霊芝リキュールに含まれる中性グルカンの構造

稲葉和功*, 渡辺隆司**, 高野真奈美*
光永俊郎*, 越島哲夫*

* 近畿大学農学部食品栄養学科

** 京都大学木質研究所

Structure of Neutral Glucan in Reishi Liqueur

Kazunari INABA,* Takashi WATANABE,** Manami TAKANO,*
Toshio MITSUNAGA* and Tetsuo KOSHIJIMA*

* Department of Food and Nutrition, Faculty of Agriculture,
Kinki University, Nara 631

** Wood Research Institute, Kyoto University, Uji 611

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 45, 163~167 (1992)

Reishi liqueur was produced from *Ganoderma lucidum* (Leyss.: FR.) KARST. by two-step extraction with a Japanese "sake" alcohol content of 19.5% at 18°C for 10 days and then at 70°C for 60 min. To analyse the fine structure of the extracted polysaccharides, the extract was dialyzed, the impermeable portion was concentrated under reduced pressure and then precipitated with 7.5 times its volume of ethanol. The precipitate was then fractionated into neutral polysaccharide (Ganoderan-N) and acidic polysaccharide (Ganoderan-A) by DEAE-Sephadex A-25 column chromatography. Methylation and ¹³C-NMR analysis indicated that Ganoderan-N consists of β-(1,3)-linked glucan bearing a monoglucosyl residue at the C-6 position in every three units of glucose.

Key Words structure, liqueur, polysaccharide, methylation, glucan.

(Received October 11, 1991)

中国名でいう霊芝は、わが国ではマンネンタケと呼ばれ、広葉樹材の腐朽菌で梅雨から夏の高湿期にかけ、立ち木の根元や切株に発生する。分類学上、担子菌類、ヒダナシ目、サルノコシカケ科に属し、学名は *Ganoderma lucidum* (Leyss.: FR.) KARST. である。傘も茎も漆を塗ったような光沢をもつ1年生の堅いキノコで、傘はコルク質で普通腎臓形をしている。また神農本草経に上薬として記載され、古くから不老長寿の薬として利用されてきた。中国では霊芝の効能効果に対する近代的な研究が進み、肝炎、高血圧症、慢性気管支炎、狭心症など数多くの症状に対して臨床的效果が解明され、薬として使用されている¹⁾²⁾。わが国でも Chihara ら³⁾ によって担子菌の成分に含まれる多糖類に抗がん作用があると報告されて以来、キノコ類の抗がん作用の研究とともに Yoshioka ら⁴⁾ によって *Pleurotus ostreatus* (Fr.) QUEL の β-(1,3)-D-グルカンの構造決定がなされてい

る。霊芝に関しても人工栽培が可能になったことによって、他のキノコ類と同様に薬効の研究がなされている^{5)~7)}。これらの報告は化学成分を明らかにしているが、制がん効果については、Sarcoma 180 でのマウス移植がんに対して、宿主仲介性の顕著な抗腫瘍性を示す多糖は、霊芝の熱水抽出成分中の β-(1,6)-モノグルコシル鎖をもつ β-(1,3)-D-グルカンであると報告されている⁸⁾。

本研究においては、熱水に溶出されてくる抗がん性成分の β-(1,3)-D-グルカンを日本酒の原酒で溶出させることにより、新しい健康酒としての霊芝リキュールの製造を試み、同時に溶存多糖の構造を詳細に検討してきた。

実験方法

1. 霊芝リキュールの製造

1) 実験材料 霊芝は人工栽培されたマンネンタケをコーヒーマイルを用いて粉碎した。清酒は飯田酒造で醸造

* 〒631 奈良市中町 3327-204

** 〒611 宇治市五ヶ庄

された原酒（アルコール濃度 19.5%）を用いた。

2) 製法 原酒 1 l に対してマンネンタケ粉末を 10, 15, 20 g 加えた試験区を設け、18°C で 2 日間ごとに 30 分間スターラーで攪拌し、10 日間浸漬した。10 日目には殺菌を兼ねてホットプレート上で攪拌しながら 60 分間で 70°C まで液温を上昇させ、ただちに吸引濾過して冷却、リキュールを製造した。この過程の化学成分の変化を検討した。

i) 酸度の測定 リキュール 5 ml をとり、BTB と NR の混合指示薬を用いて 0.1 N の水酸化ナトリウム溶液で滴定した。リキュール 5 ml を中和するに要する ml で示した。

ii) pH の測定 ガラス電極 pH メーター（堀場 F8E 型）で測定した。

iii) 色度の測定 分光光度計（島津 UX-240 型）を用いて 430 nm で吸光度を測定した。

iv) アミノ酸分析 リキュール 1 ml を封管試験管にとり、6 N 塩酸で 110°C、32 時間加水分解したのち活性炭で脱色、濃縮乾固して 0.02 N 塩酸に溶解し、アミノ酸自動分析装置（日立 835 型）で分析した。

2. 多糖の分析

1) 霊芝リキュールから多糖の分離 霊芝リキュールを Fig.1 に示すごとく濃縮し、ゲルセロファンチューブ（Visking 製、孔径 2.4 nm）を用いて水道水に対して透析し、チューブ内溶液を濃縮後、5 倍量のエタノールで沈殿させた。沈殿物をエタノール、石油エーテルの順で洗浄して真空デシケータ中で室温乾燥した。

2) 中性多糖の精製 DEAE-Sephadex A-25 を 1 N 水酸化ナトリウムで 3 時間膨潤させたのち、Cl⁻ が検出されなくなるまで水洗して、1 N 炭酸アンモニウムで一晩浸漬した。このゲルは NH₄⁺ の検出されなくなるまで

水洗して用いた。

試料の多糖を温水に溶解し、ゲルとともにパッチ法で酸性糖画分を吸着させたのち、ガラスカラムに注加し、Fig.1 に示すごとく水で中性糖画分をフェノール・硫酸反応がほとんどなくなるまで溶出した。その後、1 M 炭酸アンモニウムで酸性糖画分を溶出した。中性糖画分は濃縮後、7.5 倍量のエタノールで沈殿させて吸引濾過によって沈殿物を集め、エタノール、石油エーテルの順に洗浄して真空デシケータ中で室温乾燥した（Ganoderan-N）。また、酸性糖画分は濃縮して凍結乾燥した（Ganoderan-A）。

3) 中性単糖の分析 試料 10 mg を精秤して封管試験管にとり、1 N 硫酸 2 ml を加えて封管後、100°C で 8 時間加水分解後アルジトールアセテートに変換し、ガスクロマトグラフィーで分析した。カラムは 3 mm × 2 m のガラスカラム、充填剤は 3% ECNSS-M, Gas chrom. Q (60~80 mesh) を用いて 170°C で分析した。

4) 糖のメチル化 箱守法に従ってメチル化した。1 N-H₂SO₄ で加水分解後メチル化糖は 3% OV 225 と 3% ECNSS-M, Gas chrom. Q (100~200 mesh), (3 mm × 2 m) を使用し、185°C で分析した。

5) ¹³C-NMR による分析 試料 200 mg を DMSO-d₆ 約 2 ml に溶解し、Varian XL-200 の核磁気共鳴装置を用いて 50.3 MHz で ¹³C-NMR を測定した。なお、測定温度は 60°C とした。

結果ならびに考察

1. 霊芝リキュールの製造

リキュール製造時の酸度を測定した結果、Fig.2 に示すごとくいずれの霊芝添加区でも 3 日目までやや上昇するが、それ以降は変化が少なかった。pH は Fig.3 に示

Fig.1. Fractionation of polysaccharides from Reishi liqueur.

Fig. 2. Changes of acidity during extracting period.

■ : 20 g/l, ▲ : 15 g/l, ● : 10 g/l.

Fig. 3. Changes of pH during extracting period.

■ : 20 g/l, ▲ : 15 g/l, ● : 10 g/l.

すごとくほとんど変化がなかった。色の溶出は Fig. 4 に示すごとくであり、3 日目までかなり溶出され、それ以降 8 日目までの溶出は緩慢であるが、10 日目の加熱によって多量の溶出が認められた。また、製造過程中的のアミノ酸の変化は Table 1 に 15 g 添加区について示したが、いずれの添加区もアミノ酸組成は類似しており、原酒に由来するものと思われ、霊芝からの溶出による影響は少ないと考えられた。多糖の溶出量 (15 g 添加区で 150 mg/l, 10 g 添加区で 132 mg/l, 20 g 添加区で 154 mg/l) や味 (20 g 添加区で苦味が強い)、色調、香 (20 g 添加区では清酒の香りが薄くなる) などを考え合わせるならば、リキュールの製造条件としては、1 l の原酒に対して霊芝粉末 15 g を加えたときが最良と考えられた。

Fig. 4. Changes of color during extracting period.

■ : 20 g/l, ▲ : 15 g/l, ● : 10 g/l.

Table 1. Changes of amino acid composition during extraction period of reishi liqueur containing 15 g of reishi.

Extraction period (days)	3	4	6	8	10
Asp	10.73	10.18	10.51	10.07	9.48
Thr	5.07	6.15	5.75	5.12	5.34
Ser	7.69	8.68	7.72	7.36	7.52
Glu	13.65	9.67	9.74	13.10	10.28
Gly	16.35	17.38	15.72	15.35	14.48
Ala	19.14	19.66	18.51	18.15	16.51
Cys	0.73	0.96	1.17	1.00	1.37
Val	6.78	7.85	8.61	7.78	9.15
Met	0.27	0.36	0.34	0.38	0.68
Ileu	3.00	2.74	3.66	3.24	4.35
Leu	5.68	4.98	6.18	6.37	7.05
Typ	0.65	0.57	0.97	0.61	1.43
Phe	0.40	0.76	0.34	0.68	0.89
Lis	3.67	4.52	4.23	3.92	3.86
His	1.88	1.90	2.10	1.91	1.87
Arg	4.31	3.64	4.45	4.95	5.84

2. 多糖の分析

1) Ganoderan-N の ^{13}C -NMR DMSO- d_6 中の Ganoderan-N の 50.3 MHz における ^{13}C -NMR スペク

Fig. 5. ^{13}C -NMR spectra of Ganoderan-N.

トルを測定した結果、14 のシグナル (Fig. 5) が確認された。Ganoderan-N の ^{13}C -NMR スペクトルは、Yoshioka ら⁴⁾ によって報告されている ヒラタケの HA

β -グルカンの ^{13}C -NMR スペクトルとはほぼ同一のシグナルを示し、各シグナルのケミカルシフトは、HA β -グルカンの各ケミカルシフトにはほぼ一致した。このことから Ganoderan-N は HA β -グルカンとはほぼ同一の構造をもつと考えられ、Table 2 に示すように帰属された。これらの ^{13}C -NMR スペクトルの各ピークの相対強度の相違は、分岐の度合が影響している。すなわち、相対強度の強いピーク C (71.2 ppm) は分岐した β -1,3-グルカンの非還元末端の β -グルコシル残基 (*t*-残基) の C-4'' 位の炭素に帰属され、ピーク F (74.8 ppm), J (77.8 ppm) は、それぞれ *t*-残基の C-2'' 位、C-3'' 位の炭素に帰属される。明らかに相対強度の強いピークは、すべて *t*-残基にのみ由来することから、Ganoderan-N は HA β -グルカンに比べ β -1,6 結合した側鎖の頻度が高いものと予想できる。ピーク B (69.6 ppm) は Table 2 に示した Curdlan (直鎖状の β -1,3-グルカン)⁹⁾ と GE-3

Table 2. ^{13}C -NMR spectral lines of various β -D-glucans and their assignments.

Peak	Peak assignment			Chemical shift (ppm) for each carbon atom			
	Residue			Ganoderan-N	HA β -glucan	Curdlan ($\rightarrow 3\text{Glc} \rightarrow$)	GE-3 ($\rightarrow 6\text{Glc} \rightarrow$)
	<i>m</i> -	<i>b</i> -	<i>t</i> -				
A			C-6''	62.1	61.8	62.4	
B		C-4 C-6'		69.6	69.3	69.9	70.0
C			C-4''	71.2	70.9		71.4
D	C-2	C-2'		73.7	73.6		
E	C-2			73.7	73.8	74.3	
F			C-2''	74.8	74.5		75.0
G		C-5'		75.8	75.4		77.1
H	C-5		C-5''	77.3	76.7		
I	C-5			77.4	77.0	77.7	
J			C-3''	77.8	77.4		78.1
K		C-3'		87.1	86.4		
L	C-3			87.5	87.0	87.5	
M	C-3			87.9	87.7		
N	C-1	C-1'	C-1''	104.1	103.7	104.5	104.9

(直鎖状の β -1,6-グルカン)¹⁰⁾ のそれぞれに相当する炭素間の相違を考慮に入れて 3,6-ジ-O-置換 β -グルコシル残基 (*b*-残基) の C-6' 位の炭素に帰属される。ピーク K (87.1 ppm) は主鎖の最もリジットな位置である *b*-残基の C-3' 位の炭素に帰属される。ピーク L (87.5 ppm) とピーク M (87.9 ppm) は *m*-残基の C-3 位の炭素を示している。ピーク M はピーク L からみて低磁場シフトしているのは *b*-残基の隣接効果によるものである。また, Laminaran と GE-3 とのシグナルの比較から, グルコース側鎖の構成糖残基は大部分 1 個であると判断できる。Ganoderan-N の ¹³C-NMR スペクトルにはセロオリゴ糖, マンノオリゴ糖にみられるシグナルが認められない。ゆえに β -1,4 結合のグルコース, β -1,4 結合のマンノースユニットを含まないことが判断でき, Ganoderan-N 中にセルロース, β -1,4 マンナン, β -1,4 グルコマンナンは含まれないと考えられる。

2) Ganoderan-N のメチル化分析 メチル化分析により Table 3 に示すごとく, 未分岐の 1,3 結合したグルコースに由来する 2,4,6-グルコース, 分岐点に相当する 2,4-グルコース, 非還元末端 (側鎖を含む) に相当する 2,3,4,6-グルコースがそれぞれ約 2:1:1 の比率で検出され, 1,6 結合した中間構成単位に相当する 2,3,4-グルコースも微量検出したことから, Ganoderan-N の主成分は β -1,3 結合したグルコース三つに一つの割合で β -1,6 結合したグルコースの側鎖がついたグルカンであると推定できる。

以上, ¹³C-NMR のスペクトルおよびメチル化糖分析の結果から, Ganoderan-N は *P. ostreatus* (FR.) QUEL の熱水抽出多糖の β -1,3 結合したグルコース主鎖の四つに一つの割合で β -1,6 結合したグルコースの側鎖をもつ構造の HA β -グルカンと類似した構造をもつが, 分岐点は HA β -グルカンより多く, β -1,3 結合したグルコース主鎖三つに一つの割合で β -1,6 結合したモノグルコシル分岐鎖をもつグルカンであると結論する。

要 約

日本酒の原酒を用いて粉末霊芝の成分を 18°C, 10 日間, ついで 70°C まで 60 分間で上昇させることにより霊芝リキュールを製造した。抽出条件は, リキュールの色調, 香味, 酸度, pH など考え合わせると 1 l の原酒に対して霊芝 15 g を加えたときの条件が最良であった。

Table 3. Methyl esters from hydrolyzates of methylated ganoderan-N.

Peak	Retention coefficient		Area (%)	Methylated sugars
	Observed	Standard		
A	1.00	1.00	23.1	2,3,4,6-Glc
B	1.73	1.82*	49.1	2,4,6-Glc
C	2.09	2.10	2.0	2,3,4-Glc
D	3.81	3.60*	25.8	2,4-Glc

抽出された多糖類を分析するため, リキュールを透析してチューブ内溶液を 7.5 倍量のエタノールで沈殿させた。得られた多糖類は, DEAE Sephadex A-25 を用いてカラムクロマトグラフィーを行い, 中性多糖 (Ganoderan-N) と酸性多糖 (Ganoderan-A) に分離した。Ganoderan-N は DMSO-d₆ を用いて ¹³C-NMR によって構造を解析すると β -1,6 分岐した側鎖と 1,3 結合した β -グルコシル残基が認められ, また, メチル化分析では, 2,3,4,6-テトラ, 2,4,6-トリ, 2,4-ジ-O-メチルグルコースが 1:2:1 の割合で検出された。このことから Ganoderan-N は C-6 位にモノグルコシル分岐鎖をもつ β -1,3-グルカンであると結論した。

文 献

- 1) 中国科学院北京植物研究所, 北京医学院药理研組 (編): 靈芝, (1976), 科学出版社 (北京)
- 2) 陳 奇, 王 民楮, 許 霖英: 葯学学報, 14, 141 (1979)
- 3) Ikegawa, T., Nakanishi, M., Chihara, G. and Fukuoka, F.: *Gann*, 59, 155 (1968)
- 4) Yoshioka, Y., Tabeta, R., Saito, H., Uehara, N. and Fukuoka, F.: *Carbohydr. Res.*, 140, 93 (1985)
- 5) 有地 滋, 上原靖央, 上野 隆, 河井 洋, 谷 勲, 長谷初恵, 仕垣勝治, 谿 忠人, 久保道徳, 桐ヶ谷紀昌: 基礎と臨床, 13, 4245 (1979)
- 6) 久保道徳, 松田秀秋, 田中基晴, 木村善行, 谿 忠人, 有地 滋, 奥田拓道, 桐ヶ谷紀昌: 基礎と臨床, 14, 2445 (1980)
- 7) 久保道徳, 松田秀秋, 野上真理, 有地 滋, 高橋 猛: 薬学誌, 103, 871 (1984)
- 8) 水野 卓, 加藤尚美, 戸塚 夫, 新海健吉, 清水 雅子: 農化, 58, 871 (1984)
- 9) Saito, H., Ohmi, T., Takatsuka, N. and Sasaki, Y.: *Carbohydr. Res.*, 58, 293 (1977)
- 10) Saito, H.: *ACS Symp. Ser.*, 150, 125 (1981)

(1991年10月11日受理)