

## 論 文

シイタケおよび *Flammulina populicola* 培養への低分子ヒアルロン酸を主成分とするニワトリ鶏冠分解物の応用寺下隆夫<sup>1)\*</sup>・白坂憲章<sup>1)</sup>・楠田瑞穂<sup>2)</sup>・若山祥夫<sup>3)</sup><sup>1)</sup> 近畿大学農学部食品微生物工学研究室

〒631-8505 奈良県奈良市中町 3327-204

<sup>2)</sup> 大阪府立大学大学院生命環境科学部生物資源循環工学講座

〒599-8531 大阪府堺市中央区学園町 1-1

<sup>3)</sup> 株式会社ウイル・サーチ

〒222-0033 神奈川県横浜市港北区新横浜 2-15-12 共立新横浜ビル 3F

Application of comb (chicken) hydrolyzates containing a lot of low-molecular weight hyaluronic acid to the culture of *Lentinula edodes* and *Flammulina populicola*Takao TERASHITA<sup>1)\*</sup>, Norifumi SHIRASAKA<sup>1)</sup>, Mizuho KUSUDA<sup>2)</sup>,  
and Sachio WAKAYAMA<sup>3)</sup><sup>1)</sup> Laboratory of Food Microbiological Science and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kinki University, 3327-204 Nakamachi, Nara 631-8505, Japan<sup>2)</sup> Laboratory of Biocycle Engineering, Graduate School of Life and Environmental Science, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuencho, Naka-Ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan<sup>3)</sup> Will・Search Co Ltd., 3F Kyouritsu-Shin Yokohama Bulding, 2-15-12 Shinyokohama, Kouhoku-Ku, Yokohama, Kanagawa 222-0033, Japan

(Received 16 May 2011/Accepted 22 June 2011)

## Abstract

The effects of the addition of hydrolyzates containing a lot of low-molecular weight hyaluronic acid (LMW-HA) from comb (chicken) to the culture medium was tested on three commercial strains of *Lentinula edodes* and *Flammulina populicola* NBRC 7777 for vegetative mycelial growth and fruit-body yield. The dry weights of mycelia from *L. edodes* were increased by about 1.75 times (Mori 465 strain), 1.44 times (Meiji Strain) and 1.67 times (Kinko 324 strain) with the addition of comb hydrolyzates (0.125%), respectively. Also, mycelial dry weights and fruit-body yields of *F. populicola* NBRC 7777 were increased by about 1.70 times and 1.75 times that of the control, respectively.

To elucidate the taking of LMW-HA from comb hydrolyzates in cell, N-acetyl-D-glucosamine and glycosaminoglycan contents in mycelia and fruit-bodies of *F. populicola* were analyzed. N-Acetyl-D-glucosamine contents were increased by about 2.85 times (vegetative mycelia) and 2.69 times (fruit-bodies) with the addition of LMW-HA from comb hydrolyzates in the medium. On the other hand, the concentration of glucosaminoglycan in fruit-bodies was from 0.52% (69.30 μg/Petri dish) to 0.35% (469.0 μg/Petri dish) even though glucosaminoglycan was not detected in the control culture (without the addition of comb hydrolyzate) when the hydrolyzate (0.05–0.5%) containing LMW-HA was added to the culture medium.

**Key words:** Comb hydrolyzate, *Flammulina populicola*, Glucosaminoglycan, Hyaluronic acid, *Lentinula edodes*

## 緒 言

ヒアルロン酸 (HA) はヒトをはじめ、脊椎動物の組織中に広く分布し、N-アセチル-D-グルコサミンと D-グルクロン酸が直鎖状に連なったグルコサミノグリカンの一種である。HA は高い水分保持機能や細胞組織の保護、細菌感染に対する防止機能を持つ<sup>1)</sup>。また、HA は皮膚の瑞々しさと潤い、張りの維持など、美容と老化防止、貧血や関節症、リウマチの改善、活性酸素の除去など、健康維持と深い拘わりを持つ重要な生体高分子機能成分の一つである<sup>1-6)</sup>。しかし、食品への利用や有用発酵微生物の機能性改善などの観点からは

その分子量が 80 万から 120 万と極めて高分子であるため、組織への吸収性の点で問題がある。食品や医薬品に利用されるこれらの HA はニワトリ鶏冠由来のものであるが、乳酸菌の酵素を利用して生産させる微生物起源の HA も報告<sup>7)</sup>され実用化されている。

ところで、このような高分子 HA を低分子化する方法としては、低濃度塩酸による 50–70℃での加熱分解、酵素ヒアルロニターゼによる処理、プロテアーゼとヒアルロニターゼの併用処理、自己消化法、これらを組み合わせた方法などが知られているが、処理方法と処理条件の違いによって生成する HA の分子量が著しく変化する。また、低分子化のいずれの方法も特許であるため公表されない部分が多い。

著者らは、機能性を付与した食品や機能性微生物開発へ

\* 責任著者. E-mail: terasita@nara.kindai.ac.jp

の HA の応用を目的に、ニワトリ鶏冠均質物を食物由来のプロテアーゼを含む酵素類によって分解処理し、低分子 HA を調製した。この鶏冠分解物の化学成分組成と分子量分布を調べた結果、約 54% の HA 含量のほか、総タンパク質、遊離アミノ酸、水分をそれぞれ 10–16% 前後、その他の成分を約 8.0% 含んでいることが分かった。しかし、HA の分解物である *N*-アセチルグルコサミンは含まれていなかった。さらに、この HA は分子量 5,000 前後と 1,520 前後の二成分を主要成分とすることを明らかにしている。これらの結果はヒト肌への臨床試験による保湿効果の検討結果とともに既に報告<sup>2)</sup>した。

本報告では著者らが独自に調製した低分子 HA を機能性健康素材として注目されているきのこ生産に応用し、きのこの菌糸体生育および子実体形成に及ぼす低分子 HA の影響と、低分子 HA の菌体内への取り込みについて基礎的検討を行った結果を報告する。なお、これらの検討には、市販栽培シイタケ 3 菌種と、実験室内での液体培地において短期間で安定して子実体を発生する *Flammulina populicola* NBRC 7777 株を使用した。

## 材料と方法

### 1. 供試菌株

本研究には市販栽培シイタケ (*Lentinula edodes*) 3 菌株 (森 465 号菌, 菌興 324 号菌, 明治株) を供試した。これらの菌株は、ポテトデキストロース寒天培地 (PDA) (日水製薬製) の入った直径 18 mm の試験管に保存した。また、*Flammulina populicola* NBRC 7777 はポテトデキストロース液体培地で良好な生育を示し安定して子実体を発生すること、子実体成熟までの日数が短いことから子実体の発生試験や低分子 HA の菌体への取り込み実験などに使用した。

### 2. 接種菌の培養

本実験に使用する接種菌の培養には、市販の PDA 培地を用いた。所定の方法で調製した培地を 121°C、10 分間オートクレーブし、プラスチック製ペトリ皿 (直径 110 mm) にその 10 mL を分注・固化させて使用した。シイタケでは、24°C、30 日間、*F. populicola* では、24°C、14 日間培養し、同心円状に生育した菌糸体の外縁から 10 mm 内側の菌糸片を、殺菌したコルクボーラー (内径の直径 10 mm) で同心円状に打ち抜き接種菌として用いた。

### 3. 本培養培地の調製

本実験におけるシイタケおよび *F. populicola* の培養には、ジャガイモの抽出液から調製したポテトデキストロース液体培地を使用した<sup>8)</sup>。すなわち、皮をむいて、約 10 mm の立方体に切断したジャガイモ (男爵) 200 g に 500 mL の蒸留水を加えて弱火で 20 分加熱した抽出液をガーゼでこし、グルコース 20 g, チアミン塩酸塩 1.0 mg を加え、全体を 1,000 mL (pH 5.6) にした培地を用いた。シイタケおよび *F. populicola* の菌糸体培養実験では、100 mL 容のマイエル

フラスコに培地 20 mL を分注し、121°C、10 分間オートクレーブして使用した。また、*F. populicola* の子実体形成実験と低分子 HA の取り込み実験では、250 mL 容のポリカーボネート製、植物組織培養用高層ペトリ皿 (高さ 70 mm, 内径の直径 80 mm, 岩城硝子製) に液体培地 50 mL を分注し、同様に高圧滅菌して使用した。

### 4. シイタケの菌糸体培養

シイタケの菌糸体培養は、明所 (約 50 lx), 24°C, 28 日間培養した。また、*F. populicola* では、明所 (約 50 lx), 24°C, 14 日間培養した。子実体を発生させる場合は、24°C, 14 日間培養した高層ペトリ皿を 17°C の培養室に移して子実体の形成を誘導し、200 lx の蛍光灯照射下でさらに 10 日間培養を続けた。

### 5. 菌糸体および子実体乾燥重量の測定

一定期間培養し収穫した菌糸体および子実体は、蒸留水で数回洗浄後、秤量ビンに入れ、105°C、5 時間の乾燥後に乾燥重量を測定した。すべての実験は 1 区、7–10 連で検討し、得られた結果は統計処理した。

### 6. *F. populicola* の菌糸体および子実体への低分子 HA の取り込みの検討

培養液に添加した鶏冠分解物の主成分である低分子 HA の菌糸体および子実体への取り込み (グルコサミノグリカン含量) を検討するため、Morgan-Elson 法<sup>9)</sup> および 2-ニトロフェニルヒドラジンカップリング法<sup>10)</sup> によって分析した。また、2-ニトロフェニルヒドラジンカップリング法での分析では、分析値に影響を及ぼさない培地として、セリン 1.0 g, グルコース 20 g, チアミン塩酸塩 10 mg を 1,000 mL の蒸留水に溶解し、pH 5.6 に調整したセリン・グルコース液体培地を使用した。なお、本培地では菌糸体の生育はかなり劣ることから、まず、液体培地の 50 mL を入れた 250 mL 容の植物組織培養用ペトリ皿を用いた菌糸体生育について検討し、同時に子実体形成に必要な培養日数も調べた。

### 7. 供試した低分子 HA を主成分とするニワトリ鶏冠分解物について

プロテアーゼを含む食物由来の酵素類によって分解・調製した低分子 HA を主要成分とするニワトリ鶏冠分解物は、(株)らいむ (東京都世田谷区深沢 8 丁目 5-21) で調製し、実験に使用した。既に報告<sup>2)</sup>したが、著者らはこのニワトリ鶏冠分解物の化学成分組成について検討し、53.6% の低分子 HA を含有すること、そのほかに総タンパク質 12.2%, 遊離アミノ酸 16.3%, 水分 10.0%, その他の成分 7.9% を含むことを明らかにした。また、HA の分解物である *N*-アセチルグルコサミンは 0% であることを確認した。さらに、この HA は低分子で HPLC 分析の結果、分子量 5,000 (最小 HA 単位を 13–14 分子から構成) と 1,520 (同様に 4 分子構成) の二大成分のほかに、量的には少ないが、さらに低分子の三成分 [1,140 (最小 HA 単位 3 分子から構成), 760 (2 分子から構成), 380 (1 分子から構成)] の計五成分から構成さ

れていること、これらの構成比が分子量の大きい順に 33%, 47%, 10%, 6% および 4% であることを報告した。

### 8. N-アセチル-D-グルコサミンの定量

きのこ菌体中の N-アセチル-D-グルコサミン含量は、試料を真空凍結乾燥後、低温下、蒸留水とともにガラスホモゲナイザーで菌体を破砕し、遠心分離 (8,000 × g, 8 分) 後の上清を Morgan-Elson 法<sup>9)</sup> によって定量した。

### 9. グルコサミノグリカンの定量

実験 8 と同様に処理・調製した試料について、2-ニトロフェニルヒドラジンカップリング法<sup>10)</sup> による比色定量法によって分析した。検量線の作製には鶏冠由来の HA ナトリウム (HARC, 和光純薬製) を用いた。

## 結 果

### 1. シイタケの菌糸体生育に及ぼすニワトリ鶏冠分解物

#### (主成分：低分子 HA) の影響

きのこの菌糸体生育に及ぼすニワトリ鶏冠分解物 (主成分：低分子 HA) の影響について検討した。鶏冠分解物 (低分子 HA) の水に対する溶解性と菌糸体生育への影響についての予備実験の結果を参考に、低分子 HA の最大濃度は 0.5% とした。Fig. 1 はシイタケ森 465 株の菌糸体生育に及ぼす低分子 HA 添加培養の検討結果である。鶏冠分解物は、著しい菌糸体生育の促進効果を示し、培養 19 日目では、0.5% 添加区が最良で対照区の約 2 倍の菌糸体乾燥重量が得られた。また、培養 28 日目では、無添加対照区の 73.8 mg / フラスコに対して、同濃度の鶏冠分解物添加培養で 118.7 mg / フラスコ、さらに 0.125% の添加培養では 143.8 mg / フラスコと著しい生育促進効果を示した。

そこで、森 465 株でみられた著しい菌糸体生育促進効果がシイタケの他の菌株でも認められるかどうか、新たに明治株と菌興 324 株を用いて検討した。本結果は Table 1 に要約した。促進効果は明治株の場合、最大 1.44 倍 (無添加対照区 49.72 mg / フラスコ, 0.125% 添加区 : 71.61 mg /

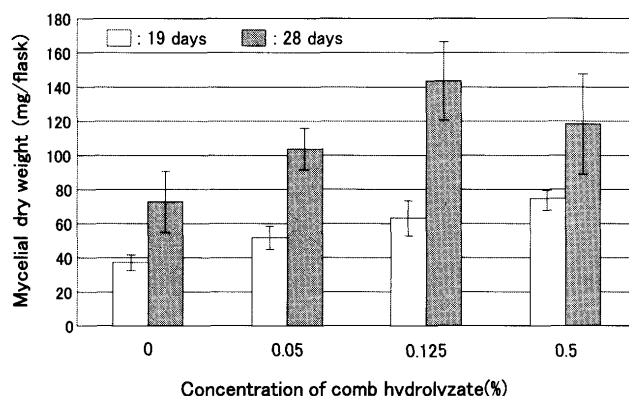


Fig. 1 Effect of comb (chicken) hydrolyzates on vegetative mycelial growth of *Lentinula edodes* Mori 465 strain.

The fungus was stationary cultured with Potato Dextrose liquid medium at 24°C.

The vertical bars represent the standard errors.

フラスコ), 菌興 324 株では、最大 1.67 倍 (無添加対照区 : 61.23 mg / フラスコ, 0.125% 添加区 : 102.5 mg / フラスコ) に増加した。これらの結果から低分子 HA を主要成分とする鶏冠分解物による菌糸体生育促進効果はシイタケに共通であることが推察された。

### 2. *F. populicola* NBRC 7777 の菌糸体生育および子実体形成に及ぼすニワトリ鶏冠分解物の影響

ポテト煮汁にグルコースを加えて調製した液体培地<sup>8)</sup> に本菌株 (*F. populicola* NBRC 7777) を接種し、菌糸体生育に及ぼすニワトリ鶏冠分解物の影響について三角フラスコを用いて検討した。これらの結果は Table 2 のとおりである。添加培養による増収効果は、本検討で用いた 0.05–0.5% の広い範囲で認められ、無添加対照区のほぼ 1.50–1.70 倍の菌糸体重量を得た (培養 14 日)。一方、本菌の子実体形成に及ぼす影響は植物組織培養用高層ペトリ皿を用いて検討し、その結果を Table 3 に示した。24°C, 14 日間の菌糸体培養後、子実体形成を誘導するため 17°C の培養室に移し、約 10 日で成熟子実体が形成された。本実験の濃度範囲における鶏冠分解物による子実体収量の顕著な増加は、0.125% および 0.5% で認められたが、0.05% では効果は認められなかった。

### 3. *F. populicola* NBRC 7777 の栄養菌糸体および子実体への低分子 HA の取り込み

#### 1) 栄養菌糸体および子実体の N-アセチルグルコサミン量

培地に添加し培養したニワトリ鶏冠分解物中の低分子 HA が菌糸体および子実体中にどの程度取り込まれるのかを植物組織培養用高層ペトリ皿を用いて検討した。この検討では、HA 構成成分の一つである N-アセチルグルコサミン量を定量した<sup>9)</sup>。本結果は Table 4 に示した。栄養菌糸中の N-アセチルグルコサミン量は低分子 HA 無添加の対照区が 77.3 μg / ペトリ皿, 0.05% および 0.125% の低分子 HA 添加区では、それぞれ 135.0 μg / ペトリ皿, 220.5 μg / ペトリ皿に増加した。本結果から、0.05% 添加で HA 無添加対照区の 77.3 μg / ペトリ皿を差し引いた 57.7 μg / ペトリ皿, 0.125% では 143.2 μg / ペトリ皿の N-アセチルグルコサミンが添加によって増加したことを示しており、この量が培地中に添加した低分子 HA に由来することが推定された。また、子実体の含量も対照区の 35.75 μg / ペトリ皿が、添加区ではそれぞれ 72.50 μg / ペトリ皿, 96.00 μg / ペトリ皿に増加し、低分子 HA 由来の N-アセチルグルコサミンが 36.75 μg / ペトリ皿 (0.05% 添加), 60.25 μg / ペトリ皿 (0.125% 添加) 増加したことが示された。なお、子実体収量の増加効果がほとんど認められなかった低分子 HA の 0.05% 添加区でも、菌糸体および子実体中の N-アセチルグルコサミン含量は添加培養で増加する結果を得た。

#### 2) 子実体のグルコサミノグリカン量

2-ニトロフェニルヒドラジンカップリング法<sup>10)</sup> によるグルコサミノグリカンの定量を行った。まず、本

Table 1. Effect of comb (chicken) hydrolyzates on vegetative mycelial growth of *L. edodes*.

Comb hydrolyzate (%)	Meiji strain*		Kinkoh 324 strain**	
	Mycelial dry weight (mg/flask)	Growth ratio***	Mycelial dry weight (mg/flask)	Growth ratio***
0 (control)	49.72±5.57	1.00	61.23±7.91	1.00
0.05	59.41±6.88	1.19	83.30±5.90	1.36
0.125	71.61±9.21	1.44	102.5±4.38	1.67
0.5	65.81±7.63	1.32	90.6±6.56	1.47

\**L. edodes* Meiji strain was stationary cultured in Potato Dextrose liquid medium at 24°C for 19 days.

\*\**L. edodes* Kinkoh 324 strain was stationary cultured in Potato Dextrose liquid medium at 24°C for 28 days.

\*\*\*Mycelial dry weights (mg/flask) with addition of comb hydrolyzate/Mycelial dry weights (mg/flask) without addition of comb hydrolyzate (control).

Table 2. Effect of comb (chicken) hydrolyzates on vegetative mycelial growth of *Flammulina populicola* NBRC 7777.

Comb hydrolyzate (%)	Vegetative mycelial dry weight (mg/flask)	Growth ratio*
0 (control)	118.7 ± 15.8	1.00
0.05	196.3 ± 22.5	1.65
0.125	201.9 ± 14.1	1.70
0.5	178.4 ± 16.9	1.50

*F. populicola* was stationary cultured in a 100 mL Erlenmeyer flask containing a medium consisting of 20 mL of Potato Dextrose liquid medium at 24°C for 14 days.

\*See Table 1

Table 3. Effect of comb (chicken) hydrolyzates on fruit-body formation of *F. populicola* NBRC 7777.

Comb hydrolyzate (%)	Yield of fruit-body (mg dry weight/Petri dish)	Growth ratio*
0 (control)	139.3 ± 21.5	1.00
0.05	141.5 ± 18.7	1.02
0.125	243.0 ± 25.3	1.75
0.5	221.3 ± 22.8	1.59

The fungus was stationary cultured in a 250 mL high-layer Petri dish for plant cultivation (polycarbonate, Iwaki glass Co., Ltd.) containing a medium consisting of 50 mL of Potato Dextrose liquid medium.

To form the mature fruit-body, the fungus was first growth at 24°C for 14 days under 50 lx, then transferred to the incubation chamber regulated at 17°C under 200 lx for 10 days.

\*Yield of fruit-body (mg dry weight/Petri dish) with addition of comb hydrolyzate /Yield of fruit-body (mg dry weight/Petri dish) without addition of comb hydrolyzate (control).

Table 4. Effect of comb (chicken) hydrolyzate on the *N*-acetylglucosamine contents in vegetative mycelia and fruit-bodies from *F. populicola* NBRC 7777.

Comb hydrolyzate (%)	<i>N</i> -Acetylglucosamine (μg/Petri dish)*			
	Vegetative mycelia	Growth ratio**	Fruit-bodies	Growth ratio**
0 (Control)	77.3	1.00	35.75	1.00
0.05	135.0	1.75	72.50	2.03
0.125	220.5	2.85	96.00	2.69

\*Morgan-Elson method

The fungus was stationary cultured in a 250 mL high-layer Petri dish for plant cultivation (polycarbonate) containing a medium consisting of 50 mL of Potato Dextrose liquid medium (pH 5.6).

To form the mature fruit-body, the fungus was first growth at 24°C for 14 days under 50 lx, then transferred to the incubation chamber regulated at 17°C under 200 lx for 10 days.

\*\**N*-Acetylglucosamine (μg/Petri dish) with addition of comb hydrolyzate/ *N*-Acetylglucosamine(μg/Petri dish) without addition of comb hydrolyzate (control)

検討に使用したセリン・グルコース液体培地を用い、*F. populicola* NBRC 7777 の菌糸体培養を行い、菌糸体の生育速度について調べた。その結果、この培地では菌糸体の生育速度は極めて緩慢で、24°C、42日間培養した時の鶏冠分解物無添加対照区では乾燥菌糸体重 29.5 mg /ペトリ皿でしかなく、鶏冠分解物添加区でやっと 47.5 mg /ペトリ皿（無添加対照区の約 2.1 倍）に増加したが、PDL 培地の場合の約 1/5 程度の生育しか得られなかった（Table 5）。そのため、本培養基で *F. populicola* NBRC 7777 株を培養し

て子実体を形成させるためには、24°Cでの栄養菌糸体の培養日数を 70 日とし、子実体誘導のため 17°Cに低温移動してさらに 28 日の培養期間が必要であった。このようにして培養し、得た子実体のグルコサミノグリカン定量結果は Table 6 に示した。本子実体中のグルコサミノグリカン含量は、無添加対照区では 0.02 μg /ペトリ皿とほぼ 0 に近い値であったが、低分子 HA の添加培養区では子実体中にグルコサミノグリカンが著量検出された。すなわち、0.05% 添加区では 69.3 μg /ペトリ皿、菌糸体生育の比較的良好であっ

Table 5. Effect of comb (chicken) hydrolyzate on vegetative mycelial growth of *F. populicola* NBRC 7777.

Incubation day	Vegetative mycelia (mg dry weight/Petri dish)		
	14	28	42
Comb hydrolyzate (%) 0 (control)	20.6±1.51	22.9±2.13	29.5±4.11
0.125	30.8±2.64	37.0±5.03	47.5±5.77

*F. populicola* was cultured with 250 mL high-layer Petri dish for plant tissue cultivation (polycarbonate) containing a medium consisting of 50 mL of Serine-Glucose liquid medium at 24°C.

Table 6. Effect of comb (chicken) hydrolyzate on the glycosaminoglycan contents in *F. populicola* NBRC 7777 fruit-bodies.

Comb hydrolyzate (%)	Glycosaminoglycan ( $\mu\text{g}$ /Petri dish)*	Ratio of uptake (%)**
0 (control)	0.02	—
0.05	69.3	0.52
0.125	145.0	0.43
0.5	469.0	0.35

\* 2-Nitrophenyl hydrazine coupling method *F. populicola* was cultured in a 250 mL high-layer for plant cultivation (polycarbonate) petri dish containing a medium consisting of 50 mL of Serine-Glucose liquid medium for 98 days.

\*\* Glycosaminoglycan ( $\mu\text{g}$ /Petri dish) in fruit-body / Glycosaminoglycan ( $\mu\text{g}$ /Petri dish) added to the medium.

た 0.125% 添加区で 145.0  $\mu\text{g}$  / ペトリ皿, 0.5% 添加区では 469.0  $\mu\text{g}$  / ペトリ皿となり, 鶏冠分解物の添加によって子実体中でグルコサミノグリカンが検出され, 低分子 HA の子実体への取り込みを示す結果を得た. また, *N*-アセチルグルコサミンの場合と同様に子実体収量の増加に効果の無かった 0.05% HA 添加区でも約 70  $\mu\text{g}$  / ペトリ皿のグルコサミノグリカンが検出された.

## 考 察

HA は *N*-アセチルグルコサミンとグルクロン酸が交互に鎖状結合した酸性ムコ多糖類の一種で, 80 万–120 万の高分子化合物である. 本化合物は機能性生体成分として知られ, その高い粘性と保水能力によって化粧品や医薬品原料として利用され<sup>1,6)</sup>, 食品への応用にも期待がもたれている. 自然の状態では HA はタンパク質と結合してゲル状を呈し, 粘滑剤, 組織の水分代謝や構造の維持, 細菌の侵入に対する防御などに機能しているとされる<sup>1)</sup>. 市場で利用されている HA の供給には, 本成分を著量含有するニワトリの鶏冠が原料として用いられ, 抽出・単離され利用されている. また, 近年乳酸菌<sup>7)</sup> によって生産される HA が開発・実用化され, 化粧品原料などに利用されている.

ところで, このような高分子化合物では生体への吸収が難しいとされることから, 著者らは, 加工食品や微生物の機能性付与への HA の利用を目的に, ニワトリ鶏冠均質物を食品から調製したプロテアーゼを含む酵素類によって分解処理し主成分が低分子 HA の鶏冠分解物を調製した. 本鶏冠分解物は 53.6% の HA を含むほか, 総タンパク質 12.2%, 遊離アミノ酸 16.3% などを含むこと, 得られた HA は低分子で, 分子量 5,000 前後と 1,500 前後の 2 種類が主成分で低分子 HA 全量の 80% を占めることなどを前報で既に報告した<sup>2)</sup>.

本報告ではこの低分子 HA を主な成分とするニワトリ鶏

冠分解物のきのこ栽培への応用を試みた. 食用きのこ類はそのほとんどが人工栽培され, 近年では貴重な機能性健康食材として位置づけられ, 生産・消費ともに増加しつつある. きのこ類は野菜と同じく大部分が水分であるが, 野菜には無いビタミン D を含む. また,  $\beta$ -グルカンにキチンを加えた難消化性繊維成分 (ダイエタリーファイバー) が乾物量の約半量を占めている<sup>11)</sup>. 著者らはシイタケなどの食用きのこ類数種を対象に, きのこ類に特異的なトレハロースを菌体内に吸収させ, ストレス保護効果, 抗酸化活性などの機能性の付与・強化について詳細な検討を行い既に報告している<sup>12-14)</sup>. さらに, 実際にシイタケを菌床栽培し, 培地に添加したトレハロースが子実体の形成と鮮度保持, 食味に及ぼす影響についても検討し, 実用化が可能なレベルの好結果を得ている<sup>15)</sup>.

本報告では低分子 HA を主成分とするニワトリ鶏冠分解物をシイタケの培養時に培地に添加し, 菌糸体の生育に及ぼす影響について検討した. その結果, 効果の程度に違いは見られたが, 供試シイタケ 3 菌株のいずれの菌株においても著しい菌糸体の増殖促進効果が認められた. しかし, 鶏冠分解物中には, 低分子 HA のほかにイソロイシンや  $\beta$ -アミノイソ酪酸を多く含む各種の遊離アミノ酸が 16.3%, タンパク質 12.3%, その他の成分 7.9% が含まれており<sup>2)</sup>, 促進効果は低分子 HA 以外の成分による効果の可能性もあり, さらに詳細な検討が必要である. ただ, 本研究の目的のひとつは食用きのこに更なる機能性を付与 (強化) することであり, そのため, 培地に添加した鶏冠分解物中の低分子 HA がきのこの栄養菌糸体や子実体にどの程度取り込まれるか (或いは単なる細胞壁からの吸収かもしれない) を検討する必要がある.

そこで, 子実体形成までの一連の検討に好都合な *F. populicola* (以前はエノキタケ IFO7777 株とされていた) NBRC 7777 を使用し検討を行った. 本菌は 250 mL 容

量の高層ペトリ皿にポテトデキストロース液体培地 50 mL を入れて培養するとほぼ 28 日目に十分量の成熟子実体を安定して形成するため、この種の検討では常用している。そこでまず *F. populicola* でも鶏冠分解物添加による増収効果が認められるか否かの確認を行った。その結果、鶏冠分解物 0.125% の添加培養で菌糸体は 1.70 倍に増収し、子実体収量も 1.75 倍に増加した。しかし、本子実体の増収効果が菌糸体増収の結果生じたのか、鶏冠分解物が直接子実体形成の増収に効果を示したのかは明確ではない。

ところで、きのこの内では *F. populicola* はキチン含量の低い部類に入るが、それでも菌糸体および子実体にはそれぞれ乾物量の 1.0–1.5%, 2.0–4.0% 含まれることを著者らは以前報告<sup>16)</sup>した。また、北本ら<sup>17)</sup>はアミスギタケ (*Polyporus arcularius*) で、吉田ら<sup>18)</sup>はヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) で、キチンはきのこの形態を維持するための支持成分として機能するほか、子実体形成の生育基質としても重要な成分のひとつであることを報告している。栄養菌糸体のキチンはキチナーゼによって *N*-アセチルグルコサミンに分解され、子実体の細胞壁成分として再びキチン合成が行われると考えられている。したがって、生育のステージによってキチン含量は増減するが、その分解物の *N*-アセチルグルコサミンもまた常に含まれ、量的な変動を示す。そこで、本実験に用いた低分子 HA が *F. populicola* の菌体内にどの程度取り込まれるのか、HA 構成成分の *N*-アセチルグルコサミン含量を測定した。その結果、培地へのニワトリ鶏冠分解物 0.125% の添加によって栄養菌糸体で 2.85 倍の、子実体では 2.76 倍の *N*-アセチルグルコサミン量が定量され、添加区で明らかに増加を示した。ニワトリ鶏冠分解物中には本成分は全く含まれていないことは確認しており、この増加は培地に添加した低分子 HA の分解物に起因するものと推察される。しかし、正確には菌体内のキチンおよび低分子 HA 量、ヒアルロニターゼ活性、キチンの分解と合成に関与する酵素の活性などに加え、どの程度の分子量の HA までが菌体内に取り込まれるのかも明らかにする必要がある。

そこで、菌体内のグルコサミノグリカン (低分子 HA) の定量を試みた。本成分の定量法には HPLC による高感度分析法<sup>19)</sup>、陰イオン交換クロマトグラフィー法<sup>20)</sup>、色素結合分析法<sup>21)</sup>などが報告されているが、著者らは簡便で有用な定量法である 2-ニトロフェニルヒドラジンカップリング法による比色定量法<sup>10)</sup>を用いた。ただ、本法では培地成分が定量値に影響を及ぼすことから、その影響を排除する培地としてセリン・グルコース液体培地を使用して検討した。Table 5 に示したように本培地では菌糸体の生育が遅く、子実体形成までに 98 日を必要とし、子実体の収量もよくなかった。しかし、ニワトリ鶏冠分解物に含まれる低分子 HA の培地への添加は、*F. populicola* 子実体中のグルコサミノグリカン含量の増加に反映し、無添加対照区の 1.55–3.19 倍に増加した。培地に添加した低分子 HA から、子実体で

検出されたグルコサミノグリカンの比率を求めると、低分子 HA の 0.35% (0.5% 添加)–0.52% (0.05%) が子実体で検出されたことになり、本実験の濃度範囲では少なくとも培地への添加量を増やすと取り込み量も増加するが、その比率はわずかずつではあるが培地への添加量の増加につれて低下することが示された。しかし、今回の検討では菌糸体の生育があまり良好ではなく子実体の収量も劣ったことから、生育の良好な培養基を工夫し、新たな分析法での低分子 HA の菌糸体および子実体への取り込みについて再度検討する予定である。

## 摘 要

機能性の生体成分として知られるヒアルロン酸 (HA) を低分子化し、低分子 HA を主成分とするニワトリ鶏冠分解物を用い、シイタケおよび *Flammulina populicola* の菌糸体生育と子実体形成に及ぼす低分子 HA の影響について検討した。その結果、シイタケの菌糸体生育は本分解物の添加培養 (0.125%) で促進され、無添加対照区のそれぞれ 1.75 倍 (森 465 号), 1.44 倍 (明治株), 1.67 倍 (菌興 324 株) の菌糸体乾燥重量を得た。また、*F. populicola* NBRC 7777 株では 0.125% の HA 分解物の添加で 1.70 倍の菌糸体重量が得られ、子実体収量も 1.75 倍に増加した。さらに、この菌株を用い、低分子 HA の菌体への取り込みについて、HA 分解物の *N*-アセチルグルコサミン量を調べたところ、菌糸体で 2.85 倍、子実体で 2.69 倍に増加した。また、無添加の対照区では検出されなかったグルコサミノグリカンが、分解物の添加区で 69.30–469.0  $\mu\text{g}$  / Petri dish 検出され、培地に添加したグルコサミノグリカン量の 0.35–0.52% が子実体中で確認された。

## 引用文献

- 1) 相沢豊三ほか: ヒアルロン酸, 医学大辞典縮刷版, 南山堂, 東京, 1722 p, (1986)
- 2) 寺下隆夫・白坂憲章・楠田瑞穂・若山祥夫: 鶏冠由来低分子ヒアルロンの化学組成とヒト肌への臨床試験による保湿効果, 近畿大学農学部紀要, **44**, 1-8 (2011)
- 3) 若山祥夫: ヒアルロン酸とは, ヒアルロン酸とコラーゲン, (株)ウイル・サーチ出版部, 神奈川, pp 6-25, (2004)
- 4) 奥田拓道: 健康・栄養食品事典, 東洋医学社, 東京, 506 p (2004)
- 5) Kawagishi, H, Tonomura Y, Yoshida, H, Sakai, S and Inoue, S: Orirubenones A, B and C. novel hyaruronan-degradation inhibitors from the mushroom *Tricholoma orirubens*, *Tertaedron*, **60**, 7049-7052 (2004)
- 6) 八藤 真: 生体分子 (グルコサミノグリカン) の低分子化による吸収性, 食の科学, **12** (通巻 334), 60-66 (2005)
- 7) Mausolf, M, Jungman, J, Robenek, H and Preham, P: Shedding of hyaluronate synthase from *Streptococci*, *Biochem J*, **267**, 191-196 (1990)
- 8) Kusuda, M, Ueda, M, Konishi, Y, Yamanaka, K, Terashita, T and Miyatake, K: Effects of carbohydrate substrate on the vegetative mycelial growth of an ectomycorrhizal mushroom, *Tricholoma matsutake*, isolated from *Quercus*, *Mycoscience*, **48**, 358-364 (2007)
- 9) Morgan, W T J and Elson, L A: A colorimetric method for the determination of *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylcondrosamine, *Biochem J*, **28**, 988-995 (1934)

- 10) Murata, Y, Miyamoto, E, Seo, S-H and Kawashima, S: Colorimetric 2-nitrophenylhydrazine coupling method, *Yakuzaigaku*, **51**, 246-249 (1991)
- 11) 菅原龍幸・服部津貴子: きのこの成分, きのこー健康食材としてー, 日本特用林産振興会, 東京, pp 1-23 (2001)
- 12) 白坂憲章・荒木賢人・渡邊智子・寺嶋芳江・寺下隆夫: 食用きのこ菌糸体のトレハロース蓄積および抗酸化活性に及ぼすトレハロース添加培養の効果, *日本きのこ学会誌*, **13**, 103-108 (2005)
- 13) 寺下隆夫: きのこの特徴的な化学成分ーその機能と利用ー, *FFI Journal Japan*, **211**, 108-116 (2006)
- 14) Shirasaka, N, Yoshida, K, Terashima, Y, Watanabe, T, Ayusawa, S and Terashita, T: Effect of trehalose on the heat tolerance of *Lentinula edodes* mycelia, *Mushroom Sci Biotechnol*, **14**, 11-148 (2006)
- 15) 寺嶋芳江・渡邊智子・鈴木亜夕帆・白坂憲章・寺下隆夫: シイタケ培地へ添加したトレハロースの子実体への影響 (第1報), 添加量と子実体の収量, 含有量, 鮮度保持, 食味との関係, *木材学会誌*, **55**, 170-175 (2009)
- 16) Terashita, T, Ueda, M, Yoshikawa, K, Kono, M and Shishiyama, J: Changes in chitin and *N*-acetylglucosamine contents and chitinolytic enzyme activities during the growth of *Flammulina velutipes* fruit-bodies, *Nippon Shokuhin Kougyougakkaiishi*, **39**, 827-835 (1992)
- 17) 北本 豊・寺下隆夫・松田末広・小畑勝義・細井 登・河野又四・市川吉夫: アミスギタケの炭水化物代謝ー子実体形成における栄養菌糸と子実体の炭水化物の代謝変動ー, *日本菌学会会報*, **19**, 273-281 (1978)
- 18) 吉田 博・菅原龍幸・林 淳三: ヒラタケ子実体の発育過程ならびに収穫後における炭水化物および有機酸の変化, *日本食品工業学会誌*, **34**, 288-297 (1987)
- 19) Gherezghiher, T, Koss, M C, Nordquist, R E and Wilkinson, C P: Rapid and sensitive method for measurement of hyaluronic acid and isomeric chondroitin sulfates using high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr*, **413**, 9-15 (1987)
- 20) Karlsson, G and Bergman, R: Determination of the distribution of molecular masses of sodium hyaluronate by high-performance anion-exchange chromatography, *J Chromatogr A*, **986**, 67-72 (2003)
- 21) Homer, K A, Denbow, L and Beighton, D: Spectrophotometric method for the assay of glycosaminoglycans and glycosaminoglycan-depolymerizing enzymes, *Analytical Biochem*, **214**, 435-441 (1993)