

# $\beta$ -グルカン高含有キノコを用いた新規食感改良剤の開発

兵庫県立大学環境人間学部

新田 陽子

研究はI, IIとしてまとめた。また、2011年9月28-30日 岡山大学で開催された高分子討論会で「 $\beta$ -グルカン高含有キノコ抽出液のゲル形成」という題目で口頭発表を行った。

## 研究 I

### <ハナビラタケ抽出液ゲルの破断特性>

#### 1. 緒言

ハナビラタケは、歯ごたえがよく、食味も良いが、非常に僅少なきのであるため高級食材である。また、キノコの機能成分として知られている $\beta$ -グルカン、特に $\beta$ -(1,3)-D-グルカンを主成分として多量に含むキノコ(文献①)である。最近このハナビラタケをピューレ状にして加熱冷却すると、ゲル化を形成することが判明した。このような現象は他のキノコでは見られず、ハナビラタケ特有のものである。もし、ハナビラタケをゲル化剤として利用できれば、少量で大量の水分を保持することができるので、少量添加、すなわち低価格化を実現できる。同じように冷却してゲルとなり、再び加熱するとゲルが融解するものは、寒天やゼラチンなどが挙げられ、ゲル化剤として利用範囲が非常に広い。ハナビラタケに含まれる $\beta$ -1,3グルカンは菌類の細胞壁に多く存在しており、自然免疫の活性化により(文献②)抗がん作用や(文献③)HIV作用(文献④)を持つことから、機能性成分を含むゲル食品となる可能性が高いので、消費者にとって魅力的で付加価値が高く、寒天やゼラチンに代わる食材になると期待できる。本研究では、ハナビラタケのゲル化成分抽出からゲル作成まで食品として利用できる試料を用いゲル作製を試みた。さらにゲル特性やテクスチャーを調べるために前回の実験より寒天ゲルで得られた結果をもとに、ハナビラタケゲルと寒天ゲルとのゲルの特性とテクスチャーの比較を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料

大和菌学研究所より提供されたハナビラタケのつぼみを使用した。

### 2.2 ハナビラタケのゲル化成分抽出

テクスチャーを評価するため作製したゲルを口に入れるので、食品に使用できる試料を用い抽出した。

#### (1) 1回目抽出

ハナビラタケのつぼみに1:1になるように水を加え

ミキサーでペースト状にした。その後ハナビラタケのペーストを鍋に入れ蒸発分の水を加えながら5分中火で加熱した。加熱したピューレを50mlチューブにいれ10分、10000rpmで遠心分離したのち上層と沈殿(沈殿1)に分けた。上層を鍋に移し火にかけ沸騰したら、エタノールを50%(v/v)になるように加え、アルコール沈殿を行った。沈殿物を取り出し、1日放置し乾燥させた。

#### (2) 2回目

沈殿1に1:1になるように水を加え、鍋に移し20分間沸騰させながら混ぜ、蒸発分の水を足した。加熱したピューレを、50mlチューブに入れ、10分、10000rpmで遠心分離した。上層と沈殿(沈殿2)に分け、上層を鍋に移し火にかけ、沸騰したらエタノールを50%(v/v)になるように加えた。その後、エタノール処理したものを10分、10000rpmで遠心分離し、上層と沈殿とに分けた。沈殿物に再びエタノールを入れ10分、10000rpmで遠心分離をかけ、沈殿物を洗った。上層部分を捨て沈殿物を1日放置し乾燥させた。

#### (3) 3回目

沈殿物2を上記2回目と同じように処理し、沈殿物を得た。

## 2.3 ゲルの作成

2で抽出し乾燥させた成分を1.5%添加になるように水を加え、ホモジナイザーで分散させた。分散液を沈殿管の中に入れ、レンジで沸騰するまで加熱し、攪拌棒で混ぜる操作を3~4回繰り返した。その後直径2cm高さ1cmの円柱状ゲル作製容器に入れフィルムで密閉し、冷蔵庫(4℃)で固めた。

## 2.4 破断測定

3で作製したゲルを卓上型物性測定器(山電のテクスチャーメータ、品番:TPU-2C)で直径2cm高さ1cmの円柱状ゲル作製容器で固めたゲルを3つずつ破断させ、見かけの破断応力、歪、破断エネルギー、破断応力を得た。(圧縮速度は1mm/se)見かけの応力、破断エネルギー、破断応力の算出方法は以下の通りである。見かけの破断応力は、試料その物の断面積を破断するのに要した力(文献⑤)であり、公称応力から求められる。破断エネルギーとは、試料を破壊するのに要する仕事量のこと、破断に至るまでの仕事量として応力-歪曲線が破断点までに描く面積であり、試料に加える力が大きく、なおかつ試料の変形量が

大きいほど破断エネルギーは大きくなる (文献⑥)。破断エネルギーを算出するために、公称応力での応力-歪曲線

$$E_n = \int_0^{f_f} P d\varepsilon \quad (E_n: \text{破断エネルギー} \quad P: \text{公称応力} \quad \varepsilon: \text{歪} \quad f_f: \text{破断歪})$$

破断応力は、平らな試料表面にプランジャーを押し込むのに要した力、試料表面の凹みの面積当たりの力なり、真の応力から求めることができる (文献⑤)。真の応力は、体

積が圧縮によって変化しないという仮定のもと算出した。真の応力を導く際に必要なサンプルの面積の求め方は以下のとおりである。

$$\begin{aligned} \text{面積 (m}^2\text{)} &= 0.01 \times 0.01 \times \text{円周率} \times \text{サンプル厚さ (mm)} \div \{ \text{サンプル厚さ (mm)} \times (1 - \text{歪}) \} \\ \text{真の応力 (N/m}^2\text{)} &= \text{応力 (N/m}^2\text{)} \times 0.01 \times 0.01 \times \text{円周率} \div \text{面積 (m}^2\text{)} \end{aligned}$$

## 2.5 $\beta$ -グルカン定量

$\beta$ グルカン定量は GEM Assay (文献⑦) に従って行った。

2の(1)~(3)で得た抽出物それぞれに含まれている $\beta$ -グルカンの量を測定した。2の(1)~(3)で抽出した成分をそれぞれアセトン処理し、乾燥させて得た。15~20 mgの試料を15 ml チューブに入れ、2 M 水酸化カリウム (KOH) を400  $\mu$ l 添加しボルテックスミキサーで攪拌した。ただちに氷上で20分間放置した。その後1.2M 酢酸溶液 (pH 3.8) を1.6 ml 添加、10U/ $\mu$ l lyticase (0.01 M Tris 0.001M EDTA, 0.02M NaCl) を600  $\mu$ l 添加して50°Cで12~18時間放置した。放置後、室温で130  $\mu$ l を取り出し、1.5 ml チューブに入れ、0.2M 酢酸溶液 (pH 5) を572  $\mu$ l、100U/ml exo-1,3- $\beta$ -D-glucanase と20U/ml  $\beta$ -glucosidase を含む溶液を78  $\mu$ l 添加して40°Cで1時間放置した。1.5 ml のチューブにブランク、グルコーススタンダード、サンプル溶液を作製し、それぞれに1000  $\mu$ l の GOPOD Reagent (メガザイム社) を添加したのち、40°Cで20分間放置した。波長540 nm で吸光度を測定し、 $\beta$ -グルカンが含まれている量を求めた。吸光度から $\beta$ -グルカン量を算出する方法は以下の通りにある。

まず、グルコーススタンダードで検量線を作成し、サンプル溶液の吸光度により得た数値を検量線  $Y = a X$  の  $Y$  にあてはめ濃度  $X$  を求める。求めた数値に $\beta$ グルカン定量用の換算計数0.9をかけ1 ml 中のハナビラタケ成分で割り、 $\beta$ -グルカンの濃度を求める。

## 2.6 寒天ゲルとの比較

粉寒天 (市販: 食用)、砂糖 (市販: 食用) でゲルを作製した。水に粉寒天を混合し、溶けるまで湯煎した。蒸発分の水を足し、直径2 cm、高さ1 cm の円柱状ゲル作製容器に流し込んだ。容器をフィルムで密封し、冷蔵庫 (5°C) で冷却した。破断測定を行い、ハナビラタケゲルと破断応力、歪、破断エネルギー、見かけの破断応力を比較した。

## 2.7 官能評価

ハナビラタケゲルのテクスチャーについて直径2 cm 高さ1 cm の円柱状ゲルを口に入れ、舌でつぶすことにより評価した。

## 3. 実験結果

### 3.1 ハナビラタケ成分の抽出・ゲルの作製

ハナビラタケのつぼみからエタノール沈殿により1回目は0.07%、2回目0.18% 3回目0.12%の抽出物が得られた。1回目の抽出物は白っぽく、2回目以降の抽出物は黒っぽいものであった。その成分で1.5% 添加のゲルを作製したところ、1回目の抽出物ではほとんどゲル化せず、2回目以降の抽出物ではゲルを作成できた。ゲルの色は白濁しており、10°C以上では離水がみられた。

ハナビラタケゲル



### 3.2 破断測定・寒天ゲルとの比較

2回目の抽出物より作成し、ゲルを破断測定した結果を表1, 2に示した。ハナビラタケゲル (表1, 2) は歪0.35、見かけの破断応力  $3.12 \times 10^3$  Pa、破断エネルギー 0.35 kJ/m<sup>2</sup>、破断応力  $2.04 \times 10^3$  Paであった。寒天ゲル (表3, 4) と比較すると破断歪みが大きい、その他の破断エネルギーや破断応力、見かけの破断応力の値は、かなり小さい値となった。応力-曲線を見ると、ハナビラタケゲルは、なだらかな曲線を描き、小さな応力で破断されたが、寒天ゲルは急激に上がり、早い段階でゲルが破断されているという違いがあった。

1.5% ハナビラタケゲル

表 3.1 見かけの破断応力

	1	2	3	平均	標準偏差
見かけの破断応力[10 <sup>3</sup> Pa]	3.27	3.04	3.04	3.12	±0.14
破断歪	0.36	0.34	0.34	0.35	±0.01
破断エネルギー[kj/m <sup>2</sup> ]	0.35	0.34	0.35	0.35	±0.006
初期弾性率[10 <sup>3</sup> Pa]	1.59	1.67	1.64	1.63	±0.04

表 3.2 破断応力

	1	2	3	平均	標準偏差
破断応力[10 <sup>3</sup> Pa]	2.04	2.02	2.00	2.02	±0.02
破断歪	0.36	0.34	0.34	0.35	±0.01
初期弾性率[10 <sup>3</sup> Pa]	1.30	1.16	1.59	1.35	±0.22

1.0% 寒天ゲル

表 3.3 見かけの破断応力

	1	2	3	平均	標準偏差
見かけの破断応力[10 <sup>3</sup> Pa]	26.06	24.74	24.97	25.26	±0.71
破断歪	0.23	0.22	0.21	0.22	±0.01
破断エネルギー[kj/m <sup>2</sup> ]	2.24	1.98	2.01	2.08	±0.14
初期弾性率[10 <sup>3</sup> Pa]	22.48	20042	24.18	22.23	±2.08

表 3.4 破断応力

	1	2	3	平均	標準偏差
破断応力[10 <sup>3</sup> Pa]	20.00	19.12	19.58	19.57	±0.44
破断歪	0.22	0.22	0.21	0.22	±0.01
初期弾性率[10 <sup>3</sup> Pa]	23.02	17.07	26.47	22.19	±4.75

3.3 β-グルカン定量

1 回目, 2 回目, 3 回目での抽出物を定量し, スタンダードの吸光度 (表 1 ~ 3) より検量線を作成し, サンプルの

吸光度から上記の実験方法 5 により濃度を算出した結果, 1 回目 25%, 2 回目が 86%, 3 回目 71% の β-グルカンが含まれているという結果になった。

表 4.1 1 回目吸光度

1回目	添加量(μm)	吸光度(nm)
ブランク		
スタンダード1	5	0.109
スタンダード2	10	0.223
スタンダード3	15	0.339
スタンダード4	20	0.427
サンプル1(1倍)	5	0.013
サンプル2(2倍)	10	0.078
サンプル3(3倍)	15	0.116

表 4.2 2 回目吸光度

2回目	添加量(μm)	吸光度(nm)
ブランク		
スタンダード1	5	0.121
スタンダード2	10	0.214
スタンダード3	15	0.339
スタンダード4	20	0.46
サンプル1(1倍)	5	0.139
サンプル2(2倍)	10	0.254
サンプル3(3倍)	15	0.46

表 4.3 3 回目吸光度

3回目	添加量(μm)	吸光度(nm)
ブランク		
スタンダード1	5	0.115
スタンダード2	10	0.236
スタンダード3	15	0.37
スタンダード4	20	0.463
サンプル1(1倍)	5	0.12
サンプル2(2倍)	10	0.259
サンプル3(3倍)	15	0.328

### 3.4 官能評価

約1.5%ハナビラタケゲルと1%寒天ゲルのテクスチャーを比較した(試験者2名)。寒天ゲルは弾力があり、潰すのに力があるのに対し、ハナビラタケゲルは柔らかかく、潰すという表現よりは口に入れるとすぐに溶けていくテクスチャーであった。

### 4. 考察

ハナビラタケのゲルは寒天と同じく離水しやすいという特徴がみられた。寒天では砂糖の添加により砂糖と水が水和するため離水を防ぐことができる(文献⑧)ので、ハナビラタケゲルでも砂糖添加により同様の効果が得られる可能性がある。また砂糖を入れることにより、寒天の場合、ゲルの透明度が増したので、ハナビラタケゲルも砂糖添加により、白濁したゲルをより透明度のあるゲルを作製することができるかもしれない。ゲル化成分抽出では、高分子の多糖類、核酸、タンパク質などを沈殿させるエタノール処理により行ったため、ハナビラタケに含まれる、タンパク質や、主成分であると言われている $\beta$ -グルカン(文献①)などの高分子が沈殿され抽出されたと考えられる。1回目の熱水抽出では $\beta$ -グルカンの濃度が低かったのはタンパク質などの $\beta$ -グルカン以外の高分子に由来する沈殿物が多かったのだと考えられる。(文献⑨)1回目でタンパク質やグリコーゲンなどが回収されて、2回目以降はハナビラタケ固体中の絶対量が多い $\beta$ -グルカンが多く回収されたと考えられる(文献①)。1回目の抽出成分がゲル化せず、2回目以降の抽出物がゲル化したのは、2回目以降の $\beta$ -グルカン濃度が高いことが関係していると考えられる。

ハナビラタケゲルの破断応力、初期弾性率、見かけの破断応力については寒天よりも非常に小さかった。しかし、寒天に比べ破断歪が大きかったため寒天よりもしなやかなゲルであると思われる。官能評価の比較では、寒天ゲルは粘りがなく、もろく弾力のあるゲルであるのに対し、ハナビラタケゲルは、舌触りがつるんと滑らかで口だけの良いテクスチャーであるという違いが見られた。これは、融点が約30℃付近で口の中で溶けるゲル特性があるゼラチンに近いように感じた(文献⑩、⑧)。しかし、口の中で溶けるが、粘りがなく、つるんとした舌触りは寒天ゲルに近いものを感じた。よってハナビラタケゲルは、両方の特性を備えた新しい食感であると考えられる。

硬さについての評価は、試験者が2名で予備実験の域ではないが、官能評価においても寒天の方が硬いという結果であった。破断測定による硬さの評価法についてはまだ検討段階であるが、総合的にみて、ハナビラタケゲルよりも寒天の方がテクスチャーとして硬いと評価されるゲルになると思われる。

### 5. 今後の課題

今回の実験では、ゲル化成分の抽出量が少なく1度に作れるゲルが多く作れなかったこと、離水しやすかったため

官能評価のための試料を作り置きできなかったことが原因で試験者2人の官能評価となってしまい、有意差検定が可能な評価を得ることができなかった。1度にとれるゲル化成分の増加、離水しにくい条件を見つけることが今後の課題である。また、寒天やゼラチンに代わる新たなゲル化食品として用いられるためにも、ゲルの透明度を上げること、ゲルの硬さ強化など食品として扱いやすいゲルへの向上が必要である。

### 文献

- ① ハナビラタケ抽出物 特許 宿前利郎 大野尚仁
- ② 多糖 $\beta$ -グルカンの受容体を利用したオリゴ核酸の選択的デリバリー 望月慎一 櫻井和朗
- ③ Di Luzio NR, Williams DL, McNamee RB, Edwards BF, Kitahama A: Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucan. *Int J Cancer* 24:773-779, 1979.
- ④ Jagodzinski PP, Wiaderkiewicz R, Kurzawski G, Kloczewiak M, Nakashima H et al: Mechanism of the inhibitory effect of curdlan sulfate on HIV-1 infection in vitro. *Virology* 202:735-745, 1994.
- ⑤ 食品のレオロジー 磯直道 水野直道 小川廣男
- ⑥ 「おいしさのレオロジー」中濱信子, 大越ひろ, 森高初恵 弘学出版 P28
- ⑦ Danielson, M. E., R. Dauth, N. A. Elmasry, R. R. Langeslay, A. S. Magee and P. M. Will (2010). Enzymatic method to measure beta-1,3-beta-1,6-glucan content in extracts and formulated products (GEM assay). *J Agric Food Chem*, 58, 10305-10308.
- ⑧ 新食品・栄養科学シリーズ 調理学 木戸詔子 池田ひろ
- ⑨ きのご類の水溶性食物繊維の製造法特許 岡田研 山内政明 三浦喜美子
- ⑩ ゼラチンゲルの融点及び物性に及ぼすトランスグルミナーゼの作用 添田孝彦, 金子智子, 外園亜紀子, 辻本久美子, 村上春香

## 研究Ⅱ ＜ハナビラタケ由来多糖類成分を含む 水溶液のゲル化過程の解析＞

### 1. 緒言

ハナビラタケは、キノコの機能性成分として知られる多糖類の $\beta$ グルカン、 $\beta$ -(1,3) (1,6) -グルカンを多量に含むキノコで、食味がよく、高級食材として販売されている他、粉末状にしたものは健康食品として販売されている。ハナビラタケは「幻のキノコ」と呼ばれるほど自生のものはなかなか見つからず、人工栽培が非常に困難なため高価格となり、あまり多く出回っていない。しかし、いくつかの業者がハナビラタケの人工栽培に取り組み、ある程度の供給が可能となったことから、キノコそのものを食す以外の展開、応用が探られてきた。その中で、ハナビラタケをピューレ状にして加熱後冷却すると、ゲルを形成することが最近判明した。現在わかっていることは、ハナビラタケと水をミキサーにかけてピューレ状にしたものを、加熱してから冷却するとゲルを形成するという事実と、そのゲルを再び加熱すると融解する熱可逆性をもつことである。ゲル化のために必要な成分やその他の条件については不明である。

ハナビラタケをゲル化剤として利用できれば、少量で多量の水分を保持することができるので、少量の添加、すなわち低価格で済ませることができる。また、ハナビラタケは免疫力を活性化させると言われている $\beta$ -(1,3) (1,6) -グルカンを乾燥重量当たり 40w/w% 以上含んでおり他のキノコに比べて非常に多い<sup>1)</sup>。ハナビラタケ由来の $\beta$ グルカンについては、抗腫瘍作用<sup>2)</sup>、造血促進作用<sup>3)4)</sup>、ヒト末梢血白血球からのサイトカイン産生誘導作用<sup>5)</sup>などが報告されている。このような機能性成分を含み、なおかつ水溶性食物繊維の一種であり、特有の粘性を持つ $\beta$ グルカンを多量に含んでいる<sup>6)</sup>ため、今までにない食感を有するゲル状食品になる可能性が高い。これらのことから、ハナビラタケをゲル化剤として使用することで、消費者にとって魅力的で、付加価値の高い食品を提案できると思われる。

食品添加物として増粘剤となる材料は多くの種類が存在するが、ゲル化剤となる材料は限られている。ハナビラタケに見られるような、冷却してゲルになり、再び加熱するとゲルが融解するものは更に限られてくる。しかし、寒天やゼラチンに見られるように、そのようなゲルを作るゲル化剤は利用範囲が非常に広い。多様なニーズに合わせて、複数のゲル化剤を混合して利用することもあるが、その選択肢の一つとしてハナビラタケ由来のゲル化剤が大いに活用されると思われる。

多糖類のゲル化成分として、 $\beta$ -(1,3) (1,6) -グルカンが報告された例が見られないことから、もしハナビラタケ由来の $\beta$ -(1,3) (1,6) -グルカンがゲル化成分であれば、新規の成分によるゲル化であり、学術的にも重要な知見となる。

本研究では、ハナビラタケピューレから多糖類を抽出し、その抽出液のゲル化をレオロジー測定により調べた。また、

$\beta$ グルカン定量を行い、抽出液に含まれる $\beta$ -(1,3) (1,6) -グルカンの量を推定した。

### 2. 実験方法

#### (1) 試料

ハナビラタケ（やまと花びらたけ [大和菌学研究所]）に水を加えてミキサーでピューレ状にしたものを使用した。

#### (2) 試料抽出方法

$\beta$ グルカンを含むハナビラタケ成分の抽出は、宿前らの方法に若干の修正を加えて行った<sup>7)</sup>。ハナビラタケピューレに同量のメタノールを添加し、攪拌後静置した。上清を除き、残渣とクロロホルムを1:1の割合で混合させ、1日以上攪拌した。攪拌後、アスピレーターで吸引ろ過し、残渣をろ紙にはさんで乾燥させた。乾燥した物質の重さを量り、50倍の純水に分散させ、85℃湯煎内でとろみがつくまで攪拌した。25℃、10000 rpm、10分の遠心分離で得られた上清を、その4倍量のメタノール中に滴下し、繊維状の沈殿物を得た。沈殿物を純水に溶解させ、85℃湯煎内で攪拌した。上清と同量のエタノールを添加して攪拌し、再び繊維状の沈殿物を得た。25℃、10000 rpm、10分の条件で遠心分離して上清を除き、適量のアセトンを添加してボルテックスミキサーで攪拌した。その後、再度遠心分離して上清を除いて空気乾燥させた。乾燥させた沈殿物をハナビラタケ抽出物とした。

#### (3) レオロジー測定

ハナビラタケ抽出物を2.0 w/w%になるよう水に分散させ、1晩以上室温で攪拌した。その後90℃で10分間攪拌しながら加熱したものをレオロジー測定用の試料とした。また、グルコース・塩化ナトリウムがレオロジー特性に及ぼす影響を検討するため、グルコース添加試料・塩化ナトリウム添加試料を調製した。グルコース添加試料は、ハナビラタケ抽出物をグルコースと水の重量の合計に対して2.0 w/w%になるよう水に分散させ、一晩以上室温で攪拌した。その後80℃湯煎内でグルコースを添加・攪拌した後、90℃で10分間攪拌しながら加熱した。グルコース添加濃度は20, 30, 40 w/w%とした。塩化ナトリウム添加試料は、ハナビラタケ抽出物を2.0%になるよう100mM NaCl溶液に分散させ、1晩以上室温で攪拌した。その後90℃で10分間攪拌しながら加熱して調製した。測定はHAAKE社のレオストレステスRS600を用い、ジオメトリはPP35Tiを使用した。ただし、グルコース40 w/w%添加の試料のみすり付きのジオメトリPP20を使用した。サンプルの蒸発を防ぐために、プレートの周りをシリコンオイルで覆い、循環恒温槽でプレート温度を制御した。貯蔵剛性率 $G'$ と損失剛性率 $G''$ の応力依存性を調べて線形領域を確認した後、0.1 ~ 50 rad/sの範囲で貯蔵剛性率 $G'$ と損失剛性率 $G''$ の周波数依存性を調べた。測定温度はA.Botらが行ったシゾフィラン溶液の立体構造転移に対するグルコー

スの影響<sup>8)</sup>をレオロジー測定で調べた測定温度を参考にした。30℃から開始し、10℃か5℃または2.5℃間隔で冷却し、その都度レオロジー測定を行った。2℃まで冷却したあとは、10℃か5℃または2.5℃間隔で加熱し、その都度レオロジー測定を行った。

#### (4) $\beta$ グルカン定量

酵素法およびメガザイム社のグルコース定量キットを用いて定量を行った (GEM Assay<sup>9)</sup>)。20 mg の試料を 15 ml ファルコンチューブに入れ、冷 2 M 水酸化カリウム溶液を 400  $\mu$ l 添加した後、ボルテックスミキサーで攪拌し、直ちに氷上で 20 分放置した。1.2 M 酢酸溶液 (pH3.8) を 1.6 ml 添加し、10 U/ $\mu$ l lyticase (0.01M Tris, 0.001M EDTA, 0.02M NaCl) を 600  $\mu$ l 添加して 50℃で 12~18 時間放置した。室温で 130  $\mu$ l を取り出し、1.5 ml チューブに入れ、0.2M 酢酸溶液 (pH5) を 572  $\mu$ l、100U/ml exo-1,3- $\beta$ -D-glucanase と 20U/ml  $\beta$ -glucosidase を 78  $\mu$ l 添加して 40℃で 1 時間放置した。1.5 ml チューブに、ブランク、スタンダード、サンプルを作成した。1000  $\mu$ l の GOPOD Reagent を添加し、40℃で 20 分間インキュベートした後、吸光度を測定した。GE ヘルスケア社の Gene Quant 100 を用い、510 nm の波長で測定を行った。

### 3. 結果と考察

#### (1) $\beta$ グルカン定量

ハナビラタケに含まれる高分子のうち、主成分は  $\beta$ -(1,3)(1,6)-グルカンと言われている<sup>10)</sup>。熱水抽出において可溶性の  $\beta$ -(1,3)(1,6)-グルカンが主に得られるという報告があることから<sup>7)</sup>、今回得られた試料を酵素法により  $\beta$ グルカン定量を行った。吸光度測定により導かれた検量線から、 $\beta$ グルカン含量を求める式は以下の通りである。

検量線式:  $y=0.1388x$

$\beta$ グルカン含量 (mg/ml) = (吸光度  $\div$  0.1388)  $\times$  0.9

$\beta$ グルカン割合 (%) =  $\beta$ グルカン含量 (mg/ml)  $\div$  1.28  $\times$  100

ここで、0.9 という値は、GEM Assay における特有の係数である。また 1.28 という値は吸光度を測定する試料に含まれるハナビラタケ抽出物の 1 ml あたりの重量である。この式に測定で得られたサンプルの吸光度を当てはめて計算したところ、サンプル 5  $\mu$ l では 78%、サンプル 10  $\mu$ l では 74%、サンプル 15  $\mu$ l では 74% の  $\beta$ グルカンが含まれているという計算結果になった。2 つのサンプルで 74% という割合が出たことから、この数字が信用できると考えた。ハナビラタケ抽出物には 74% の  $\beta$ -(1,3)(1,6)-グルカンが含まれていると推定した。

#### (2) ハナビラタケ抽出物

ハナビラタケピューレ 200 g から平均で 64.5 mg の抽出物が得られた。この値から収率を算出すると 0.032% と非常に小さい値であった。ピューレ状態は白濁していたが、

熱水抽出・遠心分離後の上澄みは透明であった。ハナビラタケ抽出物を 2.0 w/w% になるよう分散させたところ、透明で粘性の高い溶液が得られた。その溶液を加熱・冷却すると透明性が高く、離水がみられないゲルのようなものが得られた。収率が低く、透明度が高いものが得られたことから、微量の水溶性の高い高分子、 $\beta$ グルカンを回収できたと考えられた。

#### (2) レオロジー測定

レオロジー測定により貯蔵剛性率  $G'$  および損失剛性率  $G''$  の周波数依存性を調べて、ゲル化を判定した。「真のゲル」型または「弾性的ゲル」型は、 $G'$  の方が  $G''$  より 10 倍以上大きく、 $G'$  も  $G''$  も周波数依存性がなく、特に低周波領域で  $G'$  が平坦部を示す挙動である。これに対し、濃厚溶液型挙動は、低周波数では  $G'' > G'$  であるが、高周波数では  $G' > G''$  となるようなレオロジー的挙動を示し、鎖状高分子濃厚溶液によく見られる。「弱いゲル」型の挙動とは、濃厚溶液型の挙動と弾性的ゲルとの中間のレオロジー的挙動である。この挙動は、 $G' > G''$  ではあるが、 $G'$  も  $G''$  もわずかに周波数依存性を示す場合が多い。希薄溶液型の挙動では全周波数領域にわたり  $G'' > G'$  で、 $G'$  も  $G''$  も周波数増加に伴い著しく増加するような挙動を示す<sup>11)</sup>。

30℃では測定周波数全範囲で貯蔵剛性率  $G'$  が損失剛性率  $G''$  より大きくなった (図 1)。 $G'$ 、 $G''$  とともに周波数依存的に値が大きくなり、その傾向が  $G'$  の方が顕著であったことから、「弱いゲル」型の挙動を示唆している。ただし、「弱いゲル」型の挙動を示す場合は流動性があるためゲルではなく、ゾルとみなされる。ゲルの場合、測定周波数全範囲で  $G'$  が  $G''$  より大きく、損失正接  $\tan \delta$  が 0.1 以下で  $G'$  の値が  $G''$  の 10 倍以上である。また、 $G'$ 、 $G''$  の値が周波数にほぼ依存しない。2℃での  $G'$ 、 $G''$  の周波数依存性は「ゲル」型の挙動であった (図 2)。以上より、熱水抽出により得られた成分を含む溶液は 2℃まで冷却することによりゲルを形成すると考えられた。

次に、グルコース添加による影響を調べた。図 3、図 4 にグルコース 20% 添加試料の 30℃、7.5℃での周波数依存性の挙動を示した。30℃では  $G'$ 、 $G''$  が周波数増加に伴って増加し、 $\tan \delta$  が 0.1 以上であったことから、「弱いゲル」型の挙動と判断した。7.5℃まで温度を下げると、 $G'$  の値が  $G''$  の 10 倍以上となり、 $\tan \delta$  が 0.1 以下になった。また、 $G'$ 、 $G''$  の周波数依存性がほぼなくなり、平坦を示した。このことから、グルコース 20% 添加試料は 7.5℃まで冷却することでゲルを形成すると考えられた。図 5、図 6 にグルコース 40% 添加試料の 30℃、15℃での周波数依存性を表した。30℃では周波数増加と共に  $G'$ 、 $G''$  の値が増加し、 $\tan \delta > 0.1$  であったので「弱いゲル」と判断した。15℃では  $\tan \delta < 0.1$  で  $G'$  の値が  $G''$  の 10 倍以上となり、周波数にほぼ依存しなかった。したがって、グルコース 40% 添加試料は 15℃まで冷却することによりゲルを形成すると考えられた。

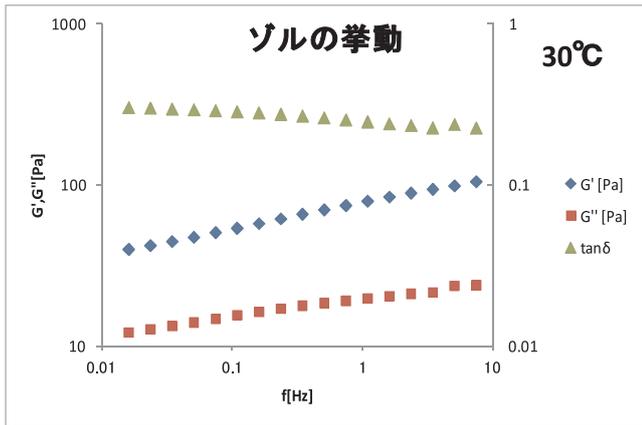


図1 2.0% ハナビラタケの  $G'$ ,  $G''$ ,  $\tan \delta$  の周波数依存性  
測定温度: 30°C  
応力: 1.2 Pa

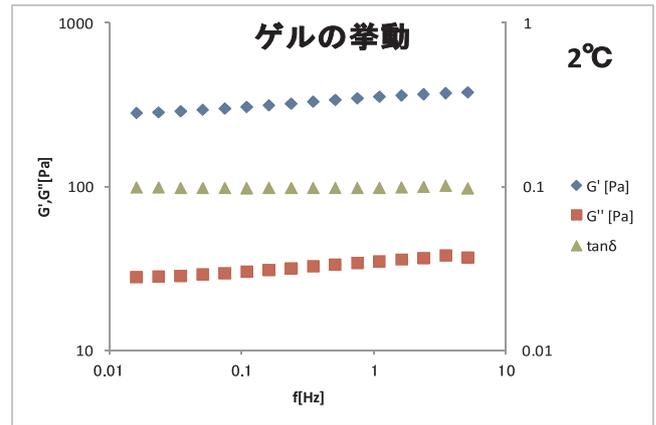


図2 2.0% ハナビラタケの  $G'$ ,  $G''$ ,  $\tan \delta$  の周波数依存性  
測定温度: 2°C  
応力: 1.2 Pa

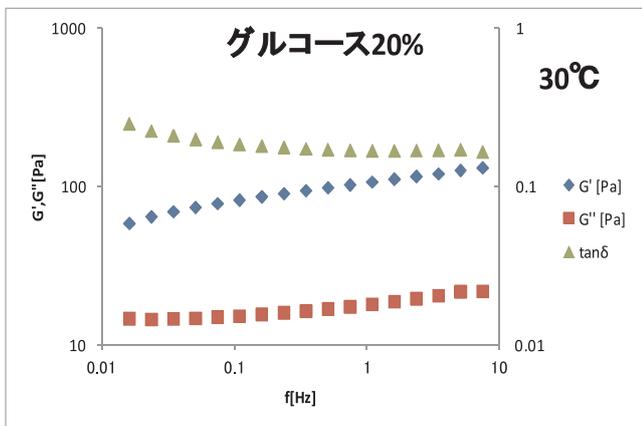


図3 2.0% ハナビラタケの  $G'$ ,  $G''$ ,  $\tan \delta$  に対する  
グルコースの影響  
グルコース添加濃度: 20%  
測定温度: 30°C  
応力: 1.2 Pa

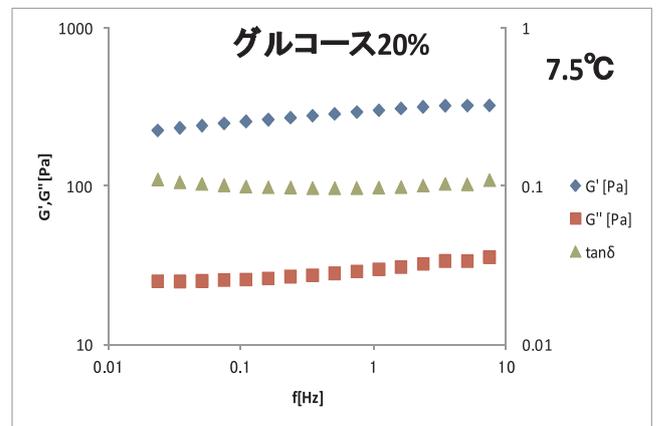


図4 2.0% ハナビラタケの  $G'$ ,  $G''$ ,  $\tan \delta$  に対する  
グルコースの影響  
グルコース添加濃度: 20%  
測定温度: 7.5°C  
応力: 1.2 Pa

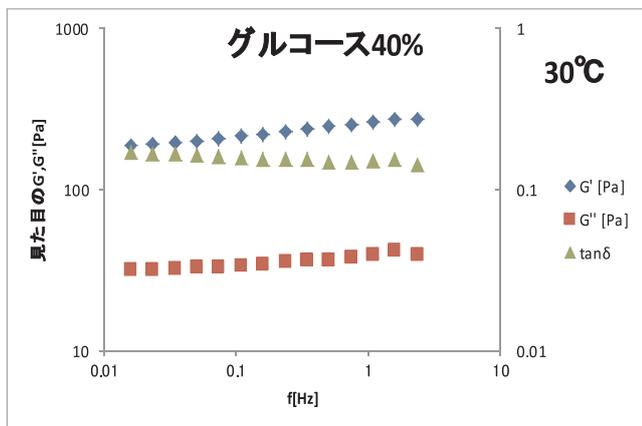


図5 2.0% ハナビラタケの  $G'$ ,  $G''$ ,  $\tan \delta$  に対する  
グルコースの影響  
グルコース添加濃度: 40%  
測定温度: 30°C  
応力: 1.2 Pa

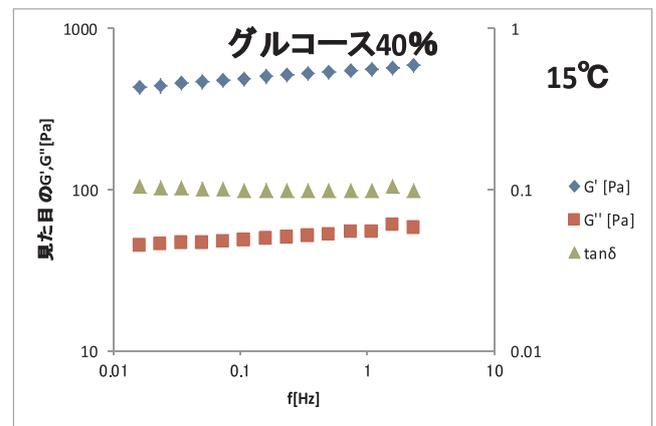


図6 2.0% ハナビラタケの  $G'$ ,  $G''$ ,  $\tan \delta$  に対する  
グルコースの影響  
グルコース添加濃度: 40%  
測定温度: 15°C  
応力: 1.2 Pa

図7, 図8にグルコース添加試料の降温過程と昇温過程の $G'$ を示した. 図中の点線は高温側(30℃付近)の $G'$ の温度変化を低温側に外挿したことを表している. 降温過程において, グルコース0%添加試料では5℃で外挿した値からはずれ,  $G'$ の値が顕著に増加した. グルコース20%添加試料では7.5℃, グルコース30%添加試料では10℃, グルコース40%添加試料では15℃以下になると $G'$ の値が外挿した値より著しく増加した. グルコース添加濃度が高くなるにつれて,  $G'$ が急増し始める温度も高くなり, ゲル形成が促進された. また, 同様に昇温過程においても高濃度のグルコースを添加した試料ほど, 高温で外挿した値からはずれ,  $G'$ の値が急減した. 以上より, ゲル化温度・融解温度はグルコース濃度の増加に伴い, 高温側に移行したと考えられる. これは, A.Botらが行ったシゾフィラン溶液の立体構造転移に対するグルコースの影響と同様

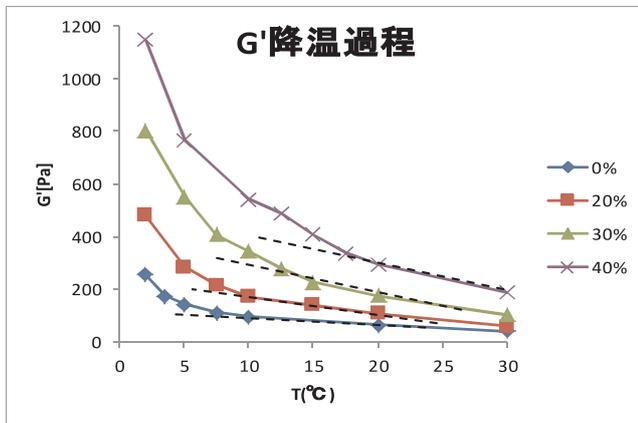


図7 降温過程の2.0%ハナビラタケの $G'$ に対するグルコース濃度の影響

グルコース添加濃度: 0, 20, 30, 40%  
周波数: 0.0159 Hz  
応力: 1.2 Pa

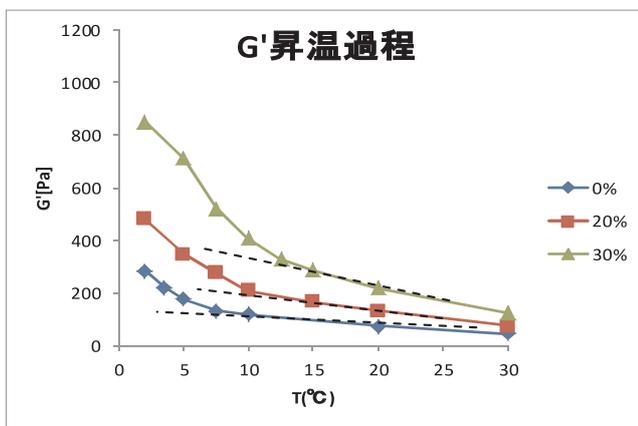


図8 昇温過程の2.0%ハナビラタケの $G'$ に対するグルコース濃度の影響

グルコース添加濃度: 0, 20, 30%  
周波数: 0.0159 Hz  
応力: 1.2 Pa

の結果となった. シゾフィランとは, スエヒロタケというキノコが産生する多糖類で, グルコースが $\beta$ -(1,3)結合した直鎖状高分子のグルコース3残基あたりに1個のグルコースが側鎖として結合している<sup>12</sup>. 水溶性で, 室温では水中で三重螺旋構造だが, 高温下・ジメチルスルホキシド中では螺旋がほどけてランダムコイル状態となることが知られている<sup>13</sup>. シゾフィランの粘弾性が上昇したのは立体構造転移が発生し, 剛直な分子鎖が絡まりあって弾性率が発生したためと考えられている<sup>14</sup>. シゾフィランの場合「真のゲル」ではなく「弱いゲル」の挙動に分類されている<sup>12</sup>. シゾフィランと類似した挙動を示したことから, ハナビラタケ抽出物を含む水溶液のゲル化成分はハナビラタケ由来 $\beta$ グルカンである可能性が高い. しかし, ハナビラタケ抽出物はレオロジー測定により $G'$ の値が $G''$ の10倍以上となり, 「真のゲル」になることが確認された(図2, 図4, 図6). ハナビラタケの $\beta$ グルカンの化学構造はシゾフィランと類似しているという報告があるが<sup>10</sup>, 今回の結果からシゾフィランとは構造が異なっている可能性が考えられた. 実際, 別のグループではハナビラタケの $\beta$ グルカンには $\beta$ -(1,2)結合が存在すると報告している<sup>15</sup>. または,  $\beta$ グルカンの精製が不完全で他の成分によってゲル化した可能性がある.

ゲル化が $\beta$ グルカンによるものであれば非電解質であり, イオンによる影響は少ないと予測されるため, 塩化ナトリウムを添加した試料を作成し, そのレオロジー測定を行った. 図9は塩化ナトリウムを100 mMになるよう添加した試料の温度依存性を表したものである. 全ての測定温度において $G'$ ,  $G''$ 共にほぼ同じ挙動を示した. よって, 塩化ナトリウムを添加することによる影響は小さいと考えられた. 塩化ナトリウムは電解質多糖類のゲル化に影響を及ぼすという報告がある<sup>16, 17</sup>. 今回行った実験で塩化ナトリウム添加の影響が小さかったことから, ハナビラタケ抽出物は非電解質の $\beta$ グルカンがゲル化成分である可能性が

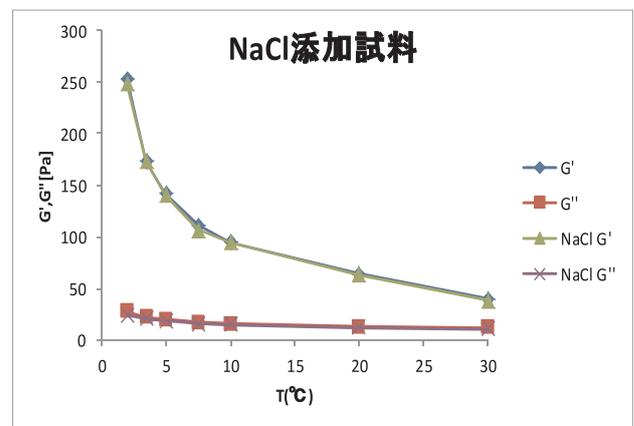


図9 降温過程の2.0%ハナビラタケの $G'$ と $G''$ に対する食塩の影響

NaCl 添加濃度: 100 mM  
周波数: 0.0159 Hz  
応力: 1.2 Pa

高いと考えられた。

$\beta$ -(1,3)-グルカンであるカードランは、55℃まで加熱してから冷却するとゲルを形成し、そのゲルは熱可逆性であることが知られている<sup>18)</sup>。しかし、カードランは水に完全に溶解しないため水分散液は白濁しており、80℃以上に加熱することでもゲルを形成するなど、今回得られたゲル化成分と異なる性質が多い。ハナビラタケを熱水抽出して得られた試料はレオロジー測定により2℃まで冷却することでゲルを形成することが確認された。5℃以下の低温で透明性を維持したままゲル化するという点においてゼラチンに類似している。ハナビラタケのゲル化成分はカードランとは異なる性質を有し、ゼラチンの代替物としての可能性も有していることから、新規のゲル化成分として幅広い応用が期待される。

#### 4. まとめと今後の課題

ハナビラタケピューレの熱水抽出物は、 $\beta$ グルカンが74%含まれていると推定された。レオロジー測定を行った結果、ハナビラタケ抽出物は2℃まで冷却するとゲル化することを確認した。グルコース添加試料のレオロジー挙動が $\beta$ グルカンであるシゾフィランの挙動に類似していた。しかし、シゾフィランは「弱いゲル」の挙動のみを示すが、ハナビラタケは「真のゲル」の挙動を示した。塩化ナトリウム添加試料において、塩化ナトリウムによる影響が少なかったことから、ゲル化が非電解質の高分子によるものだと推察した。以上より、ハナビラタケ抽出物は非電解質の $\beta$ グルカンによりゲル化すると考えられた。

ハナビラタケ抽出物はゲル化剤として活用されると考えられる。寒天やゼラチンと同様、熱可逆性があるという似た性質を持つことから、ハナビラタケゲルはそれらの代替物にも用いられる可能性がある。さらに、ハナビラタケ $\beta$ グルカンには抗腫瘍作用や造血促進作用といった機能が報告されているので、ゲル状の健康食品・サプリメントとしても販売されると、幅広い年代の人が興味を持つと思われる。今後、ハナビラタケ抽出物が新規のゲル化剤として応用が見込まれるのではないかと。

#### 文献

- 1) 山本恭介, 西川義弘, 木村隆, 鈍宝宗彦, 松浦成昭, 杉立彰夫, ハナビラタケ (*Sparassis crispa*) 子実体由来低分子画分の担癌マウスに対する抗腫瘍作用, 日本食品科学工学会誌, 54, 419-423 (2007).
- 2) Ohno, N., Miura, N. N., Nakajima, M. and Yadomae, T., Antitumor 1,3- $\beta$ -glucan from cultured fruit body of *Sparassis crispa*. *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 866-872 (2000).
- 3) Ohno, N., Harada, T., Masuzawa, S., Miura, N.N., Adachi, Y., Nakajima, M. and Yadomae, T., Antitumor activity and hematopoietic response of a  $\beta$ -glucan extracted from an edible and medicinal mushroom *Sparassis crispa* Wulf. : Fr (Aphyllphoromycetidae). *Int. J. Med. Mushr.*, **4**, 13-26 (2002).
- 4) Harada, T., Miura, N., Adachi, Y., Nakajima, M., Yadomae, T. and Ohno, N., Effect of SCG, 1,3- $\beta$ -D-glucan from *Sparassis crispa* on the hematopoietic response in cyclophosphamide induced leukopenic mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 931-939 (2002).
- 5) Nameda, S., Harada, T., Miura, N.N., Adachi, Y., Yadomae, T., Nakajima, M. and Ohno, N., Enhanced cytokine synthesis of leukocytes by a  $\beta$ -glucan preparation, SCG, extracted from a medicinal mushroom, *Sparassis crispa*. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **25**, 321-335 (2003).
- 6) 石川京子, 椿和文,  $\beta$ グルカンの特性と食品への応用, 食品と科学 48(3) 71-78 (2006)
- 7) 中島三博, 宿前利郎, 大野尚仁, ハナビラタケ抽出物, 特開 2000-217543, 2000-08-08
- 8) A. Bot, H. E. Smorenburg, R. Vreeker, M. Paques, A. H. Clark, Melting behaviour of schizophyllan extracellular polysaccharide gels in the temperature range between 5 and 20°C. *Carbohydrate Polymers*, **45**, 363-372 (2001).
- 9) Danielson, M. E., R. Dauth, N. A. Elmasry, R. R. Langeslay, A. S. Magee and P. M. Will (2010). Enzymatic method to measure beta-1,3-beta-1,6-glucan content in extracts and formulated products (GEM assay). *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 10305-10308.
- 10) R. Tada, T. Harada, N. Nagi-Miura, Y. Adachi, M. Nakajima, T. Yadomae, and N. Ohno, *Carbohydr. Res.* 2007, 342, 2611-2618
- 11) 西成勝好, 大越ひろ, 神山かおる, 山本隆, 食感創造ハンドブック, SCIENCE FORUM (2005)
- 12) 西成勝好, 澱粉・多糖の構造と物性
- 13) T. Norisuke, T. Yanaki, H. Fujita, *Macromolecules*, **13**, 1462-1466 (1980).
- 14) Y. Fang and K. Nishinari, *Biopolymers*, 73, 44-60 (2004)
- 15) Yamamoto, K., Kimura, T., Sugitachi, A., Matsuura, N. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 259-263 (2009)
- 16) 森高初恵, 郡司恵, 極性多糖類のゲル化に及ぼす食塩の影響, 学苑・生活科学紀要, 794, 7-13 (2006)
- 17) M. Watase and K. Nishinari, Effect of alkali metal ions on the viscoelasticity of concentrated kappa-carrageenan and agarose gels, *Rheol. Acta* 21, 318-324 (1982).
- 18) K. Nishinari, K.H. Zhang, T. Funami, *Handbook of hydrocolloids*, 567-591 (2009)