

# 博士学位論文

*Schizophyllum commune* による  
抗酸化活性物質生産に関する研究

武庫川女子大学大学院  
生活環境研究科 食物栄養学専攻

鮫島 由香

2019年

# 目次

緒論	1
第1章 エルゴチオネイン生合成経路から見出した 鰹出汁を用いたエルゴチオネイン高生産 培地条件の確立	6
第1節 鰹出汁培地およびマルト培地にアミノ酸を添加した 場合におけるエルゴチオネイン生産への影響	
第2節 鰹出汁培地にアミノ酸を添加した場合における エルゴチオネイン生産への影響	
第3節 鰹出汁培地およびマルト培地にアミノ酸および 酵母エキスを添加した場合におけるエルゴチオネイン 生産への影響	
第2章 スエヒロタケ後発酵茶のカテキン類の変化	31
第1節 スエヒロタケ後発酵茶の調製および抗酸化活性	
第2節 スエヒロタケ後発酵茶中の総ポリフェノール量 および総カテキン量	
第3節 スエヒロタケ後発酵茶中のカテキン類の変化	

第 3 章	スエヒロタケによる発酵黒大豆の調製および イソフラボン類の代謝産物 . . . . .	44
第 1 節	スエヒロタケ発酵黒大豆の調製および抗酸化活性	
第 2 節	スエヒロタケ発酵黒大豆中のイソフラボン類の変化	
第 3 節	スエヒロタケ発酵黒大豆懸濁液のイソフラボン類の 変化	
第 4 節	スエヒロタケ粗酵素液によるダイゼインの変化	
結論	. . . . .	63
要約	. . . . .	66
謝辞		
参考文献		
発表論文リスト		

## 緒論

世界に生息している担子菌は約 3 万種を超えるとされている。日本に生息する菌類の内、担子菌の生息数は 5,000～6,000 種と言われており、その中で名前の付いているものが約 2,000 種で、名前の付いている担子菌全体の約 10%の 200 種程度が食用とされている。日本人は古くから担子菌を食しており『万葉集』などにその様子が記載されている。また、担子菌は古くから漢方として用いられ、抗腫瘍作用や抗血栓作用などの薬効が報告されている<sup>1)</sup>。さらに、担子菌の特徴として低カロリーで食物繊維、ミネラル、ビタミンをはじめ、生体調節作用を持った機能性物質を多く含んでおり、我々の日常生活において罹患する可能性のある疾患の予防や治療効果、医薬品との相互的な利用による副作用軽減や機能の相乗・相加効果なども確認されている<sup>1)</sup>。

担子菌は従属栄養生物の一種であり自然界では自らの分泌する酵素により、枯れ木や落ち葉等から栄養源を得て生育している。担子菌の持つ酵素は、これまでに、寺下ら<sup>2),3)</sup>によって数多く研究されており、アミラーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼだけにとどまらず、アルコール脱水素酵素や凝乳酵素なども分泌する。松井ら<sup>4)-16)</sup>はこれまでに、これらの酵素を用いての発酵食品の調製を報告しており、担子菌の発酵能によりワイン、清酒、発酵豆乳などの様々な発酵食品を製造し、その機能性を見出してきた。本間ら<sup>17)-19)</sup>においても、担子菌を用いて、味噌、みりんなどの日本に古くから存在する発酵食品の調製を行っている。また、担子菌の持つ酵素の利用は発酵食品を調製するだけでなく、食品に

直接添加し、肉類の軟化や苦味成分の除去など食品工業への応用などについても検討されている<sup>20)-22)</sup>。

2017年度の日本人の死因の第1位は悪性新生物、第2位は心疾患、第3位は肺炎、第4位は脳血管疾患とされるように、悪性新生物や血管疾患による死亡が社会的な問題となっている<sup>23)</sup>。一方で、担子菌または担子菌による発酵能で製造された発酵食品は、ガンや血管疾患の予防に役立つ指標である、抗酸化活性や線溶活性、抗トロンビン活性を示すものが多いことが報告されて<sup>4),12),16)</sup>おり、特にスエヒロタケ(*Schizophyllum commune*)を用いて、調製した発酵食品において優れている。スエヒロタケは世界でも最も一般的な担子菌の一種であり、南極大陸を除く全ての大陸で発見されている。ごくまれに抵抗力が落ちたヒトやイヌの肺に寄生してスエヒロタケ感染症を引き起こすことが報告<sup>24)</sup>されているが、一方で、スエヒロタケの産生するシゾフィランは主に乳がんにおける放射線治療と併用されている<sup>25)</sup>。スエヒロタケを用いて発酵することによって、抗酸化作用の付加が示唆されていることから、スエヒロタケが含有する酵素により、これまでに報告されている抗酸化活性物質の生成のみならず、従来とは異なる発見も期待される。

そこで、本研究では、スエヒロタケが含有する酵素による抗酸化活性物質の生産を詳細に検討するために①鰹出汁を用いたエルゴチオネインの生産、②茶葉の発酵および茶葉中のカテキン類の含有量や組成の変化、③発酵黒大豆中のイソフラボンの変化について明らかにした。

日本人に身近な食素材である鰹出汁には、アンセリンやカルノ

シンが含まれており，抗酸化作用や疲労回復効果を示すことが報告されている<sup>26)</sup>．さらに，鰹出汁中には必須アミノ酸，核酸，ミネラル，ビタミン類などの成分も含まれており，中でも必須アミノ酸であるヒスチジンが特に多い<sup>27)</sup>ことが知られている．一方，エルゴチオネインはアミノ酸の一種で，人の体内にも存在する安全で有用な抗酸化物質である．これまでに，エルゴチオネインはヒスチジンやシステインを原料とし真菌や担子菌で生合成されることが報告されており<sup>28)</sup>，担子菌由来のエルゴチオネインの機能性の検討や，人工培地やソバ焼酎粕を利用した生産方法が福田<sup>29)</sup>や原田<sup>30)</sup>らによって報告されており，人工培地での培養の際，培地にヒスチジンやシステインを添加しており，これらのアミノ酸の添加がエルゴチオネインの生産量の向上に大きく関与していることが報告されている．

梶野らによる<sup>31)</sup>，鰹の血合肉からヘム鉄を回収する研究において水に鰹出汁がらを添加したものを培地として担子菌を培養した場合，菌糸が生育し，培養開始時と比較して総遊離アミノ酸濃度が低下しており，鰹出汁を用いた場合においても菌糸が十分に生育することが考えられた．これまでに，基本培地に鰹出汁を用いて，エルゴチオネインを生成した例は報告されていないが，鰹出汁中にはエルゴチオネインの生合成骨格成分であるヒスチジンやシステインを多く含んでおり，鰹だしがら中の遊離アミノ酸量が低下していたことから，鰹出汁を培地としてスエヒロタケを培養した場合に，鰹出汁中の遊離アミノ酸を利用して，スエヒロタケが新たにエルゴチオネインを生合成する可能性が考えられた．そこで，第1章では，スエヒロタケの菌糸体培養培地に鰹

出汁を用いた場合，エルゴチオネイン生産が可能であるかについて検討した．

茶は二千年以上人類に愛飲され続けており，世界で最も広く消費されている嗜好飲料の一つである．茶の種類は発酵方法の違いにより分類され，茶葉中に含まれる酸化酵素により発酵させる茶は発酵茶，半発酵茶と呼ばれており，紅茶やウーロン茶などがこれに含まれる．緑茶は収穫後，酸化酵素をすぐに失活させ発酵させていないため不発酵茶と呼ばれている．一方，後発酵茶は茶葉にカビや乳酸菌などの微生物を生育させて発酵し作る茶である．茶葉を微生物により発酵させることで，新たに色や香りのほか，酸味や遊離アミノ酸が増加し独特の風味や旨味を作り出す利点があるが，発酵期間中にカテキン類が分解されその含有量が低くなるという問題点がある<sup>32)</sup>．

一方，これまでに担子菌を用いて後発酵茶を調製した例は報告されていない．担子菌は茶葉の細胞壁の主成分であるセルロースやリグニン等を分解する作用が優れている．スエヒロタケの発酵能により，従来の後発酵茶で減少することが問題となっているポリフェノール類やカテキン類含量の多い後発酵茶を調製できる可能性が示唆された．そこで，第2章では，スエヒロタケの発酵能を利用して新たな後発酵茶を調製し，茶葉中の総ポリフェノール量およびカテキンの組成変化について探求した．

大豆には，イソフラボン，サポニン，レシチンなどの有効成分が含まれており，その抗酸化作用により動脈硬化や過酸化脂質の生成の予防効果が知られている．また，黒大豆には大豆に含まれる有効成分に加えて種皮の部分にアントシアニンを含むため大

豆よりも高い抗酸化効果が期待できる。

一方、これまでに、大豆を担子菌で発酵させた際、大豆に新たに担子菌の持つ線溶活性や抗トロンビン活性ならびに抗酸化活性が付与されるだけでなく、遊離アミノ酸量やアグリコン型のイソフラボンが増加していることが報告されている<sup>33)</sup>。しかしながら、大豆よりもより機能性が期待される黒大豆をスエヒロタケの発酵能により発酵し、発酵黒大豆を調製した例は全く報告されておらず、抗酸化物質の産生についても検討されていない。そこで、3章では担子菌発酵黒大豆の調製およびその成分の特徴、タンパク質の変化およびイソフラボンの変化について追究した。

従って本論文の構成は以下の通りである。まず緒論として本論文の目的を述べる。第1章では、スエヒロタケを鰹出汁中で培養した場合におけるエルゴチオネイン生産量の検討。第2章ではスエヒロタケ後発酵茶の製造方法および培養によるポリフェノール量の変化や、カテキン類の構成の変化について論じる。第3章ではスエヒロタケを用いた発酵黒大豆の調製方法およびイソフラボンの変化に着目した。結論では第1章から第3章の総括としてスエヒロタケを用いた抗酸化物質生産の可能性について論じた。

本論文では、スエヒロタケが生産する酵素による機能性物質生産を主目的として、以上の順序で、主に黒大豆の成分変化を中心として検討し、新たな食品利用方法についてまとめると共に、将来の食品産業の発展のみならず人類の健康維持、疾病予防への新しい知見の提言をする。



# 第 1 章 エルゴチオネイン生合成経路から見出した 鰹出汁を用いたエルゴチオネイン高生産培地条 件の確立

## 背景および目的

エルゴチオネインはアミノ酸の一種で、人の体内にも存在する安全で有用な抗酸化物質<sup>34)</sup>である。これまでに、エルゴチオネインはヒスチジンやシステインを骨格とし真菌や担子菌で生合成されることが報告されており<sup>28),35)-37)</sup>、担子菌由来のエルゴチオネインの機能性の検討や、人工培地やソバ焼耐粕を利用した生産方法が福田<sup>29)</sup>や原田<sup>30)</sup>らによって報告されている。人工培地での培養の際、基本培地にヒスチジンやシステインを添加しており、これらのアミノ酸の添加がエルゴチオネインの生産量の向上に大きく関与しているとされている。

一方、日本人に身近な食素材である鰹出汁には、アンセリンやカルノシンが含まれており、抗酸化作用や疲労回復効果を示すことが報告されている<sup>26)</sup>。さらに、鰹出汁中には必須アミノ酸、核酸、ミネラル、ビタミン類などの成分も含まれており、中でもエルゴチオネインの生合成の原料となるヒスチジンが特に多い<sup>27)</sup>ことが知られている。

梶野ら<sup>31)</sup>は、水に鰹出汁がらを添加したものを培地としてスエヒロタケを培養した場合、菌糸が生育し、培養開始時と比較すると総遊離アミノ酸濃度が低下していることを報告している。さらに、松井らは、これまでに鰹出汁粉末をスエヒロタケで発酵す

ることにより抗酸化活性が付加されることを報告している。これらのことから、鰹出汁を用いてスエヒロタケを培養した場合においても、菌糸が鰹出汁の成分を利用して十分に生育し、さらに培養期間中にエルゴチオネインを生合成する可能性が示唆された。これまでに、基本培地または、基本培地にアミノ酸を添加したものをを用いて担子菌を培養し、菌糸体中および子実体中のエルゴチオネインの生産についての検討は報告されているが、基本培地の代わりに、鰹出汁を用いて菌糸体を培養した場合のエルゴチオネイン生産量などについては全く報告されていない。

そこで、第 1 章第 1 節では、培地に鰹出汁を用いた場合、エルゴチオネイン生産が可能であるかについて検討し、エルゴチオネイン生成時の菌糸体の形状について明らかにした。

## 第 1 節 鰹出汁培地およびマルト培地にアミノ酸を添加した場合におけるエルゴチオネイン生産への影響

### 材料および方法

#### 1. 鰹出汁を用いたエルゴチオネインの生産

##### 材料

鰹出汁を取る際に使用した鰹は徳一番花かつお(ヤマキ株式会社, 愛媛県伊予市)を用いた.

##### 供試菌株

担子菌は, 独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC) から分譲されたスエヒロタケ (NBRC 30749) を用いた.

##### スエヒロタケの培養

供試菌株は, これまで松井らが発酵食品の調製に使用し, 高い抗酸化活性を示した<sup>4)</sup>スエヒロタケを用いた. スエヒロタケは, ポテトデキストロース寒天培地 (ニッスイ) で 25°C, 2 週間静置培養したものを使用した.

##### エルゴチオネインの生産

菌糸体の液体培養には鰹出汁培地およびマルト培地 (マルトエキス 2 g, グルコース 1 g, 水道水 100 mL) を使用した. 鰹出汁培地は鰹節 100 g に水道水 1 L を加え 30 分間熱水抽出後, ろ

過を行ったものにグルコース濃度が 3%になるように添加し調製した。鱈出汁培地およびマルト培地 200 mL をオートクレーブ (121°C, 20 min) 滅菌した。マルト培地にはヒスチジンおよびシステインおよびメチオニンが各 10mM<sup>38</sup>)になるようにフィルター滅菌したものを添加した。それぞれの培地にスエヒロタケ菌糸体の 5 mm 角の切片を 10 片植菌し、25°C で 42 日間回転振とう培養した。

培養後、菌糸体を取りだし、水気が出なくなるまで絞った後、重量を測定した。以下、湿重量と表記する。

## 2. 無細胞抽出液の調製

それぞれの条件で培養した各菌糸体 0.4 g に蒸留水 1 mL を加えて懸濁しマルチビーズショッカー MB400U (安井器械) および、超音波ホモジナイザー VC - 130PB (家田貿易) を用いて十分に菌糸体を潰した。その後、遠心分離 (15,000 rpm, 4°C, 15 min) を行い、その上清液を無細胞抽出液として以下の実験に用いた。

## 3. エルゴチオネインの定量

無細胞抽出液に当量の 99.8% アセトニトリル (和光純薬株式会社) を添加後混合し、遠心分離 (15,000 rpm, 4°C, 5 min) を行い、上清液を孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のサンプル前処理用フィルター 4 A (ジーエルサイエンス) でろ過後、HPLC 分析に用いた。

エルゴチオネイン含有量の測定は HPLC を用いて行った。その際、カラムは CAPCELL PAK C<sub>18</sub>MG II ((4.6mm ID×250mm), 資生堂), ポンプは DP-8020 (東ソー), 検出器は UV - 8020 (東ソ

一) を用いて行った。サンプルは 50  $\mu\text{L}$  をインジェクトした。溶出液 A は、75 mM 過塩素酸ナトリウムを含む 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.2) 溶液とし、溶出液 B は 50% アセトニトリル (v/v) を用いた。グラジエント条件は試料注入時 B 液 5%、分析開始と同時にグラジエント、15 分後 B 液 8.8%、20 分後 B 液 100%、20.1 分後 B 液 5% とした。カラム温度を 40  $^{\circ}\text{C}$ 、検出波長は 260 nm に設定した。

## 結果および考察

鰹出汁培地またはマルト培地にアミノ酸を 10mM 添加し 42 日間培養した際の乾燥菌糸体 1g 当たりのエルゴチオネイン量は、それぞれ  $0.20 \pm 0.04$  mg と  $0.03 \pm 0.02$  mg であった(図 1)。マルト培地にアミノ酸を添加し培養した菌糸体においても、わずかにエルゴチオネインを生産したが、鰹出汁培地で培養する方がはるかにエルゴチオネインの生産効率が高かった。

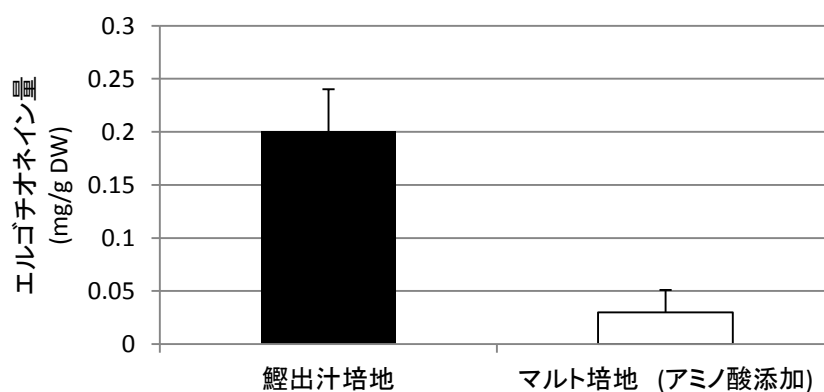
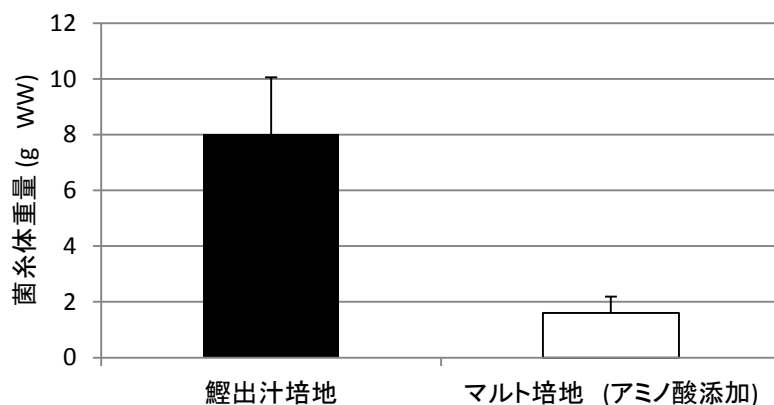


図 1 菌糸体中のエルゴチオネイン生産量の比較

アミノ酸はヒスチジン、システイン、メチオニンを各 10mM 添加した。

図中の値は平均±標準偏差を表す (n=3)。

鰹出汁培地およびマルト培地で培養後の菌糸体湿重量はそれぞれ  $8.02 \pm 2.04$  g と  $1.60 \pm 0.59$  g であった(図 2)。菌糸体重量においても鰹出汁培地の方が、アミノ酸を添加したマルト培地よりも約 5 倍量多かった。

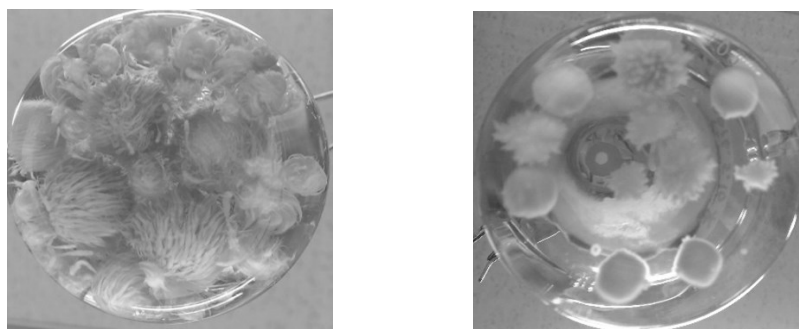


**図 2 鰹出汁およびマルト培地における菌糸体重量の比較**

アミノ酸はヒスチジン, システイン, メチオニンを各 10mM 添加した.

図中の値は平均±標準偏差を表す (n=3).

培養後の菌糸体の形状を図 3 に示す. 鰹出汁培地で培養したものは太く長い菌糸をのばし, 大きな菌糸体を形成した(図 3A). 一方, マルト培地にアミノ酸を添加して培養した場合の菌糸体は微細な短い菌糸をのばし, 小さな菌糸体を形成していた(図 3B).



A

B

図 3 鰹出汁およびマルト培地における菌糸体の形状

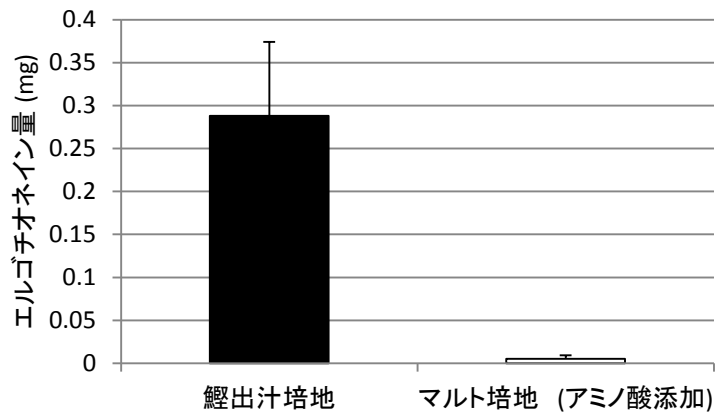
A：鰹出汁培地のみ

B：マルト培地にアミノ酸を添加

アミノ酸はヒスチジン，システイン，メチオニンを各 10mM 添加した。

乾燥菌糸体 1g あたりのエルゴチオネイン量および菌糸体湿重量から算出した培養器あたりのエルゴチオネイン量を図 4 に示した。鰹出汁培地およびマルト培地にアミノ酸を添加して培養した場合の培養器当たりのエルゴチオネイン量はそれぞれ  $0.29 \pm 0.09 \text{ mg}$  と  $0.005 \pm 0.004 \text{ mg}$  であった。培養器当たりのエルゴチオネイン量においても鰹出汁培地の方が、アミノ酸を添加したマルト培地よりも約 56 倍量多かった。また、それぞれの条件で培養した菌糸体の抗酸化活性は 73.9% および 27.4% であった。菌糸体中に含まれるエルゴチオネインの量はおよそ 56 倍であったが、抗酸化活性は 3 倍であったため、エルゴチオネインの含有量のみで抗酸化能を判断することが難しいことが示唆された。





**図 4 鰹出汁およびマルト培地における**

**培養器あたりのエルゴチオネイン量の比較**

アミノ酸はヒスチジン, システイン, メチオニンを各 10mM 添加した.

図中の値は平均±標準偏差を表す (n=3).

鰹出汁にはヒスチジンが 145~158 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ , システインが 1.92~4.17 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ , メチオニンが 1.33~2.40 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ , 含まれていることが報告されている<sup>27)</sup>. この際水に対して鰹節を 3% 加え 30 分加熱し鰹出汁として用いている<sup>27)</sup>. 本実験では水の量に対して 10%の鰹節を加えて抽出を行っているため, 鰹出汁中に含まれるアミノ酸量は約 3 倍含まれていることが推測され, ヒスチジンが 435~474 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ , システインが 5.76~12.51 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ , メチオニンが 3.99~7.20 $\mu\text{mol}/\text{mL}$  含まれると考えられる. したがって, 今回マルト培地に添加したヒスチジンおよびシステインおよびメチオニンの添加量 10mM は本実験で用いた鰹出汁に含まれているアミノ酸量と比較して充分量である. しかしながら, 鰹出汁のみで培養した場合の方がエルゴチオネインの生産量のはるかに多かった. これらのことから, 鰹出汁には

エルゴチオネインの生合成に必要なとされている、ヒスチジン、システイン、メチオニン以外のアミノ酸のみならず、エルゴチオネインの生合成に有効な成分が含まれている可能性が示唆され、アミノ酸を添加することでさらなるエルゴチオネイン生産性の向上が考えられた。そこで、次節では鰹出汁培地にそれぞれのアミノ酸を添加して菌糸を培養した場合のエルゴチオネインの生産性について検討した。

## 第 2 節 鰹出汁培地にアミノ酸を添加した場合における エルゴチオネイン生産への影響

### 材料および方法

#### 1. 鰹出汁を用いたエルゴチオネインの生産

鰹出汁を用いたエルゴチオネインの生産は，第 1 章第 1 節と同様に行った．ただし，鰹出汁に孔径  $0.22\mu\text{m}$  のフィルターでフィルター滅菌したヒスチジンおよびシステインおよびメチオニンを各  $10\text{mM}$  添加した条件下でも培養した．

#### 2. 無細胞抽出液の調製

無細胞抽出液の調製は，第 1 章第 1 節「2. 無細胞抽出液の調製」と同様に行った．

#### 3. エルゴチオネインの定量

エルゴチオネインの定量は，第 1 章第 1 節「3. エルゴチオネインの定量」と同様に行った．

## 結果および考察

鰹出汁培地および鰹出汁培地にアミノ酸を添加し，42日間培養した際の菌糸体中のエルゴチオネイン量は，乾燥菌糸体1g当たりの含有量がそれぞれ  $0.20 \pm 0.04$  mg と  $0.24 \pm 0.10$  mg であった(図5)．鰹出汁および鰹出汁培地にアミノ酸を10mM添加し培養した菌糸体中のエルゴチオネイン量についてはほとんど差がなかった．

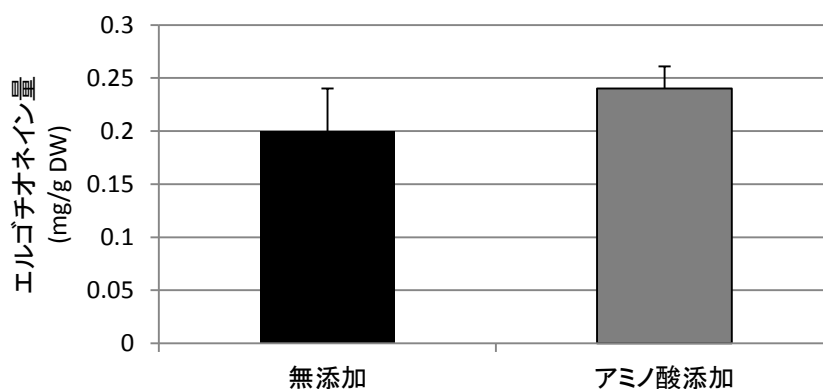
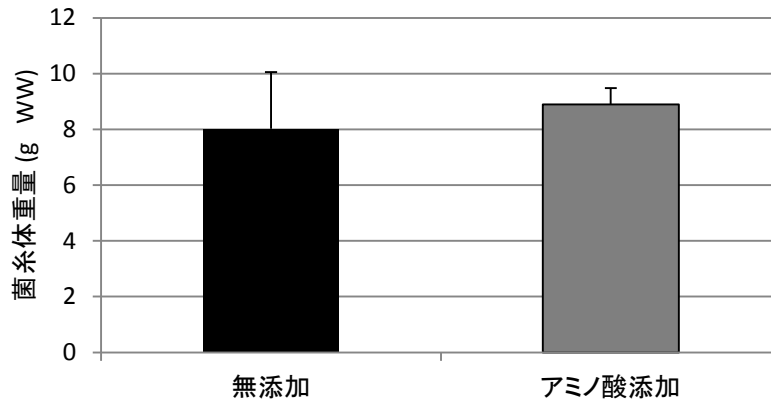


図5 アミノ酸添加の有無によるエルゴチオネイン生産量の比較

無添加はアミノ酸を添加していない鰹出汁培地を示す．アミノ酸はヒスチジン，システイン，メチオニンを各10mM添加した．図中の値は平均±標準偏差を表す(n=3)．

鰹出汁培地および鰹出汁培地にアミノ酸を添加し，42日間培養した際の菌糸体の湿重量はそれぞれ  $8.02 \pm 2.04$  g と  $8.89 \pm 1.61$  g であった(図6)．菌糸体重量においても鰹出汁培地および鰹出汁培地にアミノ酸を添加した場合でも，菌糸体重量に差はほとんど見られなかった．



**図 6 アミノ酸添加の有無による菌糸体重量の比較**

無添加はアミノ酸を添加していない鰹出汁培地を示す。アミノ酸はヒスチジン，システイン，メチオニンを各 10mM 添加した。図中の値は平均±標準偏差を表す (n=3)。

乾燥菌糸体 1g あたりのエルゴチオネイン量および菌糸体湿重量から算出した培養器あたりのエルゴチオネイン量を図 7 に示した。鰹出汁培地および鰹出汁培地にアミノ酸を添加して培養した場合の培養器あたりのエルゴチオネイン量はそれぞれ  $0.29 \pm 0.09 \text{ mg}$  および  $0.49 \pm 0.25 \text{ mg}$  であった。培養器あたりのエルゴチオネイン量においても鰹出汁培地の方が，アミノ酸を添加したマルト培地よりも約 1.6 倍量多かった。

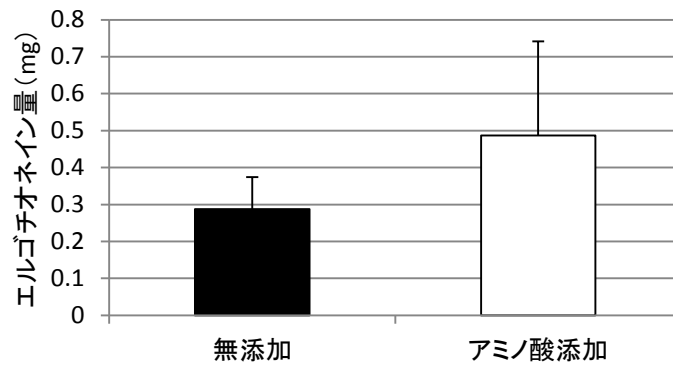


図 7 アミノ酸添加の有無による

培養器あたりのエルゴチオネイン量の比較

無添加はアミノ酸を添加していない鰹出汁培地を示す。アミノ酸はヒスチジン，システイン，メチオニンを各 10mM 添加した。図中の値は平均±標準偏差を表す (n=3)。

培養後の菌糸体の形状を図 8 に示す。鰹出汁培地ではアミノ酸の添加の有無により菌糸体の形状に違いはみられず，太く長い菌糸をのばし大きな菌糸体を形成していた(図 8A および図 8B)。

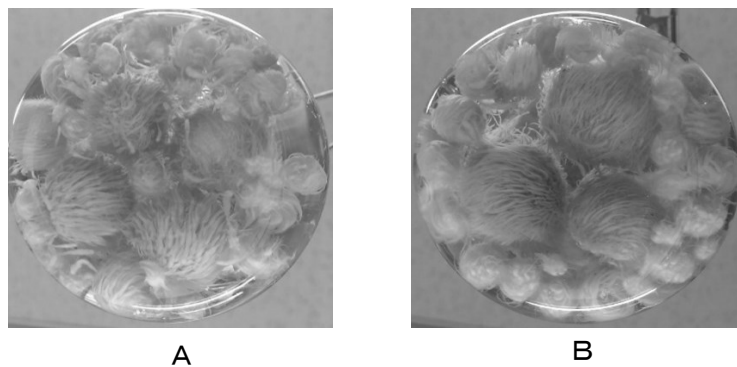


図 8 アミノ酸添加の有無による菌糸体の形状の比較

A：鰹出汁培地のみ

B：鰹出汁培地にアミノ酸を添加

アミノ酸はヒスチジン，システイン，メチオニンを各 10mM 添加した。

前節において、マルト培地にアミノ酸を添加した場合と鰹出汁中で菌糸体を培養した場合において、鰹出汁培地のみで培養した方がエルゴチオネイン生産量は約 10 倍，菌糸体重量は約 5 倍多かったことから，鰹出汁にアミノ酸を添加して培養することによって，さらにエルゴチオネインの生産性が向上すると推察した。しかし，本節においてアミノ酸添加の有無による，エルゴチオネイン生産への影響はなかったことが明らかとなった。

すでに報告されているエルゴチオネインの生合成経路において，エルゴチオネイン前駆体からエルゴチオネインが生成される場合に補酵素として PLP が関与していることが知られている<sup>39)</sup>。本研究で用いた培地にはエルゴチオネイン生産のための原料となるヒスチジン，システインおよびメチオニンは十分に含まれていることから，補酵素として PLP を添加することによりエルゴチオネイン生合成が促進されると推察したため，次節では，PLP を多く含む酵母エキスを培地中に添加して培養を行い，エルゴチオネインの生産量を検討した。

### 第 3 節 鰹出汁培地およびマルト培地にアミノ酸および酵母エキスを添加した場合のエルゴチオネイン生産への影響

#### 材料および方法

##### 1. 鰹出汁を用いたエルゴチオネインの生産

鰹出汁を用いたエルゴチオネインの生産は、第 1 章第 1 節と同様に行った。ただし、培養の際に鰹出汁およびマルト培地に古フィルター滅菌した、ヒスチジンおよびシステインおよびメチオニンを各 10mM、酵母エキスを 3% の濃度添加した。

##### 2. 無細胞抽出液の調製

無細胞抽出液の調製は、第 1 章第 1 節「2. 無細胞抽出液の調製」と同様に行った。

##### 3. エルゴチオネインの定量

エルゴチオネインの定量は、第 1 章第 1 節「3. エルゴチオネインの定量」と同様に行った。



## 結果および考察

鰹出汁培地に酵母エキスおよびアミノ酸をそれぞれ添加し、42日間培養した際の乾燥菌糸体 1g 当たりエルゴチオネイン量を図 9 に示した。鰹出汁培地培地のみで培養するよりも、アミノ酸のみ、アミノ酸および酵母エキス添加することによりエルゴチオネインの生産量がそれぞれ約 1.2 倍、約 8 倍まで増加したことからアミノ酸と酵母エキスの添加がエルゴチオネインの生産性の向上に関与していることが明らかとなった。

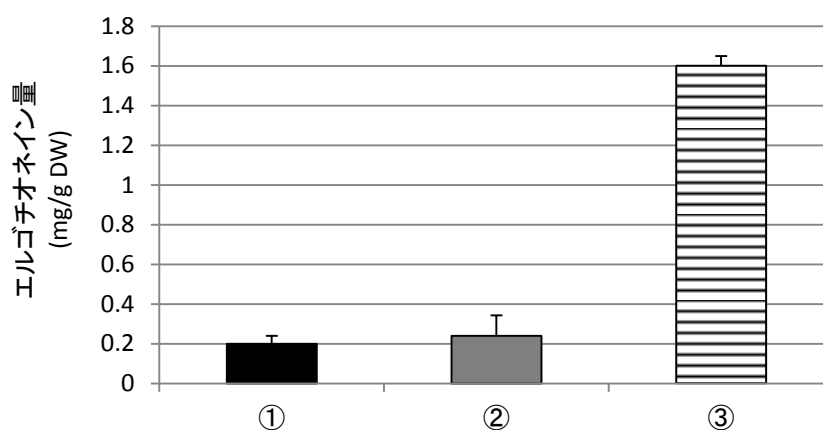


図 9 添加条件の違いによるエルゴチオネイン生産量の比較

- ① : 鰹出汁培地のみ
- ② : 鰹出汁培地にアミノ酸を添加.
- ③ : 鰹出汁培地にアミノ酸および酵母エキスを添加

アミノ酸はヒスチジン, システイン, メチオニンを各 10mM 添加した.

図中の値は平均±標準偏差を表す (n=3).

鰹出汁培地に酵母エキスおよびアミノ酸をそれぞれ添加し、42日間培養した際の菌糸体湿重量を図 10 に示した。鰹出汁培地のみの場合より、アミノ酸のみ、アミノ酸および酵母エキス添加することにより菌糸体重量はそれぞれ約 3 分の 1 まで減少した。さらに、以上のことから、鰹出汁中にアミノ酸を添加しただけでは、菌糸体の重量にさほど影響を与えないが、酵母エキスを添加することによりスエヒロタケ菌糸体の生育を抑制している可能性が示唆された。

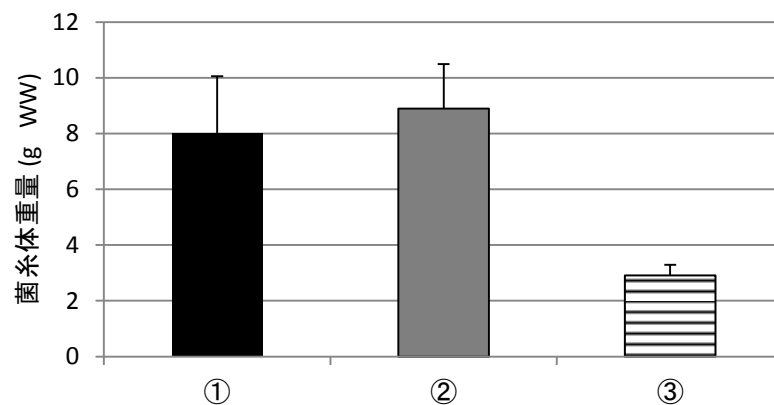


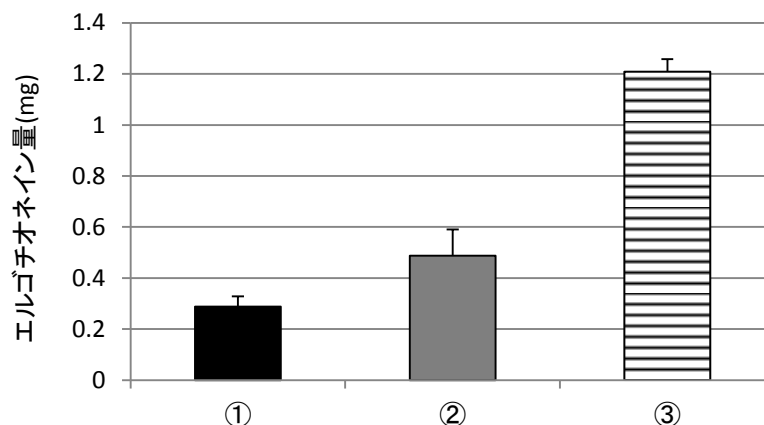
図 10 添加条件の違いによる菌糸体重量の比較

- ① : 鰹出汁培地のみ
- ② : 鰹出汁培地にアミノ酸を添加
- ③ : 鰹出汁培地にアミノ酸および酵母エキスを添加

アミノ酸はヒスチジン，システイン，メチオニンを各 10mM 添加した。

図中の値は平均±標準偏差を表す (n=3)。

鰹出汁培地で培養した菌糸体における乾燥菌糸体 1g あたりのエルゴチオネイン量および菌糸体湿重量から算出した培養器あたりのエルゴチオネイン量を図 11 に示した。最もエルゴチオネインが多く得られた条件は、鰹出汁培地にアミノ酸および酵母エキスを添加して培養したものであり、その量は  $0.29 \pm 0.09 \text{ mg}$  であった。この条件で培養した場合、3つの条件（鰹出汁培地のみ、鰹出汁培地にアミノ酸を添加、鰹出汁培地にアミノ酸および酵母エキスを添加）において比較すると、乾燥菌糸体 1g 当たりのエルゴチオネイン量は最も多かったが、得られた菌糸体重量は最も少なかった。これらのことから、鰹出汁培地へのアミノ酸および酵母エキスの添加により、エルゴチオネインの生合成が促され、代謝系が菌糸体の成長ではなく、エルゴチオネインの生産の方に傾いたことが推察された。



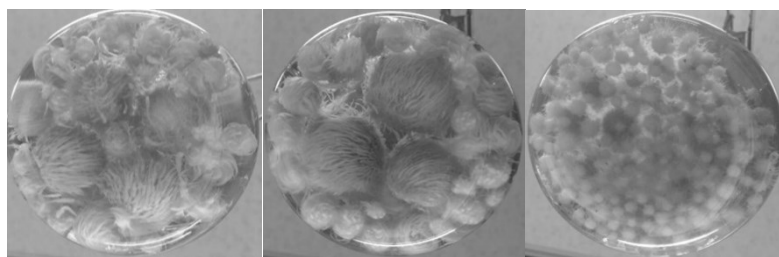
**図 11 添加条件の違いによる  
培養器あたりのエルゴチオネイン量の比較**

- ① : 鰹出汁培地のみ
- ② : 鰹出汁培地にアミノ酸を添加
- ③ : 鰹出汁培地にアミノ酸および酵母エキスを添加

アミノ酸はヒスチジン，システイン，メチオニンを各 10mM 添加した。

図中の値は平均±標準偏差を表す (n=3)。

培養後の菌糸体の様子を図 12 に示す。鰹出汁培地および鰹出汁にアミノ酸を添加して培養した場合の菌糸体においては、太く長い菌糸をのぼし大きな菌糸体を形成した(図 12①，②)。一方、鰹出汁培地にアミノ酸および酵母エキスを添加して培養した場合の菌糸体は細く短い菌糸をのぼし、ごく小さな菌糸体を形成していた(図 12③)。



①

②

③

図 12 添加条件の違いによる菌糸体の形状の違い

① : 鰹出汁培地のみ

② : 鰹出汁培地にアミノ酸を添加

③ : 鰹出汁培地にアミノ酸および酵母エキスを添加

表 1 において菌糸体の形状とエルゴチオネイン生産量および菌糸体重量について比較したものをまとめ、その特徴を記載した。すなわち、鯉出汁培地のみまたはアミノ酸を添加した場合には、菌糸体は大きく成長し太く長い菌糸を伸ばし大きな菌糸体を形成しておりエルゴチオネインはあまり生産しなかった。一方、鯉出汁培地にアミノ酸と酵母エキスを添加した場合は、多くのエルゴチオネインを生産した。この場合の菌糸体の形状は、細い菌糸を伸ばし、小さな菌糸体を形成していた。以上から、酵母エキスを添加することによって、代謝系が菌糸体の生育からエルゴチオネインの生合成へと傾いたことが示唆された。さらに、菌糸体の生育の場合とエルゴチオネイン生合成の場合では菌糸体の形状が異なったことから、菌糸体の形状とエルゴチオネインの生産性においては関係性があることが明らかになった。

表 1 菌糸体の形態とエルゴチオネイン生産量の関係

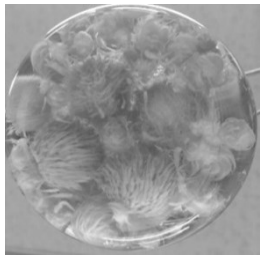
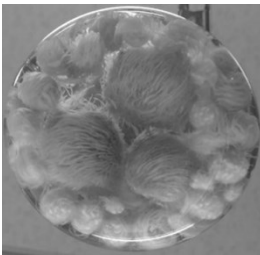
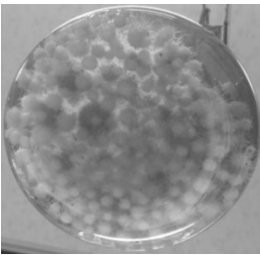
添加条件	添加無	アミノ酸添加	アミノ酸 酵母エキス添加
菌糸体形状			
特徴	太い菌糸 大きな菌糸体	太い菌糸 大きな菌糸体	細い菌糸 小さな菌糸体
菌糸体湿重量 (g)	8.02	8.89	2.91
エルゴチオネイン量 (mg/g DW)	0.20	0.24	1.60
代謝系	菌糸体生育	菌糸体生育	エルゴチオネイン 生合成

図 13 にマルト培地および鯉出汁培地にアミノ酸および酵母エキス添加した場合の培養器あたりのエルゴチオネイン量を示した。鯉出汁培地にアミノ酸および酵母エキスを加えていない場合よりも、マルト培地にアミノ酸のみまたはマルト培地にアミノ酸および酵母エキスを加えた場合において生産量が少なかった。これらのことから、鯉出汁培地では、スエヒロタケの菌糸体においてエルゴチオネインの生合成に必要とされているアミノ酸であるヒスチジン、システイン、メチオニン以外の成分からエルゴチオネインを生合成する可能性を示唆した。また、エルゴチオネイ

ンの生産においては、鰹出汁培地培地のみで培養するよりも、アミノ酸のみ、アミノ酸および酵母エキス添加することによりそれぞれ約 1.2 倍、約 8 倍まで増加したことから酵母エキスの添加がエルゴチオネインの生産性の向上に関与していることが明らかとなった。

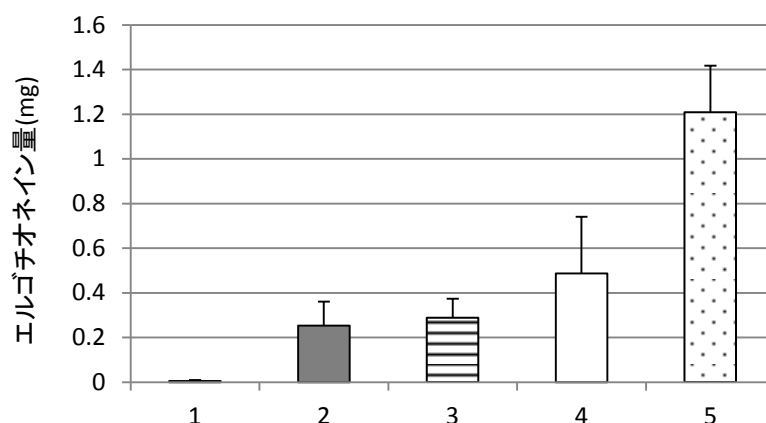


図 13 マルト培地および鰹出汁培地にアミノ酸および酵母エキス添加した場合の培養器あたりのエルゴチオネイン量

1: マルト培地にアミノ酸を添加

2: マルト培地にアミノ酸を添加および酵母エキスを添加

3: 鰹出汁培地のみ

4: 鰹出汁培地にアミノ酸を添加

5: 鰹出汁培地にアミノ酸および酵母エキスを添加

アミノ酸はヒスチジン，システイン，メチオニンを各 10mM 添加した。

図中の値は平均±標準偏差を表す (n=3)。

以上，第 1 章では，スエヒロタケの菌糸体を鰹出汁培地で培養



した場合にエルゴチオネインを生産することを明らかにした。また、エルゴチオネインのみならず他の抗酸化物質を生産することが示唆された。鰹出汁培地におけるエルゴチオネイン生産量は、アミノ酸を加えても増加しなかった。しかし、アミノ酸および酵母エキスを加えることでエルゴチオネイン生産量の増加が認められた。よって、本章で得られた鰹出汁培地においてエルゴチオネインを高生産するための条件は鰹出汁培地にグルコース 3% および酵母エキス 3% およびシステイン，ヒスチジン，メチオニン を各 10mM 添加したものであることが示唆された。

また、本章において、菌糸体の形状とエルゴチオネインの生産量に関係性があることを明らかにした。さらに、鰹出汁にはこれまでにエルゴチオネインの生合成の原料として報告されているアミノ酸以外にも、エルゴチオネインの生合成を促進する物質が含まれていることを明らかにした。

第 2 章では、スエヒロタケを用いた後発酵茶の製造方法および培養によるポリフェノール量の変化や、カテキン類の構成の変化について論じる。

## 第2章 スエヒロタケ後発酵茶のカテキン類の変化

### 背景および目的

茶は、古来より世界で広く嗜好飲料として飲用されている飲み物である。茶の種類は発酵の方法により大別される。茶葉中に含まれる酸化酵素を利用して作られるウーロン茶や紅茶などの茶は、半発酵茶、発酵茶などと呼ばれている。一方で、後発酵茶はカビや乳酸菌などの微生物により発酵させて作る茶である。日本において後発酵茶として知られているのは、阿波番茶、碁石茶などが挙げられる。海外では、プーアル茶のほか、竹筒酸茶やラペ・ソーなどが存在する。茶葉を微生物により発酵させることで、新たに色や香りの他、酸味や遊離アミノ酸が増加し独特の風味や旨味を作り出す利点があるが、一方で、発酵期間中にカテキン類が分解されるため含有量が低くなるという問題点がある<sup>32)</sup>。

一方、これまでにスエヒロタケなど担子菌を用いて後発酵茶を調製した例は報告されていない。そこで、スエヒロタケの発酵能を利用して新たな後発酵茶を調製すると共に、抗酸化活性および総カテキン量および総ポリフェノール量の増加、カテキン類の変化について明らかにすることを目的とした。

## 第 1 節 スエヒロタケ後発酵茶の調製および抗酸化活性

### 材料および方法

#### 1. 後発酵茶の調製

##### 材料

茶葉はつぼ市製茶本舗(株)(大阪府高石市)の青柳(番茶)を用いた。

##### 供試菌株

担子菌は、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC) から分譲されたスエヒロタケ (NBRC 4928) を用いた。

##### スエヒロタケの培養

スエヒロタケの培養は、ポテトデキストロース寒天培地(ニッスイ)を使用して 25℃ で 2 週間静置培養したものを用いた。

#### 2. 発酵茶葉およびスエヒロタケ後発酵茶の調製

発酵茶葉の調製は以下の方法で行った。茶葉 10g に蒸留水を 50mL 加え 30 分浸漬後、オートクレーブ(120℃, 20min)で滅菌処理し、滅菌角型シャーレに移した。菌糸体を寒天培地ごと 5mm 角に切り、茶葉に菌糸体の切片 10 片を無菌的に接種した。茶葉の発酵は 25℃ で 6 週間の静置培養で行った。茶葉を乾燥機で乾燥後(60℃, 24h), その 0.1g 中に 90℃ の熱湯を 4mL 加え 5 分間

抽出後，ろ過しスエヒロタケ後発酵茶とした．

なお，茶葉をオートクレーブ後，スエヒロタケの菌糸体を植菌せず，上記と同様の条件で静置および乾燥した茶葉の熱水抽出液を未発酵茶とした．

### 3. 抗酸化活性の測定

スエヒロタケ後発酵茶の抗酸化活性の測定は，田畑らの方法に従い化学発光法で行った<sup>16)</sup>．スエヒロタケ後発酵茶 10  $\mu\text{L}$  に 300  $\mu\text{M}$  2-メチル-6-パラ-メトキシフェニルエチニルイミダゾピラノジンと 0.1 U キサンチンオキシダーゼ / 0.1 M リン酸二水素カリウムバッファー (pH 7.5, 0.05 mM EDTA 含有) および 0.1 M リン酸二水素カリウムバッファー (pH 7.5, 0.05 mM EDTA 含有) を 1 : 6 : 17 (V/V) の割合で混合した液 120  $\mu\text{L}$  と 0.72 mM ヒポキサンチン 50  $\mu\text{L}$  を添加し，30 秒間の発光積算値を測定した．測定ブランクはスエヒロタケ後発酵茶の代わりに，0.1M リン酸二水素カリウムバッファー (pH 7.5, 0.05 mM EDTA 含有) 10  $\mu\text{L}$  を加え，同様に測定を行った．測定にはマイクロプレートリーダー (TECAN, infinit M200) を用いた．次式により酸化阻害率を算出し，抗酸化活性の指標とした．

$$\text{酸化阻害率 (\%)} = (1 - \text{スエヒロタケ後発酵茶発光量} / \text{測定ブランク発光量}) \times 100$$

## 結果および考察

本章では、スエヒロタケ菌糸体を用いて好気発酵により、新たな後発酵茶を調製した。従来の後発酵茶の製法としては、カビ等による好気発酵、乳酸菌による嫌気発酵、好気発酵と嫌気発酵を併用しているものの3通りがある。なお、それぞれの代表としてプーアル茶、阿波番茶、碁石茶があるが、これらの後発酵茶は発酵過程においてカテキン量が減少することが報告されている<sup>32)</sup>。カテキンは茶に含まれる主要な抗酸化成分であり発酵期間中の減少は大きな問題となる。

そこで、本章では、まず、第1節においてスエヒロタケ後発酵茶を調製し、抗酸化活性の経時変化を測定した。

スエヒロタケ後発酵茶の抗酸化活性の経時変化を図1に示す。スエヒロタケ後発酵茶は、発酵開始直後の約30%から抗酸化活性が約73%にまで増加し、その後も若干の増減があるものの高い抗酸化活性が維持されていた。

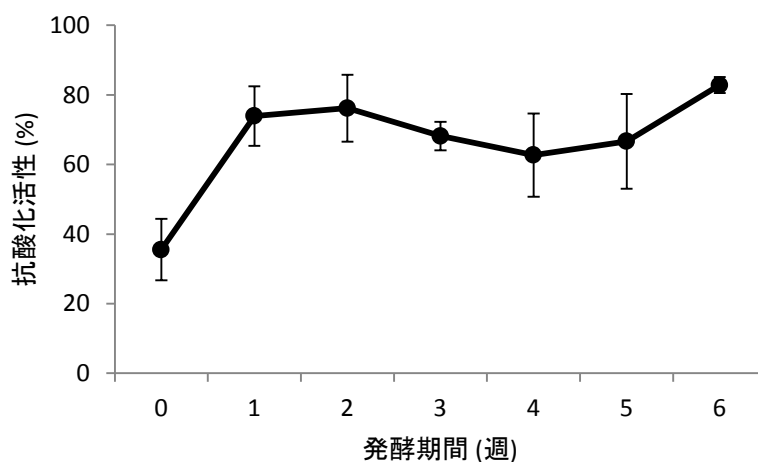


図1 スエヒロタケ後発酵茶における抗酸化活性の経時変化  
表中の値は平均±標準偏差を表す。(n=4)

調製したスエヒロタケ後発酵茶は発酵によって抗酸化活性が付加され、高い抗酸化活性が維持されていたことから、スエヒロタケ後発酵茶中の総ポリフェノール量および総カテキン量について発酵期間中に増加していることが推察されたため次節では、総ポリフェノール量および総カテキン量の継時変化について測定した。

## 第 2 節 スエヒロタケ後発酵茶の中の

### 総ポリフェノール量および総カテキン量

#### 材料および方法

試料は，第 1 節で調製したスエヒロタケ後発酵茶および未発酵茶を用いた．

#### 総ポリフェノールおよび総カテキン量の定量

総ポリフェノールおよび総カテキン量の定量には，フォーリン・チオカルト法により行った<sup>40)</sup>．試料溶液 1mL に，50% フェノール試薬 1mL を加え攪拌混和した．室温で 3 分放置後，10% (w/v) 炭酸ナトリウム溶液 1mL を加え攪拌混和後，さらに室温で 60 分間放置し，試料の反応溶液の 750nm における吸光度を測定した．測定には分光光度計(島津，UV-1800)を用いた．なお，総ポリフェノールの定量には標準液として没食子酸を使用し，試料中のポリフェノール量を没食子酸相当量として算出した．また，総カテキン量は，カテキンを標準液として使用し，総カテキン量とした．

## 結果および考察

第 1 節で調製したスエヒロタケ後発酵茶は抗酸化活性が付加され，発酵期間中も高い抗酸化活性を維持していた．抗酸化活性の増加には，茶中の総ポリフェノール量および総カテキン量が影響していることが推察されたため，第 2 節では，総ポリフェノール量および総カテキン量の経時変化について測定した．発酵期間中の総ポリフェノール量および総カテキン量の経時変化を図 2 および図 3 に示した．

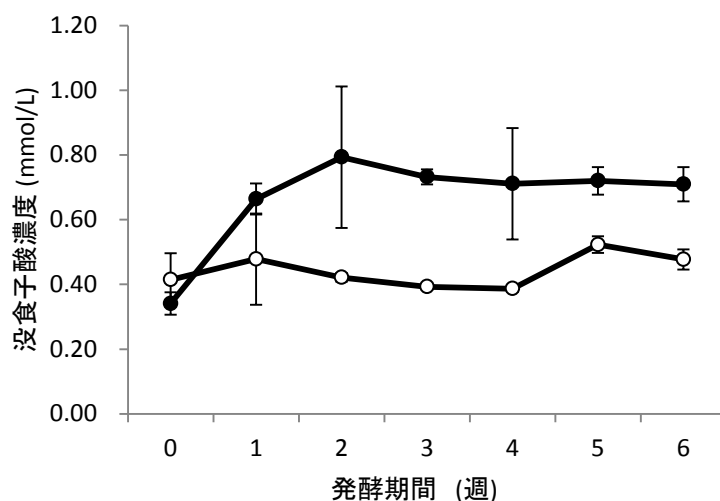


図 2 総ポリフェノール量の経時変化

コントロール (○)，スエヒロタケ後発酵茶 (●) を示す．

表中の値は平均±標準偏差を表す (n=4)．

総ポリフェノール量を没食子酸濃度として算出した．



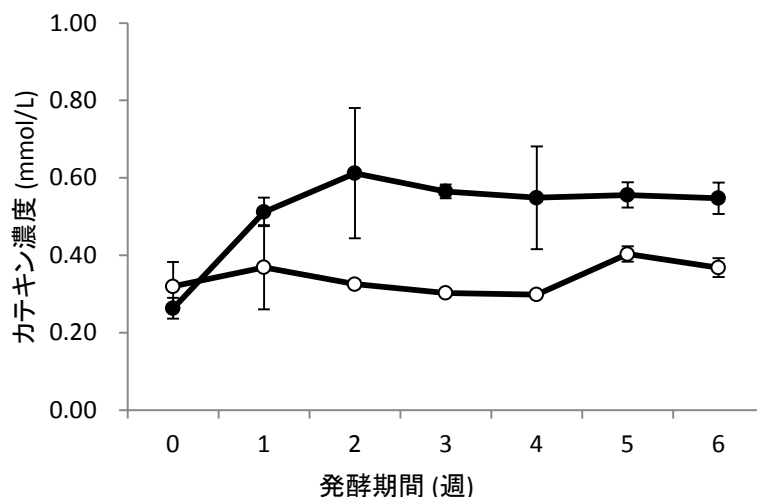


図 3 総カテキン量の経時変化

コントロール (○), スエヒロタケ後発酵茶 (●) を示す.

表中の値は平均±標準偏差を表す. (n=6)

スエヒロタケ後発酵茶の総ポリフェノール量および総カテキン量は共に増加傾向を示し、発酵開始から 2 週間目の時点で、総ポリフェノール量は 0.79mmol/L、総カテキン量は 0.61 mmol/L となり、それぞれ未発酵の茶葉と比較しておよそ 2 倍の濃度となり、発酵終了時点まで若干の増減はあるもののほぼ横ばいであった。

また、それぞれの茶葉の熱水抽出液 100mL あたりの総ポリフェノール量は、コントロールでは 7.1mg であり、スエヒロタケ後発酵茶は 13.4mg であった。

これまでに、碁石茶の総ポリフェノール量は発酵前で 0.8mg、発酵後で、6.56mg<sup>41)</sup>となり、増加していることが報告されてい

る．一方，カテキン類については，エピカテキン，エピガロカテキン，エピガロカテキンガレート，エピカテキンガレートにおいて発酵前後で全てのカテキン類が減少していることが報告されている．この要因として，発酵期間中に茶葉や空気中に存在するコウジカビの分泌するタンナーゼ等の酵素により，カテキン類が代謝され没食子酸が増加し，没食子酸が遊離したエピカテキンやエピガロカテキンは，水酸化を受けるあるいはコウジカビや乳酸菌などの微生物に利用されることが挙げられている．

スエヒロタケ後発酵茶においても，スエヒロタケの有する酵素によりエピガロカテキンガレート，エピカテキンガレートから没食子酸が遊離しただけでなく，発酵期間中に木材腐朽菌であるスエヒロタケの分泌するフェルラ酸エステラーゼが，発酵期間中に茶葉の構成成分であるリグニンに作用し，没食子酸などのポリフェノール類やカテキン類を遊離したためではないかと推察される．冒頭にも述べたように従来の後発酵茶では，発酵期間中のカテキン類の減少が問題となっているが，本章において調製した後発酵茶はむしろカテキン類が増加した．次節では，スエヒロタケ後発酵茶のカテキン類の組成についてさらに詳細に論述する．

### 第 3 節 スエヒロタケ後発酵茶中のカテキン類の変化

#### 材料および方法

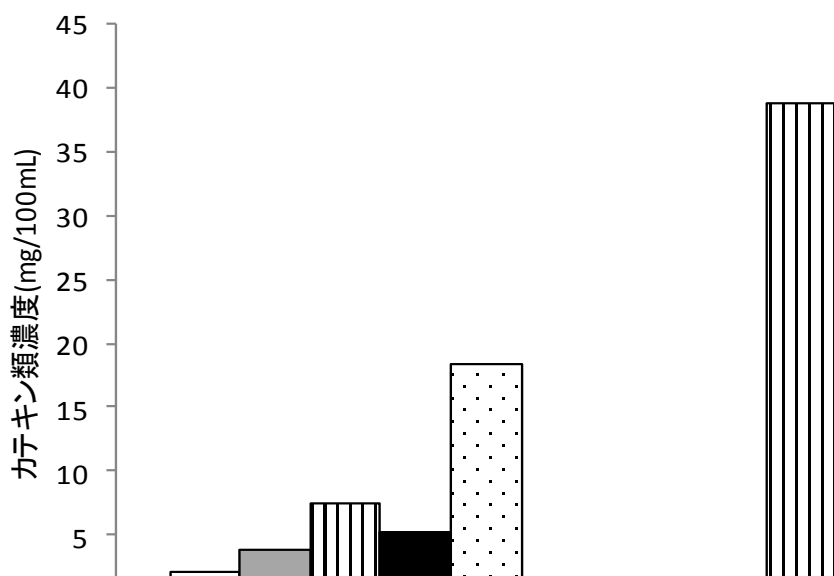
試料は、第 1 節で調製したスエヒロタケ後発酵茶および未発酵茶を用いた。

#### HPLC によるカテキン類の組成分析

カテキン組成の分析は久延ら<sup>42)</sup>の方法を改変して HPLC(ポンプ：1050, KNAUER, カラム：5C18-AR (4.6mm×150mm), 東ソー, 検出器：UV-8010, 東ソー)を用いて行った。試料溶液を孔径 0.45 $\mu$ m のメンブレンフィルターでろ過したものをサンプル液とし 10 $\mu$ L をインジェクションした。溶出液 A は、0.1%アセトニトリルおよび 5% *N, N*-ジメチルホルムアミドを含む 0.1%リン酸溶液, 溶出液 B はアセトニトリル, 流速を 1.0ml/min に設定した。B 液のグラジエント条件はサンプル注入時 1%, 35 分時点で 18%, 35.1 分から 55 分の間は 90%を維持, 55.1 分以後は 1%を維持した。検出波長は 280nm に設定し, カラム温度は 43 $^{\circ}$ C とした。

## 結果および考察

従来の後発酵茶において発酵後のカテキン組成は異なることが報告されている<sup>41)</sup>。茶の種類によって多少の違いはあるものの発酵後はエピガロカテキンガレート(epigallocatechin gallate, -EGCg)およびエピカテキンガレート(epicatechin gallate, -ECg), エピカテキン(epicatechin, -EC), エピガロカテキン(epigallocatechin, -EGC)などのカテキン類は減少傾向を示し没食子酸は増加することが明らかとなっている。渡辺らの白味噌用コウジカビで茶葉を発酵させた報告<sup>43)</sup>において, -EGCg および -ECg は減少し, -EC, -EGC は増加の傾向を示している。本章で調製したスエヒロタケの後発酵茶においてもカテキン類の組成が変化していることが予想されたため, 発酵開始 6 週間後のスエヒロタケ後発酵茶 100mL あたりのカテキン類の組成について HPLC により測定した(図 4)。スエヒロタケ発酵茶はコントロールに比べ, カテキン(catechin, -C), -EC, -EGCg, -ECg の割合が減少したが, -EGC の割合が 7.5mg から 38.8mg となり大幅に増加した。測定したカテキン類の総量もスエヒロタケ後発酵茶の方が多く 52.0mg であったのに対し, コントロールは 37.0mg であった。従来の後発酵茶のカテキン類の組成において, スエヒロタケ後発酵茶のように -C, -EC, -EGCg, -ECg が減少し -EGC が増加したものはこれまでの報告では認められておらず, スエヒロタケの発酵能により茶葉中に含まれるカテキンの前駆体からの変化が起きたことが示唆された。



**図 4 茶葉中のカテキンの組成**

発酵開始 6 週目のコントロールおよびスエヒロタケ後発酵茶の 100mL 中のカテキン類組成を示す。-C (□), -EC (■), -EGC (▨), -EGCg (■), -ECg (◻) を表す。(n=1)

従来の後発酵茶のカテキン類の組成の変化にはコウジカビおよび乳酸菌が分泌するタンナーゼが関与しており、-EGCg や -ECg などのガレート体カテキンを加水分解し、-EGC や -EC を生成することが報告されている<sup>43)</sup>。

これまでに、スエヒロタケが分泌する酵素にはアセチルキシランエステラーゼ、フェルラ酸エステラーゼ、ラッカーゼ等が知られておりラッカーゼ活性は低いことも報告されている<sup>44)</sup>。スエヒロタケ後発酵茶において -ECg や -EGCg 等のガレート体カテキンが減少していたことからポリフェノール類の分解等にはフェルラ酸エステラーゼが関与しておりコウジカビが有するタンナ

ーゼと類似の働きがあったのではないかと推察される。発酵前後のスエヒロタケ後発酵茶におけるカテキン類組成の変化から-EGC生成の要因として2種類のカテキン代謝の経路が予測される。一つは、茶葉に含まれる-ECgが加水分解を受け-ECとなり、-ECに水酸基が付与されて-EGCが生成する経路である。もう一つは-EGCgが加水分解を受け-EGCが生成した経路である。また、上記の経路を経ることで-ECや-EGCの他に没食子酸を生成することが示唆される。没食子酸は、後発酵茶に分類される富山黒茶の抗酸化成分であることが示されており<sup>45)</sup>、さらに、カテキン類の中でも *in vitro* での-EGCの抗酸化力は、-EGCgについて強いことが報告されている<sup>46)</sup>。以上のことから、スエヒロタケ後発酵茶において-EGCが増加し、高い抗酸化活性を維持する可能性があることが示唆された。

以上、本章では、スエヒロタケ後発酵茶中の総ポリフェノール量および総カテキン量が増加しており、カテキン類のうち特に-EGCが増加していることを明らかにした。さらに、スエヒロタケ後発酵茶の抗酸化活性が増加した要因は、総ポリフェノール量の増加および総カテキン量の増加によるものであることを推察した。

### 第 3 章 スエヒロタケによる発酵黒大豆の調製および イソフラボン類の代謝産物

#### 背景および目的

近年，日本人の死因の第 1 位は悪性新生物，第 2 位は心疾患，第 3 位は肺炎，第 4 位は脳血管疾患であり，悪性新生物や血管疾患による死亡が社会的な問題となっている<sup>23)</sup>．一方で，食品中には，血栓症予防に効果のあるフィブリン溶解活性，抗トロンビン活性および抗酸化活性を示す物質が存在することが報告されている<sup>47)-49)</sup>．

大豆はイソフラボン，サポニン，レシチンなどの有効成分を含有し，抗酸化作用による動脈硬化や脂質過酸化生成などの予防効果が知られている．また，黒大豆には大豆に含まれる有効成分に加えて種皮の部分にアントシアニンを含むため大豆よりも高い抗酸化効果が期待できる<sup>50),51)</sup>．

一方，担子菌であるスエヒロタケも古来より漢方薬として使用されており，プロテアーゼを産生し，血栓症<sup>52)</sup>およびガン<sup>53)</sup>に対する予防効果を示すことが報告されている．さらに， $\beta$ -D-グルカンなどの多糖類やプロビタミン D の前駆体などが豊富である<sup>54)</sup>．

これまでに，福田らは<sup>33)</sup>大豆を担子菌で発酵させた際，線溶活性や抗トロンビン活性が付与されていることを報告している．さらに，担子菌発酵大豆において発酵前後でグリコシド型のイソフラボンが減り，アグリコン型のイソフラボンが増加したことも

明らかにしている。また、松井らは担子菌発酵黒大豆において抗酸化活性が付加されていることを報告<sup>55)</sup>しているが、発酵期間中の大豆イソフラボンの挙動については明らかにしていない。また、近年、大豆に含まれるアグリコン型のイソフラボンのダイゼインが体内で代謝される際、より生理活性の強いイソフラバンであるエクオールが生産されていることが知られている。

現在、エクオールは乳酸菌を用い嫌氣的条件下で生産されているが、担子菌は種々の酵素を含有しているため、還元反応により生産効率の高い好氣的条件下でもエクオールまたはその前駆体であるジヒドロダイゼインを生産する可能性がある。

そこで、本章ではスエヒロタケ発酵黒大豆の調製およびその抗酸化活性、発酵期間中の大豆イソフラボンの挙動について論述する。



## 第 1 節 スエヒロタケ発酵黒大豆の調製および 抗酸化活性

### 材料および方法

#### 1. スエヒロタケ発酵黒大豆の調製

##### 材料

黒大豆は丹波黒(兵庫，丹波市)を用いた。

##### 使用菌株および培養方法

黒大豆の発酵には，スエヒロタケ(NBRC 4928)を用いた。スエヒロタケは NBRC より購入した。2% マルト平板培地 (pH5.6) に無菌接種して 2 週間静置培養した。

#### 1. 発酵黒大豆の調製

黒大豆 20g を水道水で十分に洗浄し，一晩水に浸漬(25℃)した。余分な水を捨て，平底試験管に入れオートクレーブ滅菌(121℃，30min)後，あらかじめ培養したスエヒロタケの菌糸体 (5mm×5mm) の切片を 5 片接種し，25℃で 28 日間静置培養し発酵黒大豆とした。なお，スエヒロタケの菌糸を接種せず，同様の条件で静置した黒大豆を対照 (黒大豆) とした。

## 2. 抗酸化活性の測定

黒大豆または発酵黒大豆の菌糸を除いたもの 0.3g に蒸留水 1.2mL を加えて混合し，水中で超音波破碎し，遠心分離（15000rpm，4℃，10 分）後の上清液を試料とし抗酸化活性の測定に用いた．測定方法は第 2 章第 1 節と同様に行った．

## 結果および考察

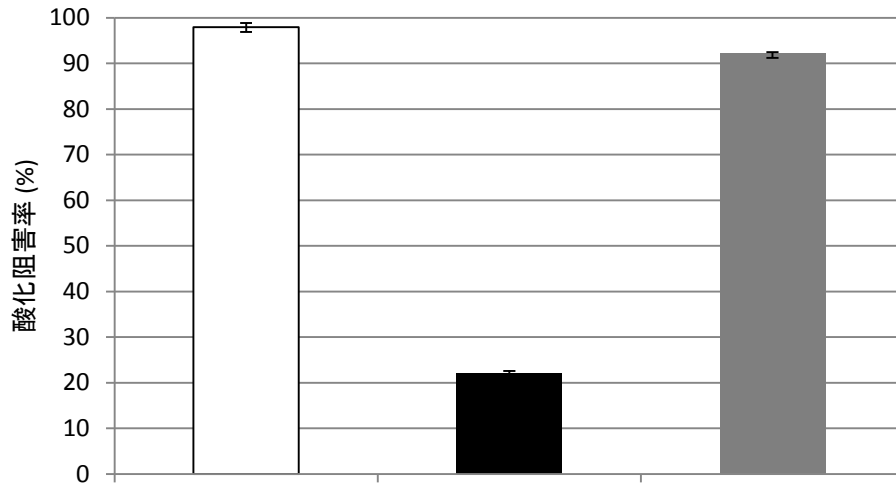
スエヒロタケ発酵黒大豆を図 1 に示す。発酵した黒大豆はスエヒロタケの菌糸で黒大豆の表面が覆われていた。顕微鏡でスエヒロタケ発酵黒大豆の内部状態を観察したところ、黒大豆の表面から内部に担子菌の菌糸が伸びていた。これらのことから、黒大豆の表面および内部から発酵が進んでいたことが考えられた。



図 1 スエヒロタケで発酵した黒大豆

黒大豆およびスエヒロタケ発酵黒大豆の抗酸化活性の測定結果を図 2 に示す。オートクレーブ滅菌直後の黒大豆の抗酸化活性は、97.9%と高値を示したが、4 週間放置することにより、22.1%にまで減少した。しかしながら、スエヒロタケ発酵黒大豆の抗酸化活性は発酵 4 週間後も 92.2%を維持していた。黒大豆の抗酸化成分として、大豆イソフラボンの主成分であるダイジンやゲニシチンなどのイソフラボン化合物やトコフェロールおよび種皮に含まれるアントシアニン等などがある。特にアントシアニンは、空気中に放置することによって、光などで分解され減少することが報告されている<sup>51)</sup>。しかしながら、スエヒロタケ発酵黒大豆においては、発酵後も抗酸化性が維持されていたことから、アグ

リコン型のイソフラボンが増加したことが推察される。これまでに、大豆発酵食品である納豆、味噌、テンペについての抗酸化活性は味噌>テンペ>納豆の順で脂質過酸化を抑制する作用が強いことが報告されている<sup>56)</sup>。これらの発酵食品の抗酸化力の違いは、アグリコン型イソフラボンの生成量に関係しており上記の3種の中では味噌が一番アグリコン型イソフラボンを生成している。味噌の抗酸化力の高さについて未発酵の大豆に含まれているグリコシド型のイソフラボンであるダイジンやゲニスチンがコウジカビなどが有する $\beta$ -グルコシターゼにより、アグリコン型イソフラボンであるダイゼインやゲニステインへ変換され、強い酸化防止作用を示すことが示唆している<sup>57)</sup>。本研究で用いたスエヒロタケにおいても、 $\beta$ -グルコシターゼ活性を有することが報告<sup>58)</sup>されており、黒大豆の発酵に用いることで、新たにアグリコン型のイソフラボンが生成し抗酸化活性に寄与している可能性が考えられた。



**図 2 スエヒロタケ発酵黒大豆の抗酸化活性**

□は培養開始時点，■は4週間経過時点での黒大豆，  
 ■は4週間経過時点での発酵黒大豆の酸化阻害率を表す。

図中の値は平均±標準偏差を示す。(n=3)

これまでに、福田らによって発酵大豆のイソフラボンの挙動については報告されているが、スエヒロタケ発酵黒大豆のイソフラボンの挙動については明らかにされていない。また、発酵黒大豆において、抗酸化活性の減少がみられなかった要因として、イソフラボンの変化が推察された。そこで、次節ではスエヒロタケ発酵黒大豆中のイソフラボンの挙動について検証した。

## 第 2 節 スエヒロタケ発酵黒大豆中のイソフラボンの変化

### 材料および方法

試料は第 1 節で調製したスエヒロタケ発酵黒大豆および未発酵の黒大豆を用いた。なお，発酵黒大豆のイソフラボン量を測定する際は菌糸を取り除いた。

黒大豆および発酵黒大豆 0.2g と同量の低アルカリガラスビーズ (0.3mm)，さらに 70%メタノールを 1.2mL 加えて混合し，マルチビーズショッカーで破碎 (2,500rpm, 4°C, 280sec(1 回の運転時間: 10sec, 休止時間: 30sec)) した。遠心分離 (15000rpm, 4°C, 10 分) 後，得られた上清液をメスフラスコに移した。沈殿物に，70%メタノールを 1.2mL 加え抽出する作業を 3 回繰り返した。抽出後，70%メタノールを加え 10mL に定容し試料液とした。

#### 1. グリコシド型イソフラボンおよびアグリコン型イソフラボンの定量

イソフラボン類 6 種(ダイジン，グリシチン，ゲニシチン，ダイゼイン，グリシテイン，ゲニステイン)の分析は HPLC を用いて行った。カラムは Unison UK-C18 [(4.6 mm × 250 mm)，インタクト]，検出器は UV-8010 (東ソー) を使用した。試料溶液を 0.45 $\mu$ m のフィルターでろ過したものをサンプル液とし 20 $\mu$ L をインジェクトした。溶出液 A は，15%アセトニトリル溶液，

溶出液 B は 35%アセトニトリル溶液，流速を 1.0 mL / min に設定した． B 液のグラジエント条件はサンプル注入時 0%，注入と同時にグラジエント開始，50 分時点で 100%，50 分から 55 分の間は 100%，57 分以後は 0% に設定した．検出波長は 254 nm に設定し，カラム温度は 37℃とした．標準ダイゼインの検量線を作成して求めた濃度に，それぞれの定量係数を乗じてイソフラボン濃度を算出した．

## 結果および考察

前節で述べたように未発酵の黒大豆は、発酵開始から 4 週間経過すると抗酸化活性は大幅に低下したが、スエヒロタケの発酵黒大豆は酸化阻害率 90% 以上の高い活性を維持していた。抗酸化活性を維持していた要因として、発酵期間中に黒大豆中のイソフラボンがスエヒロタケによって代謝されたことが推察された。そこで、黒大豆をスエヒロタケで発酵することによってアグリコン型のイソフラボンが生成したかについて検証するために、発酵前後の黒大豆中に含まれるグリコシド型イソフラボンおよびアグリコン型のイソフラボン量を定量した。

図 3 に黒大豆および発酵黒大豆に存在しているグリコシド型イソフラボン量およびアグリコン型イソフラボン量を示す。黒大豆においてはグリコシド型イソフラボンが  $200.1\mu\text{mol}/100\text{g}$ 、アグリコン型イソフラボンが  $7.51\mu\text{mol}/100\text{g}$  含まれていた。グリコシド型イソフラボンの多くは、ゲニスチンとダイジンであり、グリシチンはわずかであった。また、黒大豆に含まれるアグリコン型イソフラボンの多くはダイゼインであり、ゲニステインは極微量にしか含まれていなかった。一方、スエヒロタケ発酵黒大豆においては、アグリコン型イソフラボンが  $254.5\mu\text{mol}/100\text{g}$  含まれており、全てがダイゼインであった。福田ら<sup>33)</sup>がスエヒロタケを用いて発酵大豆を調製した場合においてもグリシチンとゲニスチンが消失しており、ダイゼインのみが増加していた。



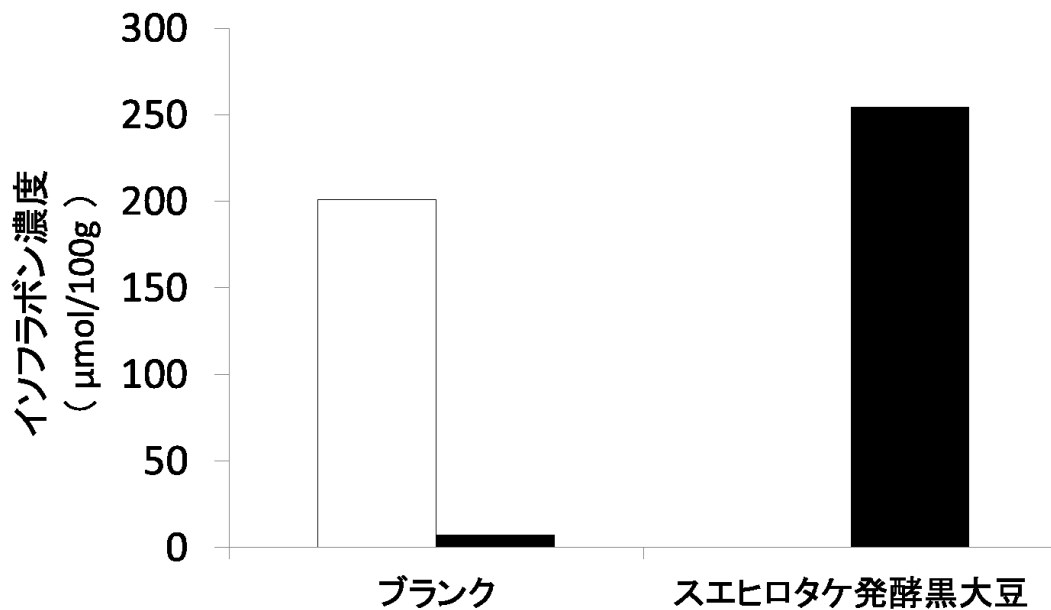


図 3 黒大豆および発酵黒大豆中のイソフラボン量

□はグリコシド型イソフラボン(ダイジン・グリシチン・ゲニシチンの合計値), ■はアグリコン型イソフラボン(ダイゼイン・グリシスチン・ゲニスチンの合計値)を表す.

これらのことから, スエヒロタケを用いて黒大豆から発酵黒大豆を調製した場合においても, 大豆を発酵して発酵大豆を調製した場合と同様の変化がグリコシド型のイソフラボンに生じ, スエヒロタケの持つ $\beta$ -グルコシターゼが作用し糖の部分が外れ, 黒大豆に含まれているダイジンがダイゼインに変換したことが推察される. ゲニシチンについては, ダイジンと同様に $\beta$ -グルコシターゼにより分解されてゲニシチンに変化しただけでなく, さらにゲニシチンの構造が変化したため, 検出が不可能であったと考えられた. 黒大豆に含まれるグリコシド型イソフラボンおよびアグリコン型イソフラボンの総量は, 発酵前は,  $208.6\mu\text{mol}/100\text{g}$ ,

発酵後は  $254.5\mu\text{mol}/100\text{g}$  であり、発酵前後では  $45.9\mu\text{mol}$  増加した。これらの要因として、発酵期間中に大豆に含まれるイソフラボンの前駆体がスエヒロタケが有する酵素によって変換され、イソフラボンのダイゼインとなったことが推察された。

コウジカビを用いて豆味噌を調製した時のイソフラボンの変化は大豆中のダイジンおよびゲニシチンが減少し、ダイゼインおよびゲニシステインが生成することが報告されている<sup>58)</sup>。本研究で得られたスエヒロタケの発酵黒大豆でのイソフラボンの代謝とは異なる傾向を示すことが明らかとなった。

スエヒロタケ発酵黒大豆中のイソフラボンは、ダイジンが減りダイゼインが大幅に増加した。近年、腸内細菌等によりダイゼインはさらに代謝されよりエストロゲン作用や抗酸化能の高いエクオールへと変換され、その変換にはレダクターゼが関与していることが報告されている<sup>59)</sup>。スエヒロタケをはじめとする担子菌は様々な酵素を有しているため、ダイゼインをさらに代謝しエクオールやエクオールに至るまでのジヒドロダイゼイン等を生成することが可能であると考えられた。そこで、発酵前後の黒大豆において、ダイジンからエクオールに至るまでの物質を測定した。

### 第 3 節 スエヒロタケ発酵黒大豆懸濁液中の イソフラボン類の変化

#### 材料および方法

粉碎した黒大豆はヘルスビューティー株式会社より提供されたものを用いた。

#### 1. 発酵黒大豆懸濁液の調製

300 mL 容三角フラスコに粉碎した黒大豆 20g と水道水 180 mL を入れ，オートクレーブ処理により滅菌後，スエヒロタケ NBRC4928 株の切片 5 mm 角を 10 片植菌し，25℃で 4 週間回転振とう培養したものをスエヒロタケ発酵黒大豆懸濁液(以下，発酵黒大豆懸濁液と記す)とした。遠心分離を行いその沈殿物をエタノール抽出し，試料溶液とした。

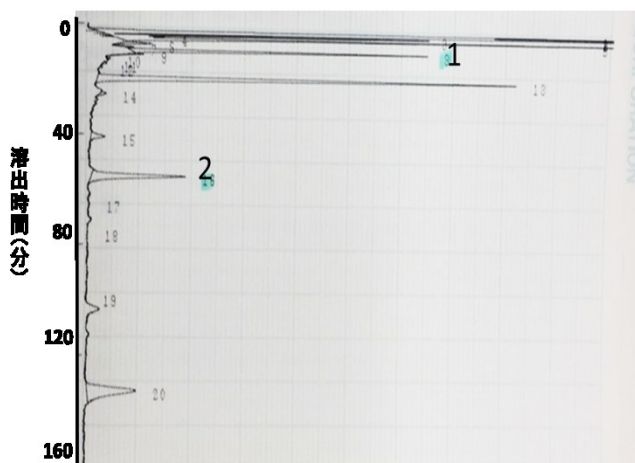
#### 2. エクオール関連物質の測定

高橋らの方法<sup>60)</sup>に従い，HPLC を用いて，ダイジン，ダイゼイン，ジヒドロダイゼイン，エクオールの測定を行った。カラム，検出器は第 3 章第 2 節と同様のものを使用した。試料溶液を 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過したものをサンプル液とし 20 μL をインジェクトした。溶出液は 0.5%リン酸溶液/アセトニトリル (83 : 17, v/v) を用い，流速は 1.0 mL / min に設定した。検出波長は 224 nm に設定し，カラム温度は 40℃とした。

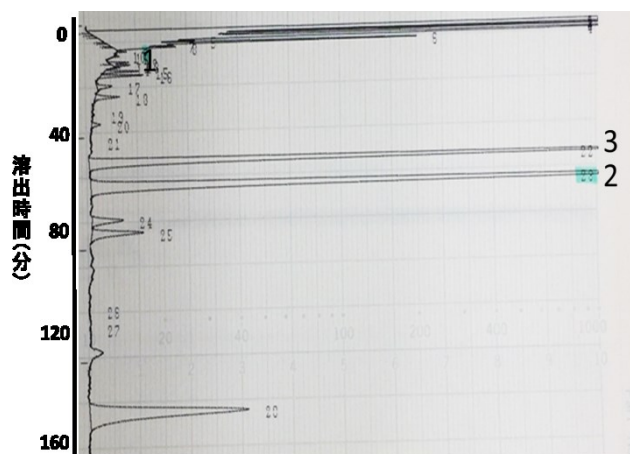
## 結果および考察

前節では，4週間発酵後のスエヒロタケ発酵黒大豆において，ダイジンからダイゼインへ代謝が観察された．そこで，本節ではよりイソフラボンの代謝を促進しやすくするために黒大豆の発酵方法を変更した．具体的には黒大豆を固形のまま用いるのではなく，皮ごと粉碎した．さらに静置培養ではなく，粉碎した黒大豆に水を加え，オートクレーブ滅菌後にスエヒロタケの菌糸を接種し回転振とう培養したスエヒロタケ発酵黒大豆懸濁液を調製した．

黒大豆懸濁液の沈殿物の部分をエタノールにより抽出し，HPLCで分析を行った．培養開始から4週間後の黒大豆懸濁液およびスエヒロタケ発酵黒大豆懸濁液のクロマトグラフを図5に示す．黒大豆懸濁液においてダイジンおよびダイゼインが検出された．一方，発酵黒大豆懸濁液においてはダイジンおよびダイゼインに加えてさらにジヒドロダイゼインに溶出時間が近いCompound Aが検出された．黒大豆懸濁液には，ダイジンが57.8  $\mu\text{mol}$ ，ダイゼインが0.16  $\mu\text{mol}$  含まれており，発酵黒大豆懸濁液にはダイジンが16  $\mu\text{mol}$ ，ダイゼインが73.3  $\mu\text{mol}$ ，Compound Aがジヒドロダイゼイン相当量として85.2  $\mu\text{mol}$  含まれていた．発酵前後で比較するとイソフラボンの総量は，発酵前が57.96  $\mu\text{mol}$ ，発酵後が174.5  $\mu\text{mol}$ であった．発酵黒大豆懸濁液においても，発酵期間中に黒大豆中に含まれる前駆体がイソフラボンに変化したことにより，総量が増加した可能性が示唆された．



A : 黒大豆



B : 発酵黒大豆

図 5 黒大豆懸濁液および発酵黒大豆懸濁液のクロマトグラフ

1 : ダイジン, 2 : ダイゼイン, 3 : Compound A

スエヒロタケ発酵黒大豆懸濁液にはスエヒロタケ発酵黒大豆には検出されなかったジヒドロダイゼインと溶出時間が同じ Compound A が検出され、ジヒドロダイゼインと構造が近い物質であることが推察された。黒大豆を粉碎後、懸濁状態とし回転振とう培養を行うことで、ダイゼインが構造を変え Compound A が生成したことが推察された。そこで、スエヒロタケの有する酵素により、ダイゼインがさらに代謝されることを検証するために、次節ではダイゼインを基質としてスエヒロタケの粗酵素液を反応させイソフラボンの変換を試みた。

## 第 4 節 スエヒロタケ粗酵素液によるダイゼインの変化

### 材料および方法

#### 1. ダイゼインを基質とした酵素反応

発酵黒大豆懸濁液には回転振とう培養により小さな球状の菌糸体が存在していることから，平板培地に生育しているスエヒロタケの菌糸を 2 週間回転振とう培養し用いた．水気を絞った球状の菌糸体を 0.7g 測り，蒸留水を 350 $\mu$ l 入れ，マルチビーズショッカーおよび超音波破碎機で破碎し，遠心分離後の上清液をスエヒロタケ粗酵素液として用いた．5ml 容マイクロチューブに，蒸留水 20 $\mu$ L，40mM ダイゼイン 20 $\mu$ L，20mM NADPH 460 $\mu$ L，スエヒロタケの粗酵素液 3.5mL を入れ混合し，37 $^{\circ}$ C で 24 時間反応した．反応後の溶液 300 $\mu$ L と氷冷エタノール 700 $\mu$ L を混合し，遠心分離（15000rpm，4 $^{\circ}$ C，10min）により得られた上清液を孔径 0.45 $\mu$ m のフィルターでろ過したものを HPLC 測定用試料液とした。

#### 2. HPLC による測定

第 3 章第 3 節の「2. エクオール関連物質の測定」と同様に行った。

## 結果および考察

酵素反応 24 時間後のクロマトグラフを図 6 に示す。反応 0 時間においては、ダイゼインが  $185.6 \mu\text{mol}$  含まれていた。24 時間反応すると、ダイゼインがわずかに減少して  $183.1 \mu\text{mol}$  になり、Compound A が生成し、ジヒドロダイゼインとして換算すると  $1.6 \mu\text{mol}$  含まれていた。スエヒロタケ粗酵素液による反応においてダイゼインが減少し、溶出時間からジヒドロダイゼインに非常に類似した化合物が生成することを明らかにした。

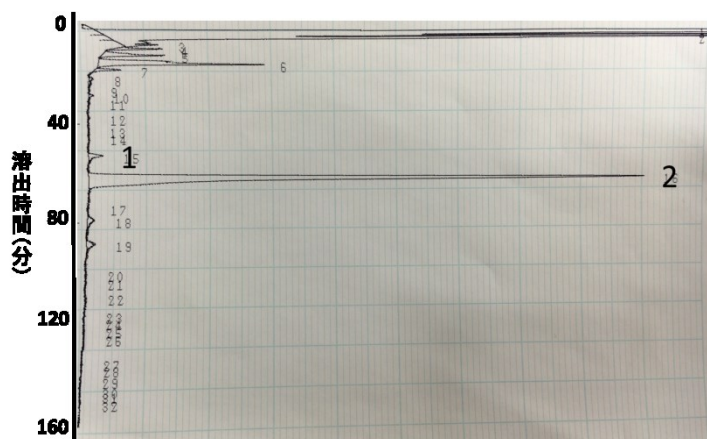


図 6 ダイゼインを基質とした酵素反応後のクロマトグラフ

1 : ダイゼイン, 2 : Compound A

本章において検証した黒大豆から調製したスエヒロタケ発酵黒大豆およびスエヒロタケ発酵黒大豆懸濁液におけるイソフラボンの変化は、まず、原料中のダイゼインはスエヒロタケが有する  $\beta$ -グルコシターゼによりほぼすべてダイゼインに代謝された。しかし、発酵黒大豆懸濁液においてはダイゼインがさらに代謝さ

れ溶出時間からジヒドロダイゼインに非常に類似した Compound A が生成した。

以上のことからスエヒロタケ発酵黒大豆懸濁液における Compound A の生成について次のようなことが考えられた。黒大豆中に含まれるダイゼインとエクオールの前駆体であるジヒドロダイゼインはそれぞれ非常に構造式が類似している<sup>61)</sup>。また、好氣的条件下ではイソフラボン<sup>62)</sup>は微生物により水酸化物に変換されやすく、特にイソフラボンの A 環が酸化開裂を受けやすいことが認められている<sup>62)</sup>。さらに、外崎らは担子菌の作用によって、女性ホルモン類似体を分解することを報告している<sup>63)</sup>。したがって、本章において調製した原料中の黒大豆に含まれていたダイゼインはスエヒロタケが有する酵素によりダイゼインを経てジヒドロダイゼインに構造が類似した Compound A に変化したことが推察される。ダイゼインとジヒドロダイゼイン、エクオールにおけるリボソーム系における脂質過酸化の阻害活性および DPPH 法では、どちらもエクオールの活性が一番強いが、他の 2 種の化合物については、化合物の濃度や酸化開始の触媒によって活性の強さの順番が前後していることが報告<sup>64)・65)</sup>されている。いずれにせよ、スエヒロタケの発酵黒大豆においては、これらの化合物が生成したことにより、高い抗酸化活性が維持されたことが示唆された。

従来のエクオールの生産は、*Bacteroides ovatus* や *Ruminococcus productus* などの腸内細菌により嫌氣的条件下で行われている。しかしながら、本章においてスエヒロタケにより好氣的条件下でジヒドロダイゼインに構造が類似している



Compound A が生成したことを明らかにした。

以上，本章ではスエヒロタケを用いて発酵黒大豆を調製し，黒大豆中のイソフラボンの変化について検証し従来では報告されていないイソフラボンの変化が起こることを示した．スエヒロタケの持つ酵素により，嫌氣的条件下での生産が報告されているエクオールおよびエクオールに至るまでの化合物が生成している可能性を示唆した．また，発酵期間中にスエヒロタケの有する酵素によって黒大豆に含まれる前駆体より新たにダイジン，ダイゼインを生成されることを明らかにした．また，アグリコン型のイソフラボンが増加しており、抗酸化活性の増加に関与していることを推察した．

結論ではスエヒロタケの発酵能による物質変換について論述する．

## 結論

結論では第1章から第3章を通して論述してきたことを総括し、スエヒロタケにおける抗酸化物質生産について考察する。

緒論でも述べたように、これまでに担子菌は数多くの種類が発見され、プロテアーゼ、アミラーゼ、アルコール脱水素酵素、乳酸脱水素酵素などの種々の酵素を分泌することが報告されているが、その特性については明らかにされていない。また、松井らによって、スエヒロタケを用いた発酵食品については調製されており、機能性が優れていることが報告されている。しかし、発酵期間中の成分変化や物質生産については明らかにされていない。そこで、本論文では、スエヒロタケの分泌する酵素による成分変化に関して論じた。

第1章においては、まず、スエヒロタケの菌糸体を鰹出汁培地中で培養することにより、エルゴチオネインを生産することを明らかにした。その際、システイン、メチオニン、ヒスチジンを各10mM および酵母エキスの添加により、エルゴチオネインの生合成量が増加することを見出した。第1章ではさらに、従来エルゴチオネインの生合成に必要されているアミノ酸のみならず、鰹出汁に含まれている成分がエルゴチオネインの生合成に大きく関与していることを解明した。

第2章では、スエヒロタケ後発酵茶において、カテキン類の中でも-EGCのみ大幅な増加がみられたことから、-ECgと-EGCgが加水分解され没食子酸が遊離することにより、-EGCが生成し、総ポリフェノール量や抗酸化活性の増加に関与した可能性が示

唆された。これらのカテキン類の成分変化は従来の後発酵茶とは異なることを論述した。また、スエヒロタケ後発酵茶は、総ポリフェノール量、カテキン量の値がいずれも未発酵の茶葉に対して高値を示した。発酵の前後で総カテキン量が増加したことから、発酵期間中に茶葉中のリグニンなどの重合体や前駆体から新たにカテキン類が遊離する可能性を見出した。

第3章においては、スエヒロタケもつ酵素により、大豆中のダイゼインが変換され、新たな化合物を生成することを明らかにした。また、発酵前後でイソフラボン量が増加していたことから、黒大豆の発酵においても、発酵期間中に前駆体から新たに、ダイジン等を生成したことを明らかにした。

以上に示すように、本論文では鰹出汁中にエルゴチオネインの生合成を促進する物質が含まれていることを明らかにした。また、スエヒロタケによるカテキンやイソフラボンなどの抗酸化活性物質生産について科学的に解明した。さらに、発酵期間中にスエヒロタケの持つ様々な酵素により茶葉および黒大豆に存在する前駆体からも、カテキンやイソフラボンなどの機能性成分が生産されることを明らかにした。本研究で使用した食材は機能性や含有成分に着目し発酵による変化が期待された鰹出汁、茶葉、黒大豆を用いて行ったが、他の食材または現在、産業廃棄物として大量に廃棄されているおからや小豆の皮などもスエヒロタケなど担子菌の発酵能により機能性の付加や、既知成分の増加、呈味性の向上がなされ新たな食品として利用価値を見出すことが可能であると推察している。

以上，本研究の成果によりスエヒロタケなど担子菌の持つさらなる可能性について迫ることになったであろう．今後も担子菌の持つ酵素により様々な食品を発酵させ，その成分変化を追求したいと考えている．本研究での研究成果で得られた発酵食品を摂取することにより，現在の人々において問題視されている，生活習慣病において食生活からの病気予防を促し，人類の健康に寄与できるようにすることを期待している．

## 要約

本論文は、担子菌の一種であるスエヒロタケ(*S. commune*)による機能性物質生産に関して論述したものである。

担子菌は古くから漢方として用いられ、薬効のみならず健康食材としても注目されている。これまでに松井や本間らによって担子菌を用い発酵食品が調製され、その機能性が報告されている。特に、スエヒロタケを用いて発酵させた鰹節粉末、茶葉、黒大豆が、未発酵のものと比較して機能性が優れていることを報告しているが、生成する物質に関しては詳細に検討されていない。

そこで、本論文は3章の構成とし、緒論、第1章では、スエヒロタケが鰹出汁培地においてエルゴチオネインを生産することを明らかにすると共に、鰹出汁を用いた高生産培養条件を確立したこと、第2章ではスエヒロタケ後発酵茶中のカテキン類の変化について明らかにしたこと、第3章ではスエヒロタケ発酵黒大豆中のイソフラボンの変化について明らかにしたことを述べている。

本論文において、特に、鰹出汁にヒスチジンおよびシステイン、酵母エキスを添加して培養することによりエルゴチオネインの高生産が認められたこと、鰹出汁に含まれる成分がエルゴチオネインの生合成を促進させることを初めて明らかにした。また、スエヒロタケで茶葉および黒大豆を発酵させることにより、発酵前と比較して、カテキン類およびイソフラボンの総量が増加していたことから、発酵期間中にスエヒロタケの有する様々な酵素により、茶葉および黒大豆に存在する前駆体からカテキンやイソフラ

ボンなどの機能性成分が生産されることを明らかにした。さらに、発酵期間中に生じたカテキンやイソフラボンの機能性物質生産および構造変化について科学的に考察し解明している。

## 謝辞

研究活動全般にわたり格別なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科 松井徳光教授に甚大なる謝意を表します。私が助手の仕事を行いながら、このように博士論文としてまとめることができましたのも、先生の熱心なご指導および研究のディスカッションを重ね、私の研究者としての成長を温かく見守ってくださったためであると深く思っております。

貴重な御教示を賜りました武庫川女子大学伊勢川教授，戸田教授に心より感謝申し上げます。先生方の御助言により，実験での精密さが改善され，本論文の完成度が高まりました。本当にありがとうございました。

また，学术交流の場として，日本きのこ学会，日本農芸化学会に言及しないわけにはまいりません。琉球大学 高畠幸司教授，鳥取大学 会見忠則教授，霜村典宏教授，近畿大学 白坂憲章教授，大阪府立大学 上田光弘教授，楠田瑞穂博士，東京農業大学 本間裕人助教ら多数の研究者たちが，研究発表に対し真剣に議論を交わしてくださいました。そこで受けた刺激が，研究を進める動機の一つとなっていたことは間違いありません。誠にありがとうございました。

実験の遂行にあたり，武庫川女子大学生生活環境学部食品微生物学研究室の皆様には多大なるご協力をいただきました。また，武庫川女子大学薬学部および生活環境学部にも所属している，先生方，助手，助教の皆様を支えていただきました。感謝申し上げます。

研究活動費においては，三菱商事フードテック株式会社およびヘルスビューティー株式会社ならびに武庫川女子大学食物栄養学科より援助をいただきました．ありがとうございました．

最後になりましたが，ありとあらゆる場面で私を温かく見守り続けてくれた両親に感謝いたします．

本研究の成果が皆々様のご期待に沿うものかどうか甚だ疑問ではありますが，ここに重ねて厚く謝意を表し，謝辞といたします．



## 参考文献

- 1) 江口文陽：キノコの多様性を科学する，木材保存，**42**，12-17 (2016)
- 2) 寺下隆夫・縄間誠・吉川賢太郎・獅山 慈孝：エノキタケ子実体のプティナーゼ，日本食品科学工学会誌，**42**，907-912 (1995)
- 3) 寺下隆夫・楠田瑞穂・松川祥子・永井勝・吉川賢太郎・坂井拓夫：マツタケ (*Tricholoma matsutake*) の菌体外アミラーゼの生成と生成酵素のデンプン分解特性，日本応用きのこ学会誌，**8**，115-120(2000)
- 4) 松井徳光：きのこ発酵能による機能性食品の開発，食品と開発，**48**，11-13 (2013)
- 5) Okamura, T, Nishikawa, Y, Okuda, N and Ohsugi, M: Effects of adding mushrooms to dough on gas production and loaf volume, *J Cookery Sci Jpn*, 31, 30-36 (1998)
- 6) Okamura, T, Nishikawa, Y, Okuda, N and Ohsugi, M: Effects of adding mushrooms to dough on gas production during bread making, *J Home Eco Jpn*, 49, 865-871 (1998)
- 7) Okamura, T, Ogata, T, Toyoda, M, Tanaka, M, Minamimoto, N, Takeno, T, Noda, H, Fukuda, S and Ohsugi, M: Production of sake by mushroom fermentation, *Mushroom Sci Biotechnol*, 8, 109-114 (2000)

- 8) Okamura, T, Ogata, T, Minamimoto, N, Takeno, T, Noda, H, Fukuda, S and Ohsugi, M: Characteristics of beer-like drink produced by mushroom fermentation, *Food Sci Technol Res*, 7, 88-90 (2001)
- 9) Okamura, T, Ogata, T, Minamimoto, N, Takeno, T, Noda, H, Fukuda, S and Ohsugi, M: Characteristics of wine produced by mushroom-fermentation, *Biosci Biotechnol Biochem*, 65, 1596-1600 (2001)
- 10) O-Matsui, T, Tomoda, T, Fukuda, S and Ohsugi, M: Discovery of alcohol dehydrogenase from mushrooms and application to alcoholic beverages, *J Mol Catal B: Enzymol*, 23, 133-144 (2003)
- 11) 松井（岡村）徳光・大杉匡弘：きのこを用いた酒類の製造，*日本醸造協会誌*，**97**，766-773（2002）
- 12) Matsui, T, Kagemori, T, Fukuda, S and Ohsugi, M: Characteristics of wine produced by mushroom fermentation using *Schizophyllum commune* NBRC4929, *Mushroom Sci Biotechnol*, 17, 107-111(2009)
- 13) O-Matsui, T, Takemura, K, Sera, M, Takeno, T, Noda, H, Fukuda, S and Ohsugi, M: Characteristics of a cheese-like food produced by mushroom fermentation of the mushroom *Schizophyllum commune*, *J Biosci Bioeng*, 92, 30-32 (2001)
- 14) O.-Matsui, T, Izuta, H, Tomoda, T, Noda, H, Fukuda, S and Ohsugi, M: Fermented soybean with thrombosis

- preventing activity using mushroom mycelia as microbial source, *Food Sci Technol Res*, 9, 227-230 (2003)
- 15) O.-Matsui, T, Izuta, H, Takeno, T, Noda, H, Fukuda, S and Ohsugi, M: Characteristics of miso-like food produced by mushroom fermentation, *Mushroom Sci Biotechnol*, 9, 117-120 (2001)
- 16) 田畑麻里子・福田祥子・大杉匡弘・佐藤美次・山川友宏 : スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) の発酵による豆乳の成分および機能性の変化について, *日本きのこ学会誌*, **16**, 159-163 (2008)
- 17) 本間裕人・中村和夫・川村拓未・徳田宏晴・中西載慶 : きのこと類を用いた味噌の試醸とその化学成分, *日本きのこ学会誌*, **21**, 23-29 (2013)
- 18) 本間裕人・徳田宏晴 : きのこと類を用いた発酵食品の製造, アルコール耐性アミラーゼ生産株の探索と味噌の製造, *日本醸造協会誌*, **112**, 378-385 (2017)
- 19) 本間裕人・徳田宏晴・永嶋涼太・中村和夫・中西載慶 : 耐塩性プロテアーゼを生産するきのこ類を用いた醤油の製造, *日本きのこ学会誌*, **23**, 26-30 (2015)
- 20) 山崎貴子・岩森大・伊藤直子 : マイタケ抽出液の注入による牛肉軟化とタンパク質の変化, *日本調理科学会誌*, **49**, 348-354 (2016)
- 21) 岡田昌己・西山一朗 : ブナシメジに含まれるプロテアーゼの筋原線維タンパク質分解作用, *日本家政学会誌*, **66**, 19-24 (2015)

- 22) 西脇俊和：マイタケ由来タンパク質分解酵素の食品加工利用，  
日本醸造協会誌，108，575-582（2013）
- 23) 厚生労働省ホームページ，人口動態統計  
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei17/index.html>（2019年7月7日閲覧）
- 24) 坂口泰人・千葉直久・齊藤正男・石川真也・中川達雄：肺結節陰影を呈した肺スエヒロタケ（*Schizophyllum commune*）症の1切除例，日本呼吸器外科学会雑誌，32，464-468（2018）
- 25) 水野卓：キノコの薬効成分，きのこの科学，1，53-59（1994）
- 26) 島村智子・受田浩之・柏木丈拈：高知県黒潮町の日戻りカツオに関する調査：抗疲労物質含量とその効果について，ニューフードインダストリー，55，25-30（2013）
- 27) 前川隆嗣・甘庶志帆乃・石盛嘉浩・榎原周平・渡邊敏明：かつお節および昆布の抽出液におけるアミノ酸組成の産地による比較検討，日本微量栄養素学会誌，24，191-197（2007）
- 28) Melville, D B, Horner, W H, and Otken, C C : Studes on the origin of ergothioneine in animals, J Biol Chem, 213,61-68（1955）
- 29) 福田絵里・青柳幸恵・山岸和敏・賀佐伸省・知地英征：タモギタケから単離したエルゴチオネインの加熱および各 pH における抗酸化性への影響，藤女子大学紀要，49，51-55（2007）
- 30) Harada, E, Nagatomi, F, Kijidani, Y ,Meguro, S and Kammera , T : Utilization of soba-shochu distillery waste for benzaldehyde and ergothioneine production from

liquid culture of the edible basidiomycete *Grifola garga*,  
Mushroom Sci Biotechnol, **21**, 165-171 (2014))

- 31) 梶野美紀・田畑麻里子・松井徳光：スエヒロタケの発酵能による昆布および鰹節だしがらを用いた調味料素材の開発，日本きのこ学会誌，**22**，69-73（2014）
- 32) 佐野満昭：茶カテキンの機能と調理時における構造的変化，日本調理科学会誌，**40**，223-230（2007）
- 33) 福田祥子・松井徳光・立花 宏美・友田智美・大杉匡弘：担子菌の発酵能による機能性大豆食品の開発，武庫川女子大学紀要 自然科学編，**55**，53-59（2007）
- 34) 大島敏明：エルゴチオネインの食品の酸化的変色防止効果，食品と容器，**52**，432-438（2011）
- 35) 賀佐伸省・山岸和敏・富山隆広：タモギタケ由来エルゴチオネインの定量法と精製法の確立，札幌医科大学医療人育成センター紀要，**1**，67-70（2010）
- 36) 慶林坊健太・堂ヶ崎知格：食用茸中のエルゴチオネインに関する基礎研究，麻布大学雑誌，**15**，65-66（2007）
- 37) 福田絵里・青柳幸恵・山岸和敏・賀佐伸省・知地英征：タモギタケから単離したエルゴチオネインの加熱および pH における抗酸化性への影響，藤女子大学紀要，**49**，51-55（2012）
- 38) 公開特許公報(A)「エルゴチオネインの製造方法」清水幸子特許取得（2012）
- 39) Seebeck, FP, In Vitro Reconstitution of Mycobacterial Ergothioneine Biosynthesis , J Am Chem Soc, **132**, 6632-6633 (2010)

- 40) 後藤哲久：総ポリフェノールの定量，「食品機能性評価マニュアル集Ⅲ」（食品機能性評価支援センター技術普及資料等検討委員会編），社団法人日本食品工学会，pp1-7（2009）
- 41) 加藤みゆき・田村朝子・大森正司・難波敦子・宮川金二郎・西村修 他：碁石茶製造工程における風味成分の変化とその特徴，日本家政学会誌，**45**，527-532（1994）
- 42) 久延義弘・朝賀昌志・松田良子・原京子・末松伸一 他：茶飲料中のカフェイン及びカテキン類の定量方法，東洋食品工業短期大学・東洋食品研究所研究報告書，**19**，69-77（1992）
- 43) 渡辺裕子・早川潔・植野洋志：麴菌による茶葉の呈味改善，日本家政学会誌，**59**，999-1004（2008）
- 44) Hatamoto, O, Sekine, H, Nakano, E and Abe, K: Cloning and expression of a cDNA encoding the laccase from *Schizophyllum commune*, *Biosci Biotechnol Biochem*, **63**, 58-64（1999）
- 45) Terasawa, N and Yamazaki, N: Radical Scavenging Activity of Japanese Black Tea, *Toyama Kurocha, Food Sci Technol Res*, **8**, 218-220（2002）
- 46) 芳野恭士・杉浦由佳・篠原千恵・廣田雅恵：フェノール化合物の抗酸化作用の測定と定量法に関する研究，技術・教育研究論文誌，**11**，59-79（2004）
- 47) Matsui, T: Development of functional foods by mushroom fermentation, *Mushroom Sci. Biotech.*, **24**, 169-175（2017）.

- 48) Kamata, H, Yamagata, Y, Nakamura, T, Pda, K, Murao, S and Ichishima, E: Characterization of the complex between  $\alpha_2$ -macroglobulin and a serine proteinase from *Bacillus natto*. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2695-2702 (1989).
- 49) Sumi, H, Hamada, H, Tsushima, H, Mihara, H and Muraki, H: A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet, *Experientia*, **43**, 1110-1111 (1987).
- 50) 難波文男：大豆と健康，日本食生活学会誌，**28**，225-229 (2018)
- 51) 佐藤浩幸：黒大豆における味噌のアントシアニンの推移と抗酸化活性，醸協，**105**，79-87 (2010)
- 52) Okamura, T, Takeno, T, Fukuda, S, Mohri, A, Noda, H, Iemoto, A, Horie, N and Ohsugi, M: *Laetiporus sulphureus*, producing an anti-thrombin substance. *Mushroom Sci. Biotech.*, **8**, 119-123 (2000).
- 53) Whistler, L S, Bushway, A A, Singh, P P, Makahara, W and Tokuzen, R: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, **32**, ed. by S.R. Tipson and D. Horton, Academic Press, New York, 235-275 (1976).
- 54) 菊本昭一・宮島徹・吉積智司・藤本紫郎・木村恵太郎：スエヒロタケの生産する多糖に関する研究(第1報)多糖の生成とその性質，日本農芸化学会誌，**44**，337-342 (1970)

- 55) 松井徳光:担子菌の発酵能による機能性黒大豆の開発, 科学研究費助成事業研究成果報告書 (2016)
- 56) Esaki, H, Onozaki, H and Osawa, T : Antioxidative Activity of Fermented Soybean Products, ACS Symposium Series, **546**, 353-360 (1994)
- 57) 池田稜子・太田 直一・渡辺 忠雄 : 大豆発酵過程における抗酸化性物質イソフラボンの変化, 日本食品科学工学会誌, **42**, 322-327 (1995)
- 58) Desrochers, M, Jurasek, L and Paice, M G : High Production of  $\beta$ -Glucosidase in *Schizophyllum commune*: Isolation of the Enzyme and Effect of the Culture Filtrate on Cellulose, Hydrolysis Appl Environ Microbiol, **41**, 222-228 (1981)
- 59) 内山成人・上野友美・鈴木淑水 : 新規エクオール産生乳酸菌のヒト糞便からの単離・同定, 腸内細菌学雑誌, **21**, 217-220 (2007)
- 60) 高橋陽子 : イソフラボンの分析, 「食品機能性評価マニュアル集第 III 集」(食品機能性評価支援センター技術普及資料等検討委員会編), 社団法人日本食品科学工学会, つくば, pp14-18 (2008)
- 61) 廣田陽 : 豆味噌と豆鼓に含まれる抗酸化ポリヒドロキシイソフラボン, 醸協, **101**, 563-570 (2006)



- 62) 工藤重光・打田悌治・尾島聡・大久保一良・藤波博子・海老根英雄：各種味噌の大豆配糖体成分組成および味噌の品質に及ぼす大豆サポニンの影響，日本食品工業学会誌，**37**，786-792 (1990)
- 63) 外崎貴志・門村紀子・山田清志・後藤秀幸・谷口正之・田中孝明：担子菌の酸化酵素を用いた女性ホルモン類似体の分解，日本生物工学会大会講演要旨集，大阪，pp304 (1999)
- 64) Arti, A, Muraleedharan, G, Nair and Gale, M S :  
Antioxidant Activities of Isoflavones and Their  
Biological Metabolites in a Liposomal System, Arch  
Biochem Biophys, **356**, 133-141 (1998)
- 65) XIAO, L L, XIU, L W, ZHUANG L I, QING, H H and  
SHI, Y W : Improved in Vitro Assays of Superoxide Anion  
and 1,1-Diphenyl- 2-picrylhydrazyl (DPPH)  
Radical-Scavenging Activity of Isoflavones and Isoflavone  
Metabolites, J Agric Food Chem, **58**, 11548-11552 (2010)

## 発表論文リスト

1. スエヒロタケの発酵能により調製した後発酵茶の特徴, 日本きのこ学会誌, 25, 66-69 (2017)
2. 鰹出汁を利用したエルゴチオネインの生産, 日本きのこ学会誌, 25, 100-103 (2017)
3. スエヒロタケによる発酵黒大豆の調製および大豆イソフラボンの変化, 日本きのこ学会誌, 27, 49-54 (2019)
4. エルゴチオネイン高生産における培地条件の確立, 日本きのこ学会誌, 27, 83-86 (2019)