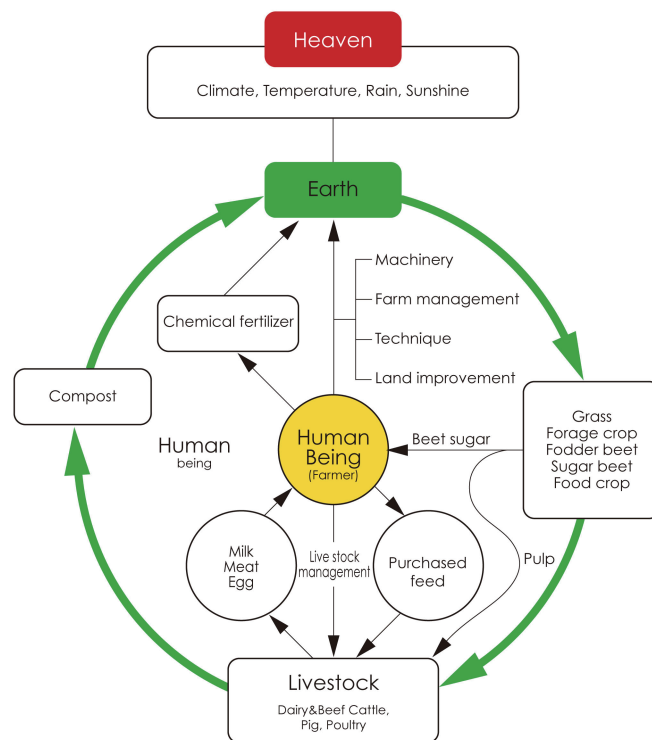




Research of One Health

2016 Sept

Chart of Agriculture with Material Circulation



**Science Journal in
Graduate School of Rakuno Gakuen University**

**ROH Editorial Office
Established in 2014**



発酵バガスおよび黒糖焼酎粕を含む培地での栽培による
アラゲキクラゲ(*Auricularia polytricha*)の*in vitro*機能性への影響
**Effects of Cultivation of *Auricularia polytricha* (Cloud Ear Mushroom) by
Elaborate Media Including Fermented Bagasse and
Brown Sugar Shochu Lees on *in vitro* Functional Properties**

山田 さゆみ¹, 涂 志豪¹, 菅原 諒太¹, 山内 正仁², 山田 真義², 永井 武³, 是枝 清上⁴,
渡 慶彦⁵, 八木 史郎⁶, 山口 隆司⁷, 山口 昭弘^{1*}

Sayumi YAMADA¹, Zhihao TU¹, Ryota SUGAWARA¹, Masahito YAMAUCHI², Masayoshi YAMADA², Takeshi
NAGAI³, Seijo KOREEDA⁴, Yoshihiko WATARI⁵, Fumio YAGI⁶, Takashi YAMAGUCHI⁷ and
Akihiro YAMAGUCHI^{1*}

¹ 酪農学園大学 農食環境学群 食と健康学類

Department of Food Science and Human Wellness, Rakuno Gakuen University

² 鹿児島工業高等専門学校 都市環境デザイン工学科

Department of Civil and Environmental Engineering, National Institute of Technology,
Kagoshima College

³ 一般財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

Tama Laboratory, Japan Food Research Laboratories

⁴ 東洋ツール工業株式会社

Toyo Tool Co., Ltd

⁵ 株式会社 奄美大島開運酒造

Amami Oshima Kaiun Syuzo Co., Ltd.

⁶ 鹿児島大学 名誉教授

Professor emeritus, Kagoshima University

⁷ 長岡技術科学大学大学院 環境・建設系

Department of Environmental Systems Engineering, Nagaoka University of Technology

* 連絡先 (Corresponding author), yama-aki@rakuno.ac.jp

〒069-8501 北海道江別市文京台緑町582

キーワード: キノコ栽培, 食品残渣, 食品機能性, 抗酸化性, β -グルカン

Keywords: mushroom cultivation, food residue, food function, antioxidation, beta-glucan

Abstract

This study focuses on improvements of *in vitro* functionalities in fruiting bodies of *Auricularia polytricha* (Cloud Ear Mushroom) when they were cultivated elaborate media including food industrial residues; fermented bagasse and brown sugar shochu lees. Total polyphenol (TPP) concentrations and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities of the fruiting bodies were not intensively affected by the differences of the media including the residues or not. The highest beta-glucan content was obtained by the cultivation with the medium containing 85% bagasse and 10% brown sugar shochu lees. Immunostimulation effects of the fruiting bodies on mouse RAW 264 macrophage-like cells were observed in any media tested although the same medium which provided the highest beta-glucan content showed the minimum activity. This discrepancy may suggest a possibility of the presence of other immunomodulative substances except for beta-glucan in the mushroom. Combining these, some functional components might be absorbed or induced from the modified media through the growth of fruiting bodies in addition to the native constituents.

はじめに

アラゲキクラゲ(*Auricularia polytricha*)は、キクラゲ科キクラゲ属のキノコであり、中華料理のキクラゲとして知られる独特の食味・風味を持つ身近な食材である¹⁾。その消費量のほとんどを中国からの輸入に頼っているため、近年では食の安全性の観点から国産栽培品の増産への期待が高まっている²⁾³⁾。今日、資源再利用あるいは未利用副産物の有効利用を目的としたキノコ栽培が注目されるなか⁴⁾⁵⁾、我々は、これまで焼酎粕やでん粉粕などの食品製造残渣を、エリンギ (*Pleurotus eryngii*)⁶⁾、ヤマブシタケ (*Hericium erinaceus*)⁷⁾⁸⁾やヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*)⁹⁾¹⁰⁾などのキノコ栽培用の培地基材および栄養剤として有効利用する研究を進めてきた。最近、アラゲキクラゲについても、発酵バガスや黒糖焼酎粕を培地に加えることにより、従来培地に比べ高い収量で子実体が得られることを見出した¹¹⁾。

一方、食による生活習慣病予防への関心の高まりを受け、キノコは機能性食材としても注目を集めている¹²⁾。アラゲキクラゲについても、抗酸化性・脂肪蓄積抑制作用¹³⁾、抗腫瘍作用¹⁴⁾や免疫調節作用¹⁵⁾などの機能性が報告されている。さらに未利用資源を含む培地で栽培したキノコにおいて特定の機能性が向上することも知られており、リンゴなどの剪定材を含む培地で栽培した鹿角霊芝の脂質代謝調節作用¹⁶⁾や機能性多糖体¹⁷⁾についての研究例がある。霊芝については子実体ではなく菌糸体培養物ではあるが、2型糖尿病マウスに対する血糖上昇抑制作用¹⁸⁾¹⁹⁾が認められている。これまで我々は焼酎粕や発酵バガスなどの食品製造残渣をヤマブシタケやアラゲキクラゲの栽培培地に利用することにより、子実体のマクロファージ

に対する抗炎症作用の促進⁸⁾や機能性成分のβ-グルカン含量が増大¹¹⁾することを報告してきた。

本研究では、発酵バガスや黒糖焼酎粕を含む培地で栽培することにより、total polyphenol (TPP)濃度、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)ラジカル消去活性、β-グルカン濃度およびマクロファージに対する免疫調節作用への影響について、アラゲキクラゲに対する作用を、ヤマブシタケおよびヒラタケのそれと比較検討した。

方 法

1. 試料

既報^{7)~11)}にしたがい、アラゲキクラゲ(アラゲキクラゲ89号、森産業(株))、ヤマブシタケ(KX-YB044号、(株)キノックス)およびヒラタケ(H67号(中生)、(株)キノックス)の菌糸を、各キノコ種に適した培地配合条件を基本に、発酵バガス・黒糖焼酎粕などの基材・栄養剤およびpH調整剤を含む培地(Table 1、Table 2)に接種し、それぞれのキノコに適した温湿度条件で、アラゲキクラゲは160日間¹¹⁾、ヤマブシタケは58日間⁷⁾⁸⁾およびヒラタケは46日間⁹⁾¹⁰⁾栽培した子実体を用いた。栄養剤を黒糖焼酎粕のみとしたアラゲキクラゲ子実体A8においては、黒糖焼酎粕の乾燥固形物が入手できず20%での添加が困難であったため半分量の10%とした(Table 1)。また比較対照のヤマブシタケおよびヒラタケについては、黒糖焼酎粕の代わりに甘藷・麦焼酎粕を用い栄養剤の割合は50%とした(Table 2)。

2. 試料抽出液の調製

子実体を温風乾燥機(50~60℃)で乾燥後、粉碎し粉末試料とした。

Table 1 Medium composition for cultivation of *Auricularia polytricha*

Mushroom	Medium composition (Dry weight %)					
	Fermentaed bagasse ^a	Broadleaf tree sawdust ^a	Brown sugar shochu lees ^b	Sweet potato shochu lee ^b	Rice bran ^b	Clam fossil ^c
A1 <i>Auricularia polytricha</i>	75	-	10	-	10	5
A5 <i>Auricularia polytricha</i>	75	-	-	-	20	5
A6 <i>Auricularia polytricha</i>	-	75	-	-	20	5
A8 <i>Auricularia polytricha</i>	85	-	10	-	-	5
A10 <i>Auricularia polytricha</i>	75	-	-	20	-	5

a: Medium base

b: Medium nutrient

c: pH adjuster

Table 2 Medium composition for cultivation of *Hericium erinaceus* and *Pleurotus ostreatus*

Mushroom	Medium composition (Dry weight %)					
	Broadleaf tree sawdust ^a	Coniferous tree sawdust ^a	Sweet potato shochu lee ^b	Barley shochu lee ^b	Rice bran ^b	Clam fossil ^c
Y1 <i>Hericium erinaceus</i>	46	-	50	-	-	4
Y2 <i>Hericium erinaceus</i>	46	-	-	50	-	4
Y3 <i>Hericium erinaceus</i>	46	-	-	-	50	4
H1 <i>Pleurotus ostreatus</i>	-	46	50	-	-	4
H2 <i>Pleurotus ostreatus</i>	-	46	-	50	-	4
H3 <i>Pleurotus ostreatus</i>	-	46	-	-	50	4

a: Medium base

b: Medium nutrient

c: pH adjuster

(1) 50% エタノール抽出液: 粉末試料0.5gに50% エタノール10mLを加え10分間しんとした後、遠心分離(16,200×g, 10min)により得られた上清を抽出液とした。本抽出液はTPP濃度, DPPHラジカル消去活性およびマクロファージ細胞に対するNO産生の抑制・促進作用の測定に用いた。

(2) アルカリ熱水抽出液: 粉末試料0.5gに2%KOH溶液10mLを加えホモジナイズし, 100°C-60分間オートクレーブにより加熱した。遠心分離(16,200×g, 10min)後に分取した上清200μLにアルコールを最終濃度80%となるように加え, 再度, 遠心分離(20,600×g, 10min)後, 得られた沈殿を80%エタノールで2回洗浄し, 蒸留水1mLに加温溶解(55°C, 30 min)した。本抽出液をCongo Red試薬によるβ-グルカンの測定に用いた。

3. TPP濃度, DPPHラジカル消去活性およびβ-グルカン濃度の測定

既報²⁰⁾にしたがい, TPP濃度はケルセチン(Cayman Chemical Co., USA)を標準品としてFolin-Denis試薬によりケルセチン相当量(mg-QE/100g)として, DPPHラジカル消去活性はトロロックス

(Sigma-Aldrich Co. LLC., USA)を標準品としてトロロックス相当量(μmol-TE/100g)として, とともに2-(1)の50% エタノール抽出液を用いて測定した。β-グルカン濃度は大麦由来(1, 3:1, 4)-β-D-グルカン(Megazyme Inc., USA)を標準品としてCongo Red法²¹⁾により, 2-(2)のアルカリ熱水抽出液を用いて測定した。

4. マクロファージ細胞に対するNO産生の抑制・促進作用の測定

NO産生抑制(抗炎症)作用の測定: RAW264細胞をリポ多糖体(LPS)により活性化し, 試料抽出液を加え24時間培養後の上清中のNO産生量を, 自然酸化物のNO₂イオンとしてGriess試薬によるジアゾカップリング反応により比色定量した。原法²²⁾をもとに, 最適化した測定条件を以下に示した。

(1) 細胞継代培養

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 ((独)理化学研究所バイオリソースセンター)を10%非働化ウシ胎児血清(FBS)(10437-028, Gibco-Thermo Fisher Scientific Inc., USA)および1%ペニシリン-ストレプトマイシン(Sigma-Aldrich Co. LLC., USA)を含むD-

MEM培地(D-5790, 和光純薬工業(株))からなる培養液を用いてCO₂インキュベータ内で培養し、75cm²培養フラスコの増殖率が80~90%となったところで2,3日毎に継代した。

(2) 試液調製

1) 1mg/mL LPS原液: *E. coli*由来のLPS(127-05141, 和光純薬工業(株)) 25mgを25mLの蒸留水に溶解し、1.5mLチューブに1mLずつ分注後-30℃で保存した。用時、培養液で1000倍に希釈した。

2) 20mmol/L ケルセチン原液: ケルセチン(Cayman Chemical Co., USA) 60.4mgをDMSO 1mLに溶解し、エタノール9mLを加えて混合後、2mLチューブに1mLずつ分注し-30℃で保存した。用時、培養液で100倍に希釈した。

3) 10 mg/mL フコイダン原液: フコイダン(F5631, Sigma-Aldrich Co. LLC., USA) 10mgを蒸留水1mLに溶解し-30℃で保存した。用時、培養液で10倍に希釈した。

4) 0.25mol/L NO₂イオン標準原液: NaNO₂ (和光純薬工業(株)) 0.862gを蒸留水に溶解し50mLとし、遮光瓶に入れ4℃で保存した。用時、蒸留水を用いて段階希釈し、25~100μmol/Lの標準溶液希釈系列を作成した。

5) Griess試薬: 0.1 % ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩(NED)(和光純薬工業(株))溶液; NED 200 mg を水200mLに溶かした。1% スルファニルアミド(SUL)(和光純薬工業(株))溶液; SUL 2gに21.25% H₃PO₄ (85%原液の4倍希釈液) 40mL を加えて溶かし、蒸留水で全量を200mLとした。NEDとSULの2液はいずれも4℃で保存し、用時等量混合してGriess試薬を調製した。

(3) NO産生抑制(抗炎症)作用の測定

細胞培養用96 wellプレートに1 μg/mL LPS 10 μLをマルチチャンネルマイクロピペットを用いて全てのwellに分注した。その後、比較対照には培養液、陽性対照には200μmol/Lケルセチンおよび各試料は抽出液の培養液による20倍希釈液(2.5mg/mL)を、それぞれ50μLずつ分注した(n=6)。次に2×10⁶ cells/mLに調整した細胞懸濁液50μLを各wellに分注し、CO₂インキュベータを用いて37℃-24 hr培養した。培養上清80μLを別の96 wellプレートに分取し、NO₂標準溶液希釈系列80μLを未使用wellに分注した。Griess試薬80μLを全てのウェルに分注し室温で20分間放置した後、マイクロプレートリーダー(Emax, Molecular Devices LLC., USA)を用いて550nmにおける吸光度を測定し検量線からNO産

生量を求めた。比較対照に対する各試料wellの相対NO産生率を求めNO産生抑制作用を評価した。

(4) NO産生促進(免疫賦活)作用の測定

上述の2-(3)NO産生抑制(抗炎症)作用の測定操作におけるLPSの添加を比較対照wellのみとし、陽性対照に1mg/mL フコイダン溶液を用いる以外はすべて同様に操作し、各試料wellのNO産生率を求めNO産生促進作用を評価した。

(5) 細胞生存率の測定

細胞増殖に対する試料の影響を評価するため、ホルマザン試薬(WST-1)による細胞の代謝活性を測定した。

1) WST-1試薬: 5.5mmol/L WST-1溶液; WST-1((株)同仁化学研究所)100mgをPBS溶液 (和光純薬工業(株))27.9mLに溶かした後、15mL遠心チューブに0.9mLずつ分注し-30℃で保存した。2mmol/L 1-Methoxy PMS溶液; 1-Methoxy PMS((株)同仁化学研究所)67.2mgを水100mLに溶かし4℃で保存した。用時、WST-1溶液0.9mLに1-Methoxy PMS溶液 0.1 mLおよびPBS 10mLを加えて混合した。

2) WST-1アッセイ: 培養上清を除いたwell内の細胞にWST-1試薬100μLを加え、フタをした後、インキュベータ内のアルミブロック上で37℃-1hr静置した。マイクロプレートリーダーを用いて、450/650nmにおける吸光度を測定し、対照に対する各試料の相対生存率を求めた。

結 果

1. TPP濃度, DPPHラジカル消去活性およびβ-グルカン濃度の測定結果

(1) TPP濃度

TPP濃度測定値の範囲は、アラゲキクラゲ、ヤマブシタケおよびヒラタケ、それぞれ57~74mg-QE/100g, 746~916 mg-QE/100gおよび872~1100 mg-QE/100gとアラゲキクラゲは明らかな低値を示し、栽培培地条件による一定の傾向は認められなかった(Fig.1A)。

(2) DPPHラジカル消去活性

DPPHラジカル消去活性測定値の範囲は、アラゲキクラゲ、ヤマブシタケおよびヒラタケ、それぞれ308~563 μmol-TE/100g, 1,660~2,470 μmol-TE/100gおよび1,080~1,680μmol-TE/100gと、アラゲキクラゲが最も低く、ヤマブシタケが最も高かった(Fig.1B)。栽培培地条件の影響としては、ヤマブシタケとヒラタケにおいて、栄養剤の種類が甘藷焼酎粕、麦焼酎粕および米糠の順に、DPPHラジカル消去活性が上昇する傾向を示した。

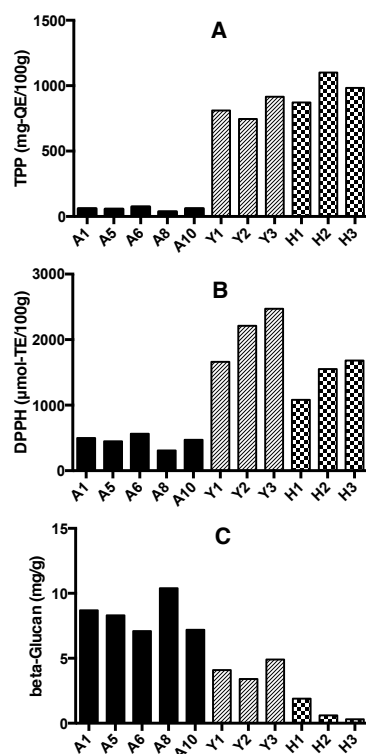


Fig. 1 Functional properties of mushrooms cultivated in different medium conditions

(A): TPP, (B): DPPH, (C): beta-Glucan

Results are expressed as mean (n=2)

Symbols at horizontal axis are corresponding to those in Table 1 or Table 2

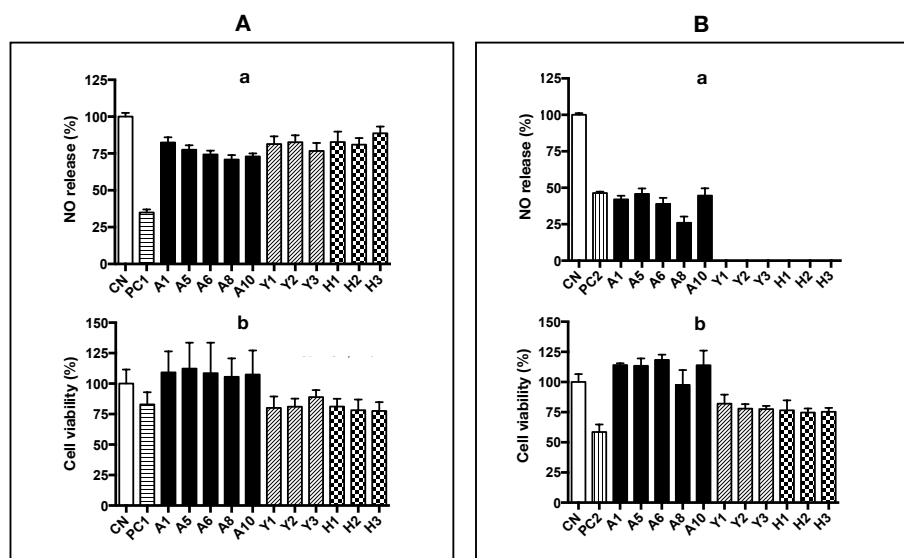


Fig. 2 Immunomodulatory effects of mushrooms on suppression (A) and promotion (B) of NO release from RAW264 macrophage cells

(a): NO release into the cell culture medium was measured by Griess reagent

(b): Cell viability was evaluated for the cells after removal of the medium by WST-1 assay

PC1: 200 μmol/L Quercetin

PC2: 1 mg/mL Fucoidan

Results are expressed as mean ± SD (n=6)

Mushroom symbols at horizontal axis are corresponding to those in Table 1 or Table 2

(3) β -グルカン濃度

β -グルカン濃度測定値の範囲は、アラゲキクラゲ、ヤマブシタケおよびヒラタケ、それぞれ7.1~10.4 mg/g, 3.4~4.9 mg/gおよび0.3~1.9 mg/gとアラゲキクラゲが明らかな高値を示した。栽培培地条件による一定の傾向は認められなかったものの、アラゲキクラゲ子実体A8(発酵バガス85%, 黒糖焼酎粕10%培地)が最も高かった(Fig.1C)。

2. マクロファージ細胞に対するNO産生の抑制・促進作用の測定結果

(1) NO産生抑制作用

NO産生率はすべての試料において70%以上であり、LPSによって誘導されたNO産生に対する抑制作用は認められなかった(Fig.2Aa)。また細胞生存率への明らかな影響も認められなかったが、アラゲキクラゲの各試料は106~112%といずれも100%を超える生存率を示した(Fig.2Ab)。

(2) NO産生促進作用

NO産生促進作用はアラゲキクラゲのすべての試料において25~50%程度認められたが、ヤマブシタケおよびヒラタケには全く存在しなかった(Fig.2Ba)。アラゲキクラゲの培地条件の比較では、 β -グルカンとは対照的に子実体A8(発酵バガス85%, 黒糖焼酎粕10%培地)が最も低かった。このときの細胞生存率もアラゲキクラゲは高値傾向を示しA8以外は100%を超える生存率を示した(Fig.2Bb)。

考 察

本研究は、食品製造における副産物の発酵バガスや焼酎粕をキノコ栽培の培地に用いることにより、資源の有効利用とともにキノコ子実体の機能性の向上をはかるものである。ここで用いた発酵バガスは、サトウキビ搾汁残渣を屋内で2ヶ月間発酵させたもので、(1,4)- β -D-グルカンのセルロースや高分子フェノール性化合物のリグニンなどの繊維素や木質素とも言われる複雑な高分子化合物がある程度分解を受けた状態にある⁹⁾。一方、焼酎粕は、甘藷や麦などのでんぷん原料が麹および酵母による発酵を経て、アルコール留去後のクエン酸をはじめとした有機酸や各種アミノ酸およびミネラルなどを豊富に含む優れた栄養素を含む材料である⁹⁾。

発酵バガスを培地基材として焼酎粕を栄養剤として栽培したアラゲキクラゲのTPP濃度およびDPPHラジカル消去活性は、通常用いられる広葉樹おが屑と米糠を用いた場合(子実体A6)と大差な

く、むしろやや減少傾向にあった(Fig.1A,B)。ヤマブシタケとヒラタケのDPPH消去活性については、培地基材のおが屑の広葉樹と針葉樹の違いに関係なく、栄養素を含む材料の種類が甘藷焼酎粕<麦焼酎粕<米糠の順に大きくなっており、子実体の成長過程におけるポリフェノールなどの抗酸化性成分の蓄積に、これらの栄養材が関係しているものと考えられる。これに対して β -グルカンは、発酵バガスを用いた子実体が高値傾向にあり、培地の発酵バガス含量が85%と最も高い子実体A8において10.4mg/gと発酵バガスを含まないA6の7.1mg/gに対して約1.5倍の高含量を示した(Fig.1C)。このことは繊維質の分解がある程度進んだ発酵バガスの方が、子実体の成長過程における β -グルカンの合成において有利であることを示唆するものである。前報²⁰⁾において、TPP濃度、DPPH消去活性および β -グルカン濃度は、それぞれキノコ種に特異的な一定の値を持つことが自生キノコとの比較から示された。ここで用いた栽培キノコの場合、培地組成が異なるため厳密な比較は出来ないが、TPP濃度はヒラタケ、DPPHラジカル消去活性はヤマブシタケおよび β -グルカン濃度はアラゲキクラゲと、それぞれ異なるキノコ種が最も高い値を示しており同様に種特異性があると考えられる。

マクロファージ細胞に対する免疫制御作用については、細菌由来の内毒素LPSにより誘導されるNO産生を共存する試料成分が抑制する作用を抗炎症作用として、LPSを含まない状態で試料成分がNO産生を誘導する作用を免疫賦活作用として評価している²²⁾。NO産生抑制作用はすべての試料において認められなかったが、NO産生促進作用がアラゲキクラゲについてのみ確認されている(Fig.2Aa, 2Ba)。このことは、細胞生存率の測定においてアラゲキクラゲのみが細胞代謝活性を上昇させていることとも関係すると考えられる(Fig.2Bb)。このときアラゲキクラゲについてはNO産生促進作用と細胞代謝活性の間に相関関係が認められており、発酵バガスおよび β -グルカン含量が最も高い子実体A8が逆にこれらの作用は最も低い値となっている。

免疫賦活作用成分に関しては、 β -グルカンの関与を考えるのが一般的だが、上述のように β -グルカン濃度が最も高いアラゲキクラゲA8はむしろ低い値を示している。この相反は、 β -グルカンの測定が熱水アルカリ抽出液であるのに対して、マクロファージ免疫制御系の測定は50%エタノール抽出

液で行っているため、抽出溶媒の違いによる高分子体の分子量や組成の相違に起因すると考えられる。いずれにしても*in vitro*でのマクロファージ活性化を指標とした場合、アラゲキクラゲの免疫賦活作用には β -グルカン以外の成分の関与が考えられる。

以上の結果から、キノコ本来が持つ様々な機能性成分に加えて子実体の成長過程を通して、異なる培地組成を反映した機能性成分が吸収された可能性、あるいは新たな機能性成分が誘導された可能性が示唆された。

要 約

本研究は、食品製造過程の副産物である発酵バガスおよび黒糖焼酎粕を含む培地で栽培した *Auricularia polytricha* (アラゲキクラゲ)子実体の*in vitro*における機能性の向上について調査したものである。子実体のtotal polyphenol (TPP)濃度および1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)ラジカル消去活性は、副産物の培地への添加の有無による大きな影響を受けなかったが、 β -グルカン含量は発酵バガス85%および黒糖焼酎粕10%を含む培地で栽培したときに最も高い値が得られた。一方、RAW264マウスマクロファージ様細胞に対する活性化作用は、全ての培地で栽培した子実体に認められたものの、 β -グルカン含量が最も高かった培地で栽培した子実体は逆に最も活性化能は低かった。この相反現象から、キノコには β -グルカン以外にも免疫制御に関わる成分が存在することが示唆された。

謝 辞

本研究を進めるにあたり親身なご支援および貴重なご助言をいただきました、酪農学園大学 横田博教授、小野寺秀一教授および村松圭准教授に心より感謝を申し上げます。また本研究の一部は、平成26年度科学研究費補助金(課題番号26281058)および文科省科研省私立大学戦略拠点事業(酪農学園大学大学院 2013年~2017年)の一環として実施された。

文 献

1) 青木孝幸, アラゲキクラゲ, 「日本のきのこ」, 増補改訂新版, 今関六也, 大谷吉雄, 本郷次雄, 保坂健太郎, 細矢 剛, 長澤栄史編, (山と溪谷社, 東京), pp.527-538 (2011).

- 2) 大賀祥治, 宮本亮平, 車 柱栄, 徐 健植, アラゲキクラゲ (*Auricularia polytricha*) 培地の炭水化物含有量と子実体発生量の相関, 木材学会誌, **57**, 8-13 (2011).
- 3) 西井孝文, アラゲキクラゲ (*Auricularia polytricha*)の菌床栽培法, 三重県林業研究所研究報告, **25**, 21-26 (2013).
- 4) 中谷 誠, 未利用副産物を活用したきのこ栽培技術の開発, 北海道立林産試験場だより, 11-13 (2003).
- 5) 山内正仁, 小村洋美, 山田真義, 大六野洋, 長野京子, 内田一平, キノコ生産を核とした焼酎粕乾燥固形物の循環システムの構築, 廃棄物資源循環学会論文誌, **21**, 155-164 (2010).
- 6) 山内正仁, 今屋竜一, 山田真義, 増田純雄, 木原正人, 米山兼二郎, 原田秀樹, 甘藷焼酎蒸留粕を利用した高付加価値きのこ(エリンギ)の実用化に関する研究, 環境工学研究論文集, **44**, 481-490 (2007).
- 7) 山内正仁, 山田真義, 八木史郎, 増田純雄, 山口隆司, 食品廃棄物(焼酎粕・でん粉粕)を用いたヤマブシタケの栽培条件の確立とその成分特性, 環境工学研究論文集, **46**, 117-127 (2009).
- 8) 山内正仁, 八木史郎, 山田真義, 山口昭弘, 増田純雄, 山口隆司, 食品廃棄物を培地材料に利用することによるきのこ(ヤマブシタケ)の機能性向上効果, 環境工学研究論文集, **47**, 603-608 (2010).
- 9) 山内正仁, 大六野洋, 山田真義, 八木史郎, 原田直人, 増田純雄, 山口隆司, 各種食用きのこへの食品廃棄物(焼酎粕, でん粉粕)の適用と廃培地の飼料利用, 環境工学研究論文集, **67**, 449-459 (2011).
- 10) 山内正仁, 山田真義, 草原大貴, 八木史郎, 是枝清上, 三谷紘明, 山口隆司, 麦焼酎粕乾燥固形物を用いたヒラタケ子実体の成分特性と廃培地の再利用に関する研究, 土木学会論文集G(環境), **69**, III_151-III_157 (2013).
- 11) 山内正仁, 池田匠児, 山田真義, 八木史郎, 渡 慶彦, 山口昭弘, 山口隆司, 発酵バガス・黒糖焼酎粕培地を用いたアラゲキクラゲ栽培技術の開発, 環境工学研究論文集, 土木学会論文集G(環境), **71**, III_229-III_237 (2015).
- 12) Feeney, M.J., Dwyer, J., Hasler-Lewis, C.M., Milner, J.A., Noakes, M., Rowe, S., Wach, M., Beelman, R.B., Caldwell, J., Cantorna, M.T.,

- Castlebury, L.A., Chang, S.T., Cheskin, L.J., Clemens, R., Drescher, G., Fulgoni, V.L., 3rd, Haytowitz, D.B., Hubbard, V.S., Law, D., Myrdal M.A., Minor, B., Percival, S.S., Riscuta, G., Schneeman, B., Thornsberry, S., Toner, C.D., Woteki, C.E., Wu D., Mushrooms and health summit proceedings. J. Nutr., **144**, 1128s-1136s (2014).
- 13) Chiu, W.C., Yang, H.H., Chiang, S.C., Chou, Y.X., Yang, H.T., *Auricularia polytricha* aqueous extract supplementation decreases hepatic lipid accumulation and improves antioxidative status in animal model of nonalcoholic fatty liver. Biomedicine (Taipei), **4**, 29-38 (2014).
- 14) Yu, J., Sun, R., Zhao, Z., Wang, Y., *Auricularia polytricha* polysaccharides induce cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer A549 cells. Int. J. Biol. Macromol., **68**, 67-71 (2014).
- 15) Sheu, F., Chien, P.J., Chien, A.L., Chen, Y.F., Chin, K.L., Isolation and characterization of an immunomodulatory protein (APP) from the Jew's Ear mushroom *Auricularia polytricha*. Food. Chem., **87**, 593-600 (2004).
- 16) 齋藤三季, 井澤弘美, 戸羽隆宏, 柴田浩夫, 長田恭一, りんご枝おが屑を利用した鹿角霊芝の脂質代謝調節作用, 日本食品科学工学会誌, **56**, 79-84 (2009).
- 17) 奈良一寛, 鳥潟 諭, 長内宏之, 河野武平, 加藤陽治, 異なる剪定材を用いて栽培した鹿角霊芝子実体の水溶性多糖類, 日本食品科学工学会誌, **58**, 216-221 (2011).
- 18) 川原由紀子, 神内伸也, 岡崎真理, 岩田直洋, 白井達洋, 玄 美燕, 鈴木史子, 飯塚 博, 日比野康英, 2型糖尿病マウスにおける霊芝菌糸体培養培地抽出物の糖負荷後の血糖上昇抑制効果と食後過血糖改善薬との併用効果, 日本補完代替医療学会誌, **8**, 1-9 (2011).
- 19) 神内伸也, 新藤由梨, 内海有香, 岩田直洋, 岡崎真理, 鈴木史子, 飯塚 博, 浅野 哲, 松崎広和, 日比野康英, 2型糖尿病マウスの肝臓における霊芝菌糸体培養培地抽出物(WER)の糖質代謝に与える影響, 日本補完代替医療学会誌, **11**, 57-66 (2014).
- 20) 菅原諒太, 山田さゆみ, 涂 志豪, 菅原明子, 干場敏博, 山内正仁, 山口昭弘, 道央圏に自生するキノコの同定と機能性成分の含有量, 日本食品科学工学会誌, **62**, 445-453 (2015).
- 21) Anderson, B.I.W., The effect of β -glucan molecular weight on the sensitivity of dye binding assay procedures for β -glucan estimation. J. Inst. Brew., **96**, 323-326 (1990).
- 22) 宝寄山裕直, 野田 遊, マクロファージ系培養細胞を用いた鶏卵由来成分の免疫賦活機能評価法, 北海道立畜産試験場研究報告, **25**, 16-23 (2003).