

糖脂質を主とするきのこの機能性成分の効率的生産技術と 素材加工技術の開発

渡邊 治, 濱岡直裕, 柿本雅史, 米山彰造*, 石塚 敏**, 富山隆広***

Study and Utilization of Bioactive Properties in Edible Mushrooms

Osamu Watanabe, Naohiro Hamaoka, Masashi Kakimoto, Shozo Yoneyama*,
Satoshi Ishizuka** and Takahiro Tomiyama***

We examined bioactive properties of various types of edible mushrooms, for example, antioxidant activity, ACE inhibitory activity, antibacterial activity, and thrombolytic activity. Our results showed that bioactivities of the mushrooms were different by the kind of the mushrooms. In ascertaining whether heat treatment affects the antioxidant activity of edible mushrooms, our results showed that heat treatment hardly affected the antioxidant activity. In practical terms, this would imply that heat treatments involved in the production process, such as extraction and sterilization, would not preclude the use of edible mushrooms for bioactive materials in manufactured foodstuffs. We believe that the mapping technology that we used is very useful to grasp a functional characteristic of the food material. We also investigated thrombolytic activity and intestinal immunostimulation; further research on these aspects may assist in the production of functional foods aimed at the prevention of various geriatric conditions.

高齢化社会の進行や食生活の欧米化にともない、生活習慣病等の予防に対する社会的ニーズが高まっている。その結果、健康食品等の市場は2005年では1兆2千億円の巨大な市場となっており、更なる拡大が予測されていたが、その後2005年をピークに減少し、2008年には1兆7百億円になった。これは世界的な不況による市場の冷え込みや薬事法などによる規制の強化、そして製品選択に対する消費者の情報分析が背景にあると考えられる。実際、エビデンスが明確な特定保健用食品の需要は伸びている。このような中、古くから抗腫瘍効果が知られているキノコ類^{2,3)}については近年様々な保健機能が注目されており、健康食品の素材としての利用が期待されている。

一方、道内のキノコの年間生産量は1万7千t、生産額

は94億円とほぼ横ばい状態にあり⁴⁾、供給過剰や価格の低迷により、小規模な生産施設が多い道内生産者は厳しい経営を強いられている。そのため、社会的ニーズに合致した健康食品等の開発と道産キノコの付加価値向上や消費拡大につながる技術開発が早急に求められている。

このような中、北海道立林産試験場（現北海道立総合研究機構林産試験場）と株式会社スリービーにより平成15～16年に行われた共同研究において、それまでの実用品種より外観や生産性に優れたタモギタケの新品種の育成に成功した。

本研究は、このタモギタケやマイタケ等の道産キノコが有する保健機能性について評価し、その結果を有効成分の生産能が高い菌株の育種・選抜にフィードバックするとともに、健康食品等に活用できる素材への加工技術

* (地独) 北海道立総合研究機構 林産試験場 (〒071-0198 旭川市西神楽1線10号)

** 北海道大学大学院農学研究院 (〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目)

***株式会社スリービー (〒069-0238 空知郡南幌町元町1丁目1番1号)

事業名：重点領域特別研究

課題名：糖脂質を主とするきのこの機能性成分の効率的生産技術と素材加工技術の開発

を開発し製品化を図ることを目的とした。

実験方法

1. 供試試料

実験試料には林産試験場で栽培された8菌種81試料(表1)の凍結乾燥物を用いた。そしてその凍結乾燥したキノコを粉碎し、粉碎物から蒸留水で2時間抽出し、得られた抽出液の凍結乾燥粉末を蒸留水に再溶解したものを試料とした。なお、抽出温度については、抽出物の加工食品への利用や殺菌等、加工工程および抽出工程における加熱による成分への影響を検討する目的で、25°Cならびに95°Cとした。

2. 保健機能性の評価

(1) 抗酸化活性の測定方法

抗酸化活性は1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)を用いたラジカル消去活性を測定する須田らの方法⁵⁾に準じて行った。試験管に200 μ M DPPH 300 μ L, 0.1 M 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) 緩衝液 300 μ L, 50%エタノールを加えたものに先のキノコ抽出試料を最終濃度 250 μ g/mLになるように加え、10分間反応後に520 nmでの吸光度を測定した。また試料中のポリフェノール量をFolin-Denis法⁶⁾を用い、タンニン酸量に換算して測定した。試験管に試料2 mL (5~20 mg/100 mL)を入れ、それにFolin試薬を2 mL添加した。室温で3分間静置したのち5%炭酸ナトリウム溶液を2 mL添加し、さらに室温で1時間静置した。その後760 nmでの吸光度を測定し、タンニン酸量として検量線より算出した。

(2) ACE阻害活性の測定方法

ACE阻害活性はCushmanらの方法⁷⁾で測定した。試験管に1.2 M NaCl 50 μ Lと先の試料または蒸留水50 μ L, 50 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.3) に溶解した40 mU ACEを氷冷下で加え、37°Cで3分間保温した後、反応基質として350 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.3) に溶解した10 mM Hippuryl-histidyl-leucine (HHL)を加えて30分間

反応させた。1 N HCl 200 μ Lを加え反応を停止させ、5分後に遊離した馬尿酸を1 mLの酢酸エチルで抽出し、蒸発乾固させ、蒸留水1 mLで溶解して226 nmでの吸光度を測定し、酵素活性の指標とした。

(3) 抗菌活性および増殖抑制効果の測定方法

抗菌活性は、大腸菌 *Escherichia coli* NBRC 3972 と黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* NBRC 12732 を用いたハロー試験を行った。すなわち溶解した標準寒天培地に前培養した供試菌を接種し、固化させ平板を作製した。1%試料懸濁液10 μ Lもしくはマイクロスパーテル1杯の凍結乾燥粉末試料を作製した平板上に載せ、35°Cで24時間培養後、ハローの形成を観察した。

増殖抑制効果は、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* NBRC 12732 を用い、前培養した供試菌を約 1×10^8 cfu/mLになるように0.1%の試料溶液に接種し供試菌液とし、接種後、バイオフォトレコーダー (TVS062CA, アドバンテック社製)にて35°C培養し、660 nmの濁度変化により判定した。

(4) 血栓溶解活性の測定方法

血栓溶解活性は須見らの方法⁸⁾で測定した。フィブリノーゲン50 mgを10 mLの0.17 M ホウ酸-生理食塩水緩衝液に溶解し、シャーレに注加した。これに5 U/mL トロンビン溶液を添加し、攪拌・静置して凝固させ、試料溶液30 μ Lを培地上に滴下し、37°Cで4時間、または18時間保持し、ハローの形成を観察した。

(5) 消化管粘膜免疫系に対する活性測定

ラット消化管から粘膜免疫系細胞であるLPLを分離回収し⁹⁾これをエフェクター細胞(E)とし、YAC-1細胞をターゲット細胞(T)としてRPMI 1640培地内でE:T=50:1となるように調整し、37°Cで2時間培養した。その際、培地中の種々のキノコ95°C抽出物濃度を0.1, 1, 10 mg/mLとなるように調整した。その後、FACSにて細胞死を起こしたYAC-1細胞の頻度を測定した。また同一培養条件でLPLを加えない試料を調整し、キノコ95°C抽出物がYAC-1の細胞死を直接誘導するかを併せて検討した。

3. β -グルカン含有量の測定方法

Yeast Beta-glucan assay kit (Megazyme International Ireland Ltd.)を用いて分析した。このキットは試料中の多糖類を分解し、総グルカン(α および β)量と α -グルカン量を測定し、その差から β -グルカン量を算出するものである。

まず、総グルカン量の測定方法であるが、試料約100 mgを精密に測定し、濃塩酸を1.5 mL加えて攪拌した。

表1 実験に供したキノコ

和名	学名	供試株数
ブナシメジ	<i>Hypsizygos marmoreus</i>	14
ムキタケ	<i>Panellus serotinus</i>	12
ホンシメジ	<i>Lyophyllum shimeji</i>	3
マイタケ	<i>Grifola frondosa</i>	14
エノキタケ	<i>Flammulina velvipes</i>	23
コムラサキシメジ	<i>Lepista sordida</i>	3
タモギタケ	<i>Pleurotus cornucopiae</i>	6
ナラタケ	<i>Armillaria mellea</i>	6

その後30°Cで15分おきに攪拌しながら45分静置した。その後100°Cで加温し、2時間後に2 M KOHを10 mL加えて分解を止めた。200 mMの酢酸ナトリウムで100 mLにメスアップした後、遠心分離(1,500 G, 10分間)で上清を得た。この上清0.1 mLに α -D-グルコナーゼ(20 U/mL)と β -D-グルコシダーゼ(4 U/mL)の混合酵素液(200 mM酢酸ナトリウム(pH 5.0)で希釈)0.1 mLを加えて40°Cで1時間インキュベーションした。その後グルコース測定試薬(グルコースオキシダーゼとペルオキシダーゼと4-アミノアンチピリジンの混合液)を3 mL添加し、さらに40°Cで20分加温した。加温後、分光光度計を用いて510 nmの吸光度を測定し、総グルカン量を求めた。 α -グルカン量の測定は、試料約100 mgを精密に測定し、2 M KOHを2 mL加えて氷冷下で20分攪拌した。その後1.2 M酢酸ナトリウム8 mLと、アミログルコシダーゼ(1,630 U/mL)とインペルターゼ(500 U/mL)の混合酵素液(50%グリセロールで希釈)0.2 mLを加えて40°Cで時々攪拌しながら加温した。加温終了後、遠心分離(1,500 G, 10分間)で上清を得た。この上清0.1 mLに200 mM酢酸ナトリウム(pH 5.0)0.1 mLと上記グルコース測定試薬3 mLを添加し、40°Cで20分加温した。加温後、分光光度計を用いて510 nmの吸光度を測定し、 α -グルカン量を求めた。以上の総グルカン量と α -グルカン量の計算値の差をとって目的とする β -グルカン量を算出した。

4. タモギタケを用いた製品開発

株式会社スリービーにおいて、グルコシルセラミドが豊富なタモギタケを用いた製品の開発を行った¹⁰⁾。タモギタケの前処理方法として、次の2通りの方法について検討した。1つめは、子実体を5分間煮沸して、水道水で水冷後、加圧脱水を行い、65°Cで水分が10%以下になるまで通風乾燥機で乾燥した。その後、乾燥子実体をマキノ式粉砕機の0.1 mmメッシュを通して粉砕し、抽出用原料とした。2つめの方法は、タモギタケの内在酵素の働きによるセラミドの抽出効率上昇を目的として、子実体をスライサーで細断し、水を3倍量加え、インキュベーターで35°C9時間処理した。その後、ライスボイラーで3分間煮沸し、水冷・圧搾脱水し、65°Cで一晩乾燥した。それをマキノ式粉砕機の0.1 mmメッシュを通して粉砕し、抽出用原料とした。また、タモギタケ由来グルコセラミドは臭いが強いので、脱臭方法について、以下の方法を検討した。 ϕ 600 mm×H 600 mmのSUS製吸引濾過器に上記抽出用原料3 kgと50%エタノール15 Lを混合し、一晩静置後吸引濾過した。その後、90%

エタノールを15 L加え、一晩静置後、吸引濾過した。その後、それぞれの濾液を減圧濃縮した。以上の工程で得られたタモギタケ由来グルコセラミド用いてサプリメント、ハンドクリームの製造を試みた。さらに乾燥タモギタケを配合したふりかけの製造を試みた。

結果及び考察

1. 抽出液の抗酸化活性の評価

キノコ抽出物の抗酸化活性を測定した結果を図1に示した。コムラサキシメジ、タモギタケ、エノキタケが抽出温度に関係なく高い活性を示した。ナラタケについては25°C抽出物の活性は高かったが、95°C抽出物については低かった。一方、ブナシメジ、ムキタケの活性は低く、菌種によって抽出物の抗酸化活性に大きな違いがあることが明らかとなった。さらにほとんどの菌種において、95°C抽出物より25°C抽出物の抗酸化活性が高く、抽出温度によっても抽出物の活性が大きく異なることが明らかとなった。また抗酸化活性に関わる成分としてはポリフェノールの存在が推察されることから、供試試料中のポリフェノール含量について測定した(図2)。抗酸化活性の傾向と大きな違いが見られないことから、キノコについてもその抗酸化活性に影響を与える成分の一つとしてポリフェノールの関与が考えられた。また活性成分の耐熱性を調べる目的で、ナラタケ、エノキタケ、タモギタケ、コムラサキシメジの25°C抽出物をさらに95°Cで2時間加熱したものの抗酸化活性を測定した。その結果、25°C抽出物もその加熱処理物も測定結果にほとんど違いは認められず、加熱による影響はほぼ無かった(図3)。このことから、これらの品種の95°C抽出による見かけ上の活性の低下は、抗酸化活性に関与しない成分の溶出が原因と考えられ、高い抽出温度が抗酸化活性に関与する成分を変質・劣化させたことによる活性の低下ではない

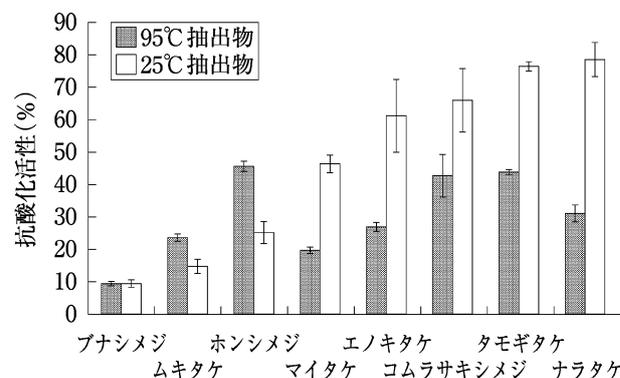


図1 濃度250 µg/mlにおけるキノコ抽出物の抗酸化活性

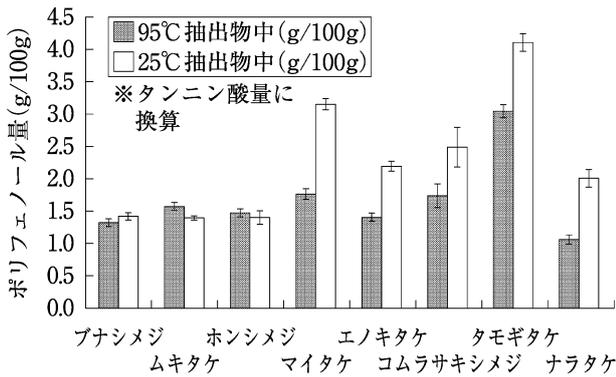


図2 キノコ抽出物中のポリフェノール量

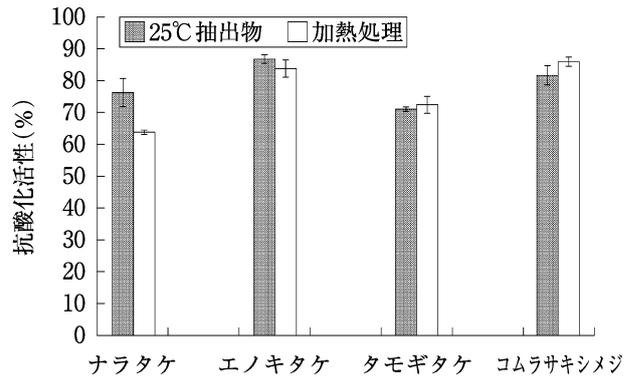


図3 抗酸化活性に対する抽出温度の影響

と推察できた。このため、食品製造における加工適性を考えた場合、殺菌工程における熱処理によってこれらのキノコ抽出液の抗酸化活性の低下はほとんど無く、加工食品素材として活用するのに十分な加工適性を有していると考えられた。

2. 抽出液の ACE 阻害活性評価

キノコ抽出物の ACE 阻害活性を測定した結果を図4に示した。コムラサキシメジ、ホンシメジ、ブナシメジ、タモギタケが抽出温度に関わらず高い活性を示した。ACE 阻害活性も抗酸化活性と同様に菌種による活性の違いは見られたが、抗酸化活性ほど顕著な違いは認めら

れず、マイタケ、ナラタケ、ムキタケ以外では菌種ごとの抽出温度による ACE 阻害活性の違いも見られなかった。

3. 抽出液の抗菌活性評価

キノコ抽出液の1%懸濁液によるハロー形成は大腸菌、黄色ブドウ球菌ともに認められず、抽出凍結乾燥物で黄色ブドウ球菌に対してわずかにハロー形成が認められた(表2)。しかし、黄色ブドウ球菌に対する増殖抑制効果は認められず(図5)、食品の保存性向上などを目的として活用するのに必要な抗菌活性を有していないことが明らかとなった。

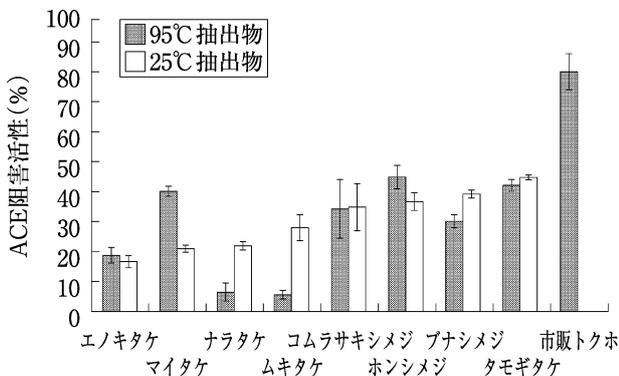


図4 濃度 250 μg/ml におけるキノコ抽出物の ACE 阻害活性

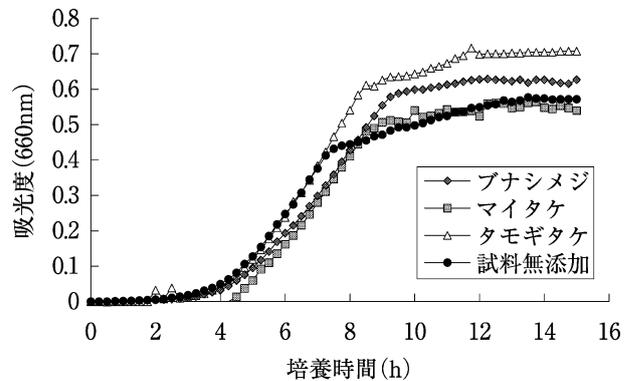
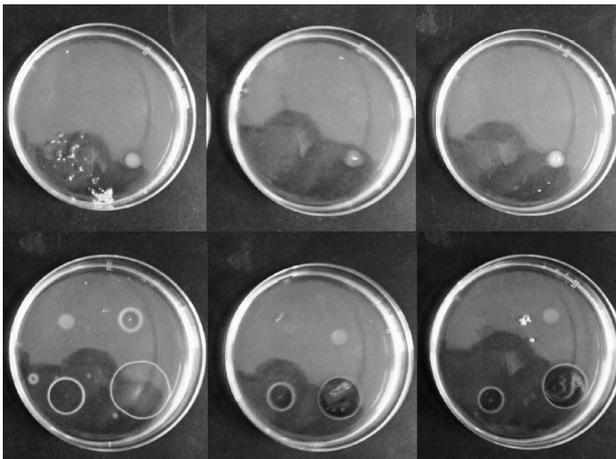


図5 95°C抽出乾燥粉末の増殖抑制効果

表2 95°C抽出物の抗菌活性

	1%懸濁液		抽出乾燥粉末	
	大腸菌	黄色ブドウ球菌	大腸菌	黄色ブドウ球菌
ブナシメジ	×	×	×	○
ムキタケ	×	×	×	×
ホンシメジ	×	×	×	×
マイタケ	×	×	×	○
エノキタケ	×	×	×	○
コムラサキシメジ	×	×	×	○
タモギタケ	×	×	×	○
ナラタケ	×	×	×	○



マイタケ コムラサキシメジ タモギタケ

図6 キノコ抽出物の血栓（フィブリン）溶解活性
(上：抽出温度 95°C, 下：抽出温度 25°C)

4. 抽出液の血栓溶解活性評価

予備的に行った幾つかの種類のきのこ抽出液において、マイタケやコムラサキシメジ、タモギタケの25°C抽出物に血栓溶解活性（フィブリン溶解性）が認められた（図6）。この結果から、これらキノコを食することによる血栓の形成予防が期待でき、心筋梗塞や脳梗塞のような血栓が原因の一つとされる疾病の予防効果を有する新しい健康食品の開発の可能性が示唆された。

5. 抽出液の消化管粘膜免疫賦活活性

ラット腸管 LPL に対する影響には、ムキタケに高い細胞傷害性が認められ（図7-1, 7-2）、含有β-グルカン量の測定結果から、細胞傷害性にはβ-グルカンの関与が高く示唆された（表3）。

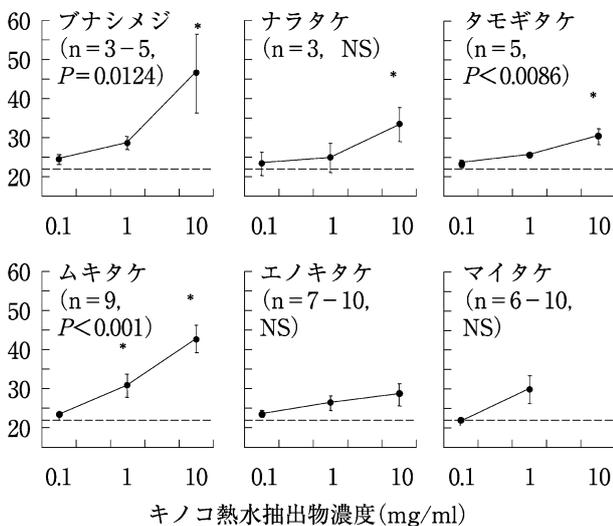


図7-1 キノコ熱水抽出物がラット小腸 LPL の細胞傷害性に及ぼす影響

表3 キノコおよび抽出物中のβ-グルカン量

試料名	原料	(g/100g)	
		95°C抽出物	25°C抽出物
ブナシメジ	23.5	13.7	10.4
ナラタケ	23.7	5.8	6.1
タモギタケ	23.2	7.5	1.2
マイタケ	33.5	34.5	25.2
ムキタケ	37.9	19.6	19.4
エノキタケ	17.3	3.2	2.5
ホンシメジ	—	31.1	26.7
コムラサキシメジ	26.2	23.0	20.1

以上の結果を踏まえ、高活性の試料や菌株ごとに大きく異なる測定結果を示した試料を今後さらにマイクロアレイ法などで遺伝子発現レベルでの新たな生理機能の解析や、LC-MS/MS などを用いて保健機能性への関与成分の変化をマッピング解析することが出来れば、キノコの持つ様々な保健機能性のメカニズムや効率的な高活性株の生産方法が検討可能と考えられる。

本研究における保健機能性評価の新たな取り組みとして、図8に示すような2次元マッピングを試みた。すなわちグラフの横軸と縦軸にそれぞれ異なる保健機能性をとり、用いた試料をその集合状態によってグルーピング化することにより、視覚的に活用しやすい評価軸の作成を行った。今回は横軸に抗酸化活性を、縦軸に ACE 阻害活性をとり、両者の相関関係をみた。その結果、今回実験に用いたキノコはその機能性から以下のように大きく3つのグループに分けられることがわかった。すなわち両活性ともに結果が良好なホンシメジ、コムラサキシメジ、タモギタケのグループA、ACE 阻害活性が良好

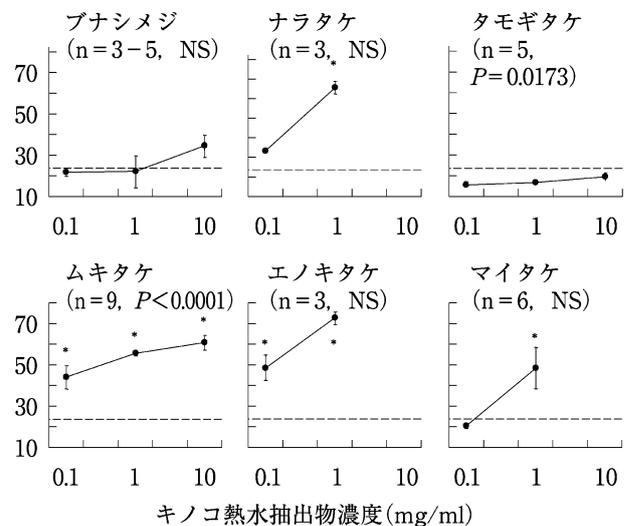


図7-2 キノコ熱水抽出物がラット大腸 LPL の細胞傷害性に及ぼす影響

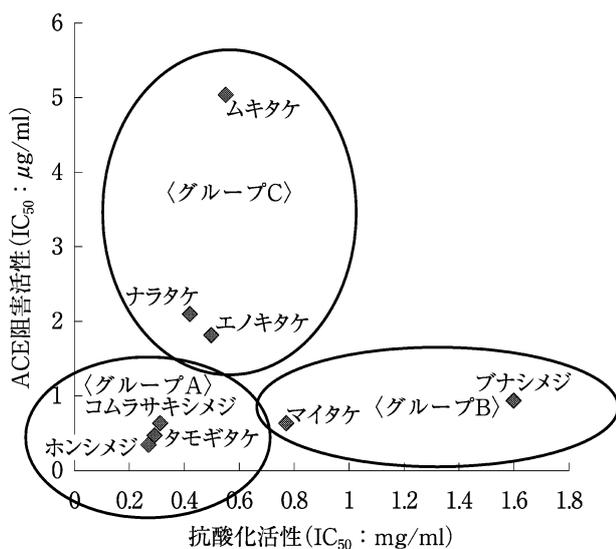


図8 抗酸化活性とACE阻害活性の相関図

な結果を示したマイタケ、ブナシメジのグループB、そして抗酸化活性が良好な結果を示したエノキタケ、ナラタケ、ムキタケのグループCである。この活性分類を指標として、効率的な栽培法や機能性成分の探索・含有率の増加などの研究をさらに進め、この研究で得られた成果を道内キノコ生産業の新たな需要開拓や生産技術の向上、食品加工業におけるキノコ加工品の高付加価値化に活用できると考えられる。

6. キノコ成分を利用した製品の開発

タモギタケの前処理方法の検討では、通常法でのセラミド回収率が原料乾燥重量あたり0.23%であったのが、内在酵素を考慮した方法においてセラミド回収率が0.34%となり、約50%の抽出効率アップとなった。これは、タモギタケのセラミドが細胞膜に存在していると考えられることから、セルラーゼ等の内在酵素の働きや、原料細断における細胞壁の破壊によるものと考えられ



図10 製品開発の例 (ハンドクリーム)



図9 製品開発の例 (サプリメント)

た。また脱臭方法の検討では、50%エタノールでの抽出において、官能試験においてエタノール層ににお成分の大部分が抽出され、かつグルコセラミドは最終抽出量において脱臭工程を入れない場合と比較しても約0.4%の損失にとどまった。このため、エタノール処理がグルコセラミドの利用において有効な脱臭方法であることが示された。

以上のグルコセラミド精製技術を用いて、株式会社スリービーにおいてサプリメント (図9)、ハンドクリーム (図10)、ふりかけ (図11) の製品化に成功し、販売を開始した。今後の検討課題であるが、今回明らかにした活性マッピングの手法を活用することにより、食品素材について特徴をつかんだ上での商品開発手法などの構築が可能と考えられ、また血栓溶解性については、その効果が期待できる結果が得られたことから、これらの成果を成人病などの予防を目的とした健康食品の開発につなげていくことが求められる。なお、コムラサキシメジなど約50種のキノコが「菌輪 (フェアリーリング)」を形成すること¹¹⁾が知られており、コムラサキシメジなどが他



図11 製品開発の例 (ふりかけ)

の植物に対する成長促進物質を産生している可能性が指摘されている。このことを明らかにすることにより、キノコ成分の肥料化や無農薬栽培分野への応用など、キノコの食品分野以外への利用、応用の可能性、それによるキノコの消費拡大が期待できると考えられる。

要 約

キノコ8菌種について、その抗酸化活性とACE阻害活性について検討した結果、抗酸化活性についてはコムラサキシメジ、タモギタケ、エノキタケの活性が高く、ACE阻害活性についてはコムラサキシメジ、ホンシメジ、ブナシメジ、タモギタケが強い活性を示した。また加熱による抗酸化活性に対する影響を検討した結果、加熱前後での活性値に変化はほとんど見られなかった。このことから、キノコの加工食品への利用を考えた場合、加工工程における抽出や滅菌などの加熱処理では抗酸化活性は低下しないことが明らかとなった。このほか、マイタケ、コムラサキシメジ、タモギタケの25°C抽出物に血栓（フィブリン）溶解活性が確認され、さらにムキタケには腸管粘膜免疫系の活性化を介した細胞傷害性が確認されるなど、新たな健康食品素材としての可能性が示唆された。

参 考 文 献

- 1) CMP ジャパン, 『食品と開発』, **41**, pp.15-16 (2006)
- 2) 水野卓, 川合正允, キノコの化学・生化学, 学会出版センター, 1992
- 3) 古川久彦, きのご学, 共立出版, 1992
- 4) 北海道水産林務部, 平成19年度北海道特用林産統計, (2007)
- 5) 農林水産省農林水産技術会議事務局, 『食品の機能性評価マニュアル集』, pp.16-18 (1999)
- 6) 科学技術庁資源調査会食品成分部会, 『五訂日本食品標準成分表分析マニュアル』, pp.137-140 (1997)
- 7) Cushman, D. W. and Cheung, H. S., Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.*, **20**, pp.1637-1648 (1971)
- 8) 須見洋行, 岡本猛, テンペ水溶液中の血栓溶解活性, *家政誌*, **54**, pp.337-342 (2003)
- 9) 岡浩輔他, 平成20年度第二回合同学術講演会要旨集, p.17 (2008)
- 10) 米山彰造他, 平成20年度重点領域特別研究報告書, (2009)
- 11) 河岸洋和, 平成22年度藪田セミナー要旨集, p.5 (2010)