

エリンギ (*Pleurotus eryngii*) の子実体における

糖質および糖質分解酵素の特徴

荒木紀美・中田陽子・菱田桂菜・池和田恵

谷亀久美子・小林幹彦

食生活科学科 食品化学研究室

Characteristics of carbohydrates and related enzymes in the fruit body
of king oyster mushroom, *Pleurotus eryngii*

Motomi ARAKI, Yoko NAKADA, Keina HISHIDA,
Megumi IKEWADA, Kumiko YAGAME and Mikihiko KOBAYASHI
Department of Human Sciences and Arts

Carbohydrate components and their related carbohydrase activities in a homogenized preparation of the fruit body of king oyster mushroom (*eryngii*), *Pleurotus eryngii*, were studied in detail. The low-molecular weight fractions contained a significant amount of trehalose compared with other constituents of mono-saccharides, and its concentration was 18.7% of the dry weight. Polysaccharides in the high-molecular weight fraction were separated into four fractions, A~D, which were analyzed for the yields and sugar components. The polysaccharide fractions were also analyzed by the ion-exchange and gel-filtration column chromatography, and enzymatic hydrolysis. The results suggested that typical polysaccharide components in the fruit body of *eryngii* might be β -glucan and galactan, corresponding to the known results obtained by the liquid-cultured *eryngii*. A crude enzyme solution was prepared from the fruit body of *eryngii*, and various carbohydrase activities were measured using 27 substrates at pH 5.2, 6.5 and 7.8. A higher enzyme activity was detected for the substrates of laminarin and trehalose. Occurrence of trehalase activity correlated with the high concentration of trehalose in the fruit body of *eryngii*.

Key words: *Basidiomycete* 担子菌, *eryngii* エリンギ, *trehalose* トレハロース, *trehalase* トレハラーゼ, β -1,3-glucan β -1,3-グルカン, *galactan* ガラクタン

1. 緒言

エリンギ (*Pleurotus eryngii*) はヒラタケ科ヒラタケ属のきのこで、その子実体は食用とされている。近縁種には同じく食用のウスヒラタケ (*Pleurotus pulmonarius*) やヒラタケ (国内では「しめじ」の名で広く流通しているもの、*Pleurotus ostreatus*) などがある。エリンギはヨーロッパが原産の食用きのこで、我が国では 1990 年代に人工栽培が行われ、その後、栽培技術の普及にともなって市販品が流通するようになった^{1,2)}。エリンギの糖質や酵素に関する研究は、主として菌糸体を培養して調製した試料を用いたものが多い。国内では食品素材としての観点から、食用の子

実体を材料として機能性を検討した例がある³⁾。エリンギの糖質としてはトレハロース含量が高いとされているが、詳細を報告した論文は少ない³⁾。

トレハロースはグルコース 2 分子が結合した非還元性の糖で、自然界にも広く分布しており、細胞やタンパク質を凍結や乾燥から保護する機能がある。近年、トレハロースの作用や機能特性が注目を集め、種々の食品への利用が図られている。トレハロースの特徴は、メイラード反応による褐変を起さず、熱や酸に対しても安定で、難吸湿性であることや、デンプンの老化防止、タンパク質の変性防止、矯味・矯臭作用、鮮度保持効果などが報告されている。これらの特徴を生か

し、トレハロースは食品のみではなく、化粧品や医薬分野にも使用されている。また、人に対する機能性として低う蝕性や骨粗鬆症予防などがある^{4,5)}。

きのこでは、一般的にトレハロースを水溶性貯蔵糖質として保持しているものが多い。また、きのこの細胞壁中には β -グルカンとともにキチンが存在し、食物繊維が豊富なことから、摂取による免疫力の増強や、抗腫瘍活性などの薬理効果も期待されている^{6,7)}。エリンギは他の種類のきのこに比べてトレハロースの含有量が高いため、日常的な摂取により上述のような効果が期待され、また、高脂血症、肝障害、動脈硬化などの予防効果など、生活習慣病予防にも効果的であるという報告もある⁸⁾。

エリンギは国内での食経験の歴史が浅く、糖質などに関する研究が少ないことから、本研究ではエリンギを材料として各種糖質成分の構成と糖質関連酵素の分布についての知見を得るため種々の検討を加えた。また、これまでに論文として報告されたものはほとんど、エリンギの菌糸体を培養して調製した試料を用い

たものである^{9~12)}。そこで、本研究ではエリンギの子実体を材料として糖質とその関連酵素について検討した。

2. 実験方法

1) エリンギの糖質の抽出および分画

市販のエリンギ (500g) を細かく刻み、ベンゼン：エタノール (1 : 1) 溶液を加えてミキサーで粉碎、抽出処理した。ろ別後の残渣を風乾し、脱脂試料(10.69g)とした。図1に示すように、脱脂試料を80% 熱エタノール (250 ml)、10% KOH (300 ml、窒素気流中) を用いて順次、抽出処理を行った。すなわち、熱水抽出液に熱エタノールを75% 濃度になるように加え、生じた沈殿画分を多糖 D とした。熱水抽出残渣は10% KOH で抽出処理し、得られた抽出画分は pH 5.0 に中和した。中和により生じた沈殿画分を多糖 A、上清から得られたものを多糖 B とした。又、10% KOH 抽出残渣から回収したものを多糖 C とした。

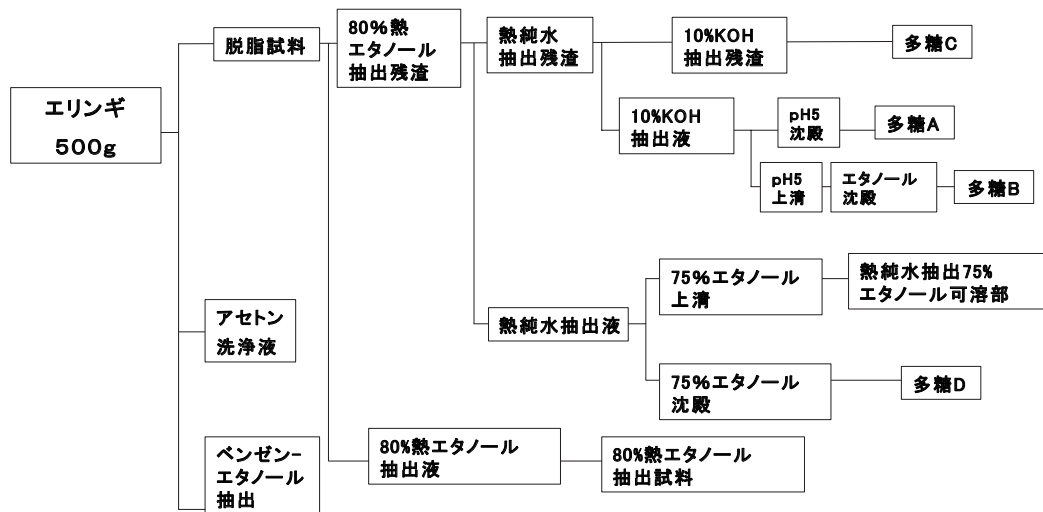


図1 エリンギの糖質の分画

2) 糖質の分析

①一般分析法

還元糖および全糖量の測定はフェノール硫酸法¹³⁾およびソモギー・ネルソン法¹⁴⁾により行った。

②薄層クロマトグラフィー (TLC) による分析

活性化したシリカゲル薄層プレート (MERC、シ

リカゲル 60、20cm × 20cm) に、サンプルと標準糖をスポットし、上昇法により展開した。展開溶媒は、*n*-ブタノール：酢酸エチル：イソプロピルアルコール：酢酸：水 = 7 : 20 : 12 : 7 : 6 を使い、*p*-アニスアルデヒド試薬を用いて 110°C で加熱発色させた。

③高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析

分離カラムは Senshu-Pak、NH2-1251-N 型、サイズ ϕ 4.6 × 250 mm を用い、装置は Waters パワーラインタイプ高速液体クロマトグラフ (Waters・600E システムコントローラー)、検出器は Waters・410 示差屈折計を使用した。サンプルは HPLC 用に調製し、フィルター処理を行ったものを 5 μ l 供試し、溶媒として 75%アセトニトリルを用い、流速 1 ml / min で溶出した。

3) エリンギの多糖成分の分画

① DEAE-Toyopearl (TOSOH) をカラム (1.3 cm × 30 cm) に充填し、40mM 酢酸緩衝液 (pH5.2) で平衡化したものに試料多糖を供試し、0 ~ 0.5 M NaCl / 酢酸緩衝液でグラジエント溶出し、5 ml / tube ずつ、70 本を分取した。

② Sephacryl S-200 (Pharmacia) をカラム (1.3 cm × 30 cm) に充填し、酢酸緩衝液で平衡化したものに試料多糖を供試し、同緩衝液を用いて溶出し、2 ml / tube ずつ、50 本を分取した。

4) エリンギの多糖画分の酵素分解

多糖 A、B、C、D の 1% 溶液 (60 mg / 6 ml 酢酸緩衝液、40 mM、pH5.2) 1 ml と、酵素液として α -アミラーゼ、セルラーゼ A (*Aspergillus niger* 起源)、セルラーゼ T (*Trichoderma viride* 起源)、ベクチナーゼ (いずれも天野エンザイム社製品) および、ザイモリアーゼ (和光純薬) の 1% 溶液を作製し、それぞれを 0.2 ml と同緩衝液 1.8 ml を混合し 30°C で 24 h 反応させ、生成還元糖量を測定し、酵素分解率を求めた。

5) エリンギの酵素の抽出法

市販のエリンギ (500g) を細かく刻んだものに、40 mM 酢酸緩衝液 (pH5.2) を加えてミキサーにかけてペースト状にし、さらに冷却しながらホモジナイザーで完全に磨砕し、全量が 1L になるように調製した。この試料を吸引ろ過してろ液を得、残渣を遠心分離して得られた上清もろ液に加えた。この抽出液に対して 80% 飽和になるよう硫酸アンモニウムを加えて 4°C で 24h 静置後、遠心分離により沈殿を回収し、粗酵素とした。粗酵素は 67% グリセロールで懸濁し、凍結保

存した。活性測定には、粗酵素を透析し、遠心分離後の上清を酵素活性の測定に用いた。

6) 酵素活性の測定法

エリンギから抽出した粗酵素中に存在する各種酵素の活性測定には以下の基質を使用した。agar, alginate, κ -carrageenan, carboxymethyl-cellulose (CMC), chitosan, conjac glucomannan, curdlan, dextran, guar gum, inulin, laminarin, levan, α -methyl-glucoside, β -methyl-glucoside), pectic acid, pectin apple, pectin citrus, soluble starch, sucrose, trehalose, xylan (以上はすべて和光純薬製)、galactan (ChromaDex, Inc.)、xyloglucan (弘前大・加藤陽治教授)。これらの基質はすべて 0.25% 溶液として用いた。酵素活性の測定は、基質と粗酵素溶液と混合して 30°C、一晩反応後に、生じた還元力を Nelson-Somogyi 法を用いて A 500 nm で測定した。また、以下の基質: cellobiose, maltose, lactose, raffinose (和光純薬) については、上と同様の反応後にグルコースオキシダーゼ法 (和光純薬、グルコース C II テスト) により遊離されたグルコース量を A 505 nm で測定した。

3. 実験結果

1) エリンギの糖質の分画

実験方法で示した通りにエリンギを処理し、8つの糖質画分を調製した (図 1)。低分子画分としてベンゼン-エタノール抽出試料、アセトン洗浄液試料、脱脂試料の抽出液から 80% エタノール抽出試料、残渣区分の熱水処理の上清から 75% エタノール可溶部を得た。これらの低分子画分の収量 (容量) はそれぞれ、ベンゼン-エタノール抽出画分 (35.0 ml)、アセトン洗浄液画分 (20.0 ml)、80% エタノール抽出画分 (20.0 ml)、75% エタノール可溶性画分 (10.0 ml) であった。高分子画分の多糖は、A、B、C、D の 4 画分に分離され、これらの糖質画分の収量はそれぞれ、多糖 A (2.20g)、多糖 B (1.60g)、多糖 C (13.83g)、多糖 D (0.56g) であった。

2) 低分子画分の分析

得られた 4 つの低分子画分についてその糖組成を TLC、HPLC で分析した。その結果、TLC では各画分のすべてからトレハロースのスポットが検出された。

HPLC 分析では、各画分の構成糖は図 2 に示す通りグルコース、トレハロース、アラビノース、キシロース、フルクトース、ガラクトース、スクロースなどが検出され、トレハロースが主要なピークであった。フェノール硫酸法を用いてエリンギ 100g あたりの全糖量を

算出したところ、ベンゼン - エタノール抽出画分では 2219.6mg、アセトン洗浄液画分は 79.7mg、80%エタノール抽出画分 329.3mg、75%エタノール可溶性画分では 51.5mg であった。

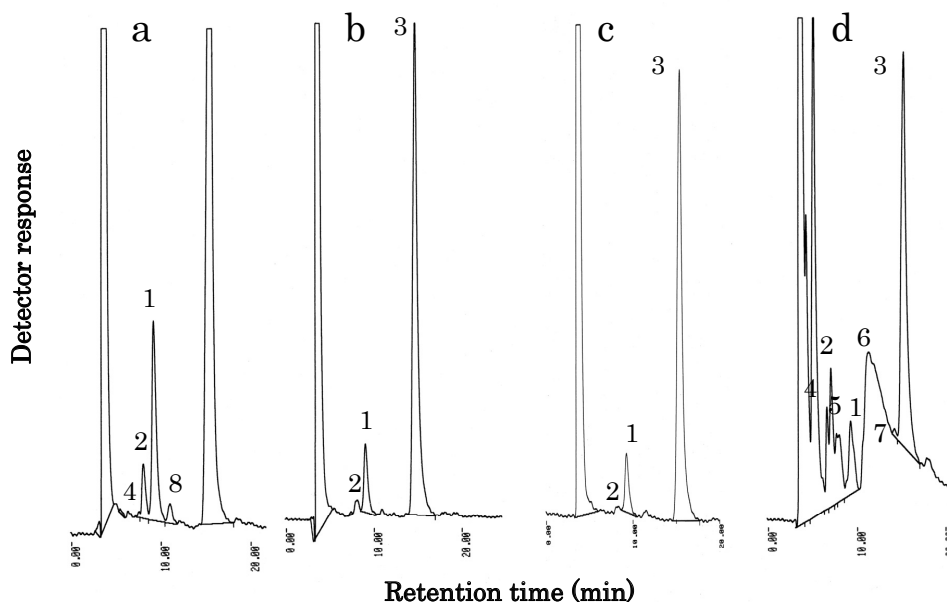


図 2 単糖・オリゴ糖画分の高速度液体クロマトグラフィーによる分析
a、アセトン洗浄液；b、ベンゼン - エタノール抽出液；c、80%熱エタノール抽出液；d、熱純水抽出 75%エタノール可溶部。
ピーク No. : 1、Glc；2、Ara；3、Trehalose；4、Xyl；5、Fru；6、Gal；7、Cellulose；8、Sucrose。

3) トレハロースの存在

先に示した結果より、すべての低分子画分にトレハロースが存在していることが明らかになった。HPLC の標準糖のピーク面積からエリンギ 100g あたりのトレハロース量を計算すると、ベンゼン - エタノール抽出画分は 2000mg、アセトン洗浄液画分は 59.6mg、80%エタノール抽出画分 258.1mg、75%エタノール可溶性画分は 22.7mg となり、エリンギの低分子画分は各画分の全糖収量の 50% から 80% 近くがトレハロースからなることが明らかになった。すなわち、エリンギのトレハロースは低分子画分の糖質（試料のエリンギ 100g あたり 2.68g）の中で量的に最も多く存在（2.34g、総量の 87.3% に相当）した。この量は試料のエリンギの水分含量を食品成分表¹⁵⁾に基づいて 87.5% とした

場合に、乾燥重量当たりでは 18.7% に相当する値であった。市販品のエリンギでは、トレハロース含量が 35.4%¹⁾、25.4%³⁾ などの報告が見られた。

4) 多糖画分の分析

多糖 A、B、C、D を加水分解しフェノール硫酸法で全糖量を求めた。エリンギ試料 100g あたりに換算すると、多糖 A の収量は 237.7mg、多糖 B は 175.7mg、多糖 C は 2151.3mg、多糖 D は 66.7mg となり、多糖 C の全糖量が他の多糖よりも圧倒的に多かった。TLC、HPLC 分析により各多糖の構成糖を検討した結果から、多糖 A はキシロースとグルコースがモル比にして 6 : 47、多糖 B はグルコースとアラビノースが 6900 : 7 で圧倒的にグルコースが多く、多糖 C

は少量のグルコースと未同定の糖を含んでいた。多糖 D の構成糖はキシロース、アラビノース、グルコース、ガラクトースがモル比にして 4 : 27 : 80 : 45 であった (表 1)。

表 1 エリンギ多糖 A, B, C, D 画分の構成糖のモル比

多糖画分	Xylose	Arabinose	Glucose	Galactose	Unknown
A	6		47		
B		7	6900		
C			1		+
D	4	27	80	45	

DEAE-Toyopearl カラムによるイオン交換クロマトグラフィーを行った結果、多糖 A は peak 1 ~ 4、多糖 B は peak 1、2 に分離された (図 3)。多糖 A の

peak 3、4 以外の 3 つの peak ではタンパク質の溶出パターンとの対応が見られることから糖タンパク質である可能性が示唆された。また、DEAE カラムに吸着された成分は酸性糖を含有するものと考えられる。

Sephacryl S-200 カラムによるゲルろ過クロマトグラフィーでは、多糖 A、多糖 C で単一の peak が得られ、多糖 B では 3 つの peak を得た (図 4)。いずれの多糖でも V0 位に溶出された peak 1 は標準タンパク質の Thyroglobulin (MW 660000) の溶出位置に対応し、 γ -Globulin (MW 160000) はこのカラムでは分画範囲内に保持されることから、分子量が 20 万以上の値をもつものと推定される。このような高分子多糖の存在はエリンギと近縁の *Pleurotus sajor-caju* でも報告されている¹⁶⁾。

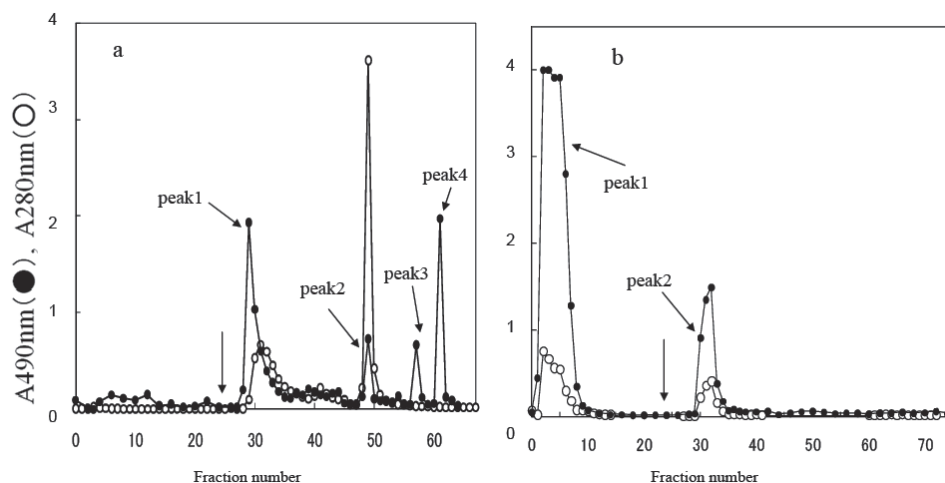


図 3 エリンギの多糖の DEAE-Toyopearl カラムによる分画 a、A 画分；b、D 画分。図中の矢印↓はグラジエント溶出の開始位置を示す。

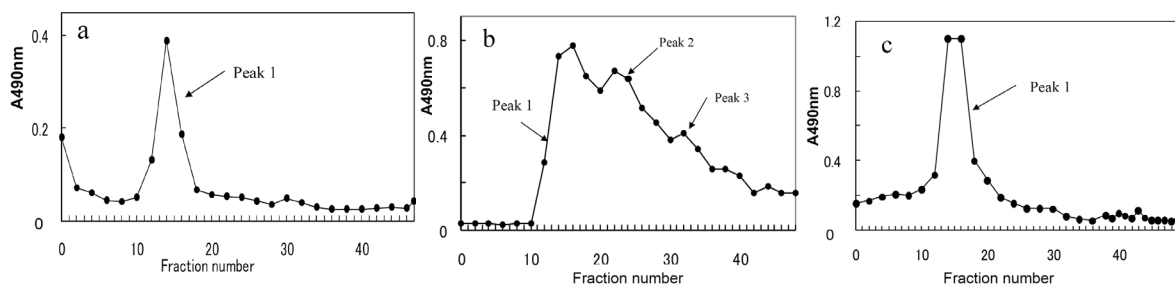


図 4 エリンギの多糖の Sephacryl S-200 カラムによる分画 a、A 画分；b、B 画分；c、C 画分。

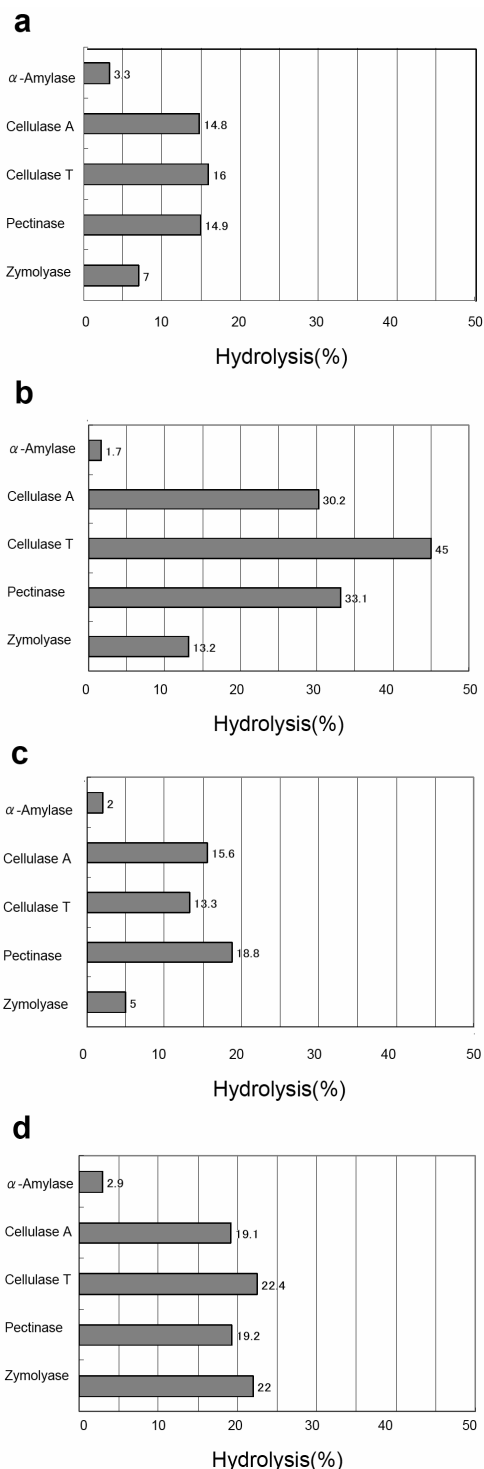


図5 エリンギの多糖 A, B, C, D 画分の酵素分解
a, A 画分; b, B 画分; c, C 画分; d, D 画分。
図中の数字は分解率 (%) を表す。

5) 多糖画分の酵素分解

多糖画分の酵素分解の結果を生成還元糖量に基づく分解率 (%) としてまとめた (図 5)。多糖 A はセルラーゼ A とセルラーゼ T で 15% 程度、多糖 B はセルラーゼ T で 45%、多糖 C はペクチナーゼで 18.8% の分解率が得られた。多糖 D は α-アミラーゼではほとんど分解されなかったが、セルラーゼ A、セルラーゼ T、ペクチナーゼでは 20% 程度の分解率であった。各多糖画分のザイモリアーゼでの分解率を比較すると、多糖 A、多糖 C ではほとんど分解されないが、多糖 B で 13.2%、多糖 D では 22% と、比較的高い分解率を示した。測定した多糖画分の水溶性は、画分 D > B > A > C の順に小さくなることから、酵素分解率の小さい画分は基質となる多糖成分の溶解性が原因の一つであると考えられる。セルラーゼ A とセルラーゼ T で分解後の反応生成物を TLC で分析したところ、前者ではグルコース、後者ではグルコースとセロビオースのスポットが検出された。

6) エリンギの酵素活性の測定

エリンギから調製した粗抽出液中に存在する酵素を調べる目的で、各種基質に対する酵素活性を測定した (表 2 a ~ c)。エリンギ中の酵素活性は、pH5.2 では laminarin, trehalose と soluble starch、pH6.5 では laminarin と pectic acid、pH7.8 では α-methyl-glucoside と pectic acidなどを基質とした場合に、粗酵素液の上清、沈殿画分について高い活性が見られた。表 2 には酵素活性の高い上位 10 点の酵素をリストアップしたが、反応の pH が高くなるほど活性は低下する傾向が認められ、上清の酵素の方が沈殿画分の酵素よりも活性が高いことがわかった。

4. 考察

食用のきのこ類にはトレハロース含量の高いものが多く知られている^{1~3,17)}が、論文としてそのデータが公表されているものは多くない。今回の分析の結果から、エリンギのトレハロースは乾燥重量当たりでは 18.7% 含まれていることが明らかになった。

エリンギの多糖成分に関する分析では、各多糖画分の収量、構成糖、イオン交換およびゲルろ過カラムによる構成成分の検討を行い、*Pleurotus* 属のほうびたけで報告されているような不均一性¹⁶⁾が認められた。

表 2 エリンギ抽出液中の糖質加水分解酵素の活性

a) pH 5.2		b) pH 6.5		c) pH 7.8	
Substrate	Product (μg) ^{a)}	Substrate	Product (μg) ^{a)}	Substrate	Product (μg) ^{a)}
Laminarin	1020.5	Laminarin	224.9	α -Me-glucoside	145.2
Trehalose	723.9	Glucomannan	194.1	Levan	130.3
Soluble starch	428.1	Pectin lemon	192.0	Xyloglucan	47.4
Curdlan	426.1	Pectin apple	169.0	Xylan	42.9
Galactan	416.0	Soluble starch	166.8	Guar gum	30.6
Xylan	350.5	Pectinc acid	161.5	Pectinc acid	25.3
Sucrose	273.0	CMC	102.2	Trehalose	21.7
α -Me-glucoside	257.0	Chitosan	96.1	Sucrose	16.7
Pectin apple	247.6	Trehalose	85.9	Galactan	15.7
Pectinc acid	241.8	Sucrose	76.8	Laminarin	11.5

a) Amount of reducing sugar was represented by glucose.

エリンギの多糖D画分は DEAE イオン交換カラムで 2 成分に分離されたが、素通り画分は水溶性の中性多糖で、グルコースが主成分であることからデンプンと推定された。また、吸着画分はガラクトースやマンノースに富む多糖で、菌糸体培養の試料で報告されているガラクトンに対応する可能性が高い¹⁰⁾。このガラクトンは 1,6-結合で分岐した 3-O-methyl-ガラクトースをモル比にしてガラクトースの 1/3 量の割合で含有している¹⁰⁾。今回の分析では、画分 D でガラクトースが高濃度で検出されており、この画分はペクチナーゼの作用性が高いことからガラクトンと思われる。

さらに、エリンギ子実体でも、菌糸体培養の試料と同様に、細胞壁に由来する β -グルカンが主要な構成成分であることが示唆された。この多糖は β -1,3 結合の主鎖に β -1,6 結合で分岐した構造^{9,11,12)}をもつものと推定される。すなわち、多糖 B 画分では、グルコースが主成分で、やや水溶性を呈し、酵素分解ではセルラーゼやザイモリアーゼに高感受性であったことから、 β -1,3,6-グルカンに相当するものと推定された。ザイモリアーゼは酵母の細胞壁の β -1,3-グルカンを分解する酵素¹⁸⁾であるが、図 5 の結果の通り、多糖 D 画分などにも高い作用性が認められた。多糖 C 画分は最も難溶性であり、構成糖がグルコースのみで収量も最大であることから、細胞壁由来のセルロースを主体とした多糖であると思われる。この画分への酵素

作用が小さいのは試料が難溶性であること、タンパク質との結合で酵素作用が阻害されていることなどが原因と考えられる。

エリンギ子実体から抽出した粗酵素標品に含まれる各種の加水分解酵素活性を測定した結果、 β -1,3-グルカンである laminarin の分解活性が高く、エリンギ細胞壁の分解に関与することが示唆された。また、pH5.2 ではトレハロースの分解活性が高いことも明らかになった。当研究室では先に、まいたけ子実体からトレハラーゼ活性を単離・精製し、その諸性質を報告している¹⁹⁾。今回の分析結果で、低分子糖質画分に著量のトレハロースの存在が確認されたことに対応して、その加水分解酵素の存在を見出したことは、エリンギの糖代謝を考える上で興味深い結果である。さらに、分解酵素活性の測定条件として pH5.2、6.5、8.7 の 3 段階で比較した結果から、各種酵素活性の分布に強弱が見られたこと、ペクチナーゼなどの活性が強いことなどの特徴も明らかになった。一方、ヒラタケ菌糸体培養の酵素では、トレハロースホスホリラーゼの活性とトレハロース合成への応用が報告されている²⁰⁾。エリンギ菌糸体の酵素の研究では、アリルアルコールオキシダーゼに関する報告¹¹⁾があるが、トレハラーゼや糖質関連酵素の報告は認められず、今後の研究が待たれる。

文献

- 1) ホクト (株) : エリンギのホームページ.
www.hokto-kinoko.co.jp/karada/02.html.
- 2) 雪国まいたけ (株) : エリンギのホームページ.
www.maitake.co.jp/06dictionary/04_yukigunni_eringi.html.
- 3) 坂倉元、西井孝文 : 三重県科学技術振興センター
林業研究部・業務報告書 (2003). www.mpstpc.pref.mie.jp/rin/hokoku/h15/rgh41217.pdf.
- 4) 伊藤汎、小林幹彦、早川幸男 : 食品と甘味料、光琳 (2008).
- 5) Y.Nishizaki et.al. : *Nutr.Res.*, 20,653-664 (2000).
- 6) 水野卓、川合正允 : キノコの化学・生化学、学会出版センター (1992).
- 7) 河岸洋和 : きこの生理活性と機能、シーエムシー出版 (2005).
- 8) 江口文陽 : 森林科学、30, 31-37 (2000).
- 9) A.Gutierrez et.al. : *Carbohydr Res.*, 281,143 ~ 154 (1996).
- 10) E.R.Carbonero et.al. : *Phytochemistry*, 69,252 ~ 257 (2008).
- 11) J.M.Barrasa et.al. : *Appl.Environ.Microbiol.*, 64,325 ~ 332 (1998).
- 12) A.Gutierrez et.al. : *Appl.Environ.Microbiol.*, 62,1928~1934 (1996).
- 13) M.Dubois et.al. : *Anal.Chem.*, 28,350 ~ 356 (1956).
- 14) M.Somogyi : *J.Biol.Chem.*, 195,19 ~ 23 (1952).
- 15) 五訂日本食品標準成分表、科学技術庁資源調査会編 (2000).
- 16) C.Zhuang et.al. : *Biosc.Biotechnol.Biochem.*, 57,901 ~ 906 (1993).
- 17) 平野年秋、南川幸、大沢つね子 : 名古屋女子大学紀要、16,81 ~ 86 (1970).
- 18) K.Kitamura and Y.Yamamoto : *Arch.Biochem. Biophys.*, 153, 403 ~ 406 (1972).
- 19) 渡部一穂、北沢靖子、馬場美穂子、北原智美 : 実践女子大学生生活科学部紀要、35,9~15 (1998).
- 20) A.Schwarz et.al. : *J.Biotechnol.*, 129,140 ~ 150 (2007).