技術報告

紫外線照射によるエルゴステロールの
ビタミン D₂ への効率的変換について

川副剛之*・湯浅克己*

Efficient Transformation of Ergosterol to Vitamin D₂ by
Ultraviolet Light Irradiation

Takayuki KAWAZOE* and Katsumi YUASA*

* Kikkoman Corporation, 399, Noda, Noda-shi, Chiba, 278

It is well known that ergosterol (provitamin D₂) transforms to vitamin D₂ by ultraviolet light irradiation. We studied efficient transformation of ergosterol to vitamin D₂ in the materials (shiitake (*Lentinus edodes*), enokitake (*Flammulina velutipes*), hiratake (*Pleurotus ostreatus*), bakers' yeast, beer yeast and koji mold). Each powdered material was irradiated by ultraviolet light under vibration conditions. It was confirmed that a portion of ergosterol in all the materials was transformed vitamin D₂ by the treatment mentioned above. Yield of vitamin D₂ increased over 1 000 IU/g in every material for only 3 minutes. Yield of vitamin D₂ tends to increase with high contents of ergosterol. Yields of vitamin D₂ in shiitake under vibration conditions increased linearly up to 10 minutes and reached 10 000 IU/g. On the other hand, yield of vitamin D₂ in shiitake under stationary conditions was 2 500 IU/g for 10 minutes. Transformation efficiency between the two was 4-fold. Thermostability of vitamin D₂ in shiitake was equal to that of vitamin D₂ in cellulose powder. Storage stability was superior to the control. It was thought that these fortified materials were of great value as additives in the field of food, petfood and feed.

(Received Mar. 3, 1994)

ビタミン D は健康な骨を作る上で必要不可欠の栄養素である。近年、若年層の骨の脆弱化、老人、特に閉経以降の女性に多くみられる骨粗鬆症が社会問題としてクローズアップされてきている。骨粗鬆症に対しても、若いうちからビタミン D やカルシウムの十分な補給がその予防に重要であるとの報告がある^{1)~4)}。

一方、各種栄養素のうち日本ではカルシウムの摂取量の不足が指摘されていること、カルシウムの吸収に重要なビタミン D を比較的多く含む食品がシイタケ、魚類の一部と限られていること⁵⁾等からカルシウム、ビタミン D を含むシリアル食品、ビタミン D を添加したカルシウム製剤が数多く開発されている。

ビタミン D はその前駆体であるエルゴステロール、7-

デヒドロコレステロールに、紫外線が当たることにより、それぞれビタミン D₂、ビタミン D₃へと変換する。ビタミン D₂の前駆体であるエルゴステロールはきのこ、酵母、麹菌等に含まれている^{6) 7)}。シイタケでは紫外線の照射により、ビタミン D₂量が増加することが知られている^{8) 9)}。また栽培の過程で、わずかな日光の照射により、エルゴステロールがビタミン D₂へ変換し、約 10 IU/g のビタミン D₂が含まれることが確認されている^{10) 11)}。

著者らはシリアル食品、カルシウム製剤などへ、少量添加するだけで、一日必要量のビタミン D を摂取できるような、ビタミン D 量の高い食品及び飼料添加素材を作ることを目的とした。本報では、試料としてエルゴステロール量の多いきのこ、酵母、麹菌を使用し、紫外線照

* キッコーマン株式会社研究本部 (〒278 千葉県野田市野田 399)

射方法として、これら試料を粉碎後、振動下、攪拌状態で、紫外線を照射することにより、エルゴステロールをビタミン D₂ に効率的に変換する方法を見出した。

実験方法

1. 供試試料

試料はきのことしてシイタケ (*Lentinus edodes*), ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*), エノキタケ (*Flammulina velutipes*), 酵母としてパン酵母, ビール酵母, そして麹菌を用いた。シイタケ, ヒラタケ, エノキタケは、近くのスーパーにて購入した。パン酵母は、オリエンタル酵母工業(株)製オリエンタルイーストを使用した。ビール酵母は、麒麟麦酒(株)製ビール酵母 A を使用した。麹菌は *Aspergillus oryzae* を液体培養し¹²⁾, 洗浄濾過後使用した。それぞれの試料は 60℃ の熱風で、水分 10% 以下まで乾燥した後、粉碎し、粉末状で使用した。

2. 紫外線照射装置及び照射条件

音響用のスピーカー上に、プラスチックのトレー (11×11cm) を固定し、トレー表面がスピーカーの微振動により振動するようにした。トレー上に試料 2.5 g を置き、試料によりもっともよく攪拌される状態を、低周波発振機で、スピーカーの振動を調節することによりつくった。

紫外線は東芝製 15 W 殺菌ランプ (GL 15, 主波長 254 nm) を使用し、高さ 10 cm の位置より照射した。その時のトレー表面での紫外線量を、トプコン社製 UVR-25 にて測定したところ、2 mW/cm² であった。紫外線照射は温度 22~27℃ の室内環境下にて行った。

3. ビタミン D₂ 及びエルゴステロールの分析方法

抽出は試料 2 g を用い、Folch ら¹³⁾ の方法に従い行った。抽出液は 50 ml に定容し、10 µl を HPLC 分析に供した。

HPLC 分析は、カラムとして逆相カラム東ソー ODS 80 T_M φ 4.6×150 mm を用い、検出は紫外吸収 265 nm, 溶離液はメタノール:水 (95:5 V/V) を流速 0.8 ml/分で行った。ビタミン D₂ 及びエルゴステロール量は標品として和光純薬(株)製、特級ビタミン D₂ 及びエルゴステロールを用い、ピークの面積比で計算した。

なお紫外線照射前では、各種試料中のビタミン D 量は少量であり、上記の測定法では検出限界以下であった。よって紫外線照射前の試料については竹内ら¹⁴⁾ の 2 段階 HPLC 法によって測定した。

4. ビタミン D₂ の同定

UV 吸収スペクトルは島津製フォトダイオードアレイ

UV 検出器 (SPD-M6 A) を用い測定した。HPLC の条件はビタミン D₂ 分析方法と同様に行った。

GC-MS は、装置は M-80 B 型日立 2 重収束 GC 質量分析計、カラムは Hewlett-Packard 社製 HP Ultra-1 (0.2 mm i.d.×30 m), 温度は試料注入口 300℃, カラム 280℃, キャリヤーガスは 1.28 ml/分, イオン化電圧は 70 eV で行った。

5. ビタミン D₂ 分析での添加回収試験

シイタケを試料として用いた。試料 1 g に対しビタミン D₂ を 200, 500, 1 000, 2 000, 10 000 IU (1 IU=0.025 µg) の割合で添加し、ビタミン D₂ 量を測定した。

6. 熱安定性試験及び保存安定性試験

熱安定性は紫外線照射シイタケ (ビタミン D₂ 量 5 000 IU/g) をシャーレ上に置き空気とふれた状態で暗所に 100, 120℃ で静置した。ビタミン D₂ 量を経時的に測定し残存率で表した。

保存安定性は紫外線照射シイタケ (ビタミン D₂ 量 5 000 IU/g) をシャーレ上に置き空気とふれた状態で暗所に 5, 20, 40℃ で 14 週間保存した。経時的にビタミン D₂ 量を測定し残存率で表した。

対照区として、標品ビタミン D₂ 62.5 mg をエーテル 100 ml に溶かし、セルロースパウダー (オリエンタル酵母工業(株)製) 500 g と均一に混合し、ビタミン D₂ 5 000 IU/g のセルロースパウダーを調製し同様に試験した。

実験結果及び考察

1. エルゴステロールとビタミン D₂ の分析

各種試料の HPLC チャートにおいて、保持時間 21.5 分に表れた最も大きなピークは、エルゴステロール標品と同一保持時間、また同一 UV 吸収スペクトルを示し、エルゴステロールと推定した。2 分間の紫外線照射後、すべての試料において、HPLC チャート上の保持時間 18 分に新たなピークが確認された。このピークの保持時間はビタミン D₂ 標品と同一保持時間であり、UV 吸収スペクトルは最大吸収波長 265 nm, また 229 nm に谷を持つビタミン D₂ 分子中の 5, 6-*cis*-トリエン構造に由来する特徴的なスペクトルであった。保持時間 18 分のピークを分取し、GC-MS 分析を行ったところ、ピロ D₂ とイソピロ D₂ の 2 つのピークに分かれること、またそれぞれのピークのフラグメントが、標品ビタミン D₂ と同一であった。HPLC での保持時間が一致すること、UV 吸収スペクトル、GC-MS の結果より、HPLC チャートでの保持時間 18 分の新たなピークはビタミン

D₂と同定した。このことより、すべての試料において、2分間という短時間の紫外線照射により、試料中に含まれるエルゴステロールの一部が、ビタミンD₂に変化していることが確認できた。

次に、ビタミンD₂分析における添加回収試験を行った。Table 1にシイタケにビタミンD₂を添加した場合の回収率を示した。ビタミンD₂添加量1000 IU/g以上では、100%近い回収率を示した。なお検量線は1000 IU/gより20000 IU/gまで直線性を示した。添加量500 IU/g、200 IU/gの回収率はそれぞれ112.2%、129.7%となり、添加量が少なくなると、定量性を示さなくなった。これは本来シイタケが含有しているビタミンD₂、また同じ保持時間に表れるシイタケ中の他成分の影響によると思われる。また添加量200 IU/gより少ない範囲は、今回の分析方法では検出限界以下であった。ビタミンD₂が1000 IU/g以上存在する場合は、簡便なる本測定法にて、ビタミンD₂を定量可能であった。

2. 各種試料の紫外線照射によるビタミンD₂の増加

Table 2に各種試料の紫外線照射前と3分間紫外線照

Table 1 Results of recovery tests of vitamin D₂ in shiitake powder

Added value (IU/g)	Recovery (%)
10 000	97.8±0.5
2 000	98.7±0.8
1 000	100.2±0.9
500	112.2±1.8
200	129.7±3.0

M±SD (n=3)

Table 2 Contents of ergosterol and vitamin D₂ in each material after Ultraviolet light irradiation for 3 minutes

Material	Before irradiation		After irradiation	
	Ergosterol	Vitamin ^{a)} D ₂	Ergosterol	Vitamin ^{b)} D ₂
	(mg/g)	(IU/g)	(mg/g)	(IU/g)
Shiitake	4.92	11.0	4.68	3 210
Hiratake	4.77	3.5	4.62	2 980
Enokitake	2.69	2.2	2.49	1 920
Baker's yeast	2.01	0	1.76	2 040
Beer yeast	1.74	0	1.51	1 470
Koji mold mycelium	1.53	0	1.38	1 160

^{a)}Vitamin D contents were determined by the method of TAKEUCHI *et al.* using two steps of HPLC.

^{b)}Vitamin D contents were determined by the simple method using one step of HPLC.

射後のエルゴステロール量、ビタミンD₂量を示した。

エルゴステロール量はシイタケで4.92 mg/g、もっとも少なかった麹菌でも1.54 mg/gであった。小山らは各種食用きのこ類のエルゴステロール量を測定し、乾物換算で0.19~7.80 mg/gの範囲にあり、シイタケ3.25 mg/g、ヒラタケ3.05 mg/g、エノキタケ2.72 mg/gと報告している¹⁵⁾。今回使用したシイタケは、かなり多くのエルゴステロールを含有していた。

ビタミンD₂量は紫外線照射前ではもっとも多いシイタケでも11.0 IU/gとごくわずかであった。

紫外線照射により、ビタミンD₂量はすべての試料において大幅に増加した。シイタケでは、3 210 IU/g、もっとも少ない麹菌でも1 160 IU/gであった。またエルゴステロール量が多い試料が紫外線照射後のビタミンD₂生成量が多い傾向にあった。これより、ビタミンD₂の前駆体であるエルゴステロールを多く含有する素材を使った方が、ビタミンD₂を容易に増加させることができる。

桐潤はシイタケ、ヒラタケ、エノキタケを試料として用い、紫外線を1~3時間照射後のビタミンD₂量を測定し、それぞれ453、1 197、2 750 IU/gに増加したとしている。また各種きのこ類において形状が異なるため、紫外線を受けた表面積がもっとも大きかったエノキタケが、ビタミンD₂量が増加したと報告している¹⁶⁾¹⁷⁾。本研究では3分間という短時間の照射でビタミンD₂を十分に増加させることが可能となった。これは試料を粉碎し、微振動下で、攪拌したことにより、紫外線照射面積が大幅に増加したためと考えられる。

3. 静置状態と振動攪拌状態での紫外線照射の比較

Fig. 1に紫外線照射時間とビタミンD₂生成量との関係を示した。試料はシイタケで行い、振動の効果を見る

Fig. 1 Time course of vitamin D₂ content in shiitake by ultraviolet light irradiation under vibration and stationary conditions.

■, vibration conditions ; ○, stationary conditions.

ため、静置状態で照射したものと比較した。静置状態での照射では、ビタミン D₂ 生成量が照射時間 10 分で 2500 IU/g、60 分で 4000 IU/g であった。一方、振動攪拌状態での照射では、ビタミン D₂ 生成量が照射時間 10 分までほぼ直線的に増加し、10000 IU/g となり、20 分で最高値約 12000 IU/g を示した。変換効率も 10 分間の時点で、静置状態に比較し 4 倍に向上した。これより振動攪拌状態で紫外線照射することにより、変換効率の向上が認められ、短時間のうちに大幅なビタミン D₂ の増加が可能であった。

現在、日本におけるビタミン D の所要量は、乳幼児 (5 歳以下) が 1 日あたり 400 IU、青少年 (6 歳以上) 及び成人が 100 IU、妊婦及び授乳婦が 400 IU となっている。そこで本研究で得られたビタミン D₂ 量 10000 IU/g のシイタケでは、成人所要量 100 IU を少量の 10 mg で摂取できる。

振動攪拌状態での紫外線照射において 20 分以降ビタミン D₂ 量が減少したのは、照射により、ビタミン D₂ が分解するためと思われた⁹⁾。この現象は溶液状態でのエルゴステロールのビタミン D₂ への光化学反応において、過度の紫外線照射によって起こる現象と同様と考えられる。

4. 粒度の影響

粒度の影響を見るために、シイタケを粗粉碎したものに、紫外線を照射し、その後、各粒度に分け、ビタミン

D₂ 量を測定した。Table 3 に各粒度ごとのビタミン D₂ 量を示した。粒度が小さくなるにしたがいビタミン D₂ 量は増加した。これは、粒度が小さくなることにより表面積が増加し、単位重量あたりに受ける紫外線照射量が増加し、ビタミン D₂ 量が増加したと思われる。紫外線を効率的に照射するには粉碎により粒度を細かくする必要がある。

5. 生成ビタミン D₂ の熱安定性と保存安定性

Fig. 2 にシイタケ中のビタミン D₂ の熱安定性を示した。シイタケ中のビタミン D₂ の残存率は 100℃、120 分間で 81%、120℃、120 分間という過酷な条件でも、47%

Table 3 Vitamin D₂ content in each particle size of coarse ground shiitake after ultraviolet light irradiation

Particle size (mesh)	Vitamin D ₂ content (IU/g)
9<	1 340±10
9~16	2 520±20
16~30	3 220±20
30~60	3 240±10
60~100	3 560±30
100>	6 690±70

M±SD (n=3)

Fig. 2 Changes in residual ratio of vitamin D₂ during heating at 100°C and 120°C.

●, Vitamin D₂ in shiitake at 100°C ; ○, Vitamin D₂ in cellulose powder at 100°C ; ■, Vitamin D₂ in shiitake at 120°C ; □, Vitamin D₂ in cellulose powder at 120°C.

Fig. 3 Changes in residual ratio of vitamin D₂ during storage at 5°C, 20°C and 40°C

▲, Vitamin D₂ in shiitake at 5°C; △, Vitamin D₂ in cellulose powder at 5°C; ●, Vitamin D₂ in shiitake at 20°C; ○, Vitamin D₂ in cellulose powder at 20°C; ■, Vitamin D₂ in shiitake at 40°C; □, Vitamin D₂ in cellulose powder at 40°C.

であった。コントロールとして用いたセルロースパウダー中のビタミンD₂の残存率とほぼ同様の値を示した。シイタケ中のビタミンD₂は炒めたり、揚げたりしてもほとんど減少しないという報告もあるが¹⁰⁾、食品加工の加熱工程において熱安定性は高いことが確認できた。

Fig. 3にビタミンD₂の保存安定性を示した。セルロースパウダー中のビタミンD₂は、5, 20, 40°Cの2週間保存後の残存率が97, 92, 19%と、保存温度の上昇に従い幾何級数的に分解が進む傾向にあると思われる。よって40°C保存で残存率は大幅に減少した。シイタケ中のビタミンD₂も保存温度の上昇とともに分解は進むもののセルロースパウダー中のビタミンD₂に比較し、保存安定性は高かった。このことは飼料、ペットフード等における添加素材として利用価値が高いことを示している。

要 約

エルゴステロール含有試料(きのこ、酵母、麹菌)を粉砕し、振動下、攪拌状態で紫外線を照射し、エルゴステロールのビタミンD₂に効率的に変換する方法の開発を試みた。

(1) 紫外線照射により、すべての試料においてエルゴステロールの一部がビタミンD₂に変化した。

(2) 3分間という短時間の紫外線照射により、試料中のビタミンD₂量はすべての試料において1000 IU/g以上に増加した。またエルゴステロール量が多い試料ほど、ビタミンD₂量が増加する傾向にあった。

(3) 静置状態で紫外線照射した場合、シイタケでは10分間でビタミンD₂量は2500 IU/gであった。一方振動下、攪拌状態で紫外線照射では、ビタミンD₂量は10分まで直線的に増加し、10000 IU/gに達し、変換効率は静置状態に比較し4倍に向上した。

(4) シイタケ中の生成ビタミンD₂はセルロースパウダー中のビタミンD₂と比較し、熱安定性は同等であり、保存安定性は高かった。

終わりに、本研究を行うにあたり、多大なご助言を頂きましたキッコーマン(株)常務取締役杉山晋一博士、取締役研究部長齊藤成正博士ならびに紫外線照射装置製作でご指導頂きました高砂工場岡本義晴氏に感謝致します。

文 献

- 1) MATKOVIC, V., KOSTIAL, K., SIMONOVIC, I., BUZINA, R., BRODAREC, A. and NORDIN, C.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 540 (1979).
- 2) 小林 正: ビタミン, **64**, 509 (1990).
- 3) 岡野登志夫・津川尚子・東野雷太・増田園子・竹内敦子・松岡 雪・小林 正・松岡昌義・日比善朗: ビタミン, **64**, 579 (1990).
- 4) DAWSON-HUGHES, B., DALLAL, G., KRALL, E., HARRIS, S., SOKOLL, L. and FALCOMER, G.: *Ann. Inter. Med.*, **115**, 505 (1991).
- 5) 竹内敦子・岡野登志夫・小林 正: ビタミン, **67**, 321 (1993).
- 6) ANTHONY, S.: *Encyclopedia of chemical technology*, **21** (John Wiley and Sons Inc, New York), p. 559 (1970).
- 7) 数野千恵子・三浦 洋: 日食工誌, **31**, 208 (1984).
- 8) 有本邦太郎・高野武悦・松岡憲固・西門義一・山下太郎・加納享一・小野忠義・佐土根範次・森喜作・宮下千篤: 日本公衛誌, **14**, 1201 (1967).
- 9) 小林 正・足立昌子・古田肇子: ビタミン, **50**, 421 (1976).
- 10) 竹内敦子・岡野登志夫・寺岡澄子・村上裕美子・鞘本万里子・澤村節子・小林 正: ビタミン, **58**, 439 (1984).
- 11) 竹内敦子・岡野登志夫・寺岡澄子・村上裕美子・鞘本万里子・澤村節子・小林 正: ビタミン, **58**, 501 (1984).

-
12) FUKUSHIMA, Y., ITOH, H., FUKASE, T. and MOTAI, H. : <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , 30 , 604 (1989).	15) 小山尚子・青柳康夫・菅原龍幸：日食工誌, 31 , 732 (1984).
13) FOLCH, J., LEES, M. and SLOANE-STANLEY, G.A. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 226 , 497 (1957).	16) 桐淵壽子：家政誌, 41 , 395 (1990).
14) TAKEUCHI, A., OKANO, T., TERAOKA, S., MURAKAMI, Y. and KOBAYASHI, T. : <i>J. Nutr. Sci. Vitaminol.</i> , 30 , 11 (1984).	17) 桐淵壽子：家政誌, 41 , 401 (1990).
- (平成6年3月3日受理)
-