

マンネンタケの抗酸化活性に関する研究

～ DPPH 法と ABTS 法による測定から ～

大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科 微生物部

難波勇多 江口直希 三明時也 榎谷和華 増田考佑 川崎裕斗

1 実験の背景と目的

マンネンタケは霊芝とも呼ばれ、マンネンタケ科の一種で、山地の樹木や切り株に自生する。天然のマンネンタケは発芽率が低く希少品であるが、近年、人工栽培による量産化が可能となった。私達は、種菌をもとに、おが培地菌床栽培において子実体形成に成功した。収穫したマンネンタケは記念祭で販売した。その用途は健康茶として愛飲していると思われる。マンネンタケは健康食品として市販され免疫力強化、ガン予防などの健康効果が謳われており、近年問題になっている活性酸素やフリーラジカルによる生体損傷についても、その成分中に抗酸化物質を含むために疾病予防に効果があるとされている。昨年度、本研究部では生育したマンネンタケの抗酸化性を判定するためにDPPH法で活性を測定し、比較のために市販のシイタケ、きくらげと比較した結果マンネンタケが高活性を有した。信頼性を得るためにABTS法を加え複数の測定法で活性測定をおこなった。又、抗酸化性とポリフェノール含量に相関性があると考えポリフェノール定量をおこなった。

2 マンネンタケの人工培養と試料調製

マンネンタケの種菌は大和菌学研究所より購入し、おが培地(図1)に種菌を接種し室温(25~30℃)で培養した。おが培地は専用プラスチック容器に入れ121℃、45分間滅菌し作成した(図2)。1ヶ月後、芽が形成され(図3)、3ヶ月後、傘(子実体)に成長した(図4)



図1 おが培地 図2 菌床栽培 図3 芽の形成 図4 子実体形成

(材料の加熱乾燥) 人工栽培のマンネンタケ、比較対照の市販品キノコ(乾燥シイタケ、乾燥きくらげ)を用いた(図5)。これら一定量をミニブレンダー(大阪が加製-図6)で粉碎し乾燥機を用い、105℃、6時間の条件で乾燥した。



図5 材料のキノコ

(成分抽出) ステンレス耐熱容器に水200mlと乾燥後のキノコ2gを入れ、加熱沸騰後弱火で5分間成分を抽出した(図7)。冷却後、抽出量を測定し(表1)、上澄み液を試料とした(図9)。



図8 熱水抽出 図9 抽出液 (マンネンタケ シイタケ きくらげ)

種類	加水量(ml)	抽出量(ml)
マンネンタケ	200	138
シイタケ	200	138
きくらげ	200	138

図6 粉体化

3 試料の抗酸化活性測定(方法)

1. DPPH法

方法: マンネンタケ等の試料液とラジカル物質であるDPPH(1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジール)を反応させて、517nmでの吸光度を測定した。測定値から標準の抗酸化物質としてビタミンE誘導体であるトロロックス(6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルロマン-2-カルボン酸)相当量を求めることで抗酸化能を判定した。



図10 エタノールに溶解したDPPH

1) 200μMDPPH(II液)を調整(図10)した後試料の抽出液1mlとEtOH1mlの混合液(I液)にII液(DPPH200μM)1mlを添加し20分後に吸光度(517nm)を測定(図11)。(空試験のII液はDPPH液のかわりにエタノール1mlを加えた。)



図11 吸光度測定

2) 標準物質トロロックスの抗酸化活性測定は0.2mMTrolox溶液(エタノール)5区分濃度を調製し、1)と同様の方法で吸光度を測定し検量線を作成した。



図12 ABTS液

2. ABTS法

方法: マンネンタケ等の試料液とラジカル物質であるABTS(アジノービス:3-エチルベンゾチアゾリン6-スルホン酸)を反応させて、734nmでの吸光度を測定した。測定値から標準の抗酸化物質としてトロロックス相当量を求めることで抗酸化能を判定した。

1) 7mMABTS100mlに140mMペルチニ硫酸カリウム1.67mlを加えた混合液(図12)を734nmにおける吸光度が0.7±0.02になるように、99.5%のエタノールで希釈してABTS+working solution(II液)を作成。II液3mlにI液(試料)を30μl添加し4分後に吸光度(734nm)を測定。(空試験のII液はABTS液のかわりにエタノール3mlを加えた。)

2) 標準物質トロロックスの抗酸化活性測定は0.2mMTrolox溶液(エタノール)5区分濃度を調製し、1)と同様の方法で吸光度を測定し検量線を作成した。

4 試料の抗酸化活性測定(結果・考察)

結果1: 1)の抽出液とDPPHの反応は図13で示され、マンネンタケは他キノコより紫色を消失していた。吸光度差(本試験-ブランク)を表2に纏めた。2)では図14のように呈色反応を示した。吸光度測定を基に検量線を作成し(図15)検量線の傾きから添加量と吸光度差は4nmolが0.171absに相当した。

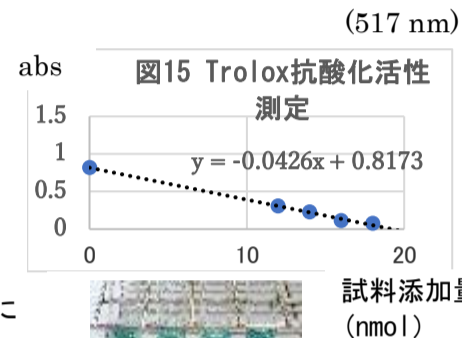


図13 反応後の混合液 (試験管の左からコントロール、マンネンタケ、シイタケ、きくらげの順)

試料種類	吸光度差(abs)
マンネンタケ	1.09
シイタケ	0.686
きくらげ	0.150



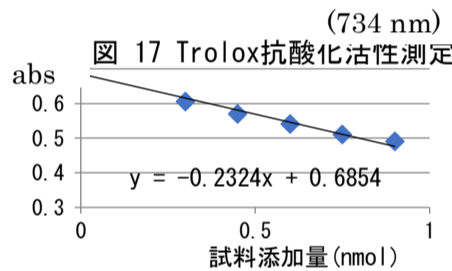
図14 Trolox溶液によるDPPHの反応(5区分濃度)



結果2: 抽出液とABTSの反応は図16に示し、吸光度差を表3に纏めた。トロロックスの抗酸化活性測定値基に検量線を作成し(図17)検量線の傾きから添加量と吸光度差は0.2nmolが0.0460absに相当した。



図16 反応後の混合液 (試験管の左からコントロール、マンネンタケ、シイタケ、きくらげの順)



試料種類	吸光度差(abs)
マンネンタケ	0.104
シイタケ	0.070
きくらげ	0.017

考察: 各試料1ml当たりのトロロックス相当量をDPPH、ABTS両法による測定値から算出し、又、加熱抽出量から換算して各キノコ材料1g当たりのトロロックス相当量を表4に纏めた。DPPH、ABTS両法による相当量は近いことから信頼性が高いと考えられる。1g当たりのトロロックス相当量比較すると、マンネンタケが他キノコより抗酸化活性が高かった。マンネンタケは他キノコに比べて酸化物質消去能が大きいといえる。

表4 試料(キノコ抽出液)のトロロックス相当量

試料	相当量(nmol/ml)		相当量(μmol/g)	
	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS
マンネンタケ	14.6	15.1	1.01	1.04
シイタケ	9.20	10.1	0.635	0.700
きくらげ	1.54	2.46	0.106	0.170

5 試料のポリフェノール定量

キノコに含有すると考えられる抗酸化成分のひとつであるポリフェノールの定量をおこなった

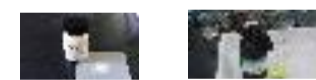
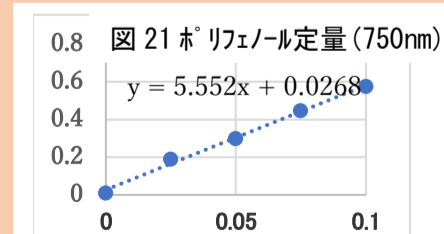


図18 ガルlic酸 図19 フェノール試薬

方法と結果: 標準液は1mg/mlのタンニン酸を用いた(図18)。反応は希釈液(5区分0、0.025、0.05、0.075、0.1mg/ml)0.1mlにフェノール試薬(図19)1ml、10%NaCO₃1ml、蒸留水0.9mlを加え全量3mlとした。60分室温で反応させた(図20)。750nmの吸光度を測定した結果から検量線を作成した(図21)。



図20 反応後の呈色 試験管の左から5区分のタンニン酸濃度(0~0.1μg/ml)



同様の方法で試料(各キノコ抽出液)について測定し(図22)。検量線よりポリフェノール含量(μg/g)算出した(図23)。



図22 試料反応後の呈色 試験管の左からマンネンタケ、シイタケ、きくらげの順



考察: マンネンタケとシイタケの抗酸化活性値は1:0.6であるがポリフェノール含量は近い値であった。ポリフェノール以外の抗酸化物質の含有が示唆される。