
$X_1X_3$	0.18	1	0.18	3.08	0.1224
$X_2X_3$	$7.232 \times 10^{-3}$	1	$7.232 \times 10^{-3}$	0.12	0.7345
$X_1^2$	2.53	1	2.53	43.58	0.0003
$X_2^2$	11.01	1	11.01	189.62	<0.0001
$X_3^2$	4.19	1	4.19	72.12	<0.0001

表 4-4 3 種類の抽出法における比較

抽出法	最適化された超音波破碎抽出法	低出力超音波破碎抽出法	熱水抽出法
抽出率の予測値 (%)	10.131	—	—
抽出率の実測値 (%)	10.011 ±0.075	8.898 ±0.285	7.189 ±0.012
装置出力 (W)	900W	900W	800W
消費電力 (kWh)	0.66	0.45	1.6

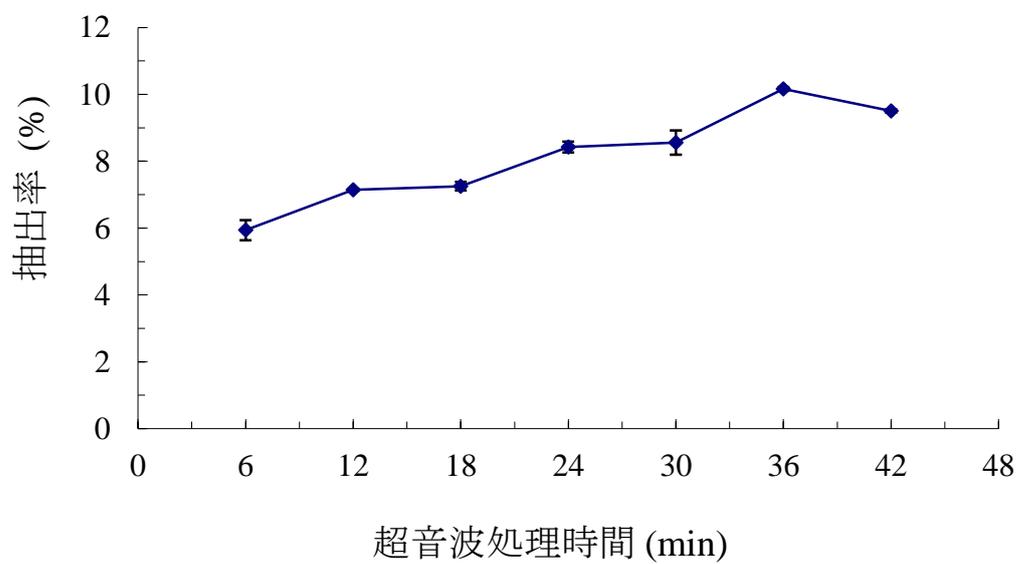


図 4-1 超音波処理時間に関する単一要素分析結果

超音波処理時間及び溶媒量は 30 min 及び 20 mL/g に設定した。

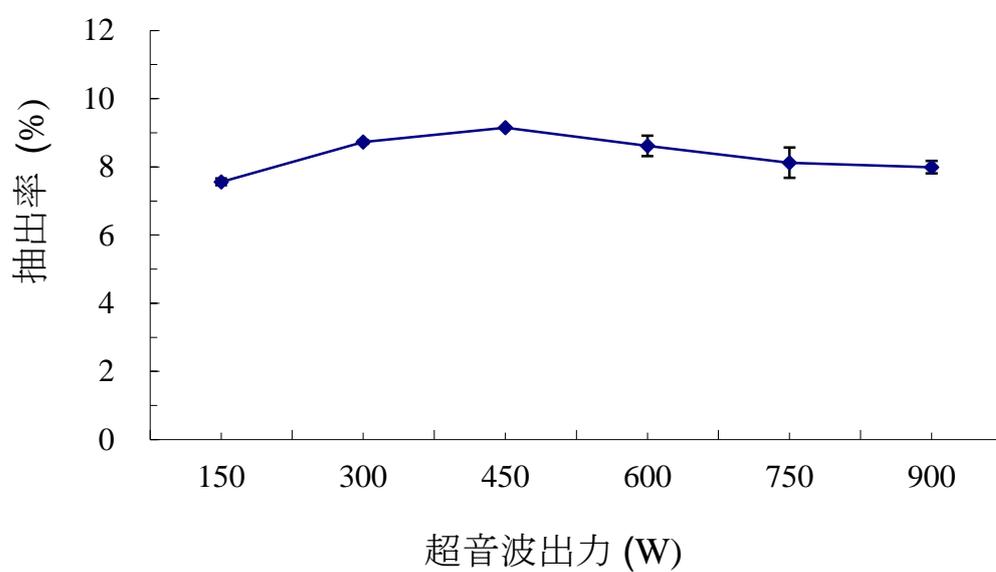


図 4-2 超音波出力に関する単一要素分析結果

超音波処理時間及び溶媒量は 36 min 及び 20 mL/g に設定した。

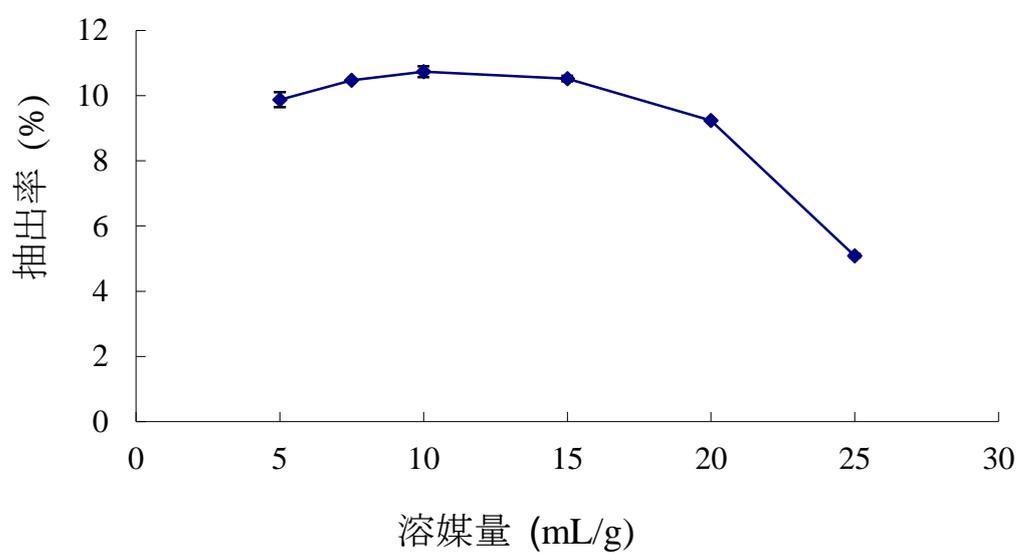
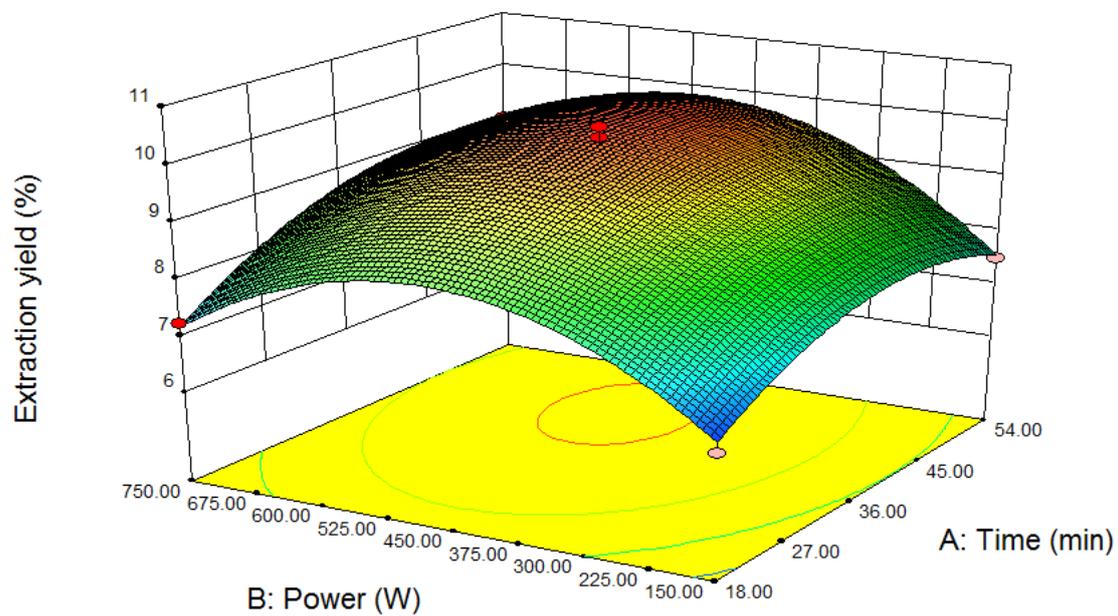


図 4-3 溶媒量に関する単一要素分析結果

超音波処理時間及び超音波出力は 36 min 及び 450 W に設定した。

(a)



(b)

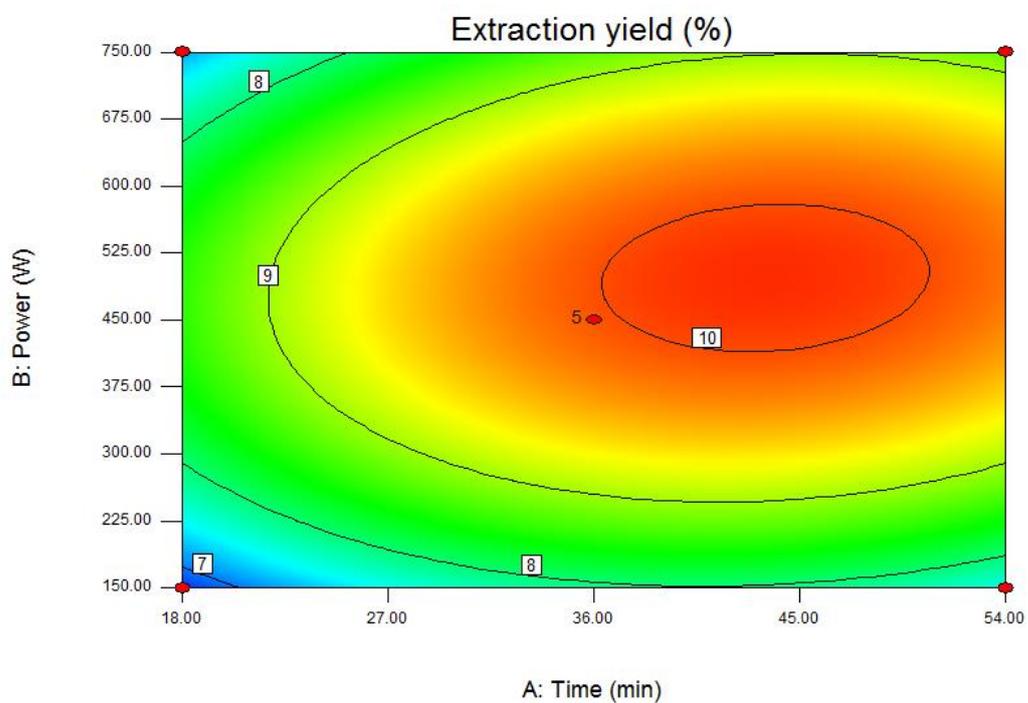
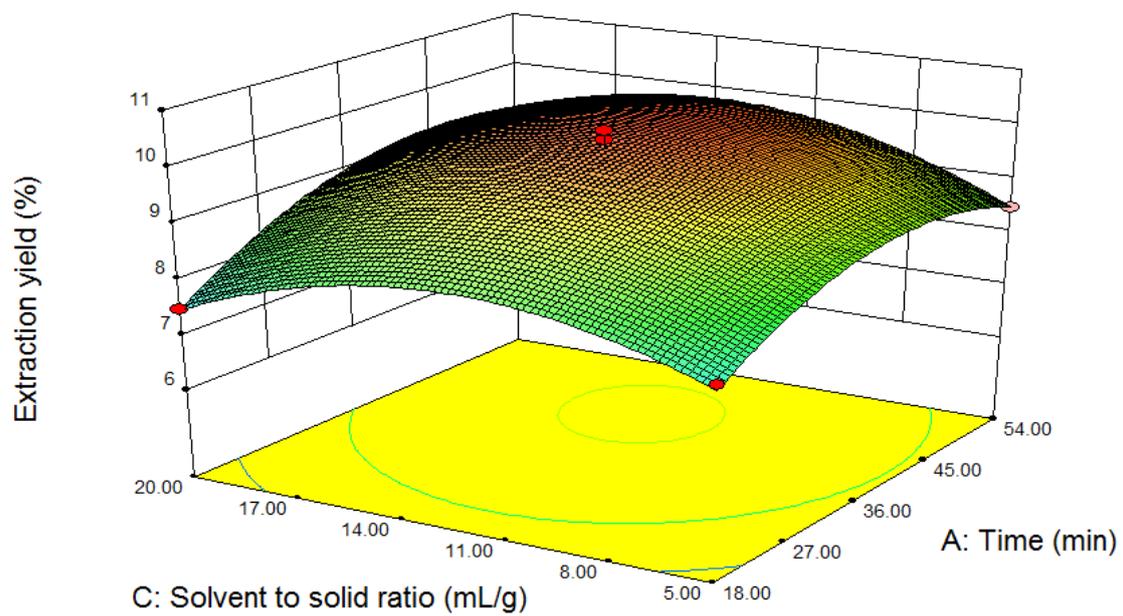


図 4-4 超音波処理時間及び超音波出力に関する 3D(a)及び 2D(b)グラフ

(a)



(b)

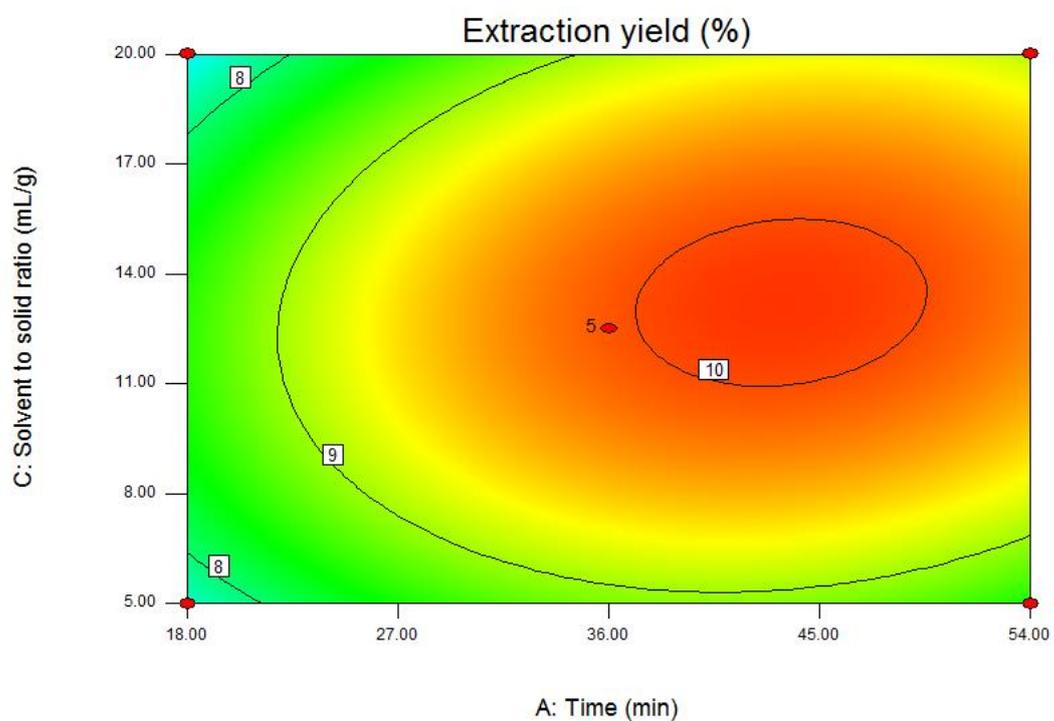
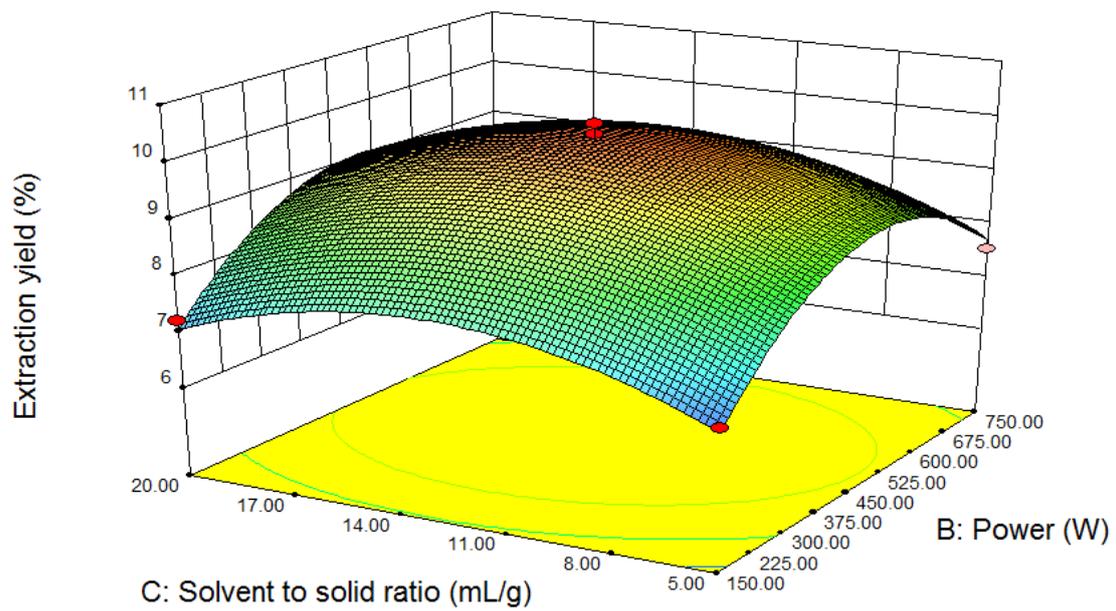


図 4-5 超音波処理時間及び溶媒量に関する 3D(a)及び 2D(b)グラフ

(a)



(b)

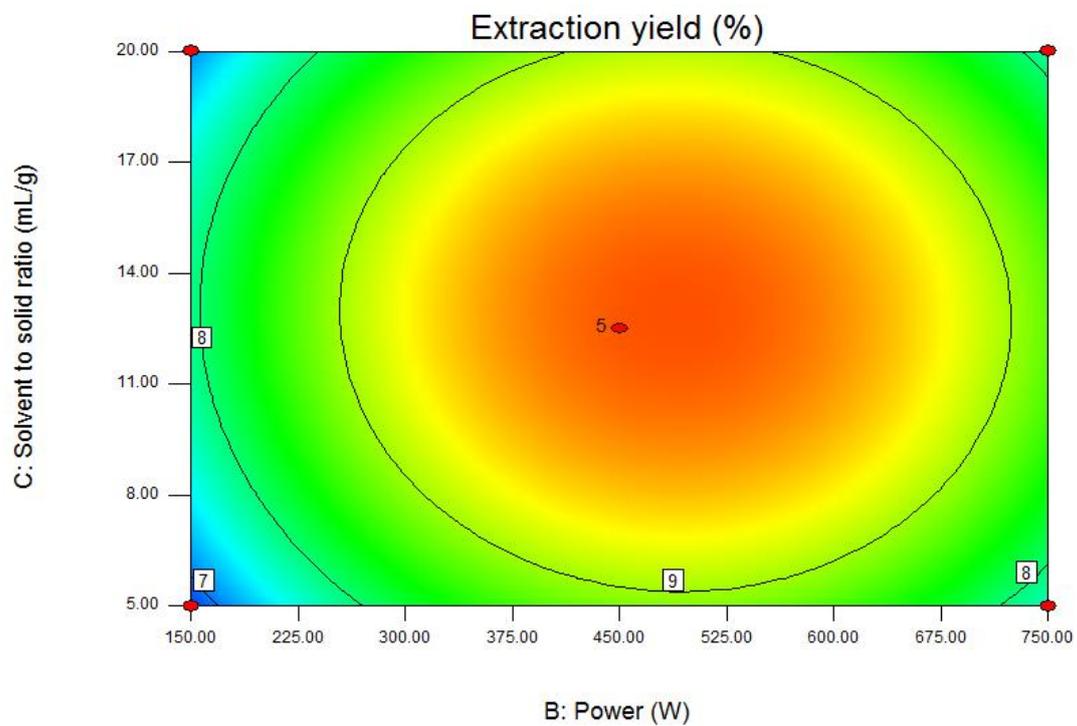


図 4-6 超音波出力及び溶媒量に関する 3D(a)及び 2D(b)グラフ

## 第5章 霊芝菌糸体発酵物に対する各抽出法の比較

### 5.1 はじめに

近年、超音波は天然物由来の各標的有効成分の抽出過程に広く応用されてきた。多くの既往報告によれば<sup>[61, 64, 83, 84]</sup>、超音波破砕抽出法には短処理時間、簡単な操作、低溶媒消費、高抽出率などのメリットを有するとされた。低出力超音波破砕抽出法を含む様々な超音波抽出法が開発されてきた。第4章で霊芝菌糸体発酵物の多糖類抽出における超音波破砕抽出法のメリットは実証された。

霊芝由来の多糖類の抽出に関しては、超音波破砕抽出法と従来法の抽出率比較研究はあったが、抽出物の生理活性が比較されない報告例が殆どであった<sup>[85]</sup>。また、既往報告に多く用いられたのは低い出力の超音波<sup>[4]</sup>であった。このため、高抽出率で得られた多糖類の生理活性を評価することは必要である。

一方、抗酸化活性を持つ物質は人体において、老化防止などの効果を示し、健康の維持に役立つと考えられるため、抗酸化物質の探索或いは開発は近年食品および医療に関する研究分野において注目される現在、霊芝由来の多糖類に高い抗酸化活性が確認されたといった報告<sup>[86-87]</sup>も多いため、抗酸化活性は霊芝の最も重要な生理活性の一つであるとも過言ではない。このため、新しく確立した抽出法に対し、多糖類の抗酸化活性を含む各生理活性を低下させないといった結果が望まれてきた。更に、抗酸化活性を含む各生理活性を向上することが可能であれば、最適化された超音波破砕抽出法は大変優れている抽出法であると言える。

本章は最適化された超音波破砕抽出法、低出力超音波破砕抽出法および熱水抽出法といった三つの抽出法により、抽出された霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類の抗酸化活性(DPPH ラジカル消去活性、ABTS ラジカル消去活性、水酸基ラジカル消去活性及び SOD 様活性)を測定した。更に、免疫調節活性(マウスマクロファージ細胞に対する細胞毒性及び保護作用)を比較した。

## 5.2 材料及び方法

### 5.2.1 素材及び試薬

#### 生理活性測定用サンプルの用意

霊芝菌糸体発酵物の乾燥粉末を用い、最適化された超音波破碎抽出法、低出力超音波破碎抽出法および熱水抽出法により、多糖類抽出を行った後、処理された懸濁液を 8000 rpm、15 分間、4 °C で遠心分離した。上清を孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルター(NY013045、アズワン株式会社)に通過させ、固形物を除去した。エタノールの使用量を節約するために、抽出液を減圧濃縮した。その後、濃縮された抽出液に対して 4 倍体積に相当するエタノールを添加し、多糖類を 4 °C で 8 時間以上かけて沈殿させた。

8000 rpm、15 分間、4 °C の遠心分離により、沈殿した多糖類を分離し、適量の蒸留水で再び溶解し、多糖類水溶液とした。この多糖類水溶液に 1/5 体積の SEVAGE 試薬(クロロホルム：ブタノール=4：1)を添加し、10 分間ほど攪拌させた後、有機相を除去し、水相を得た。水相の各イオンを除去するために、超純水による透析を 72 時間ほど行った。

透析した多糖類水溶液は減圧濃縮し、凍結乾燥した。得られた多糖類は 4 °C で密封保存した。

#### 試薬

MEM 細胞培地、DPPH、ABTS、ウシ胎仔血清(FBS)、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、トリクロロ酢酸(TC(A)などは株式会社シグマ(神奈川、日本)より、購入した。エタノールは和光純薬(大阪、日本)より、購入した。SOD キットは同仁化学分子テクノロジーズ株式会社(Dojindo Molecular Technologies, Inc.)より、購入した。他の化学試薬は全て分析グレードのものを使用した。

## 5.2.2 抗酸化活性の測定

### DPPH ラジカル消去活性の測定

DPPH ラジカル消去活性は第 3 章に記述された方法(3.2.2.1)に従って測定した。但し、第 3 章と異なる点はサンプル溶液と DPPH 標準液を混合する際に、それぞれの量が 0.6 及び 2.4 mL になるように調整された。

### ABTS ラジカル消去活性の測定

ABTS ラジカル消去活性は第 3 章に記述された方法(3.2.2.2)に従って測定した

### 水酸基ラジカル消去活性の測定

水酸基ラジカル消去活性は第 3 章に記述された方法(3.2.2.3)に従って測定した。

### SOD 様活性の測定

SOD 様活性は第 3 章に記述された方法(3.2.2.4)に従って測定した。

## 5.2.3 免疫調節活性の検討

本節では、マウスマクロファージ細胞の異なる条件下の細胞数に基づき、霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類の免疫調節活性を評価し、各抽出法を評価した。

### マウスマクロファージ細胞の培養

第 3 章に記述された方法(3.2.3.1)に従って行った。マウスマクロファージ細胞は対数期まで培養した。

## マウスマクロファージ細胞に対する細胞毒性の検討

第 3 章(3.2.3.2)に記述したように、培地に最終濃度が 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及び 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるように、最適化された超音波破碎抽出法、低出力超音波破碎抽出法および熱水抽出法による霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類を添加した。また、霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類の代わりに等積の MEM 細胞培地を添加した対照区を設定した。対数期に達したマウスマクロファージ細胞を上記のように作製した培地に移し、24 時間の培養を行った。

培養後、570 nm での吸光度を測定し、マウスマクロファージ細胞の細胞数を算出した。対照区の細胞数を 100%として各区の細胞数を算出した。

## マウスマクロファージ細胞に対する保護作用の検討

第 3 章(3.2.3.3)に記述したように、対数期に達したマウスマクロファージ細胞に、培地に最終濃度が 5.00  $\mu\text{mol}/\text{L}$  であるように、ドキソルビシンを添加した。

そして、最適化された超音波破碎抽出法、低出力超音波破碎抽出法、熱水抽出法による霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類及び等積の MEM 細胞培地を添加した実験区を設定し、24 時間の培養を行った。ドキソルビシン及び MEM 細胞培地を添加したマウスマクロファージ細胞は対照区とした。ドキソルビシン及び冬虫夏草子実体由来の多糖類の代わりに等積の MEM 細胞培地を添加したマウスマクロファージ細胞は陰性対照区とした。

培養後、570 nm での吸光度を測り、マウスマクロファージ細胞の生存率を計算した。陰性対照区の細胞数を 100%として各区の細胞数を算出した。

### 5.2.4 統計解析

すべての実験は 3 回実施し、データは平均値及び標準偏差値で表した。統計解析は IBM の統計解析ソフトウェア SPSS Statistics 19.0 で行った。P 値が 0.01 より小さい場合に限り、統計学的に有意とみなした。

## 5.3 結果及び考察

### 5.3.1 抗酸化活性

図 5-1 は 3 種類の霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類の DPPH ラジカル消去活性を示した。霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類の濃度が低い場合、DPPH ラジカル消去活性は多糖類濃度の上昇とともに高くなり、濃度が 1.0 mg/mL 以上になると、約 100%の消去率が確認され、ビタミン E と同程度の活性を示した。また、明らかな濃度依存性がみられた。

濃度が 0.06-0.5 mg/mL の範囲内において、最適化された超音波破碎抽出法の多糖類は他の 2 種類の抽出法の多糖類と比較して高い活性を示し、90%以上の消去率を達成した。

図 5-2 は 3 種類の霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類の ABTS ラジカル消去活性を示した。霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類の濃度が低い場合、ABTS ラジカル消去活性は多糖類濃度の上昇とともに高くなり、濃度が 0.5 mg/mL の際に約 100%の消去率が確認され、ビタミン E と同程度の活性を示した。また、明らかな濃度依存性がみられた。

低濃度の場合、最適化された超音波破碎抽出法および熱水抽出法の多糖類は同程度消去率を示し、低出力超音波破碎抽出法の多糖類より、低かった。濃度が 0.25 mg/mL 以上になると、最適化された超音波破碎抽出法および低出力超音波破碎抽出法の多糖類は同程度の消去率を示し、熱水抽出法の多糖類より、高い活性を示した。

図 5-3 は 3 種類の霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類の水酸基ラジカル消去活性を示した。霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類の濃度が低い場合、水酸基ラジカル消去活性は多糖類濃度の上昇とともに高くなり、濃度が 2.5 mg/mL 以上になると、約 100%の消去率が確認され、ビタミン E と同程度の活性を示した。また、明らかな濃度依存性がみられた。

いずれの濃度において、最適化された超音波破碎抽出法により抽出された多糖類は他の 2 種類の抽出法で得られた多糖類より高い活性を示し、ビタミン E と同程度の消去率を示した。

図 5-4 は 3 種類の霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類の SOD 様活性を示した。SOD 様活性は霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類の濃度上昇とともに高くなり、濃度が 0.833 mg/mL の際に、70%以上の SOD 様活性が確認された。また明らかな濃度依存性がみられた。Shi らの論文<sup>[1]</sup>により、濃度が 2.5 mg/mL の場合、エノキタケ由来の多糖類の SOD 様活性は 30%未満であったため、霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類は高い SOD 活性を持っていると考えられる。

いずれの濃度において、最適化された超音波破碎抽出法により抽出された多糖類は他の 2 種類の抽出法で得られた多糖類よりわずかに高い消去率を示した。

以上のことから、霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類は高い抗酸化活性を示し、抗酸化作用を有する食品として利用する可能性が見られた。

### 5.3.2 免疫調節活性

#### マウスマクロファージ細胞に対する細胞毒性

図 5-5 は 3 種類の霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類を使用したマウスマクロファージ細胞に対する細胞毒性試験の結果を示している。3 種類の霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類には細胞毒性が確認されず、逆に顕著な増殖促進効果がみられた。

また、最適化された超音波破碎抽出法の多糖類は約 40%ほど高い増殖促進効果を示し、残り 2 種類の抽出法で得られた多糖類より高かった。

更に、濃度が非常に低い場合(10 µg/mL)においても、十分な増殖促進効果がみられ、少量摂取に基づく効果も十分あると推察される。

以上のことから、霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類は免疫細胞に対する細胞毒性を示さないのみならず、免疫細胞を増殖させ、免疫機能を強化する効果が期待でき、免疫調節機能性食品にする価値を有すると考えられる。

## マウスマクロファージ細胞に対する保護作用

図 5-6 は 3 種類の霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類を使用したマウスマクロファージ細胞に対する保護作用の結果を示した。

陰性対照区のマウスマクロファージ細胞数を 100% とし、対照区のマウスマクロファージ細胞数は 52.5% となり、約半分のマウスマクロファージ細胞はドキシソルビシンの毒性により、増殖が抑制されたと考えられる。

ドキシソルビシンに加えて 3 種類の霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類を同時に添加した場合、マウスマクロファージ細胞の細胞数は 100% に極めて近い値をしめし、顕著な差は見られなかった。

また、濃度が非常に低い場合(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )においても、十分な保護作用がみられ、少量摂取に際しても、その効果は十分であると推察される。

以上のことから、霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類は、マウスマクロファージ細胞に対する保護作用を有し、抗がん治療を受診する患者における回復期補助食品としての利用価値があると予想される。

### 5.4 まとめ

本章により、最適化された超音波破碎抽出法は低出力超音波破碎抽出法、熱水抽出法と比べ、標的多糖類の各生理活性を保持或いは向上させることが確認できた。第 4 章の結果にあわせ、最適化された超音波破碎抽出法はより優れている多糖類抽出法であると考えられる。

更に、霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類は高い抗酸化活性およびマウスマクロファージ細胞に対する顕著な保護作用を示したほか、マウスマクロファージ細胞に対する直接的な増殖促進効果が観察されたため、抗酸化作用を有する食品、免疫調節機能性食品及び癌治療回復期の補助治療食品としての利用が期待できる。

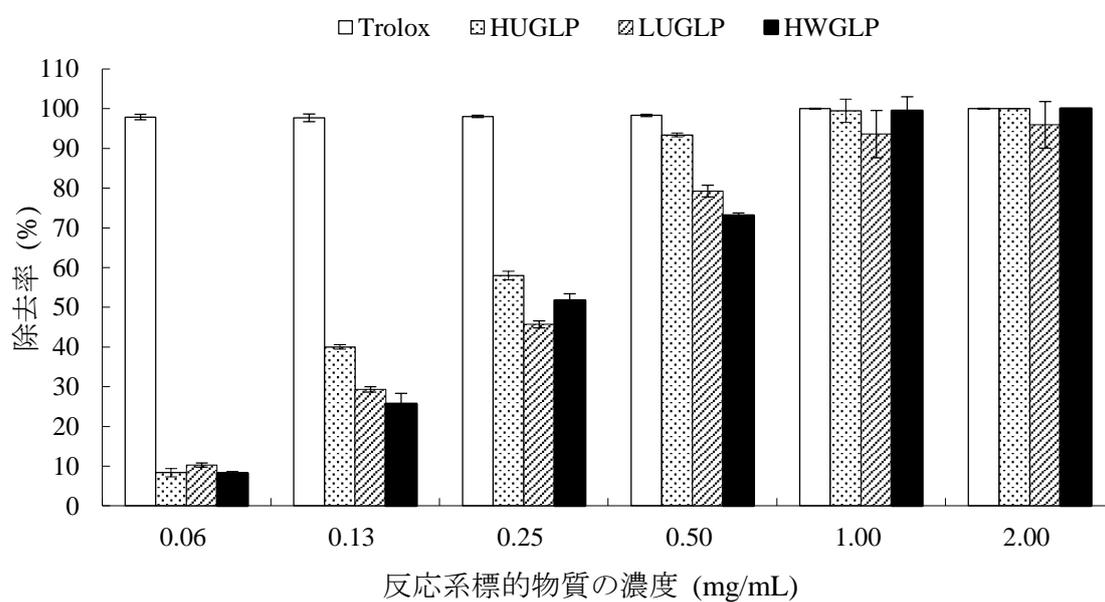


図 5-1 3 種類の霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類の DPPH ラジカル消去活性  
Trolox、HUGLP、LUGLP 及び HWGLP は水溶性ビタミン E、最適化された超音波破  
砕抽出法の高多糖類、低出力超音波破砕抽出法の高多糖類及び熱水抽出法の高多糖類を表  
示した。

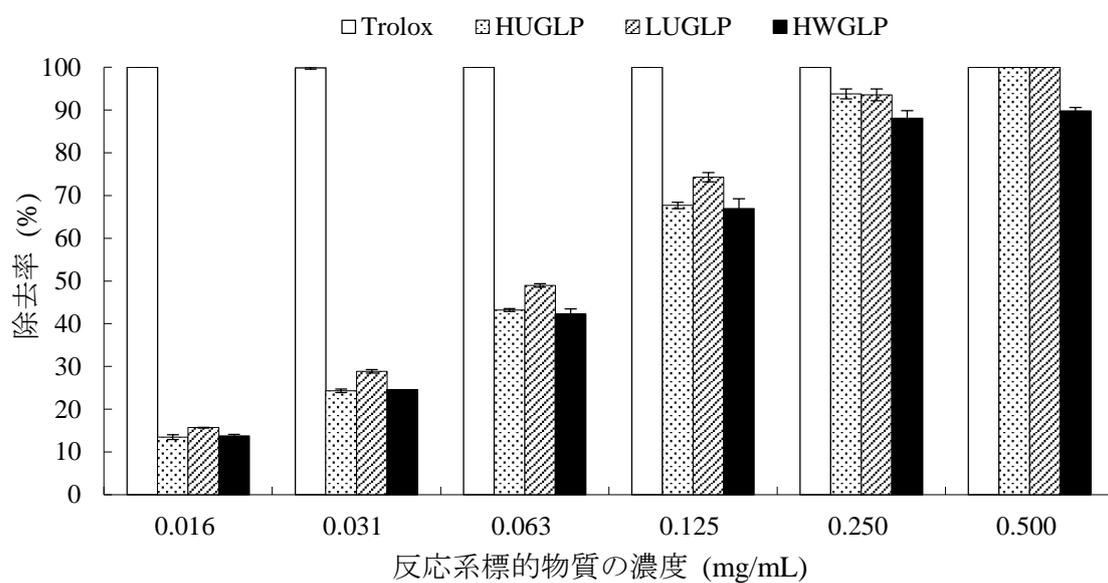


図 5-2 3 種類の霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類の ABTS ラジカル消去活性  
Trolox、HUGLP、LUGLP 及び HWGLP は水溶性ビタミン E、最適化された超音波破  
砕抽出法の高多糖類、低出力超音波破砕抽出法の高多糖類及び熱水抽出法の高多糖類を表  
示した。

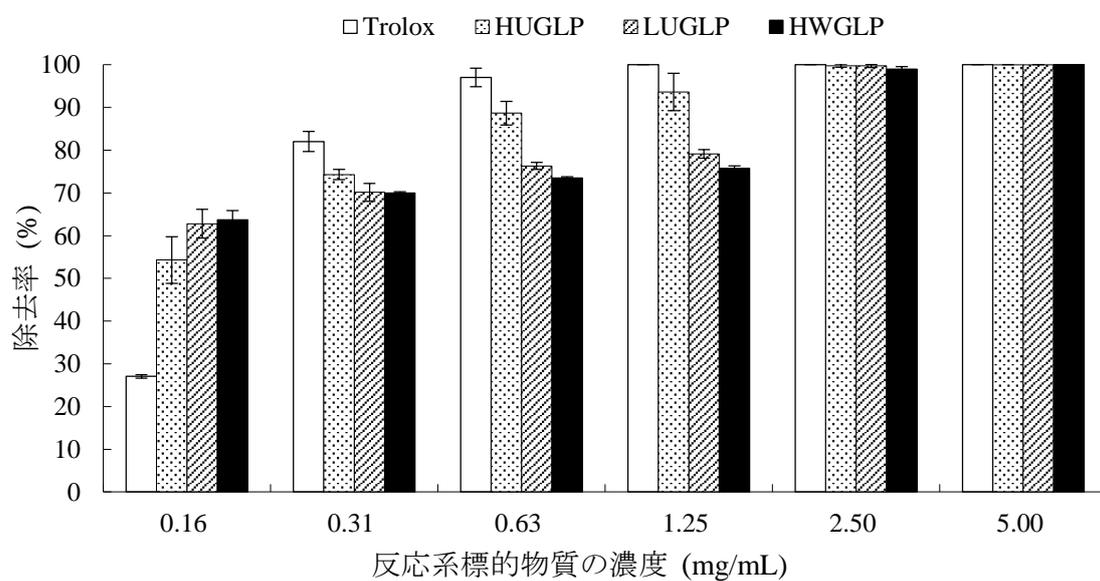


図 5-3 3 種類の霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類の水酸基ラジカル消去活性  
Trolox、HUGLP、LUGLP 及び HWGLP は水溶性ビタミン E、最適化された超音波破  
碎抽出法の多糖類、低出力超音波破碎抽出法の多糖類及び熱水抽出法の多糖類を表  
示した。

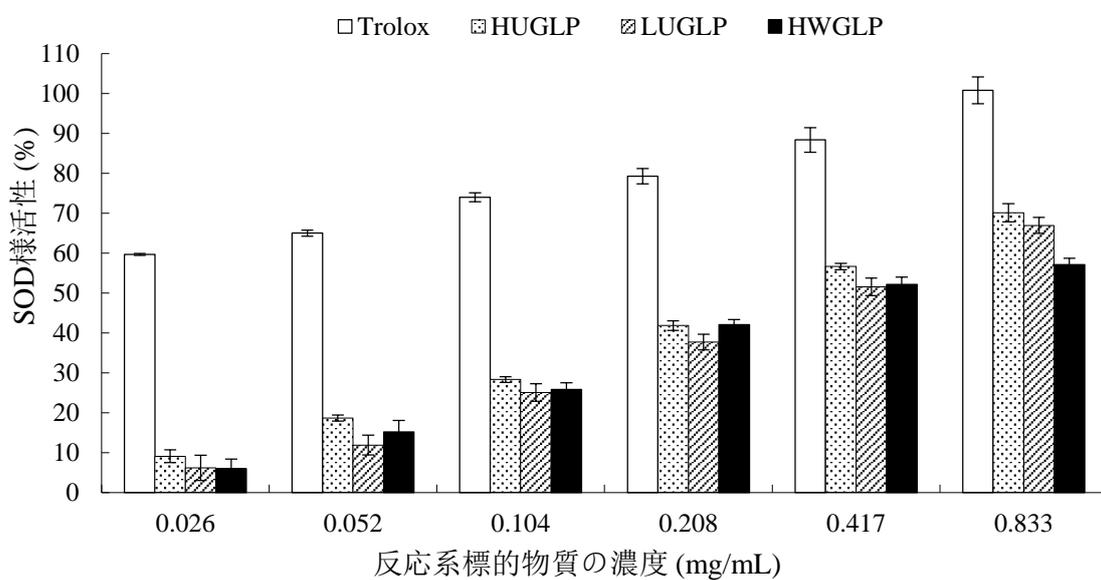


図 5-4 3 種類の霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類の SOD 様活性

Trolox、HUGLP、LUGLP 及び HWGLP は水溶性ビタミン E、最適化された超音波破碎抽出法の子糖類、低出力超音波破碎抽出法の子糖類及び熱水抽出法の子糖類を表示した。

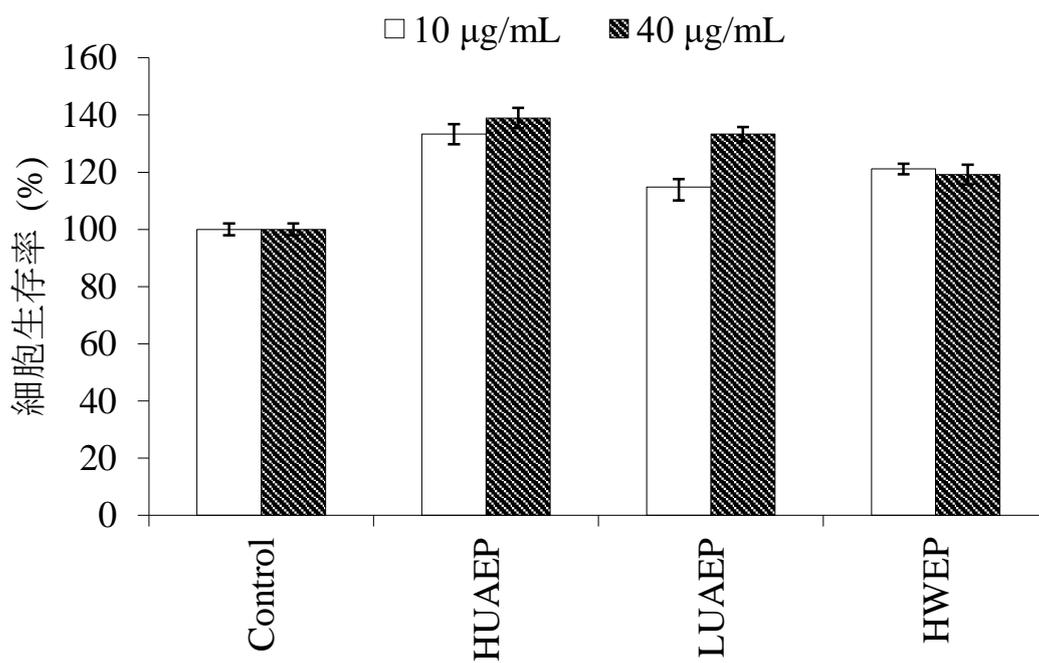


図 5-5 3 種類の霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類におけるマウスマクロファージ細胞に対する細胞毒性

Control、HUGLP、LUGLP 及び HWGLP は対照組、最適化された超音波破碎抽出法の多糖類、低出力超音波破碎抽出法の多糖類及び熱水抽出法の多糖類を表示した。

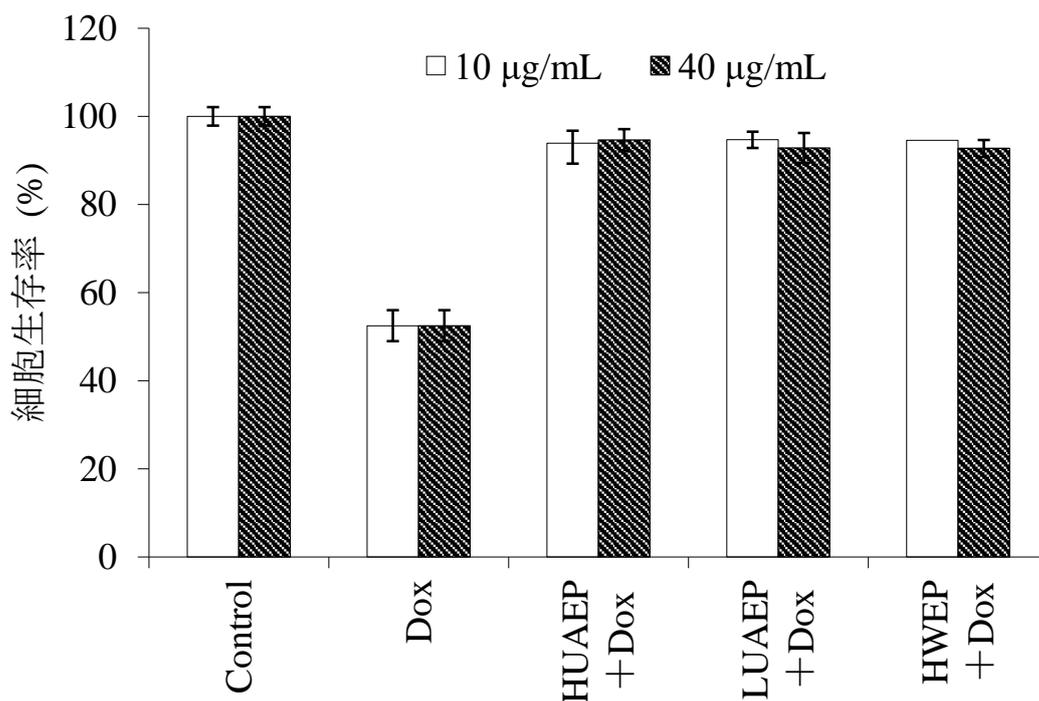


図 5-6 3 種類の霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類におけるマウスマクロファージ細胞に対する保護作用

Control、Dox、HUGLP、LUGLP 及び HWGLP は陰性対照区、対照区(ドキソルビシン添加組)、最適化された超音波破碎抽出法 of 多糖類、低出力超音波破碎抽出法 of 多糖類及び熱水抽出法 of 多糖類を表示した。

## 第 6 章 超音波破碎抽出法における抽出促進効果及びメカニズム

### 6.1 はじめに

前章により、超音波破碎抽出法による多糖類の抽出促進効果が明らかに確認された上、従来法多糖類と類似な生理活性が確認された。

抽出率に着目した場合、冬虫夏草子実体に対する促進効果は霊芝菌糸体発酵物に対する促進効果より顕著であった。

一方、霊芝菌糸体発酵物由来多糖類の分析結果、超音波を使用した場合の抽出物のマウスマクロファージ細胞に対する増殖促進活性が高かった。

このため、従来法及び超音波破碎抽出法で得られた抽出物の組成分析が必要とされる。

本章ではまず霊芝菌糸体発酵物及び霊芝子実体を使用し、熱水抽出法及び超音波破碎抽出法による二段抽出を行い、それぞれの抽出物の組成を分析すると共に、超音波破碎抽出法における抽出促進のメカニズムの究明を行った。

### 6.2 材料および方法

#### 6.2.1 研究素材

霊芝菌糸体発酵物は第 4 章に記述されているとおり培養した。

霊芝子実体は第一薬産株式会社(日本)より、購入した。

冬虫夏草子実体及び菌糸体発酵物は生物資源プロセス工学研究室(筑波大学)により、譲渡された。

上記 4 種類の素材を第 2 章に記述されているとおり、試験用サンプル粉末まで処理した。

#### 6.2.2 試薬

エタノール、フェノール、D-グルコース及び濃硫酸は和光純薬(大阪, 日本)より、購入した。ほかの化学試薬は全て分析グレードのものを使用した。

### 6.2.3 多糖類の二段抽出

熱水抽出法の抽出物と超音波破碎抽出法の抽出物の差異を検討するために、霊芝菌糸体発酵物及び霊芝子実体を用いて、熱水抽出および超音波破碎抽出を順番に行い、抽出された多糖類の組成分析をフーリエ変換赤外分光法によって行った。

#### 一段目熱水抽出

まず、霊芝菌糸体発酵物及び霊芝子実体の粉末を用いて、第 2 章の記述(2.2.3.3)に従って熱水抽出を行った。

第 3 章の記述(3.2.1.1)に従って処理された多糖類を熱水抽出多糖類とした。

#### 二段目超音波破碎抽出

一段目熱水抽出を行った後、遠心分離によって固形物を回収した。蒸留水の洗浄および遠心分離を繰り返すことで、できる限りに抽出された多糖類を除去した。洗浄された固形物を 40 °C で乾燥し、粒径 150 μm まで粉碎した。

上記のように処理された霊芝菌糸体発酵物及び霊芝子実体粉末を用い、44 min、495 W、13.21 mg/mL 及び 40 min、600 W、5 mg/mL の超音波破碎抽出を行い、第 3 章の記述(3.2.1.1)に従って多糖類を処理して得た。最終的に得られた多糖類を超音波破碎抽出多糖類とした。

### 6.2.4 二段抽出による多糖類の組成分析

本節では、フーリエ変換赤外分光法(FTIR)により、熱水抽出多糖類及び超音波破碎抽出多糖類の組成分析を行った。

FTIR とは、サンプルの官能基の特徴的な赤外吸収スペクトルを測定し、標準サンプルに照らし合わせて組成成分を定性的に解析できる分析法である。

十分研磨した KBr 粉末を用い、バックグラウンドとして赤外吸収スペクトルを測定した。そして、十分乾燥した多糖類を KBr と混合し、十分研磨した後、サンプルとして赤外吸収スペクトルを測定した。

ソフトにより KBr 及び CO<sub>2</sub> の影響を排除し、各多糖類の赤外吸収スペクトルを得た。論文、報告に照らし合わせながら、多糖類の組成成分を解析した。

### 6.2.5 素材に基づく多糖類の比較抽出

予備実験により、冬虫夏草菌糸体発酵物に対し、40 分間超音波処理時間、450 W の出力、15 mL/g の溶媒量の超音波破碎抽出の抽出率は熱水抽出法より明らかに高く、第 4 章に記述されている霊芝菌糸体発酵物の最適条件に類似した。一方、霊芝子実体に対し、40 分間超音波処理時間、600 W の出力、5 mL/g の溶媒量である超音波破碎抽出の抽出率は熱水抽出法より明らかに高く、第 2 章に記述されている冬虫夏草子実体の最適条件に類似した。

上記の結果から、本節では、冬虫夏草菌糸体発酵物および霊芝子実体に対し、上記の条件を選択し、多糖類を抽出した。

一方、冬虫夏草菌糸体発酵物および霊芝子実体に対し、30 mL/g の溶媒量、100 °C および 2 時間の熱水抽出も行った。

冬虫夏草子実体、冬虫夏草菌糸体発酵物、霊芝子実体及び冬虫夏草菌糸体発酵物に対し、超音波破碎抽出法の抽出促進効果を比較した。

### 6.2.6 統計解析

すべての実験は 3 回実施し、データは平均値及び標準偏差値で表した。統計解析は IBM の統計解析ソフトウェア SPSS Statistics 19.0 で行った。P 値が 0.01 より小さい場合に限り、統計学的に有意とみなした。

## 6.3 結果および考察

### 6.3.1 二段抽出による多糖類の組成分析

#### 霊芝菌糸体発酵物由来の多糖類

図 6-1 は霊芝菌糸体発酵物由来の熱水抽出多糖類(a)及び超音波破碎抽出多糖類(b)の赤外吸収スペクトルを示した。

熱水抽出多糖類及び超音波破碎抽出多糖類の赤外吸収スペクトルは類似していた。3389、2930、1655、1420、1325、1249 及び 1075  $\text{cm}^{-1}$  の吸収ピークはそれぞれ C(3)OH $\cdots$ O(5)といった分子内水素結合、CH<sub>2</sub> の対称伸縮振動、C=O の伸縮振動(アミド)、C-H の伸縮振動、CH<sub>2</sub> ロッキング、C=O の伸縮振動或いは NH<sub>2</sub> の変形振動及び C-O の伸縮振動を示した<sup>[89-91]</sup>。セルロース及びキトサンの特徴的な吸収ピーク<sup>[92]</sup>に合致したため、熱水抽出多糖類及び超音波破碎抽出多糖類が細胞壁の組成成分であるセルロース及びキトサンを含むと考えられる。

#### 霊芝子実体由来の多糖類

図 6-2 は霊芝子実体由来の熱水抽出多糖類(a)及び超音波破碎抽出多糖類(b)の赤外吸収スペクトルを示した。

熱水抽出多糖類の赤外吸収スペクトルに、3424、2923、1636、1419 及び 1036  $\text{cm}^{-1}$  の吸収ピークはそれぞれ O-H と N-H の伸縮振動、CH<sub>2</sub> の対称伸縮振動、結晶水中 O-H の曲げ振動、C-H の伸縮振動及び C-O の伸縮振動を示した<sup>[89-91]</sup>。

超音波破碎抽出多糖類の赤外吸収スペクトルに、上記の吸収ピークを有したため、熱水抽出多糖類と同様な組成成分を含むと考えられる。また、1558、1374、1320、1252 及び 892  $\text{cm}^{-1}$  の吸収ピークはそれぞれキチンの特徴吸収ピーク、C-H の曲げ振動、CH<sub>2</sub> ロッキング、C=O の伸縮振動或いは NH<sub>2</sub> の変形及びセルロースの  $\beta$ -連携を示した<sup>[86, 89]</sup>。キチン及びキトサンの特徴的な吸収

ピーク<sup>[90, 93]</sup>に合致したため、超音波破碎抽出多糖類が細胞壁組成成分であるキチン及びキトサンを含むと考えられる。

## 考察

霊芝子実体は木質化した構造<sup>[94]</sup>であり、その細胞壁の主な組成成分がキチン及びキトサンである。子実体の安定性が良いため、熱水抽出法では破碎出来ないに対し、超音波破碎抽出法を使用した場合は細胞壁が容易に破碎されたため、キチン及びキトサンが抽出された。同時に、細胞内部に存在する多糖類も抽出された。

菌糸体は木質化しておらず、子実体より安定性の低い構造である。熱水抽出法を使用した場合、霊芝菌糸体及び発酵されたオカラの細胞壁の一部が破碎されたため、その組成成分であるキトサン、セルロース及び細胞内部に存在する多糖類が抽出された。超音波破碎抽出法を使用した場合、残りの細胞壁が更に破碎されることで、キトサン及びセルロースがより多く抽出された。

更に、セルロースは TNF- $\alpha$  といったサイトカインの遺伝子発現を促進することによってマクロファージを活性化できる<sup>[95]</sup>。キチン及びキトサンは MHC( major histocompatibility complex 、主要組織適合抗原複合体)クラス I 及び II の遺伝子発現を促進することによってマクロファージを活性化できる。同時に、マンノース受容体を活性化し、 Fas シグナル伝達経路を介してマクロファージのキチン及びキトサンによるアポトーシスを阻害できる<sup>[91]</sup>ため、超音波破碎抽出法の霊芝菌糸体発酵物由来多糖類は熱水抽出法の霊芝菌糸体発酵物由来多糖類より高い増殖促進効果を示した(5.3.2.1)といった結果は解釈できる。

### 6.3.2 超音波による抽出促進効果の差異

表 6-1 は 4 種類研究素材の多糖類抽出率および向上率を表した。冬虫夏草子実体、冬虫夏草菌糸体発酵物、霊芝子実体および霊芝菌糸体発酵物に対して超音波の抽出促進効果が明らかに確認された。

冬虫夏草子実体および靈芝子実体に対する抽出向上率は対応する菌糸体発酵物より大幅に高いことが確認され、考察に合致した。

#### 6.4 まとめ

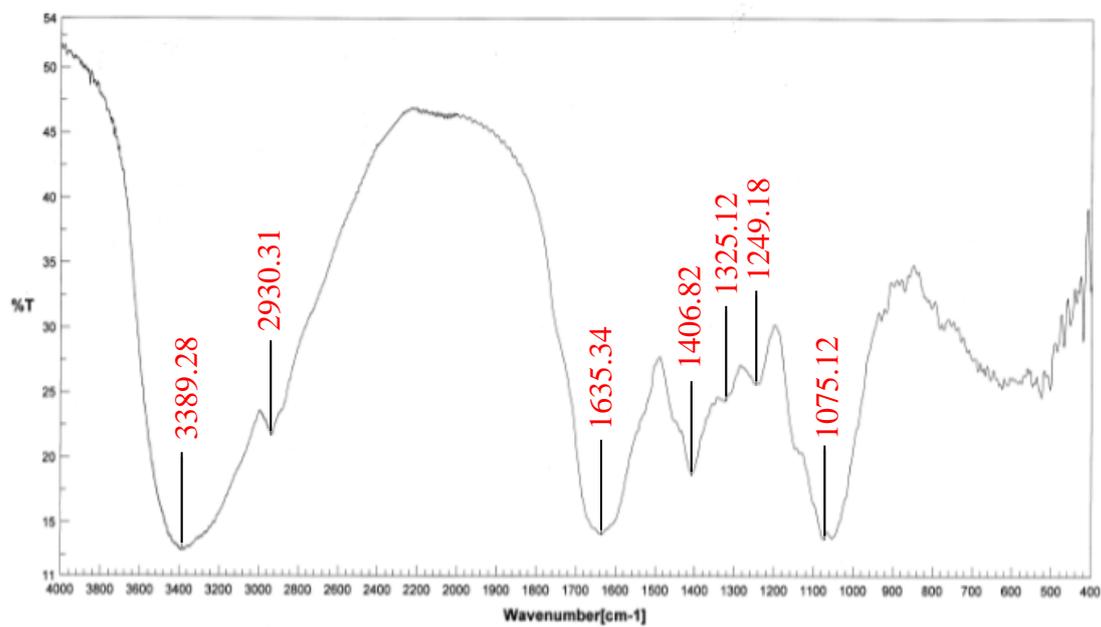
本章により、超音波破碎抽出法は素材の細胞壁を破壊し、細胞壁の組成成分である多糖類(セルロース、キチン、キトサン等)を抽出することにより、多糖類の抽出率を向上すると考えられる。

また、超音波破碎抽出法は冬虫夏草子実体、冬虫夏草菌糸体発酵物、靈芝子実体及び靈芝菌糸体発酵物といった 4 種類の素材に対する抽出促進効果を明らかに示し、薬用キノコ多糖類抽出に優れた抽出法であり、応用価値を有すると考えられる。

表 6-1 4 種類研究素材の多糖類抽出率および向上率

原材料	超音波破碎抽出率	熱水抽出率	向上率
冬虫夏草子実体	7.29±0.08%	3.01±0.10%	142%
冬虫夏草菌糸体発酵物	14.19±0.09%	8.19±0.34%	73%
靈芝子実体	4.06±0.09%	1.14±0.15%	255%
靈芝菌糸体発酵物	10.01±0.075%	7.19±0.01%	39%

(a)



(b)

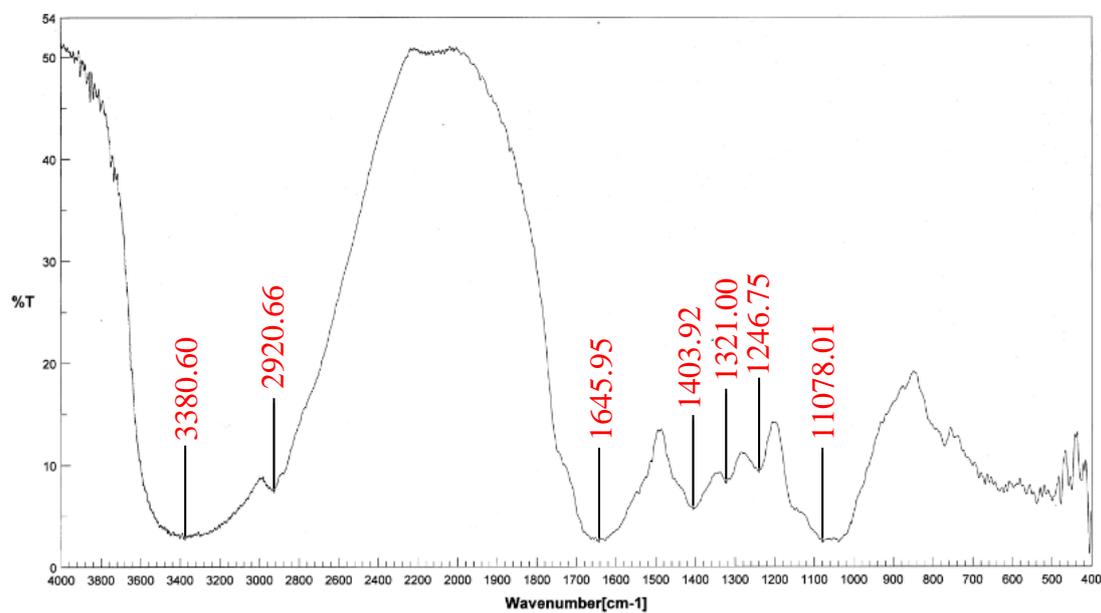
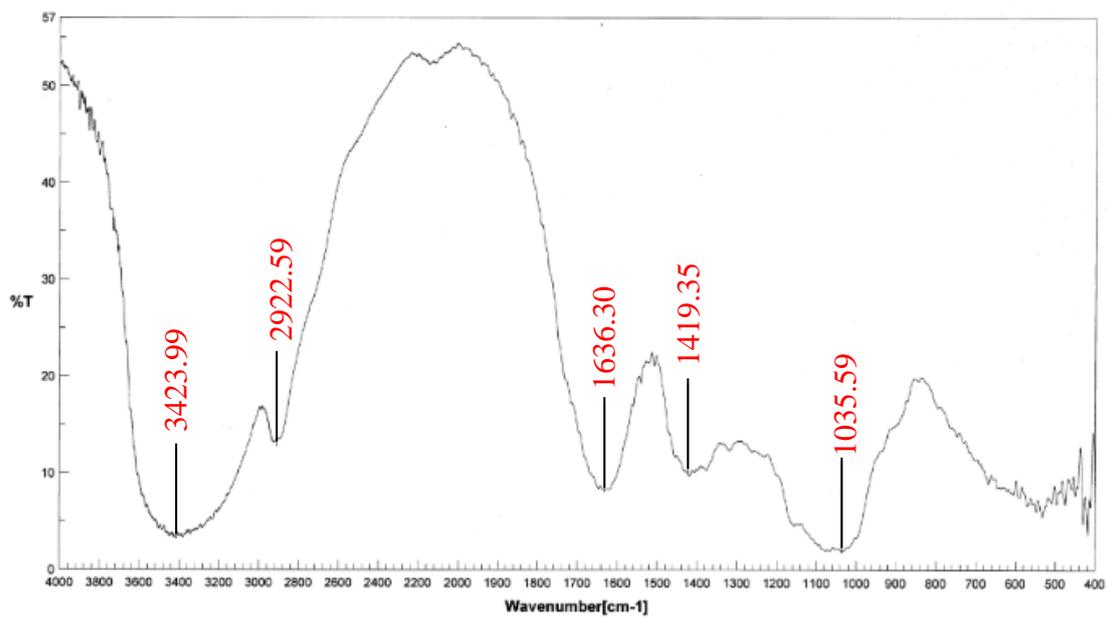


図 6-1 霊芝菌糸体発酵物由来の熱水抽出多糖類(a)及び超音波破碎抽出多糖類 (b)の赤外吸収スペクトル

(a)



(b)

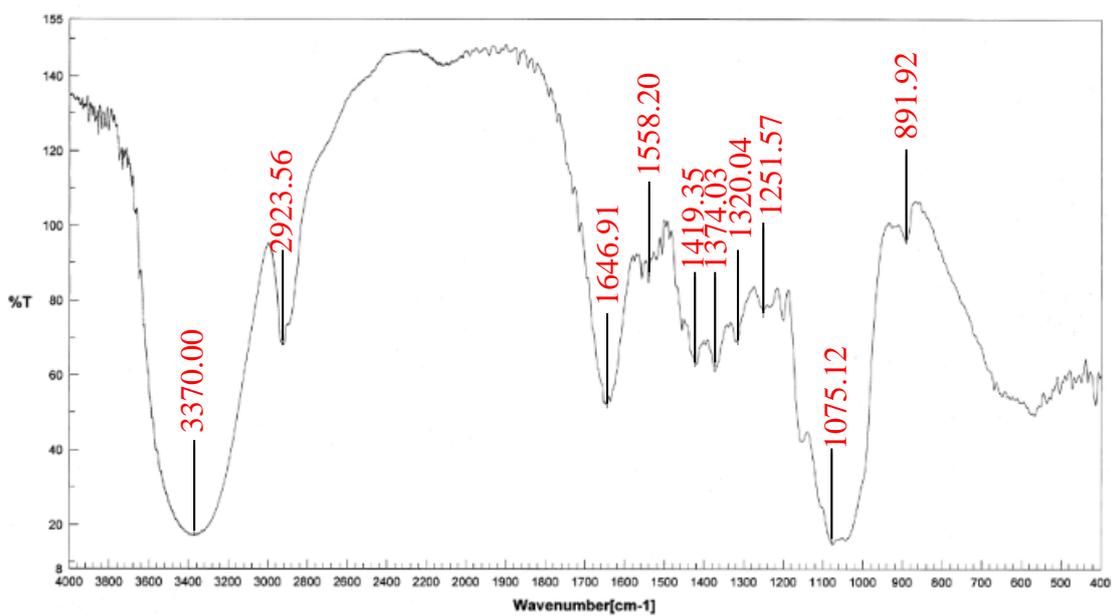


図 6-2 霊芝子実体由来の熱水抽出多糖類(a)及び超音波破碎抽出多糖類(b)の赤外吸収スペクトル

## 第7章 総括

本研究では、冬虫夏草子実体および霊芝菌糸体発酵物を主要な研究素材とし、超音波破碎抽出法の最適化更に従来法との抽出率比較を行なった(第2、4章)。

また、各抽出法が多糖類の生理活性および免疫調節活性を検討することにより、各抽出法を比較して評価した(第3、5章)。

最後に、冬虫夏草菌糸体発酵物および霊芝子実体を補助研究素材とし、超音波により菌糸体発酵物および子実体に対する多糖類抽出促進効果の差異を検討した。霊芝菌糸体発酵物及び霊芝子実体を用い、超音波の多糖類抽出率向上効果のメカニズムを検討した(第6章)。

### 7.1 結論

本研究の結果に基づき、結論は下記の通りまとめられた。

1. 薬用キノコの多糖類抽出過程において、超音波破碎抽出法は多糖類の生理活性の保持・向上及び抽出率の向上を両立させることができ、従来法より優れた抽出法である。
2. 超音波破碎抽出法は細胞壁を破壊し、細胞壁の組成多糖類を抽出することにより、多糖類の抽出率を向上させる。
3. オカラにより培養した冬虫夏草子実体が抗酸化作用を有する食品として、また、癌治療回復期の補助治療食品となりうる価値を有すると考えられる。
4. オカラにより培養した霊芝菌糸体発酵物が抗酸化作用を有する食品として、また、免疫力を改善できる機能性食品、癌治療回復期の補助治療食品となりうる価値を有すると考えられる。

## 7.2 今後の課題及び展望

### 7.2.1 課題

超音波破碎抽出法が優れていることが実証されたため、抽出された多糖類のより詳しい生理活性やメカニズム等の解明は今後の課題として残されている。例えば、マウス或いは霊長目動物などを対象とした動物試験を行い、生体に対する免疫調節活性の確認及びメカニズムの解明に関する研究を行うことはその一つである。

### 7.2.2 展望

冬虫夏草および霊芝は有名な漢方薬であり、健康補助、免疫調節、特定の病気に対する治療効果などを有することは多くの研究者によって実証されてきた。本研究室で培養された冬虫夏草子実体及び霊芝菌糸体発酵物の各生理活性も実証されたため、本研究室の薬用キノコ培養技術有機産業廃棄物であるオカラの再資源化に関しての応用価値を高く有すると考えられる。上記の事から、効率的な培養技術と抽出法を合わせ、培養された薬用キノコを商品化することは期待できる。

## 謝 辞

本研究は、筑波大学生命環境系に属する張 振亜教授から懇切丁寧なご指導を受け賜りながら行われました。ご教示およびご助言を頂いたことに、心より御礼申し上げます。また、研究の進みおよび論文作成に貴重なアドバイスをくださった生命環境系に属する楊 英男准教授および雷 中方准教授にも、心より御礼申し上げます。

そして、論文審査において生命環境系に属する山路 恵子准教授および内海 真生准教授にご高閲いただき、大変お世話になりました。懇篤なるご指導をくださったことに心より御礼申し上げます。

更に、三年間の研究活動にわたり、親切なご示唆およびアドバイスをくださった生命環境系に属する王 悦朋研究員に深く感謝致します。

最後に、ご協力をくださった筑波大学生物資源プロセス工学研究室の皆様  
に心より感謝致します。

## 参考文献

1. 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.
2. 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; 56: 666-672.
3. Li S, Wang L, Song C, Hu X, Sun H, Yang Y, Lei Z & Zhang Z. Utilization of soybean curd residue for polysaccharides by *Wolfiporia extensa* (Peck) Ginns and the antioxidant activities in vitro. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2014; 45: 6-11.
4. 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.
5. Shi M, Zhang Y & Yang N. Antioxidant and immunoregulatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP). *Carbohydrate Polymers*, 2013; 95: 200-206.
6. Li Y, Hu H, Zu X, Shi M, Zhang Z & Yang Y. Improvement of physiological active substance of wheat dried distillers' grains with solubles fermented by *Preussia aemulans* under optimum fermentation conditions. *International Journal of Biology*, 2012; 4: 91-100.
7. 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.
8. Franzen KL & Kinsella JE. Functional properties of succinylated and acetylated soy protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1976; 24: 788-795.
9. Nguyen TA, Ngo HH, Guo WS, Zhou JL, Wang J, Liang H & Li G. Phosphorus elimination from aqueous solution using 'zirconium loaded okara' as a biosorbent. *Bioresource technology*, 2014; 170: 30-37.
10. Riet W.B. v d, Wight A.W., Cilliers J.J.L. & Datel J.M.. Food chemical investigation of tofu and its byproduct okara. *Food chemistry*, 1989; 34: 193-202.

11. Khare S.K., Jha K & Gandhi A.P.. Citric acid production from okara (soy-residue) by solid-state fermentation. *Bioresource technology*, 1995; 54: 323-325.
12. Lima F S d, Kurozawa L E & Ida E I. The effects of soybean soaking on grain properties and isoflavones loss. *LWT-Food Science and Technology*, 2014; 59: 1274-1282.
13. Jankowiak L, Kantzas N, Boom R & van der Goot A J. Isoflavone extraction from okara using water as extractant. *Food chemistry*, 2014; 160: 371-378.
14. Lu F, Liu Y & Li B. Okara dietary fiber and hypoglycemic effect of okara foods. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2013; 2: 126-132.
15. Chan W.-M. & Ma C.-Y.. Acid modification of proteins from soymilk residue (okar(a). *Food Research International*, 1999; 32: 119-127.
16. Shashidhar M.G., 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.
17. Jing Y, Cui X, Chen Z, Huang L, Song L, Liu , Lv W & Yu R. Elucidation and biological activities of a new polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris*. *Carbohydrate Polymers*, 2014; 102: 288-296.
18. Zhu S-J, Pan J, Zhao B, Liang J, Wu Z-Y & Yang J-J. Comparisons on enhancing the immunity of fresh and dry *Cordyceps militaris* in vivo and in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013; 149: 713-719.
19. Chang H-L, Chao G-R, Chen C-C & Mau J-L. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata* and *Cordyceps militaris* mycelia. *Food Chemistry*, 2001; 74: 203-207.
20. Zhang A-L, Lu J-H, Zhang N, Zheng D, Zhang G-R & Teng L-R. Extraction, Purification and Anti-tumor Activity of Polysaccharide from Mycelium of Mutant *Cordyceps Militaris*. *Chemical Research in Chinese Universities*, 2010; 26: 798-802.
21. Zhu Z-Y, Dong F, Liu X, Lv Q, Yang Y, Liu F, Chen L, Wang T, Wang Z & Zhang Y. Effects of extraction methods on the yield, chemical structure and anti-tumor activity of polysaccharides from *Cordyceps gunnii* mycelia. *Carbohydrate Polymers*, 2016; 140: 461-471.
22. Das SK, Masuda M, Sakurai A & Sakakibara M. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. *Fitoterapia*, 2010; 81: 961-968.

23. Joung H-J, Kim Y-S, Hwang J-W, Han Y-K, Jeong J-H, Lee J-S, Moon S-H, Jeon B-T & Park P-J. Anti-inflammatory effects of extract from *Haliotis discus hannai* fermented with *Cordyceps militaris* mycelia in RAW264.7 macrophages through TRIF-dependent signaling pathway. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014; 38: 184-189.
24. Wang R, Chen P, Jia F, Tang J & Ma F. Optimization of polysaccharide from *Panax japonicus* C.A. Meyer by RSM and its anti-oxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012; 50: 331-336.
25. Xiao Y, Zhang Q, Miao J, Rui X, Li T & Dong M. Antioxidant activity and DNA damage protection of mung beans processed by solid state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2015; 31: 216-225.
26. Xiao Y, Xing G, Rui X, Li W, Chen X, Jiang M & Dong M. Enhancement of the antioxidant capacity of chickpeas by solid state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18. *Journal of Functional Foods*, 2014; 10: 210-222.
27. Kodama EN, McCaffrey RP, Yusa K & Mitsuya H. Antileukemic activity and mechanism of action of cordycepin against terminaldeoxynucleotidyl transferase-positive (TdT+) leukemic cells. *Biochemical Pharmacology*, 2000; 59: 273-281.
28. Chou S-M, Lai W-J, Hong T-W, Lai J-Y, Tsai S-H, Chen Y-H, Yu S-H, Kao C-H, Chu R, Ding S-T, Li T-K & Shen T-L. Synergistic property of cordycepin in cultivated *Cordyceps militaris*-mediated apoptosis in human leukemia cells. *Phytomedicine*, 2014; 21: 1516-1524.
29. Reis F S., Barros L, Calhella R C., Ćirić A, Griensven L J.L.D. v, Soković M & Ferreira I C.F.R.. The methanolic extract of *Cordyceps militaris* (L.) Link fruiting body shows antioxidant, antibacterial, antifungal and antihuman tumor cell lines properties. *Food and Chemical Toxicology*, 2013; 62: 91-98.
30. Holliday J C., Cleaver P, 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.
31. Khan M K, Abert-Vian M, Fabiano-Tixier A-S, Dangles O & Chemat F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 2010; 119: 851-858.

32. Zhou C & Ma H. Ultrasonic degradation of polysaccharide from a red algae (*Porphyra yezoensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006; 54: 2223-2228.
33. Vilku K, Mawson R, Simons L & Bates D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry-A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2008; 9: 161-169.
34. Wen L, Xia M, Song H-W, Zhang L, Zhou H, Jiang J & Yuan C-S. Yield of nucleotides secondary metabolite in *Cordyceps militaris* by corn culture. *Food Science*, 2005; 26: 65-68.
35. Yi Z-L, Huang W-F, Ren Y, Onac E, Zhou G-F, Peng S, Wang X-J & Li H-H. LED lights increase bioactive substances at low energy costs in culturing fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *Scientia Horticulturae*, 2014; 175: 139-143.
36. Wang B-S, Lee C P, Chen Z-T, Yu H M & Duh P-D. Comparison of the hepatoprotective activity between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis*. *Journal of Functional Foods*, 2012; 4: 489-495.
37. Lu R-L, Bao G-H, Hu F-L, Huang B, Li C-R & Li Z-Z. Comparison of cytotoxic extracts from fruiting bodies, infected insects and cultured mycelia of *Cordyceps formosana*. *Food Chemistry*, 2014; 145: 1066-1071.
38. Wang M, Meng X Y, Yang R L, Qin T, Wang X Y, Zhang K Y, Fei C Z, Li Y, Hu Y L & Xue F Q. *Cordyceps militaris* polysaccharide can enhance the immunity and antioxidation activity in immunosuppressed mice. *Carbohydrate Polymers*, 2012; 89: 461-466.
39. Liu Y-J, Shen J, Xia Y-M, Zhang J & Park H-S. The polysaccharides from *Ganoderma lucidum*: Are they always inhibitors on human hepatocarcinoma cells. *Carbohydrate Polymers*, 2012; 90: 1210-1215.
40. Wang H & Ng T.B.. Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides*, 2006; 27: 27-30.
41. Mau J-L, Lin H-C & Chen C-C. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2002; 50: 6072-6077.
42. Shi YL, James AE, Benzie IF & Buswell JA. Mushroom-derived preparations in the prevention of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage to cellular DNA. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*, 2002; 22: 103-111.

43. Sun J, He H & Xie B J. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004; 52: 6646-6652.
44. Yuen J.W.M. & Gohel M.D.I. The dual roles of Ganoderma antioxidants on urothelial cell DNA under carcinogenic attack. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008; 118: 324-330.
45. Lin KI, Kao YY, Kuo HK, Yang WB, Chou A, Lin HH, Yu AL & Wong CH. Reishi polysaccharides induce immunoglobulin production through the TLR4/TLR2-mediated induction of transcription factor blimp-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006; 281: 24111-24123.
46. Liu J, Kurashiki K, Fukuta A, Kaneko S, Suimi Y, Shimizu K & Kondo R. Quantitative determination of the representative triterpenoids in the extracts of *Ganoderma lucidum* with different growth stages using high-performance liquid chromatography for evaluation of their 5 $\alpha$ -reductase inhibitory properties. *Food Chemistry*, 2012; 133: 1034-1038.
47. Liu Y, Liu Y, Qiu F & Di X. Sensitive and selective liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of five ganoderic acids in *Ganoderma lucidum* and its related species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011; 54: 717-721.
48. Chen C, Shao Y, Tao Y & Wen H. Optimization of dynamic microwave-assisted extraction of *Armillaria* polysaccharides using RSM, and their biological activity. *LWT - Food Science and Technology*, 2015; 64: 1263-1269.
49. Cheng Z, Song H, Yang Y, Liu Y, Liu Z, Hu H & Zhang Y. Optimization of microwave-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015; 76: 161-168.
50. Zeng H, Zhang Y, Lin S, Jian Y, Miao S & Zheng B. Ultrasonic–microwave synergistic extraction (UMSE) and molecular weight distribution of polysaccharides from *Fortunella margarita* (Lour.) Swingle. *Separation and Purification Technology*, 2015; 144: 97-106.
51. Li J-W, Ding S-D & Ding X-L. Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. *Jinsixiaozao*. *Journal of Food Engineering*, 2007; 80: 176-183.

52. Tsochatzidis N.A., Guiraud P., Wilhelm A.M. & Delmas H.. Determination of velocity, size and concentration of ultrasonic cavitation bubbles by the phase-Doppler technique. *Chemical Engineering Science*, 2001; 56: 1831-1840.
53. Wang J, Kan L, Nie S, Chen H, Cui S W., Philips A O., Philips G O., Li Y & Xie M. A comparison of chemical composition, bioactive components and antioxidant activity of natural and cultured *Cordyceps sinensis*. *LWT - Food Science and Technology*, 2015; 63: 2-7.
54. Li J, Guan M & Li Y. Effects of Cooking on the Contents of Adenosine and Cordycepin in *Cordyceps Militaris*. *Procedia Engineering*, 2015; 102: 485-491.
55. Yuan X, Sun H, Liu Y, Shiroshita T, Kawano S, Takeshi S, Ma J & Zhang Z. Anti-cancer activity comparisons of aqueous extracts from *Inonotus obliquus*, *Cordyceps militaris* and *Uncaria tomentosa* *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2014; 2: 19-25.
56. 横山勉. おからは食品か産廃か. 2013. [http://www.foodwatch.jp/secondary\\_inde/soybeanlmm/35613](http://www.foodwatch.jp/secondary_inde/soybeanlmm/35613)
57. Mecozzi M. Estimation of total carbohydrate amount in environmental samples by the phenol-sulphuric acid method assisted by multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2005; 79: 84-90.
58. Rhee S J, Cho S Y, Kim K M, Cha D-S & Park H-J. A comparative study of analytical methods for alkali-soluble  $\beta$ -glucan in medicinal mushroom, Chaga (*Inonotus obliquus*). *LWT-Food Science and Technology*, 2008; 41: 545-549.
59. Liu Y, Wei S & Liao M. Optimization of ultrasonic extraction of phenolic compounds from *Euryale ferox* seed shells using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 2013; 49: 837-843.
60. Lin H, Zhang Y, Han M & Yang L. Aqueous ionic liquid based ultrasonic assisted extraction of eight ginsenosides from ginseng root. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2013; 20: 680-684.
61. Yan Y-L, Yu C-H, Chen J, Li X-X, Wang W & Li S-Q. Ultrasonic-assisted extraction optimized by response surface methodology, chemical composition and antioxidant activity of polysaccharides from *Tremella mesenterica*. *Carbohydrate Polymers*, 2011; 83: 217-224.

62. Xu Y & Pan S. Effects of various factors of ultrasonic treatment on the extraction yield of all-trans-lycopene from red grapefruit (*Citrus paradise Macf.*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 2013; 20: 1026-1032.
63. Wu H, Zhu J, Diao W & Wang C. Ultrasound-assisted enzymatic extraction and antioxidant activity of polysaccharides from pumpkin (*Cucurbita moschat(a)*). *Carbohydrate Polymers*, 2014; 113: 314-324.
64. Ying Z, Han X & Li J. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Food Chemistry*, 2011; 127: 1273-1279.
65. Canettieri E V, Rocha G J d M, Carvalho Jr. J A d & Silva J B d A e. Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of *Eucalyptus grandis* residue using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 2007; 98: 422-428.
66. Muralidhar R.V, Chirumamila R.R, Marchant R & Nigam P. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. *Biochemical Engineering Journal*, 2001; 9: 17-23.
67. Blois M S.. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 1958; 181: 1199-1200.
68. Debnath T, Park P-J, Nath N C D, Samad N B, Park H W & Lim B O. Antioxidant activity of *Gardenia jasminoides* Ellis fruit extracts. *Food Chemistry*, 2011; 128: 697-703.
69. Smirnoff N & Cumbes Q J.. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 1989; 28: 1057-1060.
70. Chai L-Q, Zhang H-S, Huang J-J & Zhang Y-L. An unexpected Schiff base-type Ni (II) complex: Synthesis, crystal structures, fluorescence, electrochemical property and SOD-like activities. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015; 137: 661-669.
71. Straliootto M R, Hort M A, Fiuza B, Rocha J B T, Farina M, Chiabrando G & Bem A F d. Diphenyl diselenide modulates oxLDL-induced cytotoxicity in macrophage by improving the redox signaling. *Biochimie*, 2013; 95: 1544-1551.
72. Tenorio-Borroto E, Rivas C G. P, Chagoy án J C. V, Castañedo N, Prado-Prado F J., Garc á-Mera X & Gonz ález-D áz H. ANN multiplexing model of drugs effect on macrophages; theoretical and flow cytometry study on the cytotoxicity of the anti-

microbial drug G1 in spleen. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2012; 20: 6181-6194.

73. Monsur H A, Jaswir I, Simsek S, Amid A, Alam Z & Tawakalit A-H. Cytotoxicity and inhibition of nitric oxide syntheses in LPS induced macrophage by water soluble fractions of brown seaweed. *Food Hydrocolloids*, 2014; 42: 269-274.

74. Noh J-H, Lee H-N & Kim E-S. Isolation and characterization of *wbla* homologous gene in doxorubicin-producing *Streptomyces peucetius* strain. *Journal of Biotechnology*, 2008; 136: S58.

75. Al-Abd A M., Al-Abbasi F A., Asaad G F. & Abdel-Naim A B.. Didox potentiates the cytotoxic profile of doxorubicin and protects from its cardiotoxicity. *European Journal of Pharmacology*, 2013; 718: 361-369.

76. Spadavecchia J, Perumal R, Casale S, Krafft J-M, Methivier C & Pradier C-M. Polyethylene glycol gold-nanoparticles: facile nanostructuration of doxorubicin and its complex with DNA molecules for SERS detection. *Chemical Physics Letters*, 2015; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2015.08.038>.

77. Agudelo D, Bourassa P, B érub éG & Tajmir-Riahi H-A. Intercalation of antitumor drug doxorubicin and its analogue by DNA duplex: Structural features and biological implications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014; 66: 144-150.

78. Liu C, Liu F, Feng L, Li M, Zhang J & Zhang N. The targeted co-delivery of DNA and doxorubicin to tumor cells via multifunctional PEI-PEG based nanoparticles. *Biomaterials*, 2013; 34: 2547-2564.

79. Lee J S, Kwon D S, Lee K R, Park J M, Ha S-J & Hong E K. Mechanism of macrophage activation induced by polysaccharide from *Cordyceps militaris* culture broth. *Carbohydrate Polymers*, 2015; 120: 29-37.

80. Huang J, Nie Q, Liu X, Zhang S, Nie S, Huang D, Wang S, Zhu F & Xie M. *Ganoderma atrum* polysaccharide modulates TNF- $\alpha$  secretion and mRNA expression in macrophages of S-180 tumor-bearing mice. *Food Hydrocolloids*, 2016; 53: 24-30.

81. Fang Q, Wang J-F, Zha X-Q, Cui S-H, Cao L & Luo J-P. Immunomodulatory activity on macrophage of a purified polysaccharide extracted from *Laminaria japonica*. *Carbohydrate Polymers*, 2015; 134: 66-73.

82. Shi M, Yang Y, Wang Q, Zhang Y, Wang Y & Zhang Z. Production of total polyphenol from fermented soybean curd residue by *Lentinus edodes*. *International Journal of Food Science & Technology*, 2012; 47: 1215-1221.

83. Tian Y, Zeng H, Xu Z, Zheng B, Lin Y, Gan C & Lo Y. M. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Carbohydrate Polymers*, 2012; 88: 522-529.
84. Chen W, Wang W-P, Zhang H-S & Huang Q. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from *Boletus edulis* mycelia using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 2012; 87: 614-619.
85. Jiang Y., Wong J.H., Fu M., Ng T.B., Liu Z.K., Wang C.R., Li N., Qiao W.T., Wen T.Y. & Liu F.. Isolation of adenosine, iso-sinensetin and dimethylguanosine with antioxidant and HIV-1 protease inhibiting activities from fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *Phytomedicine*, 2011; 18: 189-193.
86. Chen T-Q, Wu Y-B, Wu J-G, Ma L, Dong Z-H & Wu J-Z. Efficient extraction technology of antioxidant crude polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (Lingzhi), ultrasonic-circulating extraction integrating with superfine-pulverization. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2014; 41: 57-62.
87. Zhang J, Meng G, Zhai G, Yang Y, Zhao H & Jia L. Extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides of spent mushroom compost of *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.016>.
88. Kan Y, Chen T, Wu Y, Wu J & Wu J. Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015; 72: 151-157.
89. Abidi N, Cabrales L & Haigler C H.. Changes in the cell wall and cellulose content of developing cotton fibers investigated by FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 2014; 100: 9-16.
90. Corazzaria I, Nisticà R, Turcia F, Fagad M G, Franzosa F, Tabasso S & Magnacca G. Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. *Polymer Degradation and Stability*, 2015; 112: 1-9.
91. Habibi N. Preparation of biocompatible magnetite-carboxymethyl cellulose nanocomposite: Characterization of nanocomposite by FTIR, XRD, FESEM and TEM. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014; 131: 55-58.

92. Lan W, Liu C-F, Yue F-X & Sun R-C. *Rapid Dissolution of Cellulose in Ionic Liquid with Different Methods*. 2013. [http://dx.doi.org/ 10.5772/52517](http://dx.doi.org/10.5772/52517).
93. Jaworskaa M M. & Gorakb A. Modification of chitin particles with chloride ionic liquids. *Materials Letters*, 2016; 164: 341-343.
94. Hariharan S & Nambisan P. Optimization of Lignin Peroxidase, Manganese Peroxidase, and Lac Production from *Ganoderma lucidum* Under Solid State Fermentation of Pineapple Leaf. *BioResources*, 2013; 8: 250-271.
95. Kollar P, Závalová V, Hošek J, Havelka P, Sopuch T, Karpíšek M, Třetinová D & Suchý P Jr. Cytotoxicity and effects on inflammatory response of modified types of cellulose in macrophage-like THP-1 cells. *International Immunopharmacology*, 2011; 11: 997-1001.
96. Mori T, Murakami M, Okumura M, Kadosawa T, Uede T & Fujinaga T. Mechanism of macrophage activation by chitin derivatives. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2005; 67:51-56.