

博士論文

キノコ発酵ダイズの成分変化と
機能性解析

2024年3月

澤田 雄太

目次

要旨	1
第1章 序論	3
第2章 キノコ発酵ダイズのダイズに由来する成分の経時変化	6
2-1 実験方法	
2-1-1 キノコ（タモギタケ、ヒラタケ）によるダイズの発酵	6
2-1-2 HPLCによるイソフラボンの分析	7
2-1-3 タモギタケおよびヒラタケのエクオール産生能の確認	9
2-1-4 エクオール様物質のLC/MSによる分析	10
2-1-5 Folin-Denis法によるポリフェノールの測定	12
2-1-6 遊離アミノ酸の分析	13
2-2 結果	
2-2-1 キノコ発酵ダイズのイソフラボンの経時変化	14
2-2-2 タモギタケおよびヒラタケのエクオール産生能	23
2-2-3 エクオール様物質のLC/MSによる分析	25
2-2-4 キノコ発酵ダイズのポリフェノール量の経時変化	28
2-2-5 キノコ発酵ダイズの遊離アミノ酸の経時変化	31
2-3 考察	38
第3章 キノコ発酵ダイズの機能性解析	45
3-1 実験方法	
3-1-1 DPPHラジカル消去活性を用いた抗酸化活性の測定	45

3-1-2	FRAP 法を用いた抗酸化活性の測定	47
3-1-3	ABTS ラジカル消去活性を用いた抗酸化活性の測定	48
3-2	結果	
3-2-1	DPPH ラジカル消去活性を用いた抗酸化活性の経時変化	50
3-2-2	FRAP 法を用いた抗酸化活性の経時変化	53
3-2-3	ABTS ラジカル消去活性を用いた抗酸化活性の経時変化	56
3-3	考察	59
第 4 章	キノコ発酵ダイズのキノコに由来する成分の経時変化	61
4-1	実験方法	
4-1-1	HPLC によるエルゴチオネインの分析	61
4-1-2	HPLC によるエルゴステロールの分析	63
4-2	結果	
4-2-1	キノコ発酵ダイズのエルゴチオネインの経時変化	64
4-2-2	キノコ発酵ダイズのエルゴステロールの経時変化	67
4-3	考察	70
第 5 章	結言	74
	謝辞	76
	参考文献	77
	発表論文一覧	83

要旨

食用担子菌は、食品や医薬品の原料など多様な用途に利用されている糸状菌である。その中でも木材腐朽菌に属するキノコは、ポリフェノール類を酸化分解、または重合する活性が高いという特徴がある。また、抗酸化物質であるエルゴチオネインや、ビタミン D 前駆体であるエルゴステロールを豊富に含む。一方、ダイズは機能性成分としてポリフェノールの一種であるイソフラボンを含み、優良なタンパク源である。これまでにダイズやほかの豆類を担子菌で発酵させることにより、イソフラボン配糖体のアグリコンへの変換、抗酸化活性とポリフェノール量の増加が報告されている。しかし、発酵物の成分や抗酸化活性の変動を継時的に長期間確認した報告は少なく、キノコに由来する成分の変動は報告されていない。

そこで、本研究ではタモギタケとヒラタケでダイズを長期間発酵させ、継時的に各イソフラボン成分、総ポリフェノール量、遊離アミノ酸、抗酸化活性、キノコに由来する成分であるエルゴチオネインおよびエルゴステロールの変動に関して、解析を行った。

どちらのキノコ発酵ダイズでも、発酵 10 日目には未発酵ダイズに多く含まれるイソフラボン配糖体が減少し、アグリコンが増加した。ポリフェノール量は、発酵 30~40 日目で最大となり未発酵ダイズの約 4 倍となった。遊離アミノ酸は、発酵 10 日目から増加し、発酵 40~50 日目に 20 倍以上に増加し最大となった。抗酸化活性は、発酵 30~40 日目で最大となり、タモギタケ発酵大豆が約 2~3 倍高いことが明らかとなった。エルゴチオネインはどちらのキノコで発酵させても新たに生成され、発酵 30 日目にタモギタケ発酵ダイズで 79.7 (mg/100g dry weight) で最大となり、ヒラタケ発酵ダイズの約 5 倍であった。エルゴステロールに関してもどちらのキノコで発酵させてもダイズ中で新たに生成され、両発

酵ダイズとも発酵 20 日目で最大 (69.7~88.5[mg/100g dry weight]) となった。

本研究の結果、ダイズをタモギタケあるいはヒラタケで発酵させることにより、イソフラボン配糖体がアグリコンに変換されること、ポリフェノール量の増加が必ずしも抗酸化活性の増加に影響しないこと、および担子菌に由来する成分の抗酸化活性上昇への寄与が大きいことが明らかとなった。しかし、ABTS ラジカル消去活性による抗酸化活性の上昇の時期が、DPPH ラジカル消去活性の上昇と一致しなかったことから、抗酸化活性を示す異なる物質がキノコの種類や発酵時期によって複数生成し、抗酸化活性の変動に複雑に関与していることが示唆された。

今後はそれぞれの発酵ダイズの成分や抗酸化活性の高い物質の探索、生理機能を解析する必要がある。また、本研究で分析した有用物質が多く含まれ、抗酸化活性が高い発酵 30 日目のタモギタケ発酵ダイズは機能性食品として期待される。

第1章 序論

担子菌に属する食用キノコ類は何千年もの間、人の食事の一部であり、最近では、多数の種が食品として流通し、消費量が大幅に増加している。また、食用きのこはカロリー、脂肪含量が低く、植物性タンパク質、ビタミン、ミネラルが豊富に含まれているため貴重な健康食品である (Manzi et al., 1998, Manzi et al., 2001, Agrahar-Murugkar & Subbulakshmi, 2005)。また、食品としてだけでなく、医薬品の原料、特に多糖類が抗がん剤として利用されるなど多様な用途で利用されている (Mizuno & Nishitani, 2013)。その中でも木材腐朽菌に属するキノコは、ラッカーゼ、マンガンペルオキシダーゼおよびリグニンペルオキシダーゼを分泌することから、木材の構成成分である高分子のポリフェノール性化合物からなる難分解性のリグニンの分解能が高く、ポリフェノール類を酸化分解、または重合する活性が高い (Lundell et al., 2010; Janusz et al., 2013)。また、キノコはプロテアーゼ活性が高く、タモギタケ (Cui et al., 2007) およびヒラタケ (Palmieri et al., 2001) において、アルカリ性のプロテアーゼが精製され、その特性が調査され、キノコの生育に重要な役割を果たしている可能性がある。キノコ由来のプロテアーゼの利用に関して、きのこ破碎液を利用し米のタンパク質を分解し、遊離アミノ酸を増加したことが報告されている (松本ら, 2021)。さらに、キノコには抗酸化物質であるエルゴチオネインが豊富に含まれている。エルゴチオネインは、酸化ストレスに対する細胞保護 (Paul & Snyder, 2010; Kushairi et al., 2020) や抗アポトーシス (Ko et al., 2021; Salama et al., 2021) などの重要な生物学的活性を有することが示唆されている。エルゴチオネインはヒトにとって必須成分と考えられており、その血中濃度は加齢とともに低下することが示されている (Cheah et al., 2016)。特に一部の国における神経疾患による死亡率との関連において、長

寿と正の相関があると報告されている (Beelman et al., 2020)。そのため、エルゴチオネインを積極的に摂取することによって老化に伴って起こる様々な疾患を抑制できると考えられている。また、キノコには、紫外線と熱にさらされるとビタミン D₂ に変換されるビタミン D₂ の前駆体であるエルゴステロールが豊富に含まれている (Nölle et al., 2017)。ビタミン D は、カルシウム恒常性の調節と維持に重要な役割を果たす人の健康に不可欠なビタミンである。ビタミン D の不足は、がん、高血圧、自己免疫疾患、糖尿病のリスク増加にも関連している (Jäpelt & Jakobsen., 2013)。そのためキノコは、ビタミン D の豊富な供給源として重要である。

一方、ダイズは納豆、味噌、醤油、豆腐などさまざまな食品の原料として広く使われており、ポリフェノールの一種であるイソフラボンを機能性成分として多く含む農産物である (Rizzo & Baroni, 2018; Cao et al., 2019)。イソフラボンは、エストロゲン受容体 β に結合することによってエストロゲン様活性を示し (Rizzo & Baroni, 2018; Krizova et al., 2019)、更年期障害や骨粗鬆症などのエストロゲン分泌の低下に伴う症状に対して効果があると期待されている (Tham et al., 1998; Krizova et al., 2019)。また、ダイズに存在するイソフラボンであるダイゼインは、特定の腸内細菌によってエクオールに変換され (Bowey et al., 2003; Jackson et al., 2011; Kawada et al., 2018)、エクオールがエストロゲン応答の刺激においてダイゼインよりも 100 倍強力であることが報告されている (Sathyamoorthy & Wang, 1997)。また、ダイズは必須アミノ酸のバランスがよい優良な植物たんぱく源である (Qiu et al., 2022)。

人は健康長寿を願い、健康こそが宝であると誰しもが考えているが、発酵食品は、理論的に探求し科学的に解析される前から人々はすでに生活に取り入れてきており、今ではいつの時も願って止まない健康長寿に寄与する食品のひとつ

となっている(會田, 2020)。発酵食品の誕生は、食品の保存手段の一つとして人類が見出してきたことが最初と言われるが、その発酵過程で得られる独特の風味や食感、見た目などの変化が楽しめるようになり、現在でも発酵食品は世界中の多くの人々に消費されている。

いくつかの研究では、担子菌によるダイズまたはダイズ抽出物の発酵により、イソフラボン配糖体のアグリコンへの変換が起こることが報告されている(Miura et al., 2002; 福田ら, 2007; 鮫島, 2019)。また、豆類をキノコで発酵させると抗酸化活性とポリフェノール含有量の増加することが報告されている(Espinosa-Paez et al., 2017; Xu et al., 2018)。さらに、キノコで発酵したダイズは血栓予防、線溶活性、および抗血管新生活性を示すことが報告されている(Miura et al., 2002; Okamura- Matsui et al., 2003; 福田ら, 2007)。

しかし、ダイズを食用担子菌で長期間発酵させ、継時的に各イソフラボンの消長、ポリフェノール量、抗酸化活性および遊離アミノ酸、また、キノコに由来する成分であるエルゴチオネインおよびエルゴステロールの変動を確認した報告はなかった。

そこで、本研究では、タモギタケおよびヒラタケでダイズを発酵させ、継時的に総ポリフェノール量と抗酸化活性、各イソフラボン成分、エルゴチオネインおよびエルゴステロールの変動に関して、解析を行った。

第1章 キノコ発酵ダイズのダイズに由来する成分の経時変化

はじめに、キノコ発酵ダイズのダイズに由来する成分であるイソフラボン成分、総ポリフェノール量および遊離アミノ酸の変動に関して解析を行った。また、イソフラボン分析時にエクオールと同じ溶出位置（リテンションタイム）に物質が検出されたことからタモギタケおよびヒラタケのエクオール生産能の調査およびその物質の LC/MS による分析を行った。

2-1 実験方法

2-1-1 キノコ発酵ダイズの調製

キノコは、野生型二核菌糸株の *Pleurotus cornucopiae* var *citrinopileatus* Pc98-3 (*P. cornucopiae*) (タモギタケ) (Harada et al., 2008) および *Pleurotus ostreatus* ATCC66376 (*P. ostreatus*) (ヒラタケ) を使用した。タモギタケは、北海道立総合研究機構森林総合研究所森林研究本部林産試験場（旭川、北海道、日本）から提供していただいた。発酵原料には市販の大豆品種「ゆきぴりか」を使用した。ゆきぴりかは、イソップアグリシステム株式会社（北見、北海道、日本）から購入した。タモギタケとヒラタケをそれぞれ SMYP (2% soluble starch、1% malt extract、0.1% yeast extract、0.1% peptone) 寒天培地と 0.25 × MYPG 寒天培地で培養した (Nagai et al., 2002)。ダイズ培地は、ダイズにイオン交換水を加えて含水率 65% にし、121°Cで 30 分間オートクレーブ滅菌した。タモギタケとヒラタケを 25°C、相対湿度 70%で培養した。タモギタケとヒラタケによるダイズの発酵を、10 日から 80 日まで 10 日間隔で発酵し回収した。各発酵期間の発酵ダイズを凍結乾燥し、-30°Cで保存した。

2-1-2 HPLC によるイソフラボンの分析

イソフラボンの抽出は、Association of Official Analytical Chemists (AOAC) の方法 (Klump et al., 2001) に従って行った。凍結乾燥した発酵ダイズを乳鉢と乳棒を用いて粉末化した。イソフラボン抽出は、ダイズ粉末 2.5 g に 80%メタノール 40 mL を加え、95 rpm、65°Cで 2 時間振とうした。室温に冷却した後、3 mL の 2 M NaOH を加え、95 rpm、25°Cで 10 分間振とうした。次いで、氷酢酸 1 mL を加え、混合物を 50 mL メスフラスコに移し、フラスコにメタノールを加えて 50 mL とし、よく混合し、4°Cで一晩静置し、イソフラボン抽出液とした。次に、イソフラボン抽出液の上清 1 mL を 1.5 mL マイクロチューブに移し、18,800 × g、20°Cで 10 分間遠心分離し、上清 10 μL を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に供した。

イソフラボン抽出液は、システムコントローラー SCL-10A、液体クロマトグラフ LC-10AT、UV-VIS 検出器 SPD-10A、およびカラムオーブン CTO-10 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) の HPLC システムを使用して、逆相 C18 カラム、Inertsil ODS-4 (250 × 4.6 mm, 5μm) (GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) を使用して分析した。分析は、カラム温度 40°C、検出波長 260 nm、流速 1 mL/min で行った。移動相として、溶離液 A は超純水 (MQ 水) : メタノール : 酢酸を 44 : 5 : 1 で混合した溶液、溶離液 B はメタノール : 酢酸を 49 : 1 で混合した溶液とした。はじめに、90%の溶離液 A と 10%の溶離液 B を含む移動相でカラムを平衡化した。分析は、溶離液 B を 10%から 60%の直線濃度勾配で 0 分から 30 分まで変化させた。30~33 分で、溶離液 B をさらに 60%~100%の直線濃度勾配で変化させた。次に、溶離液 B を 100%で 2 分間保持し、35 分から 37 分で 100%から 10%の直線勾配に変更し、最終的に溶離液 A 90%と溶離液 B 10%に戻し、37 分から 50 分の間保持し、最初の移動相に平衡化させた。発酵ダイズ中の各イソフ

ラボンの含有量を算出するために、イソフラボン 6 成分（ダイジン、ダイゼイン、グリシチン、グリシテイン、ゲニスチン、ゲニステイン）とエクオールのそれぞれについて検量線を作成した。検量線からサンプル中の各イソフラボン量を求めた。

2-1-3 タモギタケおよびヒラタケのエクオール産生能の確認

SMYP 液体培地は、2% soluble starch、1% malt extract、0.1% yeast extract、0.1% peptone となるようにイオン交換水に溶解し、121°Cで 20 分間オートクレーブ滅菌した。また、0.25 × MYPG 液体培地は、0.25% malt extract、0.1% yeast extract、0.1% peptone、0.5% glucose となるようにイオン交換水に溶解し、121°Cで 20 分間オートクレーブ滅菌した。ダイゼイン 4.0 mg をメタノール 1 mL に溶解し、ダイゼイン (4.0 mg/mL) 溶液を作成した。

タモギタケのエクオール産生能確認培地は、6 穴培養プレートに 0.25 × SMYP 培地 4.95 mL に ダイゼイン 4.0 mg/mL 溶液 50 µL を加えて調製し、この培地に実験方法 2.1) で作成したタモギタケ寒天培養物から 5 × 5 mm 片を切り取り接種した。また、ヒラタケの場合は、培地を 0.25 × MYPG 培地に変えた以外は、タモギタケの場合と同じ操作とした。各試験区を 3 連とし、培養は実験方法 2.2) と同条件で行い、20 日目、40 日目、60 日目の培養液 1 mL を無菌的に採取した。採取した培養液を 15,000 rpm、20°Cで 10 分間遠心分離を行い、上清に酢酸エチル 4 mL を加え混合後、15,000 rpm、20°Cで 10 分間遠心分離を行った。上清を回収し、ロータリーエバポレーター N1100V (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) で溶媒を除去し、抽出物を得た。得られた抽出物を 1 mL のメタノールに溶解し、実験方法 3.2) と同様に HPLC による分析を行った。

2-1-4 エクオール様物質の LC/MS による分析

エクオール様物質は、タモギタケで 60 日間発酵させたダイズ粉末 200 g から抽出した。発酵ダイズ粉末 5.0 g が入った 50 mL 遠心管を 40 本用意し、各遠心管に 80%メタノール 40 mL を加え、95 rpm、65°C で 2 時間振とうした。混合物を 1,500 × g で 10 分間遠心分離し、抽出液をロータリーエバポレーター N1100V (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) で抽出溶媒を蒸発させ、凍結乾燥して抽出物 93.5 g を得た。次に、あらかじめ 200 mm (長さ) × 50 mm (内径) のカラムに Diaion HP20 (Mitsubishi Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) を詰めて、MQ 水で平衡化した後に、凍結乾燥抽出物 30 g を 100 mL の MQ 水に溶解し、重層した。メタノール濃度が低濃度から高濃度になるように 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%メタノールを含む 200 mL の MQ 水で溶出したものをそれぞれフラクション 1~10 として回収した。最後に、100%メタノール 1000 mL でさらに溶出を行い、溶出液 200 mL ずつをフラクション 11~15 として回収した。エクオール様物質を含むフラクション 14 とフラクション 15 を合わせ、溶媒を除去し、凍結乾燥した。得られた抽出物 1.22 g を 10 mL の 60%メタノールに溶解し、最初のカラムと同様に Diaion HP20 を詰めた内径 300 mm × 14 mm のカラムに供した。サンプルを 20 mL の 60%, 80%, 85%, 90%, 95 %メタノール 10 mL で溶出し、濃度を低濃度から高濃度に段階的に増加させて溶出したものを各フラクション 1~10 として回収した。最後に、100%メタノール溶液 70 mL でさらに溶出を行い、溶出液 10 mL ずつをフラクション 11~17 として回収した。エクオール様物質を含む画分 7~14 を合わせ、溶媒を蒸発させ、凍結乾燥した。得られた抽出物 112.34 mg をメタノール 3 mL に溶解した。次に、Wakosil-II5C18HG (20×250mm, 5µm, Wako, Osaka, Japan) カラムによる分離を、デュアルポンプ KP-12 (From J Co., Tokyo, Japan) を使用して、40°C、流速 7.0 mL/min の条件で

行った。エクオール様物質は、UV 検出器 S-3120 (Soma Optics., Tokyo, Japan) を用い 260 nm で検出し、検出されたピークを 100 μ L 回収し、同じ操作を 30 回繰り返した。回収した溶出液の溶媒を蒸発させた後、凍結乾燥させて得られた精製物 (1 mg) を LC/MS 分析に供した。LC/MS は、システムコントローラー CBM-20A、送液ポンプ LC-20ADXR、UV-VIS 検出器 SPD-20A、カラムオーブン CTO-20A、質量分析計 LCMS-2020 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) で構成されたシステムを使用した。LC による分離には、逆相 C18 カラム、Inertsil ODS-4 (150 \times 4.6 mm, 5 μ m) (GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) を使用し、2%酢酸を含む 50%メタノールを移動相として使用した。得られた精製物 (1 mg) を 100%メタノール 1 mL に溶解したものを分析用サンプルとし、1 mg/mL のエクオール標品 (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan) を標準として使用した。LC による分離条件は、サンプル注入量を 10 μ L とし、カラム温度は 40°C、検出波長は 260 nm、流速は 0.2 mL/min とし、MS による質量スキャンは m/z 10~1000 の範囲で実行した。

2-1-5 Folin-Denis 法によるポリフェノールの測定

ポリフェノール測定のための発酵ダイズは、乳鉢と乳棒を使って粉末化し、2.5 g を 50 mL 三角フラスコに入れ、70%エタノール 20 mL を加えて、フラスコを 30 分間超音波処理した後、混合物を 4°C で一晩静置した。上清を 50 mL ガラス遠心管に移し、1,500 × g、4°C で 20 分間遠心分離した後、上清を直径 110 mm の No.2 濾紙を用いて 50 mL メスフラスコにろ過した。次いで、残渣の入った三角フラスコに 70%エタノール 20 mL を加え、上記と同様の操作を繰り返した。得られたポリフェノール再抽出液を、最初の抽出液が入っている 50 mL メスフラスコに移し、70%エタノールを加えて最終容量を 50 mL とした。よく混合した後、抽出液を 50 mL バイアルに移し、4°C で保存した。これをポリフェノール抽出液とした。

ポリフェノール含有量は、Folin-Denis 法 (Folin & Denis, 1915) により測定した。適量のポリフェノール抽出液に MQ 水を加えて 500 μL とし、混合した後、Folin-Ciocalteu's フェノール試薬 (Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan) 500 μL を加えた。混合物を 25°C で 3 分間静置した後、500 μL の 10% Na₂CO₃ 溶液を添加し、混合物を 30°C で 30 分間静置した。MQ 水をブランクとして使用し、760 nm での吸光度を測定した。総フェノール含有量は、没食子酸の検量線を使用して、没食子酸当量 (mmol GAE/100 g dry weight) として算出した。

2-1-6 遊離アミノ酸分析

遊離アミノ酸の抽出は、500 mg の発酵ダイズ粉末に 5 mL の 500 mM トリクロロ酢酸を加え、120 rpm、40°C で 30 分間振とうして行った。混合物を 1,500 × g で 10 分間遠心分離して、上清 200 μL に 0.3 mol/L 水酸化ナトリウム 200 μL を加え、フィルターろ過（ザルトリウス クラリスステップ® 0.45 μm）をし、アミノ酸分析に供した。

アミノ酸分析装置は、システムコントローラー CBM-20A、送液ポンプ LC-20AD, AB、蛍光検出器 RF-10A XL、オートサンプラー SIL-20AC およびカラムオープン CTO-20AC（Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan）の HPLC アミノ酸分析システムを使用して、カラムは Na 型アミノ酸分析用カラム Shim-pack AMINO-NA（100 × 6 mm, 5 μm, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan）を使用した。分析は、カラム温度 60°C、励起波長 350 nm、蛍光波長 450 nm、流速 0.5 mL/min の条件で行い、移動相として、島津アミノ酸移動相キット Na 型を使用した。反応液として、島津アミノ酸分析キット OPA 試薬を使用し、反応液の流速は 0.2 mL/min で行った。また、アミノ酸の標品は、アミノ酸標準試薬（Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan）を使用し、16 種のアミノ酸（アスパラギン酸、トレオニン、セリン、グルタミン酸、プロリン、グリシン、アラニン、バリン、シスチン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、チロシン、フェニルアラニン、リシン、ヒスチジン、アルギニン）の検量線を作成し、検量線からサンプル中の各アミノ酸量を求めた。

2-2 結果

2-2-1 キノコ発酵ダイズのイソフラボンの経時変化

タモギタケとヒラタケで発酵させたダイズのイソフラボン含有量を 80 日目まで 10 日ごとに分析した。未発酵ダイズのイソフラボンのほとんどは配糖体であり、ダイジンとゲニスチンの量はそれぞれ 421.75, 460.51 ($\mu\text{mol}/100\text{ g dry weight}$) であった (Table 1, Fig. 1A)。また、未発酵ダイズ中のイソフラボンの総量は 961.30 ($\mu\text{mol}/100\text{ g dry weight}$) であり (Table 1, Fig. 1A)、ダイジンとゲニスチンの割合はそれぞれ 43.8%, 48.0%で、総イソフラボン含有量は 91.8%であった (Table 1, Fig. 1A)。

これに対してタモギタケおよびヒラタケ発酵ダイズでは、すべてのイソフラボン配糖体 (ダイジン、ゲニスチン、およびグリシチン) は培養 10 日目に大幅に減少したが、アグリコン (ダイゼイン、ゲニスチン、およびグリシチン) は増加した。イソフラボンアグリコンは 30 日目までその量がほぼ維持されたが、40 日目に減少し始め、80 日目までにほぼ消失した (Table 2, 3, Fig. 1B, C)。タモギタケ発酵ダイズのアグリコン量は、20 日目に 704.11 ($\mu\text{mol}/100\text{ g dry weight}$) と最大値を示した (Table 2, Fig. 1B)。このときダイゼインとゲニスチンは、それぞれ 367.64, 317.16 ($\mu\text{mol}/100\text{ g dry weight}$) であり (Table 2, Fig. 1B)、この 2 つのアグリコン量の合計は、総イソフラボン含有量の 94.6% ($723.84\ \mu\text{mol}/100\text{ g dry weight}$) を占めた。同様に、ヒラタケ発酵ダイズのアグリコン量は、10 日目に 774 ($\mu\text{mol}/100\text{ g dry weight}$) と最大値を示し、ダイゼインとゲニスチンはそれぞれ 381.66, 371.43 ($\mu\text{mol}/100\text{ g dry weight}$) となり (Table 3, Fig. 1C)、2 つのアグリコン量の合計は、総イソフラボン含有量の 86.3% ($873.66\ \mu\text{mol}/100\text{ g dry weight}$) を占めた。

一方、未発酵ダイズでは検出されなかったエクオール様物質 (Fig. 2B) が、

発酵 50 日目のタモギタケ (Fig. 2C) およびヒラタケ (Fig. 2D) 発酵ダイズは、HPLC のクロマトグラムにおいてリテンションタイム 29.2 分に大きなピークとして検出され、エクオール標準物質の保持時間と一致した (Fig. 2A)。エクオールの検量線からエクオール様物質含有量を算出したところ、発酵 50 日目でタモギタケおよびヒラタケ発酵ダイズどちらも最大値を示し、それぞれ 7.28, 2.13 (mmol/100 g dry weight) だった (Table 4)。

Table 1. Changes in isoflavone contents during fermentation for unfermented soybeans (control)

Fermentation time (d)	Daidzin	Genistin	Glycitin	Daidzein	Genistein	Glycitein	Total isoflavone
0	420.75 ± 82.15	460.51 ± 46.76	29.78 ± 2.41	23.52 ± 3.61	23.63 ± 1.63	3.10 ± 0.25	961.30 ± 134.27
10	429.41 ± 19.05	470.49 ± 14.84	29.55 ± 0.33	23.80 ± 1.70	22.73 ± 1.57	3.07 ± 0.13	979.04 ± 31.26
20	460.23 ± 89.17	489.92 ± 59.32	32.65 ± 0.90	24.90 ± 3.84	23.61 ± 1.88	3.36 ± 0.09	1034.66 ± 151.06
30	467.76 ± 46.44	479.67 ± 29.05	31.31 ± 0.64	25.62 ± 2.70	23.09 ± 2.27	3.29 ± 0.20	1030.74 ± 77.21
40	457.08 ± 48.21	458.01 ± 37.76	31.13 ± 1.25	24.89 ± 3.24	22.54 ± 1.36	3.52 ± 0.14	997.17 ± 89.08
50	496.34 ± 31.13	501.26 ± 10.29	31.04 ± 2.79	25.89 ± 0.29	21.35 ± 1.18	3.29 ± 0.27	1079.17 ± 31.70
60	483.22 ± 46.16	492.19 ± 49.56	30.50 ± 0.87	25.78 ± 1.99	23.38 ± 1.64	3.10 ± 0.09	1058.17 ± 79.66
70	474.36 ± 13.90	472.70 ± 24.62	30.84 ± 0.30	25.83 ± 0.94	21.84 ± 0.88	2.94 ± 0.16	1028.51 ± 37.03
80	500.52 ± 33.47	470.87 ± 26.78	32.03 ± 0.92	26.53 ± 1.25	21.44 ± 1.78	3.21 ± 0.24	1054.60 ± 34.19

µmol/100 g dry weight ± SD

Soybeans were fermented for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. The extracts from these samples were analysed by HPLC.

Table 2. Changes in isoflavone contents during fermentation for *Pleurotus cornucopiae* fermented soybeans.

Fermentation time (d)	Daidzin	Genistin	Glycitin	Daidzein	Genistein	Glycitein	Total isoflavone
0	420.75 ± 82.15	460.51 ± 46.76	29.78 ± 2.41	23.52 ± 3.61	23.63 ± 1.63	3.10 ± 0.25	961.30 ± 134.27
10	27.54 ± 3.80	93.09 ± 7.05	5.87 ± 0.05	354.90 ± 63.02	282.44 ± 44.53	16.62 ± 1.49	780.46 ± 113.00
20	11.38 ± 1.83	8.34 ± 0.42	0.01 ± 0.01	367.64 ± 25.17	317.16 ± 50.40	19.31 ± 2.15	723.84 ± 78.58
30	17.01 ± 3.33	14.79 ± 3.19	13.84 ± 2.19	341.60 ± 45.48	251.1 ± 42.17	15.84 ± 2.32	654.17 ± 87.27
40	16.47 ± 13.35	17.02 ± 3.51	9.40 ± 12.05	322.75 ± 24.63	85.39 ± 8.77	12.06 ± 0.63	463.08 ± 59.43
50	11.60 ± 10.24	8.88 ± 5.91	6.40 ± 5.56	208.60 ± 76.03	33.51 ± 6.83	6.00 ± 1.50	275.00 ± 104.67
60	14.15 ± 5.51	21.58 ± 11.32	12.98 ± 6.94	217.93 ± 28.84	32.14 ± 4.58	11.44 ± 4.33	310.22 ± 51.35
70	11.93 ± 1.97	23.49 ± 4.65	22.78 ± 12.35	113.73 ± 46.86	22.28 ± 5.07	7.41 ± 3.77	201.62 ± 34.03
80	7.11 ± 10.61	7.20 ± 2.47	3.16 ± 5.31	0.98 ± 1.69	9.92 ± 1.90	3.20 ± 0.07	31.57 ± 16.77

µmol/100 g dry weight ± SD

Soybeans were fermented with *Pleurotus cornucopiae* for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. The extracts from these samples were analysed by HPLC.

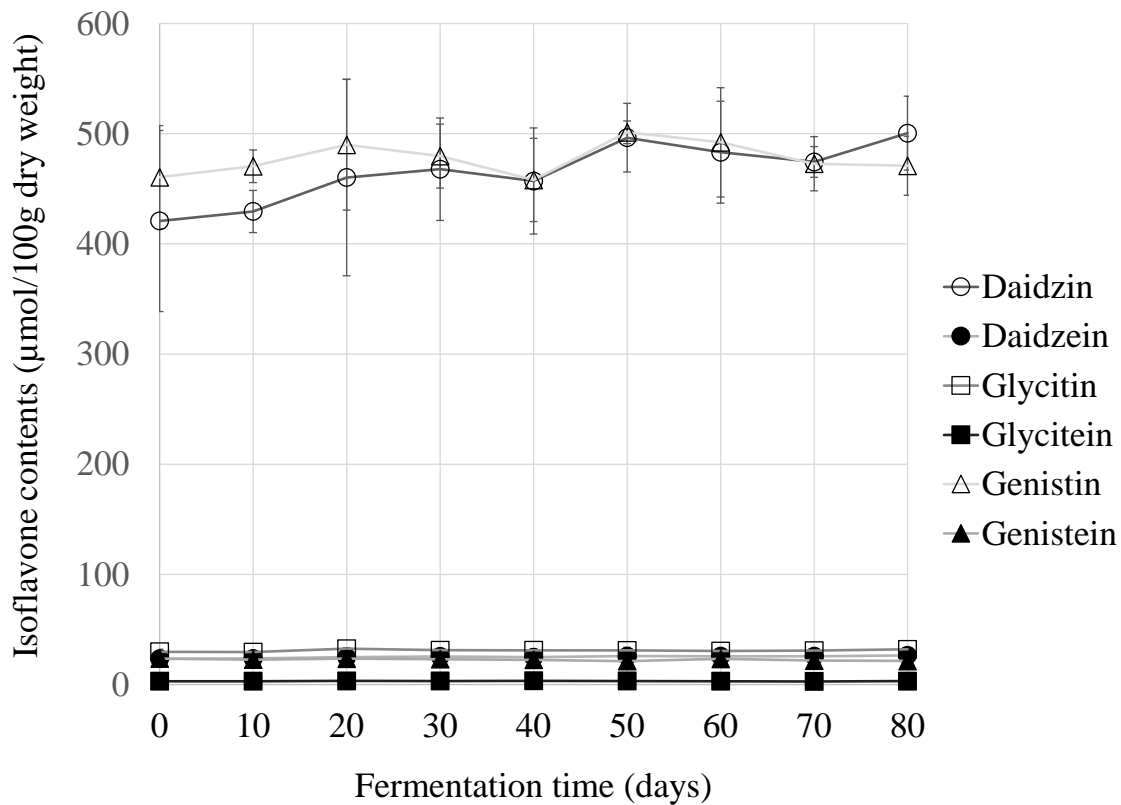
Table 3. Changes in isoflavone contents during fermentation for *Pleurotus ostreatus* fermented soybeans.

Fermentation time (d)	Daidzin	Genistin	Glycitin	Daidzein	Genistein	Glycitein	Total isoflavone
0	420.75 ± 82.15	460.51 ± 46.76	29.78 ± 2.41	23.52 ± 3.61	23.63 ± 1.63	3.10 ± 0.25	961.30 ± 134.27
10	16.73 ± 11.98	81.65 ± 15.50	0.87 ± 0.75	381.66 ± 23.10	371.43 ± 2.37	21.32 ± 0.94	873.66 ± 23.93
20	5.83 ± 1.45	7.94 ± 1.27	0	344.64 ± 24.24	282.40 ± 18.90	15.33 ± 1.14	656.13 ± 42.15
30	4.00 ± 3.83	6.39 ± 1.58	4.04 ± 3.50	363.49 ± 30.66	287.80 ± 48.87	10.30 ± 1.58	676.02 ± 57.51
40	7.85 ± 4.86	4.66 ± 2.67	7.68 ± 4.94	247.28 ± 13.13	142.87 ± 17.21	7.04 ± 2.05	417.38 ± 41.26
50	4.77 ± 8.25	3.59 ± 2.83	1.82 ± 3.16	152.61 ± 22.46	63.06 ± 6.97	4.71 ± 2.27	230.56 ± 39.32
60	2.74 ± 4.73	3.17 ± 1.55	0.37 ± 1.79	81.11 ± 26.09	32.74 ± 2.27	1.93 ± 0.13	122.05 ± 23.29
70	9.00 ± 2.18	7.47 ± 4.07	12.87 ± 8.36	5.49 ± 5.64	17.43 ± 0.55	4.14 ± 1.21	56.39 ± 11.26
80	3.65 ± 6.31	2.79 ± 1.34	3.50 ± 5.29	0	13.18 ± 1.48	3.47 ± 0.15	26.59 ± 11.62

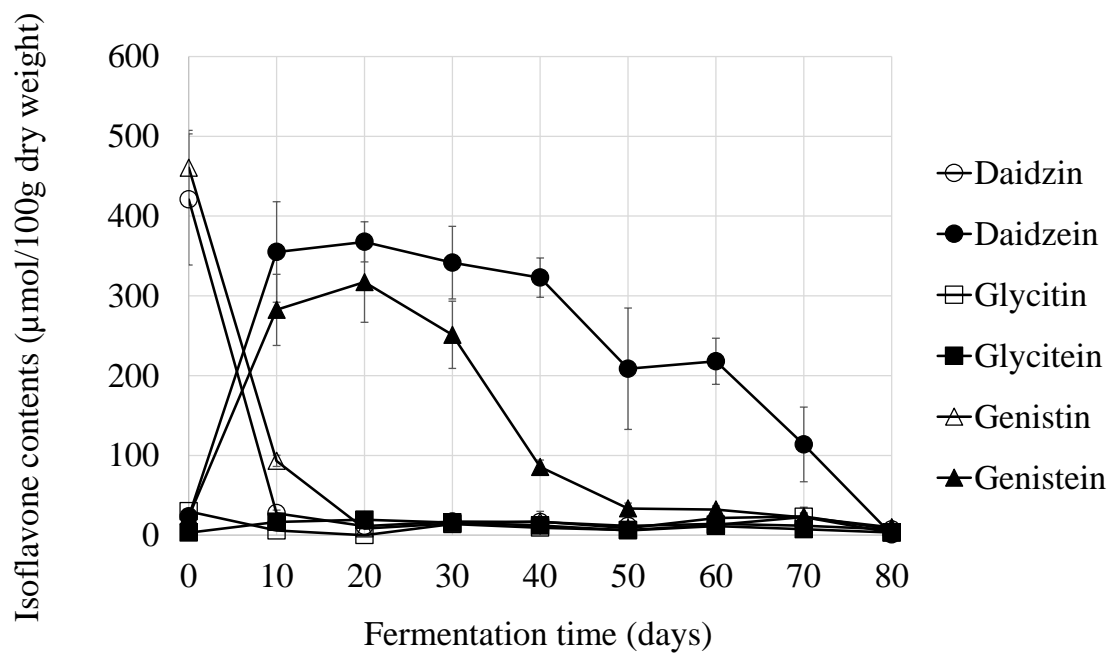
µmol/100 g dry weight ± SD

Soybeans were fermented with *Pleurotus ostreatus* for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. The extracts from these samples were analysed by HPLC.

A



B



C

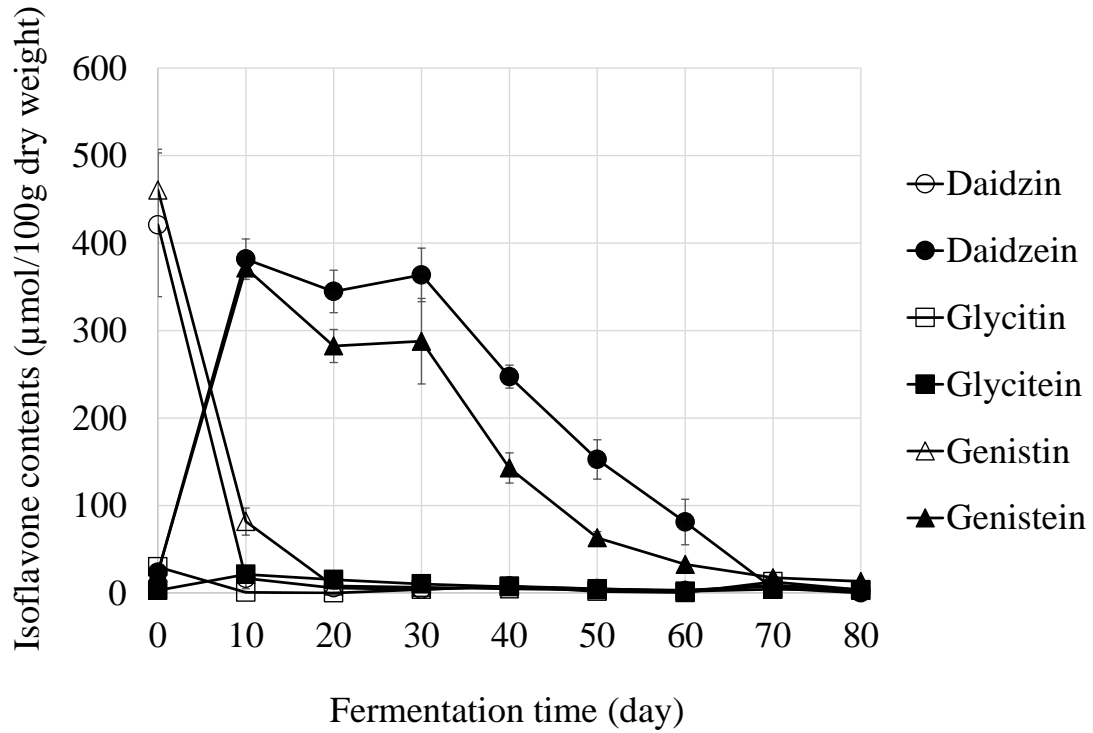


Fig. 1 – Changes in isoflavone contents during fermentation. Soybeans were fermented with *Pleurotus cornucopiae* and *Pleurotus ostreatus* for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. The extracts from these samples were analysed by HPLC. A: Unfermented soybeans (control). B: Soybeans fermented with *P. cornucopiae*. C: Soybeans fermented with *P. ostreatus*. Error bars represent standard deviation.

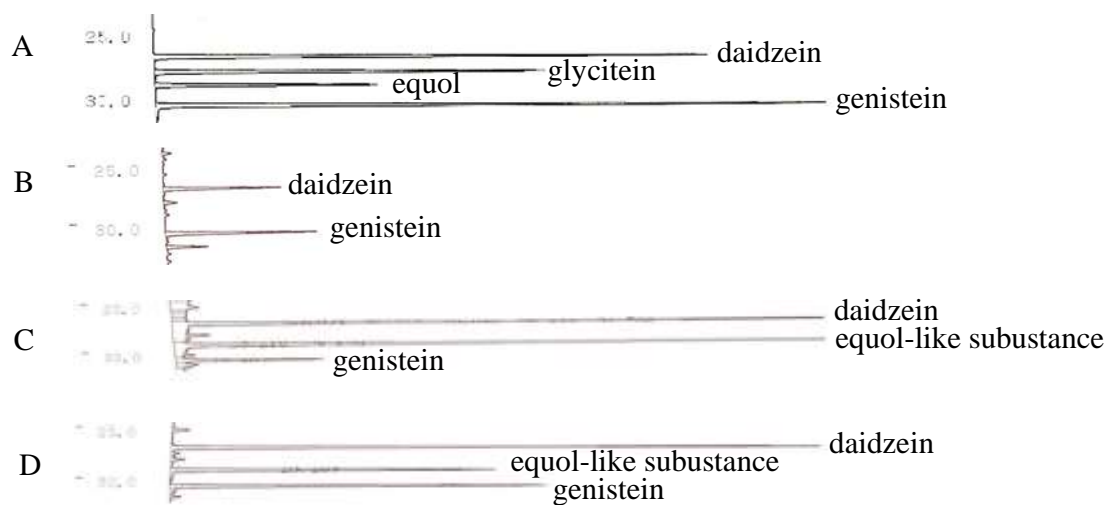


Fig. 2 – HPLC chromatograms of isoflavone and equol standards and the extracts of fermented soybeans. A: Isoflavone and equol standards, B: unfermented soybeans for 50 d incubation, C: soybeans fermented with *Pleurotus cornucopiae* for 50 d, D: soybeans fermented with *P. ostreatus* for 50 d. Retention time at approximately 27.0 min, 28.2 min, 29.2 min, 30.8 min show daidzein, glycitein, equol, and genistein, respectively.

Table 4. Changes in equol-like substance in fermented soybean extracts during fermentation.

Fermentation time (d)	Unfermented soybeans (control)	Fermented soybeans with <i>Pleurotus cornucopiae</i>	Fermented soybeans with <i>Pleurotus ostreatus</i>
0	0	0	0
10	0	0	0
20	0	0	0
30	0	0.84 ± 0.99	0
40	0	5.95 ± 0.72	0.38 ± 0.30
50	0	7.28 ± 1.44	2.13 ± 0.18
60	0	6.86 ± 0.18	1.99 ± 0.29
70	0	5.33 ± 0.69	0.84 ± 0.62
80	0	2.24 ± 0.38	0.72 ± 0.29

Soybeans were fermented with *P. cornucopiae* and *P. ostreatus* for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. Equol-like substance content was measured by HPLC. The total equol-like substance content is expressed as equol equivalents (mmol of equol/100 g dry weight) ± SD.

2-2-2 タモギタケおよびヒラタケのエクオール産生能

エクオールは、イソフラボンアグリコンであるダイゼインから合成されることが報告されている (Bowey et al., 2003; Jackson et al., 2011; Kawada et al., 2018)。そこで、タモギタケ、ヒラタケのエクオール産生能を確認するために、ダイゼインを含んだ液体培地でそれぞれを培養した。その結果、培養液中のダイゼインは、タモギダケで培養 0 日目に 0.04 mg/mL だったのに対し、培養 20 日目では 0.016 mg/mL とおよそ半分以下に減少し、それ以降は徐々に減少し、培養 40 日目では 0.014 mg/mL、培養 60 日目では 0.012 mg/mL に減少した (Fig. 3)。同様にヒラタケにおいても培養 0 日目に 0.04 mg/mL だったのに対し、培養 20 日目では 0.013 mg/mL、培養 40 日目では 0.012 mg/mL、培養 60 日目では 0.011 mg/mL と同様の傾向を示した (Fig. 3)。一方、タモギタケ、ヒラタケともに HPLC での分析においてダイゼイン以外の大きなピークは確認できず、また、エクオールのリテンションタイムに近い位置においてもピークは確認できなかった。この結果はタモギタケとヒラタケともにダイゼインは代謝するが、エクオールは産生しないことを示唆している。このことから発酵ダイズから確認されたエクオール様物質はエクオールではないと考えられる。

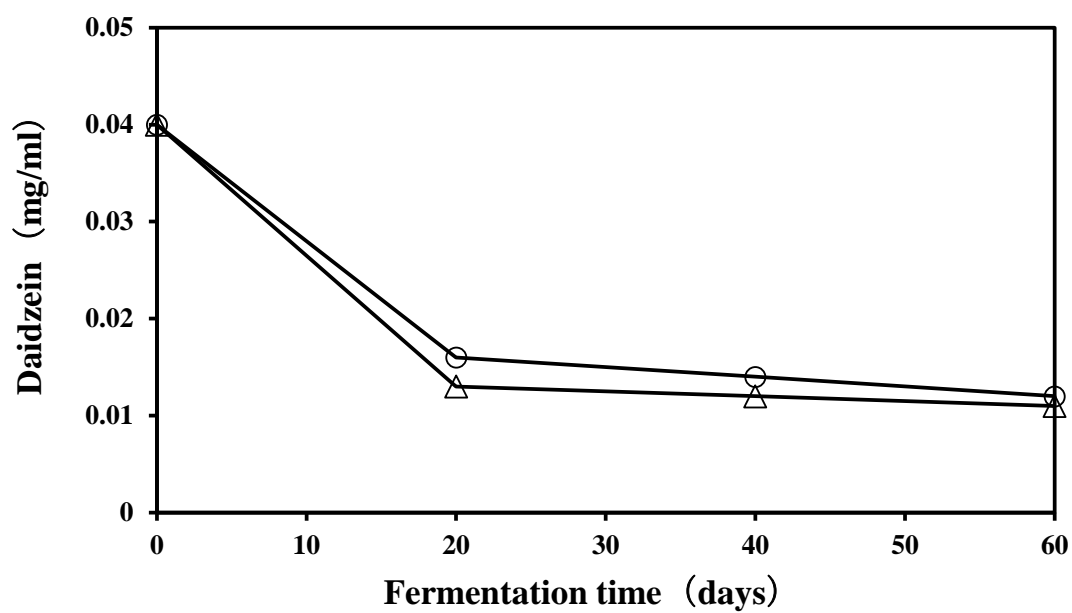


Fig. 3 Changes in daidzein in *P. cornucopiae* and *P. ostreatus* daidzein-containing liquid media. Samples were taken every 20 days of culture until day 60, and Daidzein was analyzed by HPLC.

○ : *P. cornucopiae*, △ : *P. ostreatus*

2-2-3 エクオール様物質の LC/MS による分析

最終的に粗抽出物から 209.7 倍に精製したサンプル (Table 5) の LC/MS 分析の結果、エクオール標品のマススペクトル (MS) では、243.05, 281.05 のピークが検出された (Fig. 4A)。エクオールの分子量は 242.27 g/mol であることから、243.05 は $[M+H]^+$ 、281.05 は $[M+K]^+$ が検出されたと考えられる。

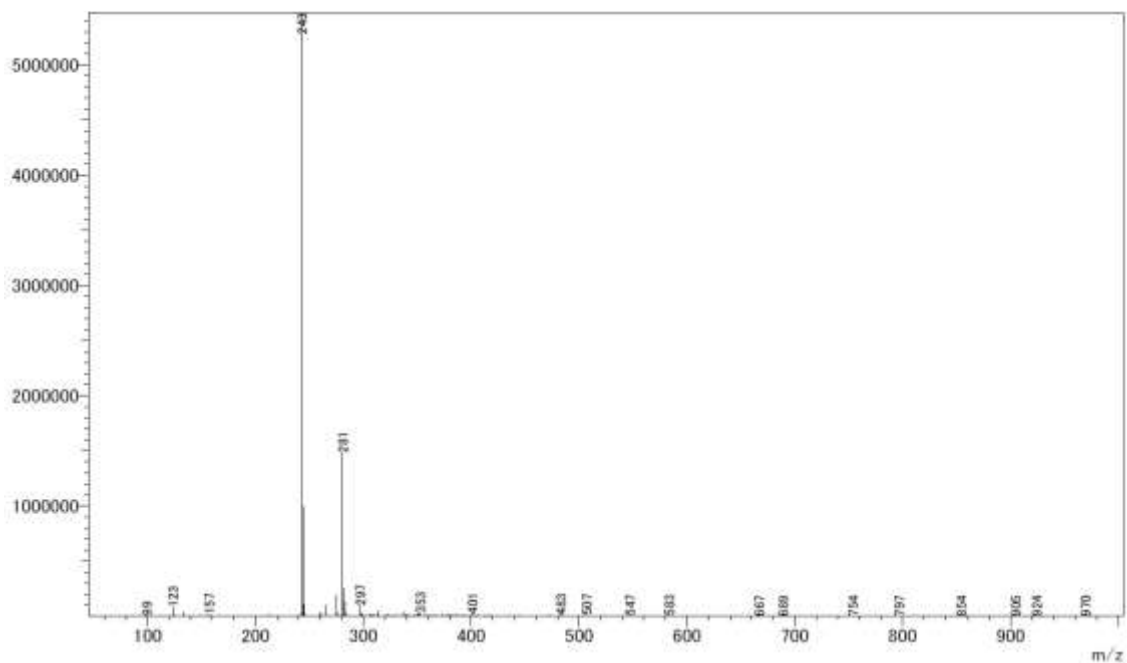
これに対して、タモギタケで 60 日発酵させたダイズから精製したエクオール様物質の MS では、ピーク強度が大きい順に、325.10, 355.00, 283.05, 125.10, 235.05, 181.05 のピークが検出され、エクオールとは異なる結果となった (Fig. 4B)。したがって、今回精製されたエクオール様物質は、エクオールとは別の物質であると考えられる。エクオール様物質の MS のピークに関して、MassBank (www.massbank.jp)、有機化合物のスペクトル・データベース (SDBS) (国立研究開発法人産業技術総合研究所) (<https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb>) の 2 種類のデータベースを使用して検索を行ったが、一致する物質はなく、物質を特定することができなかった。そのため、エクオール様物質は新規物質である可能性が考えられる。

Table 5. Purification table of equol-like substances.

	Weight (mg)	HPLC (Area)	Yield (%)	Fold
Sample	30000	46,953,755,455	100.00	1.00
HP20 (1)	1140	41,143,120,000	87.62	23.1
HP20 (2)	112.24	16,551,398,000	35.25	94.1
Wakosil- II	1.0	328,237,600	0.70	209.7
5C18HG				

The yield and fold of the purification process are expressed by the area of HPLC analysis of equol-like substances.

A



B

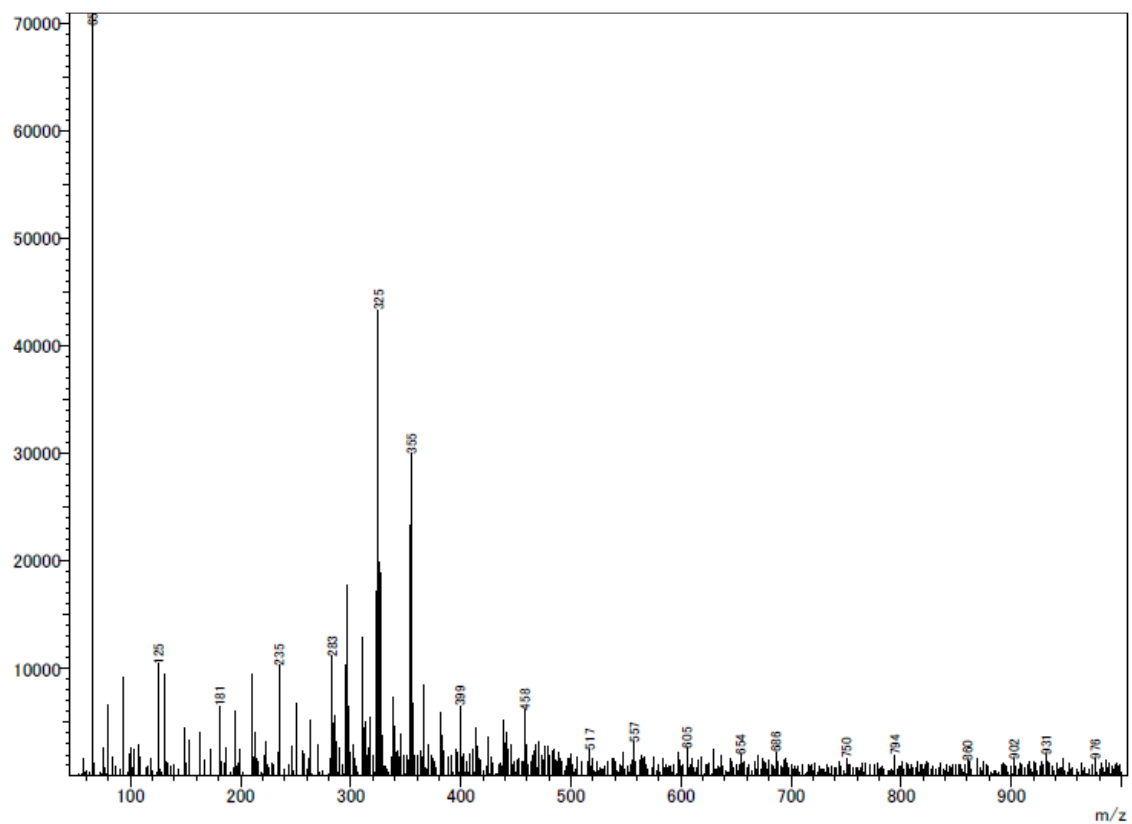


Fig. 4 – Liquid chromatography–mass spectrometry spectrum. A: Equol, B: Equol-like substance. A: 243.05 and 281.05 in descending order of peak intensity, B: 325.10, 355.00, 283.05, 125.10, 235.05, and 181.05 in descending order of peak intensity.

2-2-4 キノコ発酵ダイズのポリフェノール量の経時変化

タモギタケおよびヒラタケ発酵ダイズのポリフェノール量を没食子酸当量として測定した。未発酵ダイズ中のポリフェノール量は 1.61 (mmol GAE/100 g dry weight) であった (Table 6, Fig. 5)。タモギタケ発酵ダイズのポリフェノール量は、培養 40 日目に 6.31 (mmol GAE/100 g dry weight) と最大値を示し、未発酵ダイズの約 4.3 倍だった (Table 6, Fig. 5)。ヒラタケ発酵ダイズのポリフェノール量は、培養 30 日目に 5.69 (mmol GAE/100 g dry weight) と最大値を示し、未発酵ダイズの約 3.9 倍だった (Table 6, Fig. 5)。タモギタケおよびヒラタケ発酵ダイズのポリフェノール量は、最大値に達した後、徐々に減少した (Table 6, Fig. 5)。

Table 6. Changes in total polyphenol content during fermentation.

Fermentation time (d)	Unfermented soybeans (control)	Fermented soybeans with <i>Pleurotus cornucopiae</i>	Fermented soybeans with <i>Pleurotus ostreatus</i>
0	1.61 ± 0.01	1.61 ± 0.01	1.61 ± 0.01
10	1.63 ± 0.03	2.59 ± 0.11	2.48 ± 0.18
20	1.56 ± 0.01	4.46 ± 0.25	4.21 ± 0.31
30	1.45 ± 0.02	6.00 ± 0.56	5.69 ± 0.36
40	1.45 ± 0.03	6.31 ± 0.14	5.57 ± 0.16
50	1.54 ± 0.05	5.31 ± 0.60	4.73 ± 0.27
60	1.47 ± 0.05	4.09 ± 0.29	2.40 ± 0.20
70	1.35 ± 0.03	3.34 ± 0.73	2.09 ± 0.03
80	1.33 ± 0.05	2.50 ± 0.01	1.28 ± 0.02

Soybeans were fermented with *P. cornucopiae* and *P. ostreatus* for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. Total polyphenol content was measured using the Folin-Denis method. Total phenolic content is expressed as gallic acid equivalents (mmol GAE/100 g dry weight) ± SD.

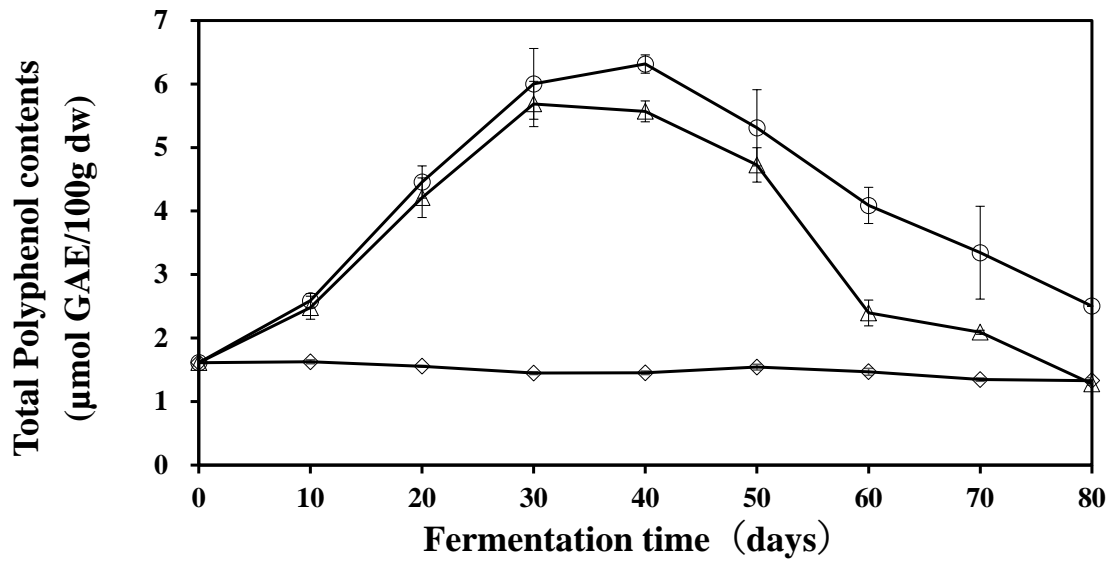


Fig 5. Changes in total polyphenol content during fermentation. Soybeans were fermented with *P. cornucopiae* and *P. ostreatus* for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. Total polyphenol content was measured using the Folin-Denis method. Total phenolic content is expressed as gallic acid equivalents (mmol GAE/100 g dry weight). Error bars represent standard deviation.

○ : *P. cornucopiae*, △ : *P. ostreatus*, ◇ : Unfermented soybeans (control)

2-2-5 キノコ発酵ダイズの遊離アミノ酸の経時変化

タモギタケおよびヒラタケ発酵ダイズの遊離アミノ酸量を分析したところ、未発酵ダイズでは総遊離アミノ酸量は、562.8 (mg/100 g dry weight) だったが (Table 7, Fig. 6)、発酵 10 日目から遊離アミノ酸が増加し、タモギタケ発酵ダイズでは、発酵 40 日目に総遊離アミノ酸量が、15,425.8 (mg/100 g dry weight) と最大となった (Table 8, Fig. 6)。ヒラタケ発酵ダイズでは発酵 50 日目に 12,735.1 (mg/100 g dry weight) と最大となった (Table 9, Fig. 6)。その後は、徐々に減少した (Table 8, 9, Fig.6)。

各アミノ酸については、タモギタケ発酵ダイズでは、セリン、ロイシン、フェニルアラニンおよびアルギニンは発酵 20 日目、ヒスチジンは発酵 30 日目に最大となり、その後、減少した (Table 8, Fig.6)。アスパラギン酸は、発酵 20 日目から 70 日目まで徐々に増加し、80 日目にわずかに減少した。そのほかのアミノ酸は発酵 40 日目に最大となり、その後、徐々に減少した (Table 8, Fig.6)。ヒラタケ発酵ダイズにおいても、同様の傾向を示すものがほとんどだったが、グルタミン酸、プロリン、アラニン、バリン、イソロイシン、ヒスチジンが、タモギタケ発酵ダイズよりも 10 日あるいは 20 日遅く最大となった (Table 9, Fig.6)。未発酵ダイズでは、分析した 16 種類のアミノ酸の中ではアルギニンがもっとも多く、2 番目にグルタミン酸が多かったが、発酵に伴ってどちらの発酵ダイズとも、グルタミン酸が最も増加した。タモギタケ発酵ダイズおよびヒラタケ発酵ダイズのグルタミン酸量は、それぞれ発酵 40 日目から 60 日目にかけて総遊離アミノ酸量の約 23~24%、約 16%~19%を占めた (Table 8, 9, Fig.6)。

Table 7. Changes in free amino acid contents during fermentation for unfermented soybeans (control).

Fermentation time (d)	0	10	20	30	40	50	60	70	80
Asp	62.1 ± 1.5	57.3 ± 1.4	59.7 ± 0.8	54.5 ± 1.8	59.4 ± 0.0	59.3 ± 0.8	57.9 ± 1.1	58.5 ± 0.9	59.2 ± 1.9
Thr	20.0 ± 2.9	12.5 ± 2.4	17.0 ± 0.2	14.4 ± 2.7	15.7 ± 0.9	15.9 ± 0.5	16.1 ± 2.3	16.1 ± 3.1	14.1 ± 0.9
Ser	16.0 ± 0.4	12.0 ± 0.7	9.6 ± 0.1	9.0 ± 0.8	9.9 ± 0.2	9.7 ± 0.1	10.0 ± 0.1	10.2 ± 0.3	10.2 ± 0.2
Glu	80.5 ± 2.0	59.2 ± 5.0	52.8 ± 0.7	46.8 ± 3.3	52.2 ± 0.1	52.2 ± 0.6	52.3 ± 0.7	52.5 ± 0.4	51.3 ± 1.6
Pro	8.2 ± 0.2	6.0 ± 0.5	3.6 ± 0.1	3.3 ± 1.6	3.7 ± 0.0	3.6 ± 0.1	3.8 ± 0.1	3.7 ± 0.1	3.5 ± 0.3
Gly	23.9 ± 0.5	21.9 ± 0.0	21.7 ± 0.3	20.4 ± 0.4	21.8 ± 0.1	21.7 ± 0.1	21.8 ± 0.0	21.7 ± 0.4	21.8 ± 0.2
Ala	36.5 ± 0.8	31.3 ± 1.4	33.8 ± 0.5	29.8 ± 1.2	33.2 ± 0.2	34.4 ± 0.3	35.2 ± 0.8	33.7 ± 0.4	33.6 ± 2.0
Val	15.9 ± 0.4	17.2 ± 0.3	15.7 ± 0.2	17.3 ± 1.4	15.8 ± 0.1	16.0 ± 0.1	16.0 ± 0.1	15.9 ± 0.2	15.5 ± 0.8
Met	30.5 ± 0.5	31.7 ± 0.5	30.3 ± 0.4	31.7 ± 0.2	30.5 ± 0.2	30.4 ± 0.2	30.3 ± 0.1	30.4 ± 0.5	29.7 ± 1.3
Ile	9.3 ± 0.2	8.8 ± 0.3	8.3 ± 0.1	8.8 ± 1.6	8.5 ± 0.0	8.5 ± 0.1	8.5 ± 0.0	8.5 ± 0.2	8.0 ± 0.7
Leu	19.8 ± 0.7	21.9 ± 0.5	19.3 ± 0.3	21.8 ± 1.7	19.7 ± 0.0	19.5 ± 0.1	19.7 ± 0.0	19.7 ± 0.3	18.7 ± 1.4
Tyr	41.2 ± 1.6	43.3 ± 0.9	38.3 ± 0.5	41.3 ± 0.8	38.9 ± 0.2	38.8 ± 0.1	38.1 ± 0.1	38.1 ± 0.5	37.1 ± 2.6
Phe	14.9 ± 0.3	14.7 ± 0.3	12.8 ± 0.2	13.2 ± 1.8	13.4 ± 0.2	13.3 ± 0.1	13.0 ± 0.1	12.7 ± 0.2	12.5 ± 1.1
His	12.7 ± 0.3	12.5 ± 3.5	9.6 ± 0.1	9.7 ± 0.6	9.2 ± 0.3	9.1 ± 0.1	9.0 ± 0.5	9.2 ± 0.9	8.4 ± 0.4
Lys	4.5 ± 0.1	3.4 ± 0.3	2.3 ± 0.0	3.2 ± 3.3	2.1 ± 0.3	2.2 ± 0.2	2.5 ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.1 ± 0.4
Arg	166.8 ± 4.4	154.0 ± 78.4	137.0 ± 1.7	127.1 ± 12.8	122.9 ± 8.9	128.1 ± 7.0	120.8 ± 6.8	145.3 ± 24.5	137.2 ± 9.8
Total	562.8 ± 10.0	507.7 ± 92.9	471.8 ± 6.2	452.4 ± 21.2	456.9 ± 9.7	463.0 ± 7.6	455.1 ± 12.2	478.5 ± 26.3	462.9 ± 21.3

mg/100 g dry weight ± SD

Asp: Aspartic Acid, Thr: Threonine, Ser: Serine, Glu: Glutamic Acid, Pro: Proline, Gly: Glycine, Ala: Alanine, Val: Valine, Met: Methionine, Ile: Isoleucine, Leu: Leucine, Tyr: Tyrosine, Phe: Phenylalanine, His: Histidine, Lys: Lysine, Arg: Arginine.

Soybeans were fermented for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. The extracts from these samples were analysed by HPLC using post-column derivatization method.

Table 8. Changes in free amino acid contents during fermentation for *Pleurotus cornucopiae* fermented soybeans.

Fermentation time (d)	0	10	20	30	40	50	60	70	80
Asp	62.1 ± 1.5	95.5 ± 5.9	454.7 ± 16.3	438.6 ± 47.0	460.9 ± 59.6	548.9 ± 36.0	554.3 ± 13.7	578.9 ± 14.2	517.0 ± 34.4
Thr	20.0 ± 2.9	276.3 ± 15.9	863.4 ± 78.1	1327.7 ± 73.6	1349.1 ± 104.1	1039.1 ± 97.9	939.4 ± 56.5	963.6 ± 40.3	758.2 ± 83.1
Ser	16.0 ± 0.4	121.5 ± 4.2	558.8 ± 32.4	267.6 ± 185.8	204.3 ± 36.7	278.9 ± 42.4	250.7 ± 8.3	234.6 ± 16.2	251.5 ± 16.6
Glu	80.5 ± 2.0	235.9 ± 11.9	1903.2 ± 271.5	2296.2 ± 295.2	3567.4 ± 225.8	3230.1 ± 173.8	3125.1 ± 118.0	3157.5 ± 63.4	2679.5 ± 183.1
Pro	8.2 ± 0.2	77.5 ± 2.1	358.4 ± 13.9	705.3 ± 81.5	984.1 ± 59.6	922.6 ± 84.8	955.4 ± 18.4	965.5 ± 37.3	740.9 ± 76.8
Gly	23.9 ± 0.5	37.9 ± 0.6	214.3 ± 36.5	395.5 ± 66.2	546.4 ± 34.4	444.8 ± 45.2	399.4 ± 38.3	427.6 ± 25.7	352.3 ± 37.8
Ala	36.5 ± 0.8	111.1 ± 2.6	590.5 ± 18.8	793.5 ± 169.5	1377.1 ± 21.3	1168.8 ± 80.1	1194.8 ± 38.2	1230.6 ± 54.3	1076.6 ± 110.2
Val	15.9 ± 0.4	141.7 ± 10.1	617.9 ± 40.7	817.8 ± 71.9	994.9 ± 43.6	932.8 ± 79.3	966.5 ± 8.8	967.1 ± 25.7	764.1 ± 72.1
Met	30.5 ± 0.5	93.7 ± 3.1	184.0 ± 24.0	227.8 ± 49.4	269.7 ± 8.9	228.1 ± 4.5	217.4 ± 3.3	218.7 ± 2.9	215.7 ± 3.6
Ile	9.3 ± 0.2	150.4 ± 36.7	555.7 ± 15.8	767.8 ± 26.7	947.2 ± 33.6	878.4 ± 61.6	898.3 ± 5.0	889.9 ± 28.5	718.9 ± 56.5
Leu	19.8 ± 0.7	346.1 ± 2.4	1245.6 ± 139.3	1020.7 ± 53.0	1225.4 ± 71.5	1108.8 ± 135.0	1144.0 ± 23.1	1191.6 ± 51.5	865.1 ± 136.7
Tyr	41.2 ± 1.6	240.7 ± 6.7	452.4 ± 20.0	455.3 ± 31.8	484.9 ± 27.9	379.5 ± 88.1	365.6 ± 25.6	255.7 ± 125.2	176.3 ± 1.3
Phe	14.9 ± 0.3	358.1 ± 11.7	810.5 ± 48.1	700.2 ± 42.5	761.6 ± 45.8	621.3 ± 58.4	605.2 ± 20.5	599.0 ± 33.1	474.7 ± 54.7
His	12.7 ± 0.3	57.3 ± 6.3	320.7 ± 3.9	367.5 ± 12.5	332.3 ± 13.4	203.0 ± 45.2	157.7 ± 19.7	153.2 ± 29.4	94.2 ± 14.9
Lys	4.5 ± 0.1	403.1 ± 21.9	718.3 ± 15.2	972.8 ± 9.0	1165.4 ± 41.7	1033.1 ± 90.8	1000.6 ± 33.9	1015.3 ± 37.4	797.0 ± 87.9
Arg	166.8 ± 4.4	428.4 ± 47.5	1080.0 ± 5.6	1044.5 ± 312.6	755.0 ± 90.6	696.5 ± 81.6	655.1 ± 35.3	690.2 ± 11.8	569.0 ± 91.1
Total	562.8 ± 10.0	3175.2 ± 110.1	10928.4 ± 411.3	12598.9 ± 191.1	15425.8 ± 826.3	13714.6 ± 1086.6	13429.5 ± 414.1	13539.0 ± 385.2	11050.9 ± 1020.6

mg/100 g dry weight ± SD

Asp: Aspartic Acid, Thr: Threonine, Ser: Serine, Glu: Glutamic Acid, Pro: Proline, Gly: Glycine, Ala: Alanine, Val: Valine, Met: Methionine, Ile: Isoleucine, Leu: Leucine, Tyr: Tyrosine, Phe: Phenylalanine, His: Histidine, Lys: Lysine, Arg: Arginine.

Soybeans were fermented with *Pleurotus cornucopiae* for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. The extracts from these samples were analysed by HPLC using post-column derivatization method.

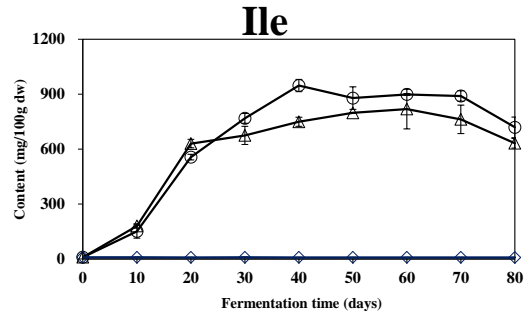
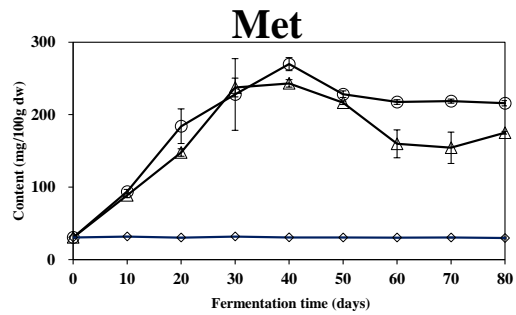
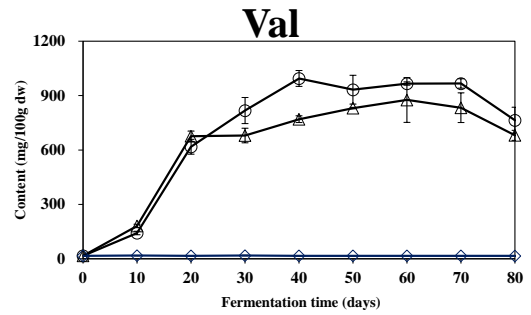
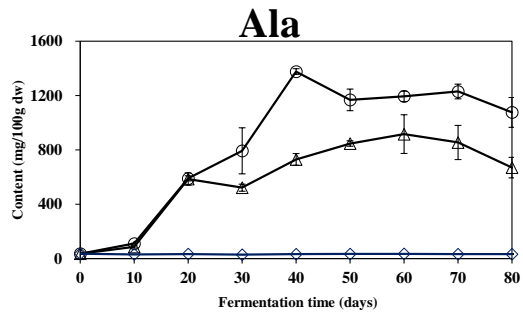
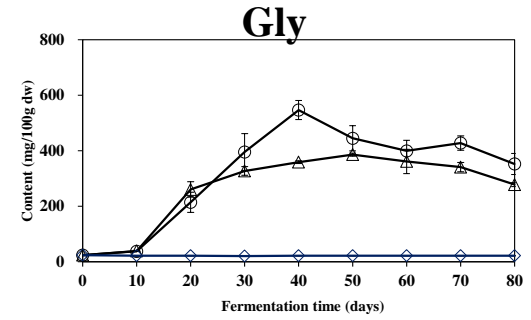
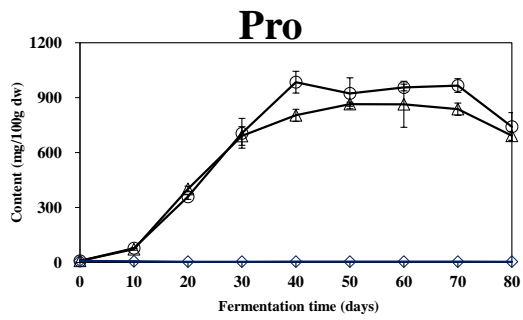
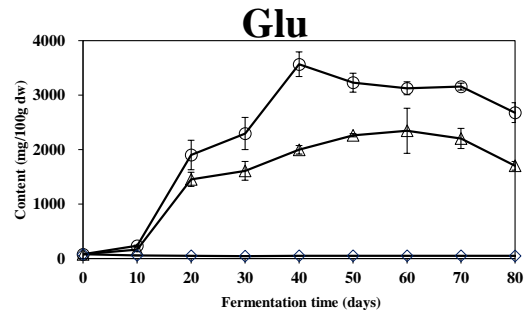
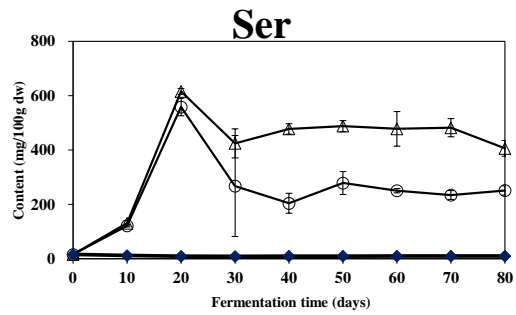
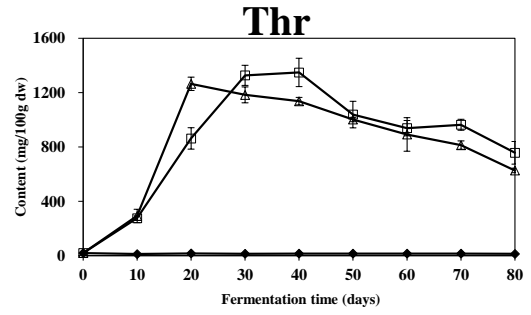
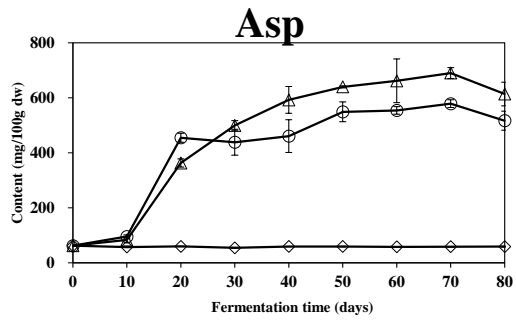
Table 9. Changes in free amino acid contents during fermentation for *Pleurotus ostreatus* fermented soybeans.

Fermentation time (d)	0	10	20	30	40	50	60	70	80
Asp	62.1 ± 1.5	83.3 ± 10.9	363.1 ± 14.8	499.6 ± 17.3	592.6 ± 48.5	639.8 ± 3.6	661.8 ± 79.4	690.1 ± 19.8	613.9 ± 43.4
Thr	20.0 ± 2.9	292.8 ± 49.4	1265.3 ± 48.9	1183.7 ± 58.7	1137.5 ± 27.6	1002.5 ± 15.7	892.3 ± 123.4	814.0 ± 30.6	627.8 ± 17.2
Ser	16.0 ± 0.4	131.1 ± 10.1	615.9 ± 11.2	424.7 ± 53.6	478.0 ± 19.2	488.4 ± 20.5	478.2 ± 63.7	482.3 ± 33.4	406.4 ± 29.1
Glu	80.5 ± 2.0	166.5 ± 32.1	1455.3 ± 130.5	1611.0 ± 171.2	1998.8 ± 77.2	2264.0 ± 29.1	2347.1 ± 414.5	2205.3 ± 185.4	1704.9 ± 79.1
Pro	8.2 ± 0.2	71.8 ± 5.2	400.8 ± 15.5	690.3 ± 50.9	803.2 ± 33.5	864.4 ± 11.4	863.2 ± 125.7	836.8 ± 33.6	691.4 ± 24.6
Gly	23.9 ± 0.5	38.7 ± 2.0	260.6 ± 27.6	327.1 ± 15.8	358.7 ± 4.8	386.1 ± 5.4	361.4 ± 43.9	340.9 ± 16.8	277.9 ± 7.2
Ala	36.5 ± 0.8	86.8 ± 8.0	585.9 ± 45.4	522.7 ± 25.5	730.2 ± 43.0	847.2 ± 19.0	916.6 ± 141.8	855.2 ± 125.4	670.3 ± 75.9
Val	15.9 ± 0.4	180.6 ± 10.1	676.0 ± 28.9	680.3 ± 40.5	769.8 ± 18.8	831.3 ± 4.3	876.5 ± 123.7	833.1 ± 81.8	680.9 ± 28.1
Met	30.5 ± 0.5	88.6 ± 3.1	147.8 ± 5.2	237.4 ± 13.0	243.1 ± 5.0	216.5 ± 2.4	159.7 ± 19.2	154.3 ± 21.7	175.0 ± 1.8
Ile	9.3 ± 0.2	179.8 ± 11.4	629.8 ± 23.2	674.5 ± 49.7	749.1 ± 24.5	797.8 ± 1.3	818.7 ± 108.6	762.2 ± 78.0	631.8 ± 26.4
Leu	19.8 ± 0.7	342.0 ± 20.5	1026.4 ± 49.8	889.2 ± 62.6	949.2 ± 33.2	988.8 ± 8.4	1022.2 ± 138.6	901.4 ± 127.9	763.7 ± 26.5
Tyr	41.2 ± 1.6	164.6 ± 17.5	494.3 ± 27.4	516.6 ± 53.6	467.5 ± 47.5	351.1 ± 6.3	190.3 ± 38.9	146.4 ± 12.8	173.7 ± 12.9
Phe	14.9 ± 0.3	271.6 ± 22.4	708.2 ± 30.1	698.0 ± 34.6	703.1 ± 20.2	673.8 ± 4.1	635.6 ± 76.5	553.5 ± 60.7	481.7 ± 24.0
His	12.7 ± 0.3	169.4 ± 7.8	336.9 ± 8.9	367.7 ± 13.1	372.7 ± 8.9	296.8 ± 7.6	214.4 ± 18.4	151.8 ± 10.0	112.3 ± 8.5
Lys	4.5 ± 0.1	594.8 ± 30.9	1079.1 ± 23.8	1228.5 ± 69.8	1337.4 ± 33.3	1321.8 ± 8.1	1287.7 ± 174.9	1163.3 ± 119.4	921.9 ± 15.2
Arg	166.8 ± 4.4	587.3 ± 44.7	1201.6 ± 35.2	1340.2 ± 29.3	896.5 ± 113.3	765.2 ± 9.0	560.9 ± 85.9	664.5 ± 110.0	525.2 ± 56.8
Total	562.8 ± 10.0	3449.7 ± 238.1	11247 ± 480.0	11891.5 ± 494.4	12587.7 ± 308.4	12735.1 ± 34.1	12286.6 ± 1683.8	11555.0 ± 745.2	9458.9 ± 271.7

mg/100 g dry weight ± SD

Asp: Aspartic Acid, Thr: Threonine, Ser: Serine, Glu: Glutamic Acid, Pro: Proline, Gly: Glycine, Ala: Alanine, Val: Valine, Met: Methionine, Ile: Isoleucine, Leu: Leucine, Tyr: Tyrosine, Phe: Phenylalanine, His: Histidine, Lys: Lysine, Arg: Arginine.

Soybeans were fermented with *Pleurotus ostreatus* for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. The extracts from these samples were analysed by HPLC using post-column derivatization method.



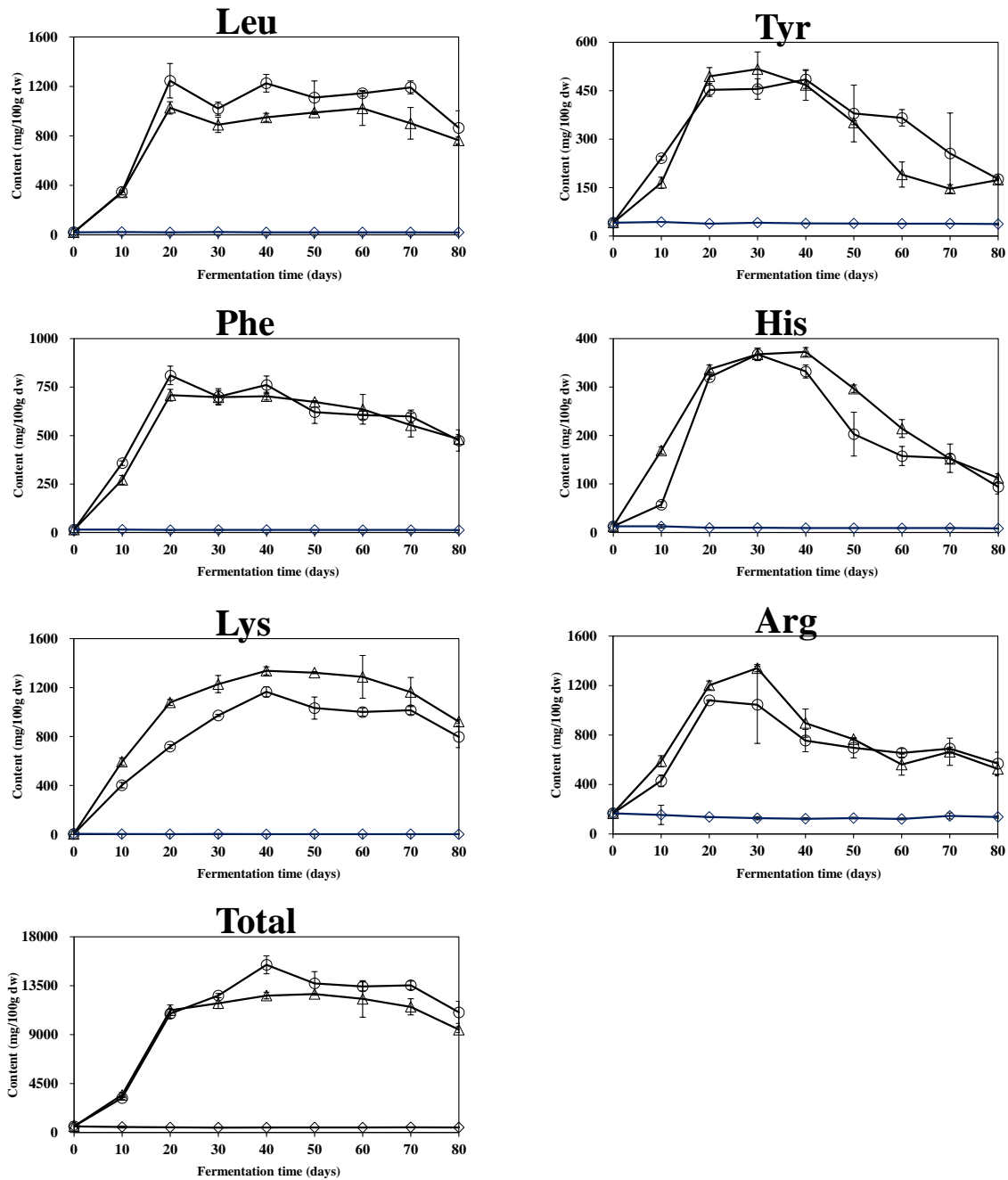


Fig. 6 Changes in free amino acid contents during fermentation. Soybeans were fermented with *Pleurotus cornucopiae* and *Pleurotus ostreatus* for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. The extracts from these samples were analysed by HPLC using post-column derivatization method. Error bars represent standard deviation.

Asp: Aspartic Acid, Thr: Threonine, Ser: Serine, Glu: Glutamic Acid, Pro: Proline, Gly: Glycine, Ala: Alanine, Val: Valine, Met: Methionine, Ile: Isoleucine, Leu: Leucine, Tyr: Tyrosine, Phe: Phenylalanine, His: Histidine, Lys: Lysine, Arg: Arginine.

○ : *P. cornucopiae*, △ : *P. ostreatus*, ◇ : Unfermented soybeans (control).

2-3 考察

本研究では、タモギタケおよびヒラタケ発酵ダイズのイソフラボン量の変動に関して解析した。未発酵ダイズ(0日)に含まれるイソフラボンの総量(961.30 [$\mu\text{mol}/100\text{ g dry weight}$]) (Table 1, Fig. 1A) は、タモギタケおよびヒラタケ発酵に伴って徐々に減少したが (Table 2, 3, Fig. 1B, C)、主要なダイズイソフラボン配糖体であるダイジン(420.75 [$\mu\text{mol}/100\text{ g dry weight}$]) およびゲニスチン(460.51 [$\mu\text{mol}/100\text{ g dry weight}$]) (Table 1, Fig. 1A) が、発酵の初期段階で大部分がアグリコン(ダイゼインとゲニステイン)に変換された (Table 2, 3, Fig. 1B, C)。タモギタケおよびヒラタケ発酵20日目のダイズのイソフラボンの総量は、20日目の未発酵ダイズと比較して、それぞれ70.0%および63.4%に減少したが、アグリコンの割合はそれぞれ97.3%および97.9%と最大値を示した (Table 1~3, Fig. 1)。この結果は、キノコ発酵ダイズをアグリコンの供給源として利用するには、タモギタケおよびヒラタケ両菌種とも、20日目の発酵物が適していることが明らかとなった。

キノコを用いたダイズの固体発酵のイソフラボン分析は、これまでに2つの研究グループによって報告されている。福田ら(2007)は、タモギタケで14日間発酵させたダイズでは、すべての配糖体が消失し、ダイジンがほぼ100%ダイゼインに変換され、ゲニスチンが約88%のゲニステインに変換されたと報告した。しかし、抽出されたイソフラボンの量は、今回の研究で抽出された量の約8分の1から10分の1であり、両者の量的な相違は、使用されたダイズとタモギタケ品種や抽出方法が異なることが部分的に影響している可能性がある。鮫島ら(2019)は、スエヒロタケで28日間発酵させた黒ダイズにおいて、未発酵黒ダイズの配糖体の総量83.75 (mg/100 g dry weight) が消失し、64.7 (mg/100 g dry weight) のアグリコンが生成したと報告した。本研究では、未発酵ダイズ中の総

イソフラボン量は400.85 (mg/100 g dry weight) (=961.30 [$\mu\text{mol}/100\text{ g dry weight}$])、発酵20日目のタモギタケ発酵ダイズおよびヒラタケ発酵ダイズのアグリコン量は、それぞれ184.66 (mg/100 g dry weight) (総イソフラボン:193.01 mg = 723.84 [$\mu\text{mol}/100\text{ g dry weight}$]) および168.29 (mg/100 g dry weight) (総イソフラボン:174 mg = 656.13 [$\mu\text{mol}/100\text{ g dry weight}$]) (Table 1~3, Fig. 1) だった。したがって、今回得られたタモギタケ発酵ダイズのアグリコン量は、鮫島ら (2019) の報告より2.5倍多かった。また、鮫島ら (2019) のスエヒロタケで発酵させた黒ダイズのアグリコンはすべてダイゼインであり、ゲニステインは検出されなかった。

一方、Leeら (2019) は、マツタケで発酵させた発芽ダイズにおける配糖体からアグリコンへの最大変換率は、発酵9日目で88%であり、総アグリコン量は500 ($\mu\text{mol}/100\text{ g dry weight}$) であったと報告した。さらに、Miuraら (2002) は、霊芝で15日間発酵させたダイズの配糖体からアグリコンへの変換率は70.7%、ゲニスチンからゲニステインへの変換率は81.6%であると報告した。実験条件が異なるため、直接比較することはできないが、本研究の配糖体からアグリコンへの変換率は、他の研究例に比べて高い結果であった。上述のように、すべての報告で担子菌によるイソフラボン配糖体のアグリコンへの高い変換率が示されているが、本研究は、各イソフラボン成分を詳細に分析した最初の研究であり、タモギタケおよびヒラタケで10~30日間発酵させたダイズ中で、ほとんどの配糖体がアグリコンに変換されることが明らかになった。また、配糖体からアグリコンへの変換率が97%以上であるため、タモギタケおよびヒラタケで発酵したダイズは、他の担子菌で発酵したダイズよりも高いアグリコン生産効率を示したことから、今後、キノコ発酵によるアグリコン生産では我々の系が最も適していると考えられる。

エクオールは元々ダイズには存在しないが、腸内細菌叢によってダイゼイン

から代謝され生成される (Jackson et al., 2011; Sathyamoorthy & Wang, 1997)。エクオール様物質は、タモギタケ発酵ダイズでは発酵 30 日目から、ヒラタケ発酵ダイズでは発酵 40 日目から大きなピークとして検出された (Table 4)。しかし、ダイゼインを液体培地に添加して、タモギタケおよびヒラタケのエクオール産生能を調べたところ、ダイゼイン量は減少したが、エクオールは確認されなかった。また、タモギタケ発酵ダイズから精製したエクオール様物質を LC/MS 分析したところ、分子量がエクオールよりも大きく同等ではないことが明らかとなった (Fig. 3A, B)。この結果は、発酵ダイズにはエクオールとほぼ同じ時間で溶出されるエクオールではない未知の物質が検出されたことを示している。今後はエクオール様物質を精製し、正確な質量分析や NMR を用いて同定する必要がある。

タモギタケおよびヒラタケ発酵ダイズのポリフェノール量は、発酵 30 日目と 40 日目で未発酵ダイズの約 4 倍に増加、その後減少した (Table 6, Fig. 5)。未発酵ダイズ中のイソフラボンの総量 (961.30 [$\mu\text{mol}/100\text{ g}$ 乾燥重量]) は、ポリフェノールの総量 (1.61 [$\text{mmol GAE}/100\text{ g}$ 乾燥重量]) と単純に比較すると 60.1% を占める計算になる (Table 6, Fig. 5)。Xu & Chang は (2007, 2011)、ダイズ中の没食子酸に相当するポリフェノールの総量が、1.17~1.53 ($\text{mmol GAE}/100\text{ g dry weight}$) であると報告しており、これは本研究とほぼ同様の数値であった。一方、タモギタケとヒラタケ発酵ダイズの総ポリフェノール量と総イソフラボン量の経時変化を比較してみると、総ポリフェノール量は、発酵ダイズでは発酵 30 日目と 40 日目で約 3.5~3.9 倍 (5.57~6.31 [$\text{mmol GAE}/100\text{ g dry weight}$]) まで増加し、その後減少したのに対して (Table 6, Fig. 5)、発酵ダイズの総イソフラボン量は発酵中に徐々に減少した (Table 6, Fig. 5)。この結果から、タモギタケおよびヒラタケ発酵ダイズでは、総ポリフェノール量の増加を引き起こしている物

質は、キノコ発酵によって新たに生成されたポリフェノール成分であると考えられる。

ダイズの表皮には、イソフラボンに加えて他のポリフェノール成分、特に高分子量リグニンとプロアントシアニジンが含まれている (Senda et al., 2017; Xu & Chang, 2009)。キノコは高いリグニン分解活性を持っているため (Lundell et al., 2010)、タモギタケおよびヒラタケはこれらの高分子量ポリフェノールを分解できるため、タモギタケやヒラタケがダイズに含まれる高分子のポリフェノールを分解し、ポリフェノール量が増加する可能性がある。さらに、キノコはポリフェノールを酸化的に分解するだけでなく、ポリフェノールを重合させることも可能である (Rodriguez Couto & Toca Herrera, 2006)。したがって、40~50 日の発酵後にポリフェノール量が低下した原因として、タモギタケおよびヒラタケによって一旦低分子化したポリフェノール成分の再重合による見かけ上のポリフェノール量の減少の可能性が考えられる。あるいは、ポリフェノールは代謝され、より小さな分子に分解された可能性も考えられる。

Espinosa-Páez ら (2017) は、ヒラタケで 14 日間発酵させた黒豆は、総ポリフェノール含有量が 1.26 倍増加したと報告した (未発酵の黒豆 : 148 [mg GAE/100 g dry weight]、ヒラタケ発酵黒豆 : 187 [mg GAE/100 g dry weight])。Xu ら (2018) は、マッシュルーム (*Agaricus bisporus*) で 35 日間発酵させたダイズでは、総ポリフェノールが 50 (mg GAE/100 g dry weight) から 60 (mg GAE/100 g dry weight) まで 1.2 倍増加したと報告した。本研究では、ポリフェノール量は未発酵ダイズの 274.35 (mg GAE/100 g dry weight) (= 1.61 [mmol GAE/100 g dry weight]) からヒラタケ発酵ダイズで発酵 10 日目に 1.67 倍 (421.77 [mg GAE/100 g dry weight] = 2.48 [mmol GAE/100 g dry weight])、発酵 20 日目に 2.83 倍 (716.11 [mg GAE/100 g dry weight] = 4.21 [mmol GAE/100 g dry weight]) に増加した (Table 6, Fig. 5)。

上記の報告では、ポリフェノールの量は本研究よりも低かったものの、キノコ発酵により総ポリフェノールが増加する傾向は同様であった。さらに、本研究では、40 日間のダイズのキノコ発酵でポリフェノールの総量が最大約 4 倍に増加し、タモギタケ発酵ダイズでは最大 1,074.13 (mg GAE/100 g dry weight) (= 6.31 [mmol GAE/100 g dry weight)、ヒラタケ発酵ダイズでは最大 967.56 (mg GAE/100 g dry weight) (= 5.57 [mmol GAE/100 g dry weight]) になることが明らかになった。本研究は、タモギタケでダイズを発酵させるとポリフェノール含有量が増加することを初めて明らかにした。今後は、ポリフェノール量が最も高い発酵ダイズにおけるポリフェノール成分の解析が必要である。

一方、本研究では、タモギタケ発酵ダイズおよびヒラタケ発酵ダイズの遊離アミノ酸の発酵期間での変動についても解析した。タモギタケ発酵ダイズおよびヒラタケ発酵ダイズは、それぞれ総遊離アミノ酸量が最大を示した発酵 40 日目、発酵 50 日目において、それぞれ未発酵ダイズの約 27 倍、約 23 倍に増加した (Table 8, 9, Fig.6)。タモギタケおよびヒラタケに含まれるプロテアーゼによってダイズ中のタンパク質が遊離アミノ酸に分解されたと考えられる。ゆでたダイズの総アミノ酸量 (日本食品標準成分表 2020 年版 (八訂)) (Table 10) のデータと本研究で使用した未発酵ダイズの総アミノ酸 (Table 10) を比較すると、メチオニン、チロシンのみ本研究で使用したダイズの方が八訂のダイズよりも含有量が多く、そのほかのアミノ酸は含有量が少なかった。未発酵ダイズの総アミノ酸量と発酵ダイズの遊離アミノ酸量を比較すると、タモギタケ発酵ダイズではアスパラギン酸、セリン、メチオニンおよびチロシンを除く 12 種のアミノ酸、ヒラタケ発酵ダイズではタモギタケ発酵ダイズと同様の 4 種とグリシンを除く 11 種が、タモギタケおよびヒラタケによって分解され、ほぼすべて遊離アミノ酸に変換されたことが示唆される。特に、旨味成分の 1 つであるグルタミン酸は、

もっとも増加したアミノ酸であった。これらのことからキノコ発酵ダイズは、タンパク質のほぼすべてが遊離アミノ酸に変換されたことから栄養吸収性が向上し、また、グルタミン酸が顕著に増えたことから、呈味性も向上したと考えられることから、機能性食品の原材料としての利用が期待される。

Leeら（2019）は、発芽ダイズをマツタケで3日間、6日間、9日間および12日間、発酵させたところ、遊離アミノ酸が発酵期間に応じて増加することを報告している。また、その中でもグルタミン酸が最も増加したことも報告しており、本研究と同様の結果だった。本研究では、さらに長い期間の発酵によりダイズ中のタンパク質をほぼすべてタモギタケおよびヒラタケが遊離アミノ酸へ変換することが明らかとなった。また、ヒラタケのダイズ発酵の遊離アミノ酸の変動を解析した報告は本報告が初めてである。

Table 10. Soybean boiled of total amino acid contents

	Standard Tables of Food Composition in Japan 2020 (eighth Revised Version)	unfermented soybeans (control) used in this study
Asp	1900	1292
Thr	700	478
Ser	940	751
Glu	3000	2083
Pro	870	708
Gly	690	541
Ala	690	592
Val	800	448
Met	210	550
Ile	760	359
Leu	1300	973
Tyr	590	860
Phe	860	678
His	430	85
Lys	1000	700
Arg	1200	868
Total	15940	11967

mg/100 g dry weight

Asp: Aspartic Acid, Thr: Threonine, Ser: Serine, Glu: Glutamic Acid, Pro: Proline, Gly: Glycine, Ala: Alanine, Val: Valine, Met: Methionine, Ile: Isoleucine, Leu: Leucine, Tyr: Tyrosine, Phe: Phenylalanine, His: Histidine, Lys: Lysine, Arg: Arginine.

第3章 キノコ発酵ダイズの機能性解析

ダイズをタモギタケ、または、ヒラタケで発酵させることによってイソフラボン配糖体からアグリコンに変換させることおよびポリフェノール量が増加することが明らかとなった。他報告では、イソフラボンアグリコン増加やポリフェノール量の増加に伴い抗酸化活性が増加すること (Espinosa-Paez et al, 2017, Lee et al, 2019)、もしくは未発酵よりも抗酸化活性の減少が小さいことが報告されている (鮫島ら、2019)。タモギタケ発酵ダイズおよびヒラタケ発酵ダイズにおいても増加する可能性があることから抗酸化活性の変動について 3 種の抗酸化活性測定を行った。

3-1 実験方法

3-1-1 DPPH ラジカル消去活性を用いた抗酸化活性の測定

抗酸化活性は、Blois によって報告された 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性の方法 (Blois, 1958) に従って、いくつかの修正を加えて測定した。100%エタノールで適当な濃度に希釈されたポリフェノール抽出液 (100 μ L) を 96 穴プレートに加え、続いて 50 μ L の MQ 水と 50 μ L の 400 μ M DPPH エタノール溶液を加えた。攪拌後、反応混合液を暗所、室温で 20 分間静置した。反応混合液の吸光度を、Multiskan GO プレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, USA) を使用して 517 nm で測定した。コントロールとして、上記 400 μ M DPPH 溶液の代わりに 100%エタノール 50 μ L を加え、暗所での静置時間を除いて同様の操作を行った (コントロール A)。また、ブランクとして、両反応液とも、抽出液の代わりに 100%エタノール 100 μ L を添加したサンプルフリー反応液を調製し、同様の操作を行った (ブランク)。そして以下の式で計算される酸化阻害率として表した。

$$\text{酸化阻害率(\%)} = 1 - \frac{\text{サンプル吸光度} - \text{ブランク}}{\text{コントロール吸光度} - \text{ブランク}} \times 100$$

また、抽出液の代わりに 160 μ M Trolox 溶液を 160, 120, 80, 40 μ M の濃度になるように添加し陽性コントロールとした。横軸にサンプルまたは、Trolox 濃度、縦軸に酸化阻害率をプロットし回帰線を作成した。求めた回帰線からサンプル、Trolox の IC50 (50%阻害率) を求めた。Trolox 当量を次式で求めた。

$$\text{TEAC} = \text{Trolox の IC50} / \text{サンプルの IC50}$$

抗酸化活性の指標として、Trolox を標準物質として使用し、結果を Trolox 当量 (μ M TE/100 g dry weight) として算出した。

3-1-2 FRAP 法を用いた抗酸化活性の測定

Benzie and Strain によって報告された Ferric Reducing Antioxidant Power 法 (FRAP 法) (Benzie & Strain, 1996, 1999) に従って、いくつかの修正を加えて測定した。300 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.6)、10 mM 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) 溶液および 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液を 10 : 1 : 1 で混合し、これを FRAP 試薬とした。100%エタノールで適当な濃度に希釈されたポリフェノール抽出液 (10 μL) を 96 穴プレートに加え、続いて 190 μL の FRAP 試薬を加えた。攪拌後、反応混合液を暗所、37°C で 20 分間静置した。反応混合液の吸光度を、Multiskan GO プレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, USA) を使用して 593 nm で測定した。ブランクとして、上記 FRAP 試薬の代わりに MQ 水 190 μL を加え、暗所での静置時間を除いて同様の操作を行った (ブランク)。また、抽出液の代わりに Trolox 溶液を 400, 300, 200, 100 μM の濃度になるように添加し陽性コントロールとした。横軸にサンプルまたは、Trolox 濃度、縦軸に吸光度をプロットし回帰線を作成した。サンプルの傾きを Trolox の傾きで割ることによって Trolox 当量 ($\mu\text{M TE}/100 \text{ g dry weight}$) として算出した。

3-1-3 ABTS ラジカル消去活性を用いた抗酸化活性の測定

Re らによって作られた 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid) (ABTS) ラジカル消去活性 (Re et al, 1999) に従って、いくつかの修正を加えて測定した。7 mM ABTS 溶液 5 mL に 140 mM K₂S₂O₈ 88 μL を加え、室温、暗所で 12~16 時間反応させ、ABTS ラジカルを調製した。その後、734 nm における吸光度が 0.7 ± 0.02 になるように 100%エタノールで希釈し、これを ABTS ラジカル溶液とした。100%エタノールで適当な濃度に希釈されたポリフェノール抽出液 (100 μL) を 96 穴プレートに加え、続いて 100 μL の ABTS ラジカル溶液を加えた。攪拌後、反応混合液を暗所、30°C で 4 分間静置した。反応混合液の吸光度を、Multiskan GO プレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, USA) を使用して 734 nm で測定した。コントロールとして、上記 ABTS ラジカル溶液の代わりに 100%エタノール 100 μL を加え、暗所での静置時間を除いて同様の操作を行った (コントロール A)。また、ブランクは、両反応液とも、抽出液の代わりに 100%エタノール 100 μL を添加したサンプルフリー反応液を調製し (ブランク)、同様の操作を行った。そして以下の式で計算される酸化阻害率として表した。

$$\text{酸化阻害率(\%)} = 1 - \frac{\text{サンプル吸光度} - \text{ブランク}}{\text{コントロール吸光度} - \text{ブランク}} \times 100$$

また、抽出液の代わりに 160 μM Trolox 溶液を 40μl, 30μl, 20μl, 10μl 分注し、総量で 100 μL になるようにエタノールを加え、陽性コントロールとした。横軸にサンプルまたは、Trolox 濃度、縦軸に酸化阻害率をプロットし回帰線を作成した。求めた回帰線からサンプルと Trolox の IC₅₀ (50%阻害率) を求めた。Trolox 当量は次式で求めた。

TEAC = Trolox の IC50 / サンプルの IC50

Trolox を標準として使用し、結果を Trolox 当量 ($\mu\text{M TE}/100 \text{ g dry weight}$) として算出した。

3-2 結果

3-2-1 DPPH ラジカル消去活性による抗酸化活性の経時変化

タモギタケおよびヒラタケ発酵ダイズのポリフェノール抽出物の DPPH ラジカル消去活性の測定により、抗酸化活性の経時変化を求めた。未発酵ダイズの DPPH ラジカル消去活性は 155.9 ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g dry weight}$) であった (Table 11, Fig. 7)。タモギタケ発酵ダイズでは、発酵に伴い DPPH ラジカル消去活性が急激に増加し、発酵 30 日目に 953.7 ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g dry weight}$) と最大値を示し、これは未発酵ダイズの約 6.1 倍であった (Table 11, Fig. 7)。その後、DPPH ラジカル消去活性は発酵 40 日目には急激に低下し、50 日目には未発酵ダイズと同程度まで低下した (Table 11, Fig. 7)。これに対して、ヒラタケ発酵ダイズでは、発酵に伴い DPPH ラジカル消去活性は発酵 20 日目に 296.5 ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g dry weight}$) と最大値を示し、未発酵ダイズの約 1.9 倍であった。その後、発酵 40 日目に減少し、40 日目以降は未発酵ダイズと同程度 (137.4 ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g dry weight}$)) まで低下した (Table 11, Fig. 7)。

Table 11. Changes in antioxidant activity (DPPH) of fermented soybean extracts during fermentation.

Fermentation time (d)	Unfermented soybeans (control)	Fermented soybeans with <i>Pleurotus cornucopiae</i>	Fermented soybeans with <i>Pleurotus ostreatus</i>
0	155.9 ± 26.6	155.9 ± 26.6	155.9 ± 26.6
10	134.2 ± 18.4	424.3 ± 204.1	104.7 ± 12.0
20	147.5 ± 28.2	857.4 ± 145.2	187.0 ± 28.1
30	144.8 ± 18.4	953.7 ± 213.4	296.5 ± 36.6
40	159.8 ± 20.2	341.7 ± 125.4	137.4 ± 16.5
50	173.9 ± 33.9	142.6 ± 21.4	75.8 ± 6.4
60	178.6 ± 26.5	112.3 ± 1.5	76.2 ± 4.1
70	171.3 ± 30.3	107.0 ± 23.4	103.4 ± 2.0
80	172.7 ± 19.2	121.5 ± 9.2	109.6 ± 5.6

Soybeans were fermented with *P. cornucopiae* and *P. ostreatus* for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. The antioxidant activity of the extracts was analysed by DPPH radical scavenging activity. Trolox was used as a standard and the results were expressed as Trolox equivalents ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g dry weight}$) \pm SD.

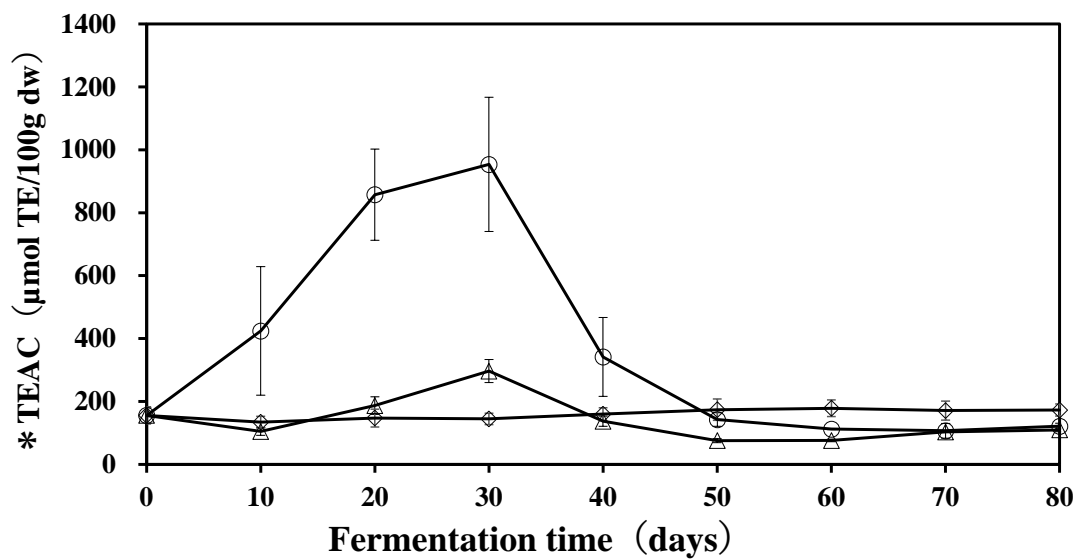


Fig. 7 Changes in antioxidant activity (DPPH) of fermented soybean extracts during fermentation. Soybeans were fermented with *P. cornucopiae* and *P. ostreatus* for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. The antioxidant activity of the extracts was analysed by DPPH radical scavenging activity. Trolox was used as a standard and the results were expressed as Trolox equivalents ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g dry weight}$). Error bars represent standard deviation.

○ : *P. cornucopiae*, △ : *P. ostreatus*, ◇ : Unfermented soybeans (control)

3-2-2 FRAP 法による抗酸化活性の経時変化

3-2-1 と同様に、タモギタケおよびヒラタケ発酵ダイズの FRAP 法による抗酸化活性の経時変化を求めた。未発酵ダイズの FRAP 法による抗酸化活性は 394.9 ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g dry weight}$) であった (Table 12, Fig. 8)。タモギタケ発酵ダイズでは、FRAP 法による抗酸化活性が急激に増加し、発酵 30 日目に 1195.6 ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g dry weight}$) と最大値を示し、これは未発酵ダイズの約 3.7 倍であった (Table 12, Fig. 8)。その後、発酵 40 日目には急激に低下し、50 日目には未発酵ダイズと同程度まで低下した (Table 12, Fig. 8)。これに対して、ヒラタケ発酵ダイズでは、FRAP 法による抗酸化活性は発酵 30 日目に 603.1 ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g dry weight}$) と最大値を示し、未発酵ダイズの約 1.8 倍であった。その後、発酵 40 日目に減少し、40 日目以降は未発酵ダイズと同程度まで低下した (Table 12, Fig. 8)。DPPH ラジカル消去活性と同様の傾向を示した。

Table 12. Changes in antioxidant activity (FRAP) of fermented soybean extracts during fermentation.

Fermentation time (d)	Unfermented soybeans (control)	Fermented soybeans with <i>Pleurotus cornucopiae</i>	Fermented soybeans with <i>Pleurotus ostreatus</i>
0	394.9 ± 7.7	394.9 ± 7.7	394.9 ± 7.7
10	309.3 ± 27.8	749.3 ± 143.8	295.6 ± 7.0
20	359.6 ± 60.4	1028.2 ± 52.7	525.4 ± 9.9
30	327.5 ± 39.5	1195.6 ± 181.9	603.1 ± 41.4
40	363.6 ± 11.2	697.8 ± 87.4	343.1 ± 31.5
50	286.8 ± 20.1	396.3 ± 88.0	233.6 ± 17.1
60	315.3 ± 16.0	406.3 ± 82.9	185.2 ± 28.2
70	286.9 ± 36.2	258.1 ± 3.1	190.1 ± 11.5
80	258.4 ± 9.4	269.7 ± 37.7	257.4 ± 54.0

Soybeans were fermented with *P. cornucopiae* and *P. ostreatus* for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. The antioxidant activity of the extracts was analysed by FRAP Assay. Trolox was used as a standard and the results were expressed as Trolox equivalents ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g dry weight}$) \pm SD.

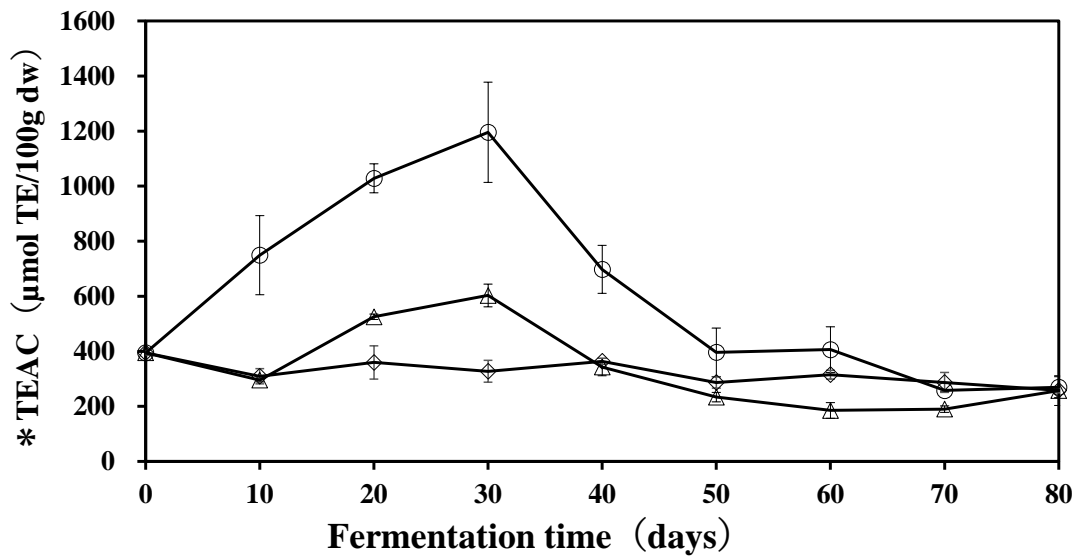


Fig. 8 Changes in antioxidant activity (FRAP) of fermented soybean extracts during fermentation. Soybeans were fermented with *P. cornucopiae* and *P. ostreatus* for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. The antioxidant activity of the extracts was analysed by FRAP Assay. Trolox was used as a standard and the results were expressed as Trolox equivalents (μmol TE/100 g dry weight). Trolox was used as a standard and the results were expressed as Trolox equivalents (μmol TE/100 g dry weight). Error bars represent standard deviation.

○ : *P. cornucopiae*, △ : *P. ostreatus*, ◇ : Unfermented soybeans (control)

3-2-3 ABTS ラジカル消去活性による抗酸化活性の経時変化

タモギタケおよびヒラタケ発酵ダイズの ABTS ラジカル消去活性による抗酸化活性の経時変化を求めた。未発酵ダイズ ABTS ラジカル消去活性は 1360.8 ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g dry weight}$) であった (Table 13, Fig. 9)。タモギタケ発酵ダイズでは、ABTS ラジカル消去活性は急激に増加し、発酵 40 日目に 7874.0 ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g dry weight}$) と最大値を示し、これは未発酵ダイズの約 6.3 倍であった (Table 13, Fig. 9)。その後、発酵 40 日目には急激に低下したが、発酵 80 日目においても未発酵ダイズの約 1.7 倍であった (2380.4 [$\mu\text{mol TE}/100 \text{ g dry weight}$]) (Table 13, Fig. 9)。これに対して、ヒラタケ発酵ダイズでは、ABTS ラジカル消去活性は発酵 20 日目に 3512.9 ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g dry weight}$) と最大値を示し、未発酵ダイズの約 2.9 倍であった。その後、発酵 50 日目に減少し、60 日目以降は未発酵ダイズよりも低下した (Table 13, Fig. 9)。

Table 13. Changes in antioxidant activity (ABTS) of fermented soybean extracts during fermentation.

Fermentation time (d)	Unfermented soybeans (control)	Fermented soybeans with <i>Pleurotus cornucopiae</i>	Fermented soybeans with <i>Pleurotus ostreatus</i>
0	1360.8 ± 31.2	1360.8 ± 31.2	1360.8 ± 31.2
10	1256.9 ± 89.8	3974.0 ± 276.0	2305.6 ± 151.4
20	1223.9 ± 69.5	5978.2 ± 352.9	3512.9 ± 125.7
30	1242.3 ± 49.9	6974.9 ± 369.6	3361.6 ± 119.7
40	1242.7 ± 20.2	7874.0 ± 504.1	3297.6 ± 166.7
50	1276.8 ± 50.3	2675.1 ± 760.9	2642.7 ± 133.7
60	1265.4 ± 60.7	2430.6 ± 566.5	1075.2 ± 267.6
70	1345.4 ± 38.2	2137.4 ± 154.5	547.9 ± 73.3
80	1401.1 ± 143.7	2380.4 ± 69.1	635.8 ± 49.1

Soybeans were fermented with *P. cornucopiae* and *P. ostreatus* for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. The antioxidant activity of the extracts was analysed by ABTS scavenging activity. Trolox was used as a standard and the results were expressed as Trolox equivalents ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g dry weight}$) \pm SD.

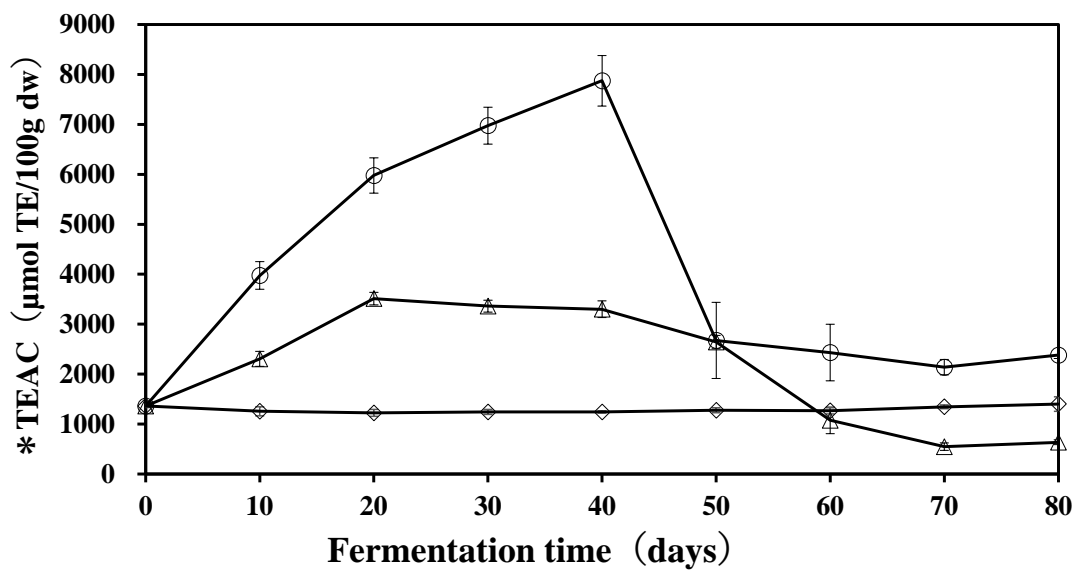


Fig. 9 Changes in antioxidant activity (ABTS) of fermented soybean extracts during fermentation. Soybeans were fermented with *P. cornucopiae* and *P. ostreatus* for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. The antioxidant activity of the extracts was analysed by ABTS radical scavenging activity. Trolox was used as a standard and the results were expressed as Trolox equivalents (μmol TE/100 g dry weight). Error bars represent standard deviation.

○ : *P. cornucopiae*, △ : *P. ostreatus*, ◇ : Unfermented soybeans (control)

3-2 考察

発酵 30 日目の DPPH ラジカル消去活性は未発酵ダイズに比べてヒラタケ発酵ダイズでは 1.9 倍、タモギタケ発酵ダイズで 6.1 倍高く、最大であった (Table 11, Fig. 7)。発酵 30 日目の FRAP 法による抗酸化活性においても未発酵ダイズに比べてヒラタケ発酵ダイズでは 1.8 倍、タモギタケ発酵ダイズで 3.7 倍高く、最大であった (Table 12, Fig. 8)。また、ABTS ラジカル消去活性は未発酵ダイズに比べて発酵 20 日目のヒラタケ発酵ダイズでは 2.9 倍、発酵 40 日目のタモギタケ発酵ダイズで 6.3 倍高く、最大となった (Table 13, Fig. 9)。この結果から、タモギタケ発酵ダイズの抗酸化活性はヒラタケ発酵ダイズよりもはるかに高いことが明らかとなった。Espinosa-Páez ら (2017) は、ヒラタケとともに 14 日間発酵させた黒豆の DPPH ラジカル消去活性が、未発酵黒豆に比べて約 1.4 倍増加したと報告した。本研究では、どちらのキノコも上記の報告結果よりも抗酸化活性が高く、特にタモギタケ発酵ダイズの抗酸化活性はヒラタケ発酵ダイズの約 3 倍以上であった (Table 11, Fig. 7)。ダイズをタモギタケで発酵させると抗酸化活性が顕著に増加することは、本研究で初めて明らかとなった。

一方、Lee ら (2019) は、発芽ダイズをマツタケで発酵したところ、発酵期間に応じて抗酸化活性が上昇し、12 日間培養で DPPH ラジカル消去活性が約 10 倍、ABTS ラジカル消去活性が約 3 倍に増加することを報告した。これらの結果は担子菌でダイズを直接発酵させることによって抗酸化活性が増加することを示唆している。

また、DPPH ラジカル消去活性と FRAP 法の抗酸化活性の変動は、発酵 30 日目で最大となってその後急激に減少するという同様の傾向を示したが、ABTS ラジカル消去活性は、タモギタケ発酵ダイズでは発酵 40 日目が最大なのに対して、ヒラタケ発酵ダイズでは発酵 20 日目が最大となり、その後発酵 40 日目までは

同程度で推移する結果となり、明らかに異なる傾向を示した。このことから、DPPH ラジカル消去活性および FRAP 法の抗酸化活性と ABTS ラジカル消去活性の抗酸化活性を示している物質が異なることが考えられる。Xu ら (2018) は、3 種類のマッシュルームを用い 7 日間隔で発酵させたダイズが 7 日目から DPPH ラジカル消去活性が急激に増加し、その後 21 日目に少し減少したが 35 日目に最大となることと、FRAP 法による抗酸化活性は、21 日目に急激に増加を示し、その後少し減少を示したと、異なる傾向を示したことを報告している。この結果からも抗酸化活性の測定法に対して抗酸化活性を示している物質が異なることが示唆される。今後、各抗酸化活性の測定法に対して作用している物質を解析することが必要である。

第4章 キノコ発酵ダイズのキノコに由来する成分の経時変化

ヒラタケ発酵ダイズよりもタモギタケ発酵ダイズが3種の抗酸化活性が2~3倍高いことが明らかとなったが、イソフラボンアグリコンやポリフェノール量においては、菌種間で大きな差はなかった。このことから、菌種間の抗酸化活性の差はキノコに由来する成分による可能性が考えられるため、キノコに由来するエルゴチオネインおよびエルゴステロールの分析を行った。

4-1 実験方法

4-1-1 キノコ発酵ダイズの HPLC によるエルゴチオネインの分析

エルゴチオネインの抽出は、トリクロロ酢酸によって行った。500 mg の発酵ダイズ粉末に 5 mL の 500 mM トリクロロ酢酸を加え、120 rpm、40°C で 30 分間振とうした。混合物を 1,500 × g で 10 分間遠心分離した。続いて、上清 1 mL を MQ 水で平衡化した Sep-Pak C18 Plus に添加し、4 mL の MQ 水で溶出し、これを HPLC 注入サンプル溶液として使用した。エルゴチオネインの分析は以下の HPLC システムで行った。HPLC システムは、ポンプ PU-980、UV-VIS 検出器 UV-2075 Plus、およびカラムオーブン CO-965 (JASCO Corporation., Tokyo, Japan) を使用し、カラムとして逆相 C30 カラム Develosil C30-UG-5 (250 × 4.6 mm, 5 μm) (Nomura Chemical Co., Ltd., Aichi, Japan) を使用した。分析は、カラム温 40°C、検出波長 260 nm、流速 1 mL/min で行った。0.1%酢酸 (v/v) 水溶液 (溶離液 A) および 0.1%酢酸 (v/v) メタノール溶液 (溶離液 B) を使用して、メタノールの低濃度から高濃度のグラジエントで溶出した。まず、溶離液 A を 100%含む移動相を使用してカラムを平衡化した。分析は、5 分から 10 分で溶離液 B を 0%から 100%変化させ、15 分間溶離液 B を 100%で保持した。25 分から 27 分で溶離液 B を 100%から 0%に変化させ、最後に溶離液 A 100%、27 分から 40 分で初期

条件に平衡化した。発酵ダイズ中のエルゴチオネイン量を算出するために検量線を作成した。発酵ダイズ中のエルゴチオネイン量は、検量線を使用して算出した。

4-1-2 キノコ発酵ダイズの HPLC によるエルゴステロールの分析

Ohga and Wood (2000) によって報告された方法に従って、いくつかの修正を加えて分析した。発酵ダイズ粉末 1 g に、メタノール 20 mL、エタノール 10 mL、水酸化カリウム 4 g を加え混合し、40°C、100 rpm で 90 分間振とう抽出した。抽出液を、3000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を分液漏斗に添加し、MQ 水 20 mL とヘキサン 20 mL を加え、5 分間混合した。静置後、ヘキサン層を回収し、ロータリーエバポレーターでヘキサンを蒸発させた。乾固物をメタノール 2 mL に溶解し、HPLC に供した。

HPLC システムは、ポンプ PU-980、UV-VIS 検出器 UV-2075 Plus、およびカラムオーブン CO-965 (JASCO Corporation., Tokyo, Japan) を使用し、カラムとして逆相 C18 カラム Inertsil ODS-4 (150 × 4.6mm, 5 μ m) (GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) を使用した。分析は、カラム温度 40°C、検出波長 260 nm、流速 1 mL/min、溶離液はメタノールで行った。発酵ダイズ中のエルゴステロール量を算出するために検量線を作成した。発酵ダイズ中のエルゴステロール量は、検量線を使用して算出した。

4-2 結果

4-2-1 キノコ発酵ダイズのエルゴチオネインの経時変化

エルゴチオネインは、未発酵ダイズでは検出されなかったが、発酵ダイズではどちらも発酵 10 日目から検出され、発酵 30 日目に最大値を示し、発酵 40 日目を以降は減少した (Table 14, Fig. 10)。また、エルゴチオネイン量は、タモギタケ発酵ダイズでは、79.70 (mg/100g dry weight)、ヒラタケ発酵ダイズでは、16.34 (mg/100g dry weight) となり、タモギタケ発酵ダイズは、ヒラタケ発酵ダイズよりも 4.9 倍高かった (Table 14, Fig. 10)。

Table 14. Changes in ergothioneine of fermented soybean extracts during fermentation.

Fermentation time (d)	Unfermented soybeans (Control)	Fermented soybeans with <i>Pleurotus cornucopiae</i>	Fermented soybeans with <i>Pleurotus ostreatus</i>
0	0	0	0
10	0	2.64 ± 0.23	3.20 ± 2.77
20	0	23.71 ± 11.04	7.62 ± 0.53
30	0	79.70 ± 29.97	16.34 ± 3.18
40	0	4.57 ± 0.98	7.14 ± 0.63
50	0	4.99 ± 0.42	3.18 ± 2.75
60	0	2.59 ± 0.18	0
70	0	3.15 ± 1.18	0
80	0	3.31 ± 0.31	0

Soybeans were fermented with *P. cornucopiae* and *P. ostreatus* for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. Ergothioneine content was measured by HPLC (mg of ergothioneine /100 g dry weight) ± SD.

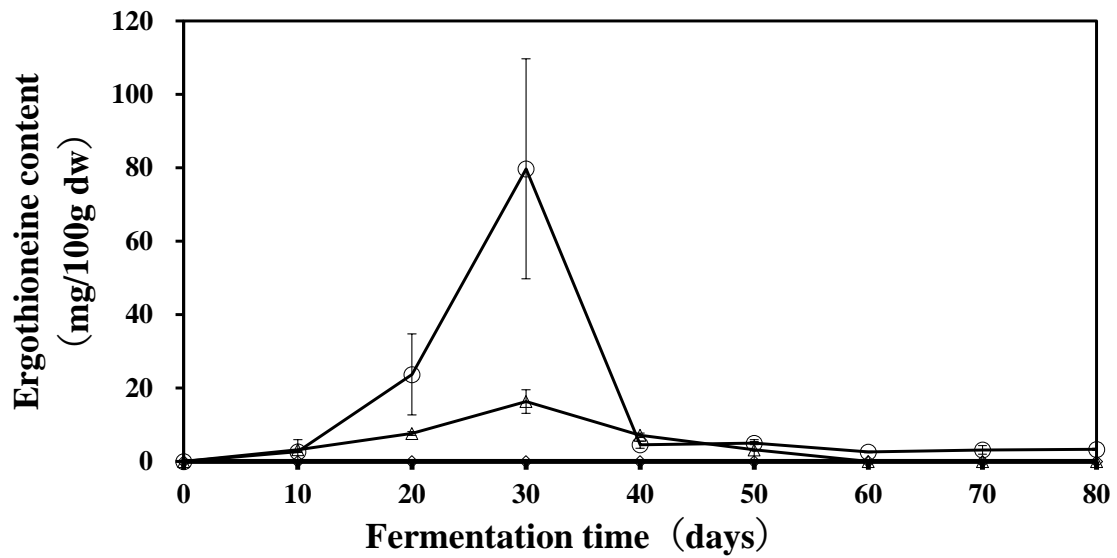


Fig. 10 Changes in ergothioneine of fermented soybean extracts during fermentation. Soybeans were fermented with *P. cornucopiae* and *P. ostreatus* for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. The extracts from these samples were analysed by HPLC. Error bars represent standard deviation.

○ : *P. cornucopiae*, △ : *P. ostreatus*, ◇ : Unfermented soybeans (control)

4-2-2 キノコ発酵ダイズのエルゴステロールの経時変化

エルゴステロールは、未発酵ダイズでは検出されなかったが、発酵ダイズではどちらも発酵 10 日目から検出され、両発酵ダイズとも発酵 20 日目に最大値を示し、発酵 30 日目以降は徐々に減少した (Table 15, Fig. 11)。また、エルゴステロール量は、20 日目で、タモギタケ発酵ダイズでは、69.66 (mg/100g dry weight)、ヒラタケ発酵ダイズでは、84.46 (mg/100g dry weight) となり、ヒラタケ発酵ダイズが高かった (Table 15, Fig. 11)。

Table 15. Changes in ergosterol of fermented soybean extracts during fermentation.

Fermentation time (d)	Unfermented soybeans (Control)	Fermented soybeans with <i>Pleurotus cornucopiae</i>	Fermented soybeans with <i>Pleurotus ostreatus</i>
0	0	0	0
10	0	41.50 ± 4.57	58.97 ± 13.28
20	0	69.66 ± 7.15	84.46 ± 16.09
30	0	62.58 ± 13.22	66.06 ± 8.28
40	0	35.72 ± 10.56	35.45 ± 6.56
50	0	5.35 ± 2.34	3.67 ± 0.47
60	0	2.81 ± 1.28	1.11 ± 0.25
70	0	2.91 ± 1.74	1.16 ± 0.28
80	0	3.54 ± 4.17	0.66 ± 0.21

Soybeans were fermented with *P. cornucopiae* and *P. ostreatus* for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. Ergosterol content was measured by HPLC (mg of ergosterol /100 g dry weight) ± SD.

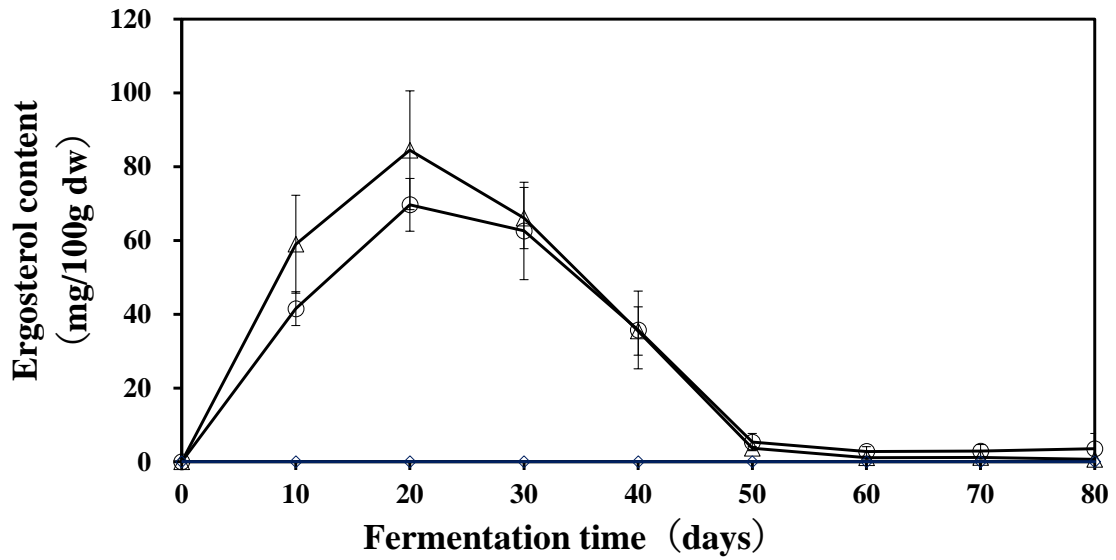


Fig 11. Changes in ergosterol of fermented soybean extracts during fermentation. Soybeans were fermented with *P. cornucopiae* and *P. ostreatus* for up to 80 d. Fermented soybeans were sampled and freeze-dried every 10 d. The extracts from these samples were analysed by HPLC. Error bars represent standard deviation.

○ : *P. cornucopiae*, △ : *P. ostreatus*, ◇ : Unfermented soybeans (control)

4-3 考察

エルゴチオネインは、抗酸化活性があり、キノコに豊富に含まれるが菌糸体よりも子実体の方が豊富に含まれることが報告されている (Kalaras et al., 2017; Krakowska et al., 2020)。また、キノコの中では、タモギタケ子実体に特に豊富に含まれていることが知られている。エルゴチオネインは両キノコで発酵させたダイズ中で新たに生成され、発酵 30 日目にタモギタケ発酵ダイズで最大 79.70 (mg/100g dry weight) を示し、ヒラタケ発酵ダイズの約 5 倍であった。タモギタケの子実体には 394 (mg/100g dry weight)、ヒラタケの子実体には 121 (mg/100g dry weight) のエルゴチオネインが含まれていることが報告されている (Kalaras et al., 2017)。また、別の報告ではタモギタケの子実体には 129.89 (mg/100g dry weight)、菌糸体には 128.35 (mg/100g dry weight)、ヒラタケの子実体には 70.52 (mg/100g dry weight) 菌糸体には 96.32 (mg/100g dry weight) のエルゴチオネインが含まれていることが報告されている (Krakowska et al., 2020)。どちらも本研究と同様にヒラタケよりもタモギタケが多い結果となっている。今回の発酵ダイズのエルゴチオネイン量の結果は、Kalara ら (2017) の子実体の結果と比較するとタモギタケ発酵ダイズで 1/5、ヒラタケ発酵ダイズで 1/7 に相当する。

エルゴステロールは、紫外線と熱にさらされるとビタミン D₂ に変換されるビタミン D₂ の前駆体であり、キノコに豊富に含まれている (Nölle et al, 2017)。エルゴステロールは両キノコで発酵させたダイズ中で新たに生成され、発酵 20 日目にタモギタケ発酵ダイズで最大 69.66 (mg/100g dry weight)、ヒラタケ発酵ダイズで最大 84.46 (mg/100g dry weight) であった。Krakowska et al. は (2020)、タモギタケの子実体には 31.04 (mg/100g dry weight)、菌糸体には 8.43 (mg/100g dry weight)、ヒラタケの子実体には 33.98 (mg/100g dry weight) 菌糸体には 12.12 (mg/100g dry weight) のエルゴステロールが含まれていることを報告している。

また、Koutrotsios ら (2022) は、タモギタケの子実体で 376 (mg/100g dry weight)、Mattila ら (2002) は、ヒラタケの子実体で 674 (mg/100g dry weight) 検出されたと報告している。どちらも本研究と同様にタモギタケよりもヒラタケがやや多い結果となっている。

本研究は、ダイズをタモギタケおよびヒラタケで発酵させた場合のエルゴチオネイン量とエルゴステロール量の長期間の変動について初めて分析した。また、エルゴチオネインおよびエルゴステロール両物質は、発酵に伴って、30 日目で最大となった後、急激に減少した。タモギタケおよびヒラタケのダイズ発酵は、発酵 20~30 日目までは白色の菌糸が伸長していたが、発酵 30~40 日目にかけて、菌糸の伸長が止まり、褐変化が進行した。このことがエルゴチオネインおよびエルゴステロールの発酵 40 日目以降の急激な減少と関連している可能性が考えられるが、現状詳細は不明である。タモギタケおよびヒラタケ菌糸体のダイズ上での生育と、これらの物質の生成との関連に関して興味もたれる。

DPPH ラジカル消去活性 (Table 11, Fig. 7) は、エルゴチオネインの量が多い発酵日数 (Table 14, Fig. 10) に高かった。エルゴチオネインは、*in vitro* ではヒドロキシルラジカル (OH)、次亜塩素酸 (HOCl)、ペルオキシ亜硝酸塩 (ONOO⁻)、DPPH、ABTS の強力な捕捉剤であることが報告されている (D. Akanmu et al., 1991, N. Monotohashi & I. Mori., 1986., Matthew Whiteman, Barry Halliwell., 1997., F. Franzoni et al., 2006., 福田ら, 2012., M. katsube et al., 2022)。エルゴチオネイン標品を使用して DPPH ラジカル消去活性を測定し、4,698 ($\mu\text{mol TE/g}$) の値が得られた。この値から、キノコ発酵によって生成したエルゴチオネイン量の抗酸化活性を DPPH ラジカル消去活性のトロロックス当量として計算すると、最大のエルゴチオネイン量を示した発酵 30 日目ではエルゴチオネインの抗酸化活性への寄与率はタモギタケ発酵ダイズで約 40%、ヒラタケ発酵ダイズで約 25%と推定

された。Park ら (2010) は、*Gastrodia elata* 根茎抽出物の DPPH ラジカル消去活性の IC₅₀ 値とエルゴチオネイン濃度をプロットすると決定係数が 0.6531、ABTS ラジカル消去活性では決定係数が 0.7411 と有意な負の直線相関を報告した。また、Bhattacharya ら (2014) は、ヒラタケ抽出物の DPPH ラジカル消去活性の IC₅₀ 値とエルゴチオネイン濃度をプロットすると決定係数が 0.94 と有意な負の直線相関を報告した。本研究においてタモギタケ発酵ダイズとヒラタケ発酵ダイズでの分析、測定した項目に関して比較すると、抗酸化活性とエルゴチオネイン量にのみ大きな差が見られ、いずれの値もタモギタケの方が高かった。これらの結果は、上記の研究と同様に、エルゴチオネインが抗酸化活性に寄与していることを示唆している。

また、DPPH ラジカル消去活性が 953.7 ($\mu\text{mol TE}/100\text{g dry weight}$) で最大となる発酵 30 日目のポリフェノール量は 6.00 ($\text{mmol GAE}/100\text{g dry weight}$) であったが、発酵 40 日目のポリフェノールの量が 6.31 ($\text{mmol GAE}/100\text{g dry weight}$) で最大であったのに対し、40 日目の抗酸化活性 (341.7 [$\mu\text{mol TE}/100\text{g dry weight}$]) は、発酵 30 日目より有意に低かった (Table 6, 11, Fig. 5, 7)。これは、30 日目には DPPH ラジカル消去活性のあるポリフェノールの量が多く、ポリフェノールが多いことが必ずしも抗酸化作用が高いとは限らないことを示している。イソフラボンアグリコンの抗酸化活性は、そのグリコシドの抗酸化活性よりも高いと報告されている (Arora et al., 1998)。この研究では、発酵 10 日目と発酵 20 日目のアグリコンの量はほぼ最大だったが (Table 2, 3Fig.1 B, C)、発酵 10 日目の抗酸化活性は発酵 20 日目の半分以下であったことから (Table 2, 3Fig.1 B, C)、抗酸化活性に対するアグリコンの寄与が低いことが示唆された。Lee ら (2019) と鮫島ら (2019) は、抗酸化活性の増加はイソフラボンアグリコンの増加による可能性があるとして報告しているが、本研究では、キノコで発酵させたダイズの抗酸

化活性の上昇には、イソフラボンアグリコンよりもエルゴチオネインの生成が寄与していることが示唆された。エルゴチオネイン標品の DPPH ラジカル消去活性と比較することにより、抗酸化活性が高かったタモギタケ発酵ダイズ発酵 30 日目におけるエルゴチオネインの抗酸化活性への寄与率は最大で約 40%であると推定された。このことから、発酵 30 日目のキノコ発酵ダイズに存在する残り 60%の抗酸化活性には、エルゴチオネイン以外の複数の抗酸化活性を示す物質が関与していることが示唆される。

一方、エルゴチオネイン標品を使用して FRAP 法による抗酸化活性および ABTS ラジカル消去活性を測定したところ、それぞれ 2934 ($\mu\text{mol TE/g}$) および 6579 ($\mu\text{mol TE/g}$) の値が得られた。この結果から、FRAP 法による抗酸化活性および ABTS ラジカル消去活性が最大値を示した発酵ダイズの抗酸化活性を比較するとそれぞれエルゴチオネインの寄与率は発酵 30 日目にタモギタケ発酵ダイズで 20%および 8%、ヒラタケ発酵ダイズで 8%および 3%と推定された。この結果は、FRAP 法による抗酸化活性および ABTS ラジカル消去活性へのエルゴチオネインの寄与が DPPH ラジカル消去活性に比べ低いことを示している。このことから、キノコ発酵ダイズでは、複数の抗酸化活性を示す物質が発酵日数によっても異なり、その生成や減少が複雑に関与していることが示唆される。イソフラボンアグリコンや特にエルゴチオネインは高い抗酸化作用を有しており、様々な生理機能素材としての利用が期待されていることから、両物質を含有する発酵 30 日目のダイズは機能性食品として期待される。今後はそれぞれの発酵ダイズの成分や抗酸化活性の高い物質の探索、生理機能を解析する必要がある。

第5章 結言

本研究では、タモギタケおよびヒラタケでダイズを発酵させ、継時的に各イソフラボン成分、総ポリフェノール量、遊離アミノ酸、抗酸化活性、キノコに由来する成分のエルゴチオネインおよびエルゴステロールの変動に関して、解析を行った。

どちらのキノコ発酵ダイズでも、発酵 10 日目には未発酵ダイズに多く含まれるイソフラボン配糖体が減少し、アグリコンが増加し、発酵 30 日目まで維持された。また、発酵 40 日目には減少し始め、発酵 80 日目までにはほぼ消失することが明らかとなった。また、イソフラボンの HPLC 分析の際、エクオールと同じ溶出位置 (リテンションタイム) にエクオール様物質が検出されたが、エクオールの原料となるダイゼイン含有培地でのエクオール産生能の確認、エクオール様物質の LC/MS による分析の結果、エクオールではないことが明らかとなった。また、2 種の MS データベースで検索索を行ったが、一致する物質はなく、物質を特定することができなかった。そのため、エクオール様物質は新規物質である可能性が考えられる。さらに、ポリフェノール量は、発酵 30~40 日目で最大となり未発酵ダイズの約 4 倍に上昇することが明らかとなった。発酵に伴った遊離アミノ酸の分析結果では、どちらの発酵ダイズでも総遊離アミノ酸量が発酵に伴って大幅に増加することが明らかとなった。発酵 10 日目から遊離アミノ酸量が増加し、タモギタケ発酵ダイズでは、発酵 40 日目に総遊離アミノ酸量が、15,425.8 (mg/100 g dry weight) で最大となり、ヒラタケ発酵ダイズでは発酵 50 日目に 12,735.1 (mg/100 g dry weight) で最大となった。また、強いうま味を示すグルタミン酸が顕著に増えることも明らかとなった。これらの結果から、キノコ発酵ダイズでは呈味性向上が期待できるとともに、栄養吸収性の向上も期待できる。

キノコ発酵ダイズの抗酸化活性は、発酵 30 日目の DPPH ラジカル消去活性が未発酵ダイズに比べてヒラタケ発酵ダイズでは 1.9 倍、タモギタケ発酵ダイズで 6.1 倍高かった。発酵 30 日目の FRAP 法による抗酸化活性においても未発酵ダイズに比べてヒラタケ発酵ダイズでは 1.8 倍、タモギタケ発酵ダイズで 3.7 倍高かった。また、ABTS ラジカル消去活性は未発酵ダイズに比べて発酵 20 日目のヒラタケ発酵ダイズでは 2.9 倍、発酵 40 日目のタモギタケ発酵ダイズで 6.3 倍高かった。この結果から、タモギタケ発酵ダイズの抗酸化活性はヒラタケ発酵ダイズよりもはるかに高いことが明らかとなった。

エルゴチオネインは両キノコで発酵させたダイズ中で新たに生成され、発酵 30 日目にタモギタケ発酵ダイズで最大 79.70 (mg/100g dry weight) を示し、ヒラタケ発酵ダイズの約 5 倍であった。エルゴステロールは両キノコで発酵させたダイズ中で新たに生成され、発酵 20 日目にタモギタケ発酵ダイズで最大 69.66 (mg/100g dry weight)、ヒラタケ発酵ダイズで最大 84.46 (mg/100g dry weight) であった。エルゴチオネイン標品の DPPH ラジカル消去活性と比較することにより、抗酸化活性が高かったタモギタケ発酵ダイズ発酵 30 日目におけるエルゴチオネインの抗酸化活性への寄与率は最大で約 40%であると推定され、エルゴチオネインが DPPH ラジカル消去活性に寄与していることを示唆している。しかし、FRAP 法による抗酸化活性および ABTS ラジカル消去活性エルゴチオネインの寄与が DPPH ラジカル消去活性に比べ、低い結果であり、複数の抗酸化活性を示す物質が生成や減少し複雑に関与していることが示唆される。

以上の結果より、本研究で分析した物質が多く含まれ、抗酸化活性が高い発酵 30 日目のダイズは機能性食品として期待されることが明らかとなった。今後はそれぞれの発酵ダイズの成分や抗酸化活性の高い物質の探索、生理機能を解析する必要がある。

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました北見工業大学・地域未来デザイン工学科・バイオ食品工学コース 佐藤利次教授に心より深く感謝申し上げます。

本研究を進めるあたり、実験方法の指南、セミナーなどを通じてご指導頂いただけでなく、本論文を審査して頂いた北見工業大学・地域未来デザイン工学科・バイオ食品工学コース 新井博文教授に心より感謝申し上げます。

本論文を審査して頂いた北見工業大学・地域未来デザイン工学科・バイオ食品工学コース 菅野亨教授、宮崎健輔准教授および邱泰瑛准教授に心より感謝申し上げます。

また、LC/MS 分析を行って頂いた北見工業大学・地域環境工学科・先端材料物質工学コース 小針良仁助教授およびサンプルの凍結乾燥を行って頂いた企業組合北見産学医協働センターおよび北見工業大学特任講師 金澤勉氏に心より感謝申し上げます。

加えて、食品科学研究室で本研究の先行研究を行った富井さやか氏、高橋佑生氏および福士涼介氏、また、食品科学研究室で共に研究室生活を過ごした皆様に感謝いたします。

2024年3月 澤田雄太

参考文献

- 會田 久仁子, (2020). 伝統発酵食品に関する食文化的, 食品衛生学のおよび微生物学的研究, *日本調理科学会誌* 53, (2), 69-73.
<https://doi.org/10.11402/cookeryscience.53.69>
- 鮫島 由香, 由良 知佳, 薦田 媛香, 田畑 麻里子, 松井 徳光. (2019). 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, 55-60. https://doi.org/10.24465/msb.27.2_55
- 原田 陽, 宜寿次 盛生, 森 三千雄, 米山 彰造, 五十嵐 啓蔵, 富山 隆広. (2008). 品質を考慮したタモギタケ品種の選抜. *日本きのこ学会誌*, 16, 117-122.
https://doi.org/10.24465/msb.16.3_117
- 福田 絵里, 青柳 幸恵, 山岸 和敏, 賀佐 伸省, 知地 英征. (2012). 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.
- 福田 祥子, 松井 徳光, 立花 宏美, 友田 智美, 大杉 匡弘. (2007). 担子菌の発酵能による機能性大豆食品の開発. *武庫川女子大紀要 (自然科学)*, 55, 53-59.
- 松本 保博, 柴崎 直人, 加納 明子, 福田 泰久, 寺下 隆夫, 白坂 憲章. (2021) きのこ由来プロテアーゼを用いた米タンパク質分解と生成する遊離アミノ酸組成の特徴. *日本きのこ学会誌* 28(4). 159-164.
https://doi.org/10.24465/msb.28.4_159
- Agrahar-Murugkar, & D, Subbulakshmi, G. (2005). Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Khasi hills of Meghalaya. *Food Chemistry*, 89(4), 599-603. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.042>
- Arora, A., Nair, M. G., & Strasburg, G. M. (1998). Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Arch Biochem Biophys*, 356(2), 133-141. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0783>
- Beelman, R. B., Kalaras, M. D., Phillips, A. T., & Richie, J. P., Jr. (2020). Is ergothioneine a 'longevity vitamin' limited in the American diet? *J Nutr Sci*, 9, e52. <https://doi.org/10.1017/jns.2020.44>
- Benzie, I, F, F., & Strain, J, J., (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1). 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Benzie, I, F, F., & Strain, J, J., (1999). [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic

- acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15-27.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5)
- Bhattacharya, M., Srivastav, P. P., & Mishra, H. N. (2014). Optimization of process variables for supercritical fluid extraction of ergothioneine and polyphenols from *Pleurotus ostreatus* and correlation to free-radical scavenging activity. *The Journal of Supercritical Fluids*, 95, 51-59.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.07.031>
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *nature*, 181, 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Bowey, E., Adlercreutz, H., & Rowland, I. (2003). Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. *Food Chem Toxicol*, 41(5), 631-636. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(02\)00324-1](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(02)00324-1)
- Cao, Z. H., Green-Johnson, J. M., Buckley, N. D., & Lin, Q. Y. (2019). Bioactivity of soy-based fermented foods: A review. *Biotechnol Adv*, 37(1), 223-238.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.12.001>
- Cui, L., Liu, Q. H., Wang H. X., & Ng T, B., (2007). An alkaline protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 81-85. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0801-z>
- Cheah, I. K., Feng, L., Tang, R. M. Y., Lim, K. H. C., & Halliwell, B. (2016). Ergothioneine levels in an elderly population decrease with age and incidence of cognitive decline; a risk factor for neurodegeneration? *Biochem Biophys Res Commun*, 478(1), 162-167. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.074>
- Espinosa-Paez, E., Alanis-Guzman, M. G., Hernandez-Luna, C. E., Baez-Gonzalez, J. G., Amaya-Guerra, C. A., & Andres-Grau, A. M. (2017). Increasing Antioxidant Activity and Protein Digestibility in *Phaseolus vulgaris* and *Avena sativa* by Fermentation with the *Pleurotus ostreatus* Fungus. *Molecules*, 22(12).
<https://doi.org/10.3390/molecules22122275>
- Folin, O., & Denis, W. (1915). A colorimetric estimation of phenols (and phenol derivatives) in urine. *J Biol Chem*, 22, 305-308.
- Jackson, R. L., Greiwe, J. S., & Schwen, R. J. (2011). Emerging evidence of the health benefits of S-equol, an estrogen receptor beta agonist. *Nutr Rev*, 69(8), 432-448.
<https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00400.x>
- Janusz, G., Kucharzyk, K. H., Pawlik, A., Staszczak, M., & Paszczynski, A. J. (2013). Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression

- and regulation. *Enzyme Microb Technol*, 52(1), 1-12.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.10.003>
- Jäpelt, R. B., & Jakobsen, J. (2013). Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis. *Front Plant Sci*, 4.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00136>
- Kalaras, M. D., Richie, J. P., Calcagnotto, A., & Beelman, R. B. (2017). Mushrooms: A rich source of the antioxidants ergothioneine and glutathione. *Food Chem*, 233, 429-433. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.109>
- Katsube, M., Watanabe, H., Suzuki, K., Ishimoto, T., Tatebayashi, Y., Kato, Y., & Murayama, N. (2022). Food-derived antioxidant ergothioneine improves sleep difficulties in humans. *Journal of Functional Foods*, 95.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105165>
- Kawada, Y., Goshima, T., Sawamura, R., Yokoyama, S. I., Yanase, E., Niwa, T., Ebihara, A., Inagaki, M., Yamaguchi, K., Kuwata, K., Kato, Y., Sakurada, O., & Suzuki, T. (2018). Daidzein reductase of *Eggerthella* sp. YY7918, its octameric subunit structure containing FMN/FAD/4Fe-4S, and its enantioselective production of R-dihydroisoflavones. *J Biosci Bioeng*, 126(3), 301-309.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.018>
- Klump, S., P., Allred, M., C., MacDonald, J., L., & Ballam, J., M. (2001). Determination of isoflavones in soy and selected foods containing soy by extraction, saponification, and liquid chromatography: Collaborative study. *J AOAC Int*, 84, 1865-1883.
- Ko, H. J., Kim, J., Ahn, M., Kim, J. H., Lee, G. S., & Shin, T. (2021). Ergothioneine alleviates senescence of fibroblasts induced by UVB damage of keratinocytes via activation of the Nrf2/HO-1 pathway and HSP70 in keratinocytes. *Exp Cell Res*, 400(1), 112516. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112516>
- Koutrotsios, G., Tagkouli, D., Bekiaris, G., Kaliora, A., Tsiaka, T., Tsiantas, K., & Zervakis, G. I. (2022). Enhancing the nutritional and functional properties of *Pleurotus citrinopileatus* mushrooms through the exploitation of winery and olive mill wastes. *Food Chem*, 370(15), 131022.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131022>
- Krakowska, A., Zieba, P., Wlodarczyk, A., Kala, K., Sulkowska-Ziaja, K., Bernas, E., Sekara, A., Ostachowicz, B., & Muszynska, B. (2020). Selected edible medicinal mushrooms from *Pleurotus* genus as an answer for human civilization diseases. *Food Chem*, 327, 127084.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127084>

- Krizova, L., Dadakova, K., Kasparovska, J., & Kasparovsky, T. (2019). Isoflavones. *Molecules*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/molecules24061076>
- Kushairi, N., Phan, C. W., Sabaratnam, V., Naidu, M., & David, P. (2020). Dietary amino acid ergothioneine protects HT22 hippocampal neurons against H₂O₂-induced neurotoxicity via antioxidative mechanism. *PharmaNutrition*, 13. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2020.100214>
- Lee, J. H., Hwang, C. E., Son, K. S., & Cho, K. M. (2019). Comparisons of nutritional constituents in soybeans during solid state fermentation times and screening for their glucosidase enzymes and antioxidant properties. *Food Chem*, 272, 362-371. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.052>
- Lundell, T. K., Makela, M. R., & Hilden, K. (2010). Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes--ecological, functional and phylogenetic review. *J Basic Microbiol*, 50(1), 5-20. <https://doi.org/10.1002/jobm.200900338>
- Manzi, P., Gambelli, L., Marconi, S., Vivanti, V., & Pizzoferrato, L. (1999). Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chemistry*, 65(4), 477-482. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00212-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00212-X)
- Manzi, P., Aguzzi, A., & Pizzoferrato, L. (2001). Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chem*, 73(3), 321-325. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00304-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00304-6)
- Mattila, P., Lampi, A. M., Ronkainen, R., Toivo, J., & Piironen, V., (2002). Sterol and vitamin D₂ contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chem*, 76(3), 293-298. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00275-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00275-8)
- Miura, T., Yuan, L., Sun, B., Fujii, H., Yoshida, M., Wakame, K., & Kosuna, K. (2002). Isoflavone aglycon produced by culture of soybean extracts with basidiomycetes and its anti-angiogenic activity. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66(12), 2626-2631. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.2626>
- Mizuno, M., & Nishitani, Y. (2013). Immunomodulating compounds in Basidiomycetes. *J Clin Biochem Nutr*, 52(3), 202-207. <https://doi.org/10.3164/jcbtn.13-3>
- Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M., & Enei, H. (2002). Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60(3), 327-335. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1109-2>
- Nölle, N., Argyropoulos, D., Ambacher, S., Müller, J., & Biesalski, H. K. (2017). Vitamin D₂ enrichment in mushrooms by natural or artificial UV-light during

- drying. *Food Science and Technology*, 85(B). 400-404.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.072>
- Ohga, S., & Wood, D. A. (1999). Efficacy of ectomycorrhizal basidiomycetes on Japanese larch seedlings assessed by ergosterol assay. *Mycologia*, 92(3). 394-398. <https://doi.org/10.1080/00275514.2000.12061173>
- Okamura-Matsui, T., Izuta, H., Tomoda, T., Noda, H., Fukuda, S., & Ohsugi, M. (2003). Fermented Soybean with Thrombosis Preventing Activity Using Mushroom Mycelia as Microbial Source. *Food Science and Technology Research*, 9(3), 227-230. <https://doi.org/10.3136/fstr.9.227>
- Palmieri, G., Bianco, C., Cennamo, G., Giardina, P., Marino, G., Monti, M., & Sanna, G. (2001). Purification, Characterization, and Functional Role of a Novel Extracellular Protease from *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2754-2759. <https://doi.org/10.1128/aem.67.6.2754-2759.2001>
- Park, E.-J., Lee, W. Y., Kim, S. T., Ahn, J. K., & Bae, E. K. (2010). Ergothioneine accumulation in a medicinal plant *Gastrodia elata*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(12), 1141-1147. <https://doi.org/10.5897/JMPR10.184>
- Paul, B. D., & Snyder, S. H. (2010). The unusual amino acid L-ergothioneine is a physiologic cytoprotectant. *Cell Death Differ*, 17(7), 1134-1140.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2009.163>
- Qin, P., Wang, T., Luo, Y. (2022) A Review on Plant-Based Proteins from Soybean: Health Benefits and Soy Product Development. *Journal of Agriculture and Food Research*, 7. 100265. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100265>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10). 1231-1237.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rizzo, G., & Baroni, L. (2018). Soy, Soy Foods and Their Role in Vegetarian Diets. *Nutrients*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/nu10010043>
- Rodriguez Couto, S., & Toca Herrera, J. L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol Adv*, 24(5), 500-513.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.04.003>
- Salama, S. A., Abd-Allah, G. M., Mohamadin, A. M., Elshafey, M. M., & Gad, H. S. (2021). Ergothioneine mitigates cisplatin-evoked nephrotoxicity via targeting Nrf2, NF-kappaB, and apoptotic signaling and inhibiting gamma-glutamyl transpeptidase. *Life Sci*, 278, 119572. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119572>

- Sathyamoorthy, N., & Wang, T. T. (1997). Differential effects of dietary phytoestrogens daidzein and equol on human breast cancer MCF-7 cells. *Eur J Cancer*, 33(14), 2384-2389. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(97\)00303-1](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(97)00303-1)
- Senda, M., Yamaguchi, N., Hiraoka, M., Kawada, S., Iiyoshi, R., Yamashita, K., Sonoki, T., Maeda, H., & Kawasaki, M. (2017). Accumulation of proanthocyanidins and/or lignin deposition in buff-pigmented soybean seed coats may lead to frequent defective cracking. *Planta*, 245(3), 659-670. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2638-8>
- Tham, D. M., Gardner, C. D., & Haskell, W. L. (1998). Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(7), 2223-2235. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.7.4752>
- Xu, B., & Chang, S. K. (2009). Phytochemical profiles and health-promoting effects of cool-season food legumes as influenced by thermal processing. *Journal of Agricultural Food Chem*, 57(22), 10718-10731. <https://doi.org/10.1021/jf902594m>
- Xu, B., & Chang, S. K. (2011). Reduction of antiproliferative capacities, cell-based antioxidant capacities and phytochemical contents of common beans and soybeans upon thermal processing. *Food Chem*, 129(3), 974-981. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.057>
- Xu, B. J., & Chang, S. K. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J Food Sci*, 72(2), S159-166. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00260.x>
- Xu, L. N., Guo, S., & Zhang, S. (2018). Effects of solid-state fermentation with three higher fungi on the total phenol contents and antioxidant properties of diverse cereal grains. *FEMS Microbiol Lett*, 365(16). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny163>

発表論文一覧

Yuta Sawada, Toshitsugu Sato, Ryosuke Fukushi, Yoshihito Kohari, Yuuki Takahashi, Sayaka Tomii, Lifeng Yang, Takashi Yamagishi, Hirofumi Arai (2023). Fermentation of soybeans with *Pleurotus cornucopiae* and *Pleurotus ostreatus* increases isoflavone aglycones, total polyphenol content and antioxidant activity. *Mycoscience*, 64(6), 156-165. <https://doi.org/10.47371/mycosci.2023.09.004> (2023年11月20日公表)