

マイタケ子実体の栽培ロットによる β -グルカン含有率のばらつきの検証

津田 真由美, 東 智則*¹, 米山 彰造*¹

Verification of the variation of β -glucan content between or within the production lots of the maitake (*Grifola frondosa*) fruiting body

Mayumi TSUDA, Tomonori AZUMA*¹, Syozo YONEYAMA*¹

キーワード: マイタケ, *Grifola frondosa*, β -グルカン, 食品機能性

マイタケ品種「大雪華の舞1号」の機能性食品素材としての利用に向けて、本品種の生産企業の栽培施設において、栽培ロット（子実体の収穫日）内及びロット間における β -グルカン含有率を調査した。 β -グルカン含有率の各ロット内の標準偏差は3%未満であったが、ロット間には有意差が見られた。一方、1菌床当たりの収量が高いロットほど β -グルカン含有率が高くなり、収量が高いロット間には有意差が見られなかった。これらのことから、子実体の β -グルカン含有率のばらつきを抑えるには、栽培ロット間において安定した子実体収量を得ることが重要であると考えられた。

さらに、子実体の品質管理基準として β -グルカン含有率を使用する場合の定量方法を検討し、コンゴーレッド法は簡便で有用な方法であることを確認した。

1. はじめに

北海道立総合研究機構林産試験場では、カンバ類よりも安価で入手しやすい、カラマツやトドマツのおが粉を使用して栽培できるマイタケ品種「大雪華の舞1号」（登録番号: 第17041号）を開発し、平成20年に品種登録した（第1図）。従来品種はカラマツのおが粉を使用して栽培すると、傘の開きが不十分で、収量が低下する。一方、「大雪華の舞1号」は、培地基材の30%をカンバ類からカラマツに置換した場合でも、収量、生産効率ともに、従来品種より高い結果が得られている^{1,2)}。



第1図 大雪華の舞1号
企業の生産施設で撮影

著者らは、「大雪華の舞1号」について、ヒト介入試験によるインフルエンザワクチン効果の増強作用³⁾と抗動脈硬化作用⁴⁾、動物試験による腸内環境

改善効果⁵⁾の科学的エビデンスを明らかにしている。現在、本品種は道内企業によって生産・上市されており、北海道食品機能性表示制度（ヘルシーDo）に認定された実績があり、今後も機能性食品素材としての利用が期待できる。

農林水産物を機能性食品の素材として利用する場合には、機能性成分の含量を把握することが求められる⁶⁾。マイタケを健康機能性に着目して利用する際も同様に、栽培ロット内、ロット間での機能性成分のばらつきを把握するとともに、機能性成分に着目した品質管理が必要となる。

本研究は、当該品種の機能性食品素材としての利用拡大や機能性表示の活用に向け、当該品種を生産（4,000菌床/週）する企業の栽培施設において、栽培ロット（子実体の収穫日）による成分含有量のばらつきを調査した。栽培施設で収穫されたマイタケについて、ロット内・ロット間でのサンプリングを行い、マイタケの主要成分であり、各種食品機能性を有する β -グルカンについて、各サンプルの含有量の測定を行った。

また、 β -グルカンの定量法の一つである酵素分解法は、キット化されているものの分析に時間を要する。そのため、 β -グルカン含有率を品質管理基準とする場合の定量法として、より簡便な方法を検討し

た。酵素分解法と silkworm larvae plasma (SLP) 試薬、コンゴーレッド法及びアニリンブルー法を用いて得られた β -グルカンの定量データの相関を明らかにし、品質管理に適した簡便な定量法を検討した。

2. 実験方法

2.1 栽培及び試料

子実体の部位による β -グルカン含有率のばらつきを検討するため、林産試験場において、大雪華の舞1号 (Hfpri Gf433) を栽培した¹⁾。培地組成は、おが粉 (ダケカンバ70%とカラマツ30%) 27%、フスマ8%、培地水分65%とし、子実体は菌傘裏の管孔が成熟した時点で収穫し、菌床ごとに収量 (生重量) を測定した。3菌床 (A, B, C) から収穫した子実体について、部位別の β -グルカン含有率のばらつきを検討した。

栽培ロット内及びロット間における子実体の β -グルカン含量のばらつきを検討するため、同品種の生産企業の栽培施設 (北海道夕張郡栗山町) において収穫適期の子実体をサンプリングした。本研究では、同一日に収穫した子実体を同ロットとした。サンプリングした子実体は林産試験場に冷蔵輸送した後、直ちに凍結乾燥し、粉末試料とした。粉末試料は、分析前に一晚真空ポンプで減圧乾燥した。

2.2 β -グルカン含有量の定量

2.2.1 酵素分解法

β -グルカンの定量キットである、Mushroom and yeast β -glucan assay (Megazyme Ltd., Ireland) を用いて、添付の説明書に従い、総グルカン (α -グルカン、 β -グルカン、オリゴ糖、スクロース中のD-グルコース及び遊離D-グルコース) と α -グルカンをそれぞれ定量し、それらの差から β -グルカン量を算出した。

総グルカン量は、以下のとおり定量した。粉末試料45 mg をスクリュウキャップ付き試験管に精秤し、1.0 mLの氷冷12 M硫酸 (37% v/v) を加えて攪拌後、氷浴上で2時間静置した。その後10~15秒数回攪拌し、 β -グルカンを完全に溶解させた後、5 mLの蒸留水を加え、湯浴上で2時間加温した。加温後、200 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で定量的に50 mLメスフラスコに移し、3 mLの10 M KOH溶液を加え、200 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で定容した。攪拌後、一部を遠心管に採取し、遠心分離 (1,500 \times g, 10 min) し、上清0.1 mL をスクリュウキャップ付き試験管に採取した。これに α -

β -1,3-グルカナーゼ (20 U/mL) と β -グルコシダーゼ (4 U/mL) の混合酵素液0.1 mLを加えて攪拌後、40°Cで1時間インキュベートした。その後、グルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ試薬 (GOPOD試薬) を3 mL添加し、40°Cで20分加温後、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 -グルカンは以下のとおり定量した。粉末試料50 mg を精秤し、攪拌子と1 mLの2 M KOHを加えて氷冷下で20分間スターラーにより攪拌した。その後1.2 M 酢酸ナトリウム (pH 3.8) 4 mLを加えて攪拌し、ただちにアミログルコシダーゼ (1,630 U/mL) とインベルターゼ (500 U/mL) の混合酵素液 (50%グリセロール溶液) 0.1 mL を加えてよく攪拌し、40°Cで30分間時々攪拌しながら加温した。加温後、10 mL容メスフラスコで定容した後、遠心分離 (1,500 G, 10分間) した。この上清0.1 mLに、200 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0) 0.1 mLとGOPOD試薬3 mLを添加し、40°Cで20分加温後、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。

β -グルカン量は総グルカン量と α -グルカン量の定量値の差から算出し、乾燥重量あたりの β -グルカン含有率とした。“3.1 子実体の部位別の β -グルカン含有率のばらつき”と“3.2 ロット内及びロット間の β -グルカン含有率のばらつき”については、酵素分解法で定量した。

2.2.2 β -グルカン抽出液の調製

β -グルカン抽出は、菅原ら²⁾の方法を改変して以下のとおり行った。乾燥粉末試料50 mgに2% KOH 1 mLを加え、攪拌した。オートクレーブを用いて100°C, 60 min 加熱抽出し、遠心分離 (16,200 \times g, 10 min, 25°C) 後の上清をデカンテーションで分取した。続いて、エタノール沈殿による β -グルカンの精製を以下のとおり行った。分取した上清200 μ Lを1.5 mL容エッペンドルフチューブに採取し、99.5 %エタノール800 μ Lを加えた。攪拌後、遠心分離 (20,600 \times g, 10 min, 25°C) し、上清を取り除いた。次に80 %エタノール1 mLを加え転倒混和して沈殿を洗浄後、再度、遠心分離 (20,600 \times g, 10 min, 25°C) し上清を除去した。この洗浄工程を再度繰り返し、スピンドウン (20,600 \times g, 1 min, 25°C) によりチューブ底部に残った上清をマイクロピペットで取り除いた。得られた沈殿に蒸留水1 mLを加え、

ブロックヒーターを用いて 55°C, 30 min 加温溶解した。溶けにくい場合には激しく混合して可溶化した。

2.2.3 比色定量

2.2.3.1 コンゴレッド法

コンゴレッド（関東化学（株））74 mg及び2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol（Tris, 和光純薬（株））40 gを蒸留水400 mLに溶解し、6 M HCl 約33 mLを加えpH 8.0に調整後、全量を500 mLとして0.2 mM コンゴレッド溶液を調製した。β-グルカン標準品には、前述のMushroom and yeast β-glucan assay（Megazyme）付属のβ-グルカン標品（control yeast β-glucan preparation, β-グルカン含量49%）を使用し、希釈系列を調製し、検量線を作成した。

2.2.2で得られたβ-グルカン抽出液150 μLを96ウェルマイクロプレートに採取し、コンゴレッド溶液100 μLを加え、30分間放置した後に570 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー（Infinite 200 Pro, Tecan製）を用いて測定した。また各抽出液についてコンゴレッド溶液を0.66 M Tris buffer（pH 8.0）に置き換えたサンプルブランクの吸光度を差し引き、抽出液の着色の影響を除いた。検量線から粉末試料の乾燥重量あたりのβ-グルカン含有率を算出した。

2.2.3.2 SLP法

2.2.2で得られたβ-グルカン抽出液を適宜希釈し、SLP試薬セット（和光純薬工業（株））を用いて、添付の説明書に従いβ-グルカンを定量した。β-グルカン抽出液またはβ-グルカン標品50 μLを96ウェルマイクロプレートの各ウェルに入れ、SLP試液50 μLをすばやく添加した。マイクロプレートリーダー（Infinite 200 Pro, Tecan製）を用いて、以下の条件で測定を行った。

測定波長: 650 nm

測定モード: Kinetic

Onset OD: 0.01

測定時間: 30°C

Auto mix: Once

標品濃度を横軸に、反応時間（試料の吸光度が初期値から一定量まで増加するのに要する時間）を縦軸に対数プロットした検量線により、各試料の反応時間からβ-グルカン濃度を求め、粉末試料の乾燥重量あたりのβ-グルカン含有率を算出した。

2.2.3.3 アニリンブルー法

Koenig ら⁸⁾の方法に従った。12.7 mLの蒸留水、3.70 mLのグリシン/NaOH緩衝液（1.0 Mグリシン、1.25 M NaOH）、1.31 mLの2M HCl、及び2.50 mLのアニリンブルー溶液（5.0 g/L）を混合し、検量用液（最終濃度: 183m Mグリシン、229 mM NaOH、130 mM HCl、618 mg/Lアニリンブルー）を調製した。検量用液を暗所で一晩保存し、青から黄に脱色した。

2.2.2で得られたβ-グルカン抽出液を適宜希釈した。希釈溶液40 μLとアニリンブルー溶液360 μLをエッペンドルフチューブに採取し、攪拌後、50°Cで30分間インキュベートし、蛍光複合体を形成させた。内容物を十分に混合した後、96 ウェル蛍光プレート（Nunc 96 ウェルオプティカルボトム、黒色、Thermo Fisher Scientific Inc., USA）に移し、マイクロプレートリーダー（Infinite 200 Pro, Tecan製）を用いて励起波長405 nm、発光波長495 nmにより蛍光を測定した。

2.3 統計解析

得られたデータは、統計解析ソフト JMP11.0.0（SAS Institute Inc. USA）を用い、Tukey-KramerのHSD検定により群間の平均を比較した。なお、本研究では、β-グルカン含有率のロット内及びロット間の標準偏差をばらつきの目安とした。

3. 結果と考察

3.1 子実体の部位別のβ-グルカン含有率のばらつき

林産試験場で栽培した菌床A, B, Cから収穫したマイタケを第2図に示すように傘3~4枚程度の小片に分け、β-グルカンを定量した（第3図）。各菌床とも、子実体内のどの部位から傘を採取してもβ-グルカン含有率のばらつき（標準偏差）は、マイタケ乾燥重量の2%以下（β-グルカン含有量の5~6%程度）であることが確認された。このことから、品質管理の際には、子実体の一部を採取し、β-グルカン含有率を定量することにより、子実体全体の含有率として利用できると考えられた。一方、菌床A, B, Cから得られた子実体のβ-グルカン含有量の間には、有意差が見られた。

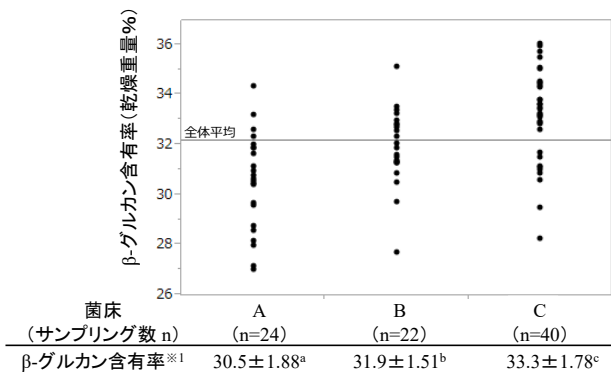
3.2 ロット内及びロット間のβ-グルカン含有率のばらつき

企業の栽培施設において、当該年度のマイタケ栽培が開始された5~6月の各収穫日（ロット1~3）に10菌床/ロットから子実体を採取し、栽培ロット内

の β -グルカン含有率のばらつきを検討した。これら3ロット、計30菌床から得られた子実体の β -グルカン含有率の平均値は29.9%, 標準偏差は2.8%であり、正規性が認められた(第4図, 濃い色のヒストグラム)。また、各ロット内の β -グルカン含有率のばらつきは、マイタケ乾燥重量の2%以内(1.4~2.0%)だった(第1表)。一方、3ロット間の含有率には有意差が見られた。

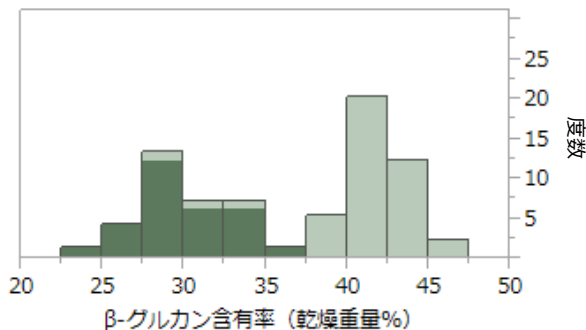


第2図 部位別の β -グルカン含有率測定試料のサンプリング例



第3図 各菌床から採取したサンプルの β -グルカン含有率(乾燥重量%)

※1平均値 \pm 標準偏差
異なるアルファベット(a, b, c)は、有意差があることを示す(Tukey-KramerのHSD検定, $p < 0.05$)



第4図 全9ロットの菌床から得られた子実体の β -グルカン含有率(乾燥重量%)のヒストグラム

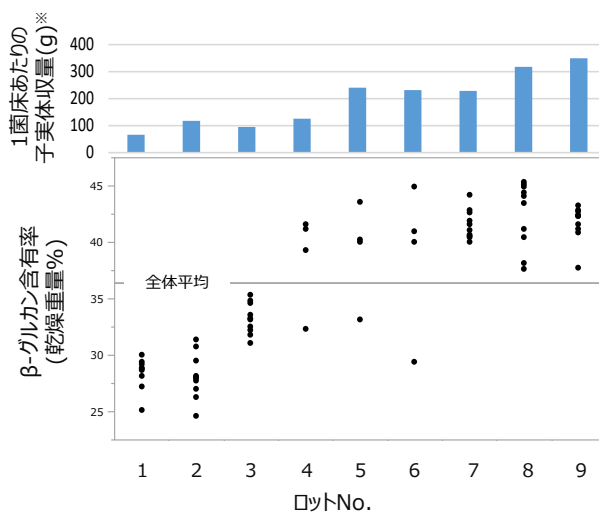
濃い色のヒストグラムは、ロット1~3のデータを示す。

第1表 各菌床から採取したサンプルの β -グルカン含有率(乾燥重量%)

ロットNo. 収穫日 菌床数 n	1 5月15日 10	2 5月29日 10	3 6月19日 10
β -グルカン含有率 ^{※1}	28.4 \pm 1.39 ^b	28.1 \pm 2.04 ^b	33.2 \pm 1.40 ^a

※1平均値 \pm 標準偏差
異なるアルファベット(a, b, c)は、有意差があることを示す(Tukey-KramerのHSD検定, $p < 0.05$)

その後同様に、8月(ロット4~6)と11~12月(ロット7~9)にサンプリングし、子実体の β -グルカン含有率を測定した。全9ロットの菌床から得られた子実体の β -グルカン含有率のヒストグラムを第4図に、各栽培ロットの1菌床あたりの子実体収量と各菌床から得られた子実体の β -グルカン含有率を第5図に示す。この栽培施設では、種菌の管理方法(温度、保管期間)、培地調製方法(計量、水分)、発生室1部屋あたりの菌床数、菌床の配置方法、温度管理(特に秋冬の発生室の温度維持)などの工夫や改善により、ロットを追うごとに収量が改善した。ロット1~9全体の β -グルカン含有率は平均36.4%, 標準偏差6.33%, ロット4~9全体では平均41.0%, 標準偏差3.29%であり、1菌床当たりの収量が高いロットほど、 β -グルカン含有率が高くなる傾向が見られた(第5図)。また、収量が高いロット7~9の含有率には、ロット間の有意差が見られなかった



第5図 各栽培ロットの1菌床あたりの子実体収量と各菌床から得られた子実体の β -グルカン含有率

※各ロットの収量/菌床数: ロット1~3, 7~9: n=10; ロット4~6: n=4.

(Tukey-KramerのHSD検定, $p < 0.05$)。以上のことから、子実体のβ-グルカン含有率のばらつきを抑えるには、栽培ロット間において安定した子実体収量を得ることが重要であると考えられた。

一方、林産試験場(第3図)と企業の栽培施設(第1表, 第4及び第5図)においてβ-グルカン含有率が異なる原因として、培地材料や栽培環境、収穫のタイミング等の影響が考えられ、品質管理基準は生産者ごとに設定する必要があると考えられる。

3.3 β-グルカンの定量方法の検討

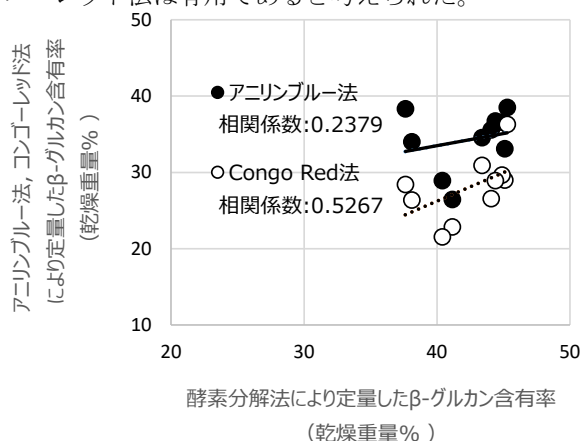
コンゴレッド法, silkworm larvae plasma (SLP) 試薬及びアニリンブルー法のような比色定量では、粉末試料からβ-グルカンを分離する必要があるが、マイタケ粉末のアルカリ抽出液をエタノール沈殿し、得られた沈殿を可溶化する分離方法は、簡便であり、多検体の測定に有効であった。

β-グルカンの比色定量法として、SLP法、コンゴレッド法、アニリンブルー法を比較した。SLP試薬は、ヒトの血液を試料として細菌感染を診断する試薬である。そのためマイタケのβ-グルカン含有率の定量に使用するにはかなり感度が高い。そのため、試料の希釈倍率が大きくなり、実験操作による誤差も大きくなる。また、試薬が高価であり、コスト面からも品質管理には不向きと考えられた(第2表)。コンゴレッド法はアニリンブルー法に比べ、酵素分解法の定量値との相関が高かった(第6図)。コンゴレッド法は酵素分解法と同様に吸光度を、アニリンブルー法は蛍光を測定する方法であるが、蛍光測定できる分光蛍光光度計は、紫外可視の分光光度計に比べ一般に高価である。そのため、コンゴレッド法はアニリンブルー法に比べ、分析機器の導入コストを抑えられる。一方、コンゴレッド法は(1→3, 1→6)-D-β-グルカンの三次元立体構造との反応を利用した定量方法であるため、酵素分解法に比べ測定値が低くなるが(第6図)、マイタケの機能性成分は(1→3, 1→6)-D-β-グルカンであるとい

第2表 SLP法、コンゴレッド法、アニリンブルー法と酵素分解法との比較

	SLP	コンゴレッド	アニリンブルー
コスト	× 試薬が高価	◎	△ 機器が高価
簡易さ	△ 感度が高すぎる	○	○
分析値	△	○	△

われており、食品機能性を評価する点からもコンゴレッド法は有用であると考えられた。



第6図 コンゴレッド法、アニリンブルー法及び酵素分解法で測定したβ-グルカン含有率の相関

4. まとめ

本研究では、栽培施設で収穫されたマイタケについて、栽培ロット内及びロット間によるβ-グルカン含有率のばらつきを明らかにした。子実体収量が高くなると、β-グルカン含有率も高くなり、また、ロット間において安定した子実体収量を得ることにより、β-グルカン含有率のばらつきを抑制できることが示唆された。本調査を行った栽培施設では、特に種菌の管理方法、培地の計量方法、栽培温度と換気のバランスが収量と品質に大きく影響しており、これらの管理は機能性素材としての品質維持にも重要であると考えられる。

なお、本品種の加工品をヘルシーDoに申請した際には、栽培ロットによるβ-グルカン含有率のばらつきを示すデータが必要であったことから、本研究のデータを提出している。

5. 引用文献

- 1) 米山彰造, 宜寿次盛生, 原田陽, 森三千雄: 林産試験場報, 20 (3), 21-26 (2006).
- 2) 米山彰造: 林産試だより1月号, 6-7 (2009).
- 3) Nishihira J, Sato M, Tanaka A, Okamatsu M, Azuma T, Tsutsumi N, Yoneyama S: Functional Foods in Health and Disease, 7(7), 462-482 (2017).
- 4) 佐藤真由美, 東 智則, 米山彰造, 韓圭鎬, 得宇圭彦, 島田謙一郎, 木下幹朗, 福島道広, 田中藍子. 西平順: 日本木材学会北海道支部講演集, 第49号, pp.1-4 (2017).

- 5) 佐藤真由美, 東 智則, 米山彰造, 韓圭鎬, 末岡さつき, 得字圭彦, 島田謙一郎, 木下幹朗, 福島道広 : 日本木材学会北海道支部講演集, 第47号, pp. 8-10 (2015).
- 6) 農林水産省 農林水産技術会議事務局 : 農林水産物の機能性表示に向けた 技術的対応についてー生鮮食品などの取扱いー平成27年8月, <http://www.kinkiagri.or.jp/library/houseido/kinouseihyouzinimuketagizyututekaitaiou.pdf> (2020年11月15日参照) .
- 7) 菅原諒太, 山田さゆみ, 涂 志豪, 菅原明子, 干場敏博, 山内正仁, 山口昭弘 : 道央圏に自生するキノコの同定と機能性成分の含有量, 日本食品科学工学会誌, 62 (9) (2015).
- 8) Koenig S, Rühmann B, Sieber V, Schmid J : Carbohydrate Polymers, 174, 57-64 (2017).

ー企業支援部 研究調整グループ
ー*1 : 利用部 微生物グループ
(原稿受理 : 20.11.30)