

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013年11月21日(21.11.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/172304 A1

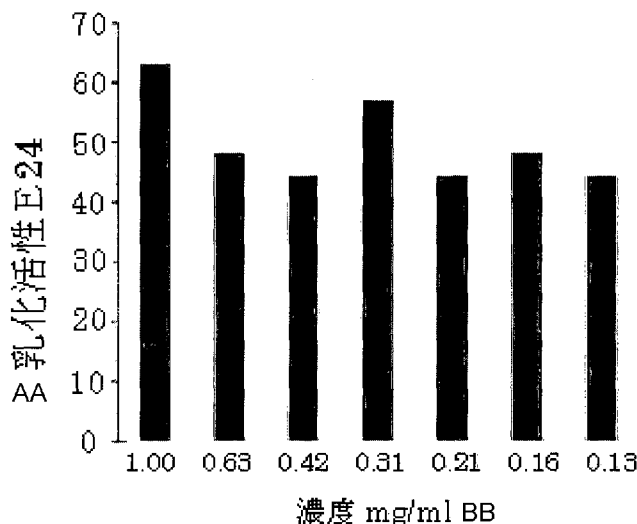
- (51) 国際特許分類:
A23L 1/28 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/063296
- (22) 国際出願日: 2013年5月13日(13.05.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-112438 2012年5月16日(16.05.2012) JP
- (71) 出願人: 学校法人関西大学(A SCHOOL CORPORATION KANSAI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5648680 大阪府吹田市山手町3丁目3番35号 Osaka (JP). 有限会社 一栄(ICHIEI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒3810042 長野県長野市稲田2丁目9-4 4 Nagano (JP).
- (72) 発明者: 河原 秀久(KAWAHARA, Hidehisa); 〒5648680 大阪府吹田市山手町3丁目3番35号 学校法人関西大学 化学生命工学部内 Osaka (JP). 小出 芳栄(KOIDE, Yoshihide); 〒3810042 長野県長野市稲田2丁目9-4 4 有限会社一栄内 Nagano (JP).
- (74) 代理人: 藤本 昇(FUJIMOTO, Noboru); 〒5420081 大阪府大阪市中央区南船場1丁目15番14号 塚筋稲畑ビル2階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING ENOKITAKE MUSHROOM EXTRACT, ENOKITAKE MUSHROOM EXTRACT, AND FOOD ADDITIVE

(54) 発明の名称: エノキタケ抽出物の製造方法、エノキタケ抽出物および食品添加剤

[図1]



AA Emulsification activity E24
BB Concentration mg/ml

(57) Abstract: This process for producing an *enokitake* mushroom (*Flammulina velutipes*) extract comprises immersing fruit bodies of *enokitake* mushroom in an alcohol, subsequently separating the fruit bodies from the alcohol, immersing the separated fruit bodies of *enokitake* mushroom in water having a temperature of 80°C or higher, and then obtaining the supernatant as an extract.

(57) 要約: 本発明は、エノキタケ子実体をアルコールに浸漬した後に前記アルコールから分離することと、分離した前記エノキタケ子実体を80°C以上の水に浸漬した後に上澄みを抽出物として得ることと、を備えるエノキタケ抽出物の製造方法等である。

WO 2013/172304 A1

ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,
NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

エノキタケ抽出物の製造方法、エノキタケ抽出物および食品添加剤

関連出願の相互参照

[0001] 本願は、日本国特願2012-112438号の優先権を主張し、引用によって本願明細書の記載に組み込まれる。

技術分野

[0002] 本発明は、エノキタケ抽出物の製造方法、エノキタケ抽出物およびエノキタケ抽出物を含む食品添加剤に関する。

背景技術

[0003] キノコやカビ等の菌類、地衣類等から抽出される抽出物は、粘着性や乳化性を示す低分子タンパク質であるヒドロフォビンを含むことが知られている。このヒドロフォビンを増粘剤、乳化剤、界面活性剤等の各種剤へ利用することが検討されている。

例えば、特許文献1乃至3には、真菌類由来のヒドロフォビンを食品添加剤として使用することが記載されている。

[0004] 特許文献1乃至3には、ヒドロフォビンを得る方法として、真菌からヒドロフォビンをコードする遺伝子を取り出し宿主細胞に導入する遺伝子組み換えの手法によってヒドロフォビンを得ること、及び、真菌の菌糸体からエタノール等でヒドロフォビンを抽出することが記載されている。

[0005] しかしながら、遺伝子組み換え技術で製造されたヒドロフォビンは、安全性の観点から食品添加剤として食品へ使用することを制限される場合がある。

また、真菌の菌糸体からエタノール等で抽出するという一般的な抽出方法では、抽出量が少なく抽出効率が悪いという問題がある。

[0006] 非特許文献1には、ヒドロフォビンの抽出方法として、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）等の薬品で処理することが記載されている。かかる方法

によればヒドロフォビンの抽出量は増加する。しかし、かかる抽出方法で抽出されたヒドロフォビンは安全性の観点からみると好ましくない。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：日本国特開2008-507958号公報
特許文献2：日本国特開2008-507959号公報
特許文献3：日本国特開2011-41583号公報

非特許文献

- [0008] 非特許文献1：Interfacial Self-Assembly of Fungal Hydrophobins of the Lichen-Forming Ascomycetes *Xanthoria parietina* and *X. ectaneoides*, *Fungal Genetics and Biology* 30, 81-93(2000)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明は、上記のような点に鑑み、ヒドロフォビンを比較的多く含む安全性の高い抽出物を効率よく得ることができる方法、および安全性の高い抽出物および食品添加剤を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0010] 上記課題を解決すべく、本発明のエノキタケ抽出物の製造方法は、エノキタケ子実体をアルコールに浸漬した後に前記アルコールから分離することと、
分離した前記エノキタケ子実体を80℃以上の水に浸漬した後に上澄みを抽出物として得ることと、を備える。
- [0011] 本発明は、前記エノキタケ子実体をアルコールに浸漬する前に、前記エノキタケ子実体を酸性溶液に浸漬しその後に前記酸性溶液から分離することを、備えていてもよい。
- [0012] 前記酸性溶液はpH1.0～3.0であってもよい。
- [0013] 前記酸性溶液は酢酸溶液であってもよい。

[0014] 本発明のエノキタケ抽出物は、
エノキタケ子実体をアルコールに浸漬した後に前記アルコールから分離し
、
分離した前記エノキタケ子実体を 80℃以上の水に浸漬することで抽出さ
れる。

[0015] 食品添加剤に係る本発明は、前記エノキタケ抽出物を含む。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]実施例のエノキタケ抽出物の乳化活性を示すグラフ。

[図2]実施例のエノキタケ抽出物の乳化活性を示すグラフ。

[図3]実施例のエノキタケ抽出物のヒドロキシプロピルセルロースに対する結
合性を示すGPCクロマトグラフ。

[図4]実施例のエノキタケ抽出物のペクチンに対する結合性を示すGPCクロ
マトグラフ。

[図5]実施例のエノキタケ抽出物のワキシコーンスターチに対する結合性を示
すGPCクロマトグラフ。

[図6]エノキタケ抽出物のタンパク質濃度と各種試料に対する接着性との関係
を示すグラフ。

[図7]シャンプーの泡高さを測定した結果を示すグラフ。

発明を実施するための形態

[0017] 本実施形態のエノキタケ抽出物の製造方法は、
エノキタケ子実体をアルコールに浸漬した後に前記アルコールから分離する
ことと、

分離した前記エノキタケ子実体を 80℃以上の水に浸漬した後に上澄みを
抽出物として得ることと、を備える。

[0018] さらに、必要に応じて、前記エノキタケ子実体をアルコールに浸漬する前
に、前記エノキタケ子実体を酸性溶液に浸漬しその後に前記酸性溶液から分
離することを、備えていてもよい。

[0019] 本実施形態で用いる材料としては、エノキタケ (*Flammulina velutipes* (C

urt.:Fr.) Sing) の茎部分と傘部分とからなる子実体の部分が用いられる。

エノキタケは、天然のものあるいは人工栽培したものいずれであってもよく、その産地等も問わない。

[0020] 尚、本実施形態でいうエノキタケ子実体とは、エノキタケ (*Flammulina velutipes* (Curt.:Fr.) Sing) の生の子実体、エノキタケ子実体の乾燥体、およびエノキタケ子実体からタンパク質以外の成分を除去する処理を施した処理物を含む。

[0021] 前記エノキタケ子実体は、凍結乾燥などによる乾燥状態で、あるいはそのまま生の状態で、粉末にして用いることができる。

あるいは、前記エノキタケ子実体から、多糖類等のタンパク質以外の成分を除去する処理を施した処理物を用いてもよい。

[0022] 菌類の一種であるエノキタケにヒドロフォビンが含まれていることは従来から知られている。エノキタケは安全性の高い材料であるため、エノキタケからヒドロフォビンを抽出することで、安全性の高いヒドロフォビン抽出物が得られる。

[0023] [酸処理工程]

本実施形態では、前記エノキタケ子実体をアルコールに浸漬する前に、前記エノキタケ子実体を酸性溶液に浸漬した後に前記酸性溶液から分離する酸処理工程を実施してもよい。

尚、酸処理工程の実施は、必須ではない。

[0024] 前記酸処理工程で使用される酸性溶液としては、例えば、酢酸、クエン酸等の酸の水溶液が挙げられる。

特に、酢酸水溶液を用いることが安全性の面からみて好ましい。

前記酸性溶液のpHは、pH 1.0~3.0、特に好ましくはpH 1.0~2.0程度になるように調整することが好ましい。

前記pHの範囲であれば、効率よくヒドロフォビンを抽出することができる。

[0025] 酸処理工程では、前記子実体の粉末を前記酸性溶液中に懸濁して、そのま

ま酸性溶液中に10分間～60分間浸漬させた後に、遠心分離、ろ過、デカンテーション等の公知の分離方法で上澄みと前記エノキタケ子実体である沈殿物とに分離する。

遠心分離によって、前記沈殿物を得る場合には、例えば、 $8000 \times g \sim 10000 \times g$ で、10分間～30分間程度遠心分離することが好ましい。

[0026] 酸処理工程において、前記エノキタケ子実体を浸漬する前記酸性溶液の量は、例えば、エノキタケ子実体20mg（絶乾重量換算）に対して1ml～2ml程度であることが好ましい。

[0027] 本実施形態の酸処理工程において、前記浸漬と分離とを複数回行なってもよい。すなわち、酸性溶液に浸漬後分離された沈殿物を、さらに酸性溶液中に浸漬して、沈殿物を分離することで不純物の少ない、より多くのヒドロフォビンを含む抽出物が得られる。

[0028] [アルコール処理工程]

本実施形態では、前記酸処理工程後のエノキタケ子実体をアルコールに浸漬させた後に前記アルコールから分離するアルコール処理工程を実施する。

本実施形態で使用するアルコールとしては、特に限定されるものではないが、例えば、エチルアルコール、メチルアルコール、1-プロパノール等が挙げられる。

中でも、エチルアルコールを使用することが安全性の面から好ましい。

[0029] 前記酸処理工程で分離されたエノキタケ子実体（沈殿物）を前記アルコール中に懸濁して、そのままアルコール中に浸漬する。この時前記アルコールの温度は、 $-80^{\circ}\text{C} \sim -10^{\circ}\text{C}$ 程度の低温であることが、アルコール中へのタンパク質の溶解を抑制する観点から好ましい。

[0030] アルコール処理工程において、前記エノキタケ子実体を浸漬する前記アルコールの量は、例えば、エノキタケ子実体20mg（絶乾重量換算）に対して1ml～2ml程度であることが好ましい。

[0031] 前記沈殿物は、前記アルコール溶液中に懸濁後10分間～60分間浸漬させた後に、遠心分離、ろ過、デカンテーション等の公知の分離方法で上澄み

とエノキタケ子実体である沈殿物とに分離する。

遠心分離によって、前記沈殿物を得る場合には、例えば、 $8000 \times g \sim 10000 \times g$ で、10分間～30分間程度遠心分離することが好ましい。

[0032] 本実施形態のアルコール処理工程において、前記浸漬と沈殿物の分離とを複数回行なってもよい。すなわち、アルコールに浸漬後、分離された沈殿物を、さらにアルコール中に懸濁して浸漬し、沈殿物を分離することで不純物が少ない、より多くのヒドロフォビンを含む抽出物が得られる。

[0033] 本実施形態においては、前記アルコール処理工程の後、沈殿物として得られたエノキタケ子実体中に含まれるアルコール分を除去するため、60分間～240分間程度の時間、例えば、ドラフトチャンバーのような排気可能な空間に置きアルコールを揮発させてもよい。

[0034] [抽出工程]

次に、前記アルコール処理工程で分離したエノキタケ子実体（沈殿物）を、 80°C 以上の水に浸漬して抽出物を得る抽出工程を実施する。

前記沈殿物を、 80°C 以上、好ましくは 100°C の沸騰水中に10分間～60分間、好ましくは20分間～40分間浸漬する。

前記水が 80°C 未満、好ましくは $30^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ 程度になるまで冷却した後、さらに $8000 \times g \sim 10000 \times g$ 、10分間～30分間、遠心分離等を行った上澄みを、エノキタケ抽出物として得る。

[0035] 本実施形態の製造方法で得られたエノキタケ抽出物には、ヒドロフォビンが含まれている。

ヒドロフォビンは、ジスルフィド架橋を形成するシステイン残基を含む数100程度のアミノ酸からなる低分子タンパク質であり、構造的にSDS可溶性を示すクラスIIと、不溶性を示すクラスIとに分類される。

尚、本実施形態でいう「ヒドロフォビン」は、前記ヒドロフォビン、およびヒドロフォビンに、他のポリペプチド又はポリサッカライド等が融合した融合タンパク質を含むものを指す。

[0036] 本実施形態で得られるエノキタケ抽出物に含まれるヒドロフォビンはS

D S可溶性を示すクラスIIであると考えられている。

前記クラスIIのヒドロフォビンは、無機粒子、多糖類、他のタンパク質等に対して結合する結合性及び乳化活性を示すため、食品添加剤、化粧品用添加剤、薬品、接着剤、塗料等各種製品に使用することが考えられる。

[0037] 本実施形態の製造方法で得られるエノキタケ抽出物は、有害な抽出用の薬品を使用しなくても得られるため、安全性が高い、というメリットがある。

また、本実施形態の製造方法でエノキタケ抽出物を得ることで、抽出される抽出物の量が比較的多く、製造効率がよく、低コストで製造できる、というメリットがある。

[0038] 本実施形態のエノキタケ抽出物は食品添加剤として利用することができる。

前記エノキタケ抽出物は、例えば、乾燥させた粉末状等の形状や、溶媒中に溶解させた液体状等の形状にして、食品添加剤として製造することができる。

また、必要に応じて、タンパク質や多糖類等の他の成分と混合してもよい。

本実施形態の食品添加剤は、前述のように多糖類や他のタンパク質等に対して結合する結合性及び乳化活性を示すため、増粘性や乳化性を付与する食品添加剤として各種食品に添加することができる。

[0039] また、本実施形態のエノキタケ抽出物は、酸化チタン、酸化亜鉛、酸化鉄等の無機粒子表面に付着し、無機粒子の表面特性を変化させる。

無機粒子表面にエノキタケ抽出物を付着させる方法は特に限定されるものではないが、例えば、無機粒子と、エノキタケ抽出物を含む溶液とを混合することで、エノキタケ抽出物を無機粒子表面に付着させること等が挙げられる。

エノキタケ抽出物が付着した無機粒子は、エノキタケ抽出物によって肌、金属、その他の各種部材の表面への付着性が向上するため、化粧品材料、塗料等の原料として用いることができる。

- [0040] さらに、本実施形態のエノキタケ抽出物は、界面活性剤等の界面活性作用を向上させうる。
- 従って、例えば、洗剤、シャンプー、ボディークリーム等の原料として用いることで、洗浄力を向上させることができる。
- [0041] 本発明によれば、ヒドロコピンを比較的多く含む安全性の高いエノキタケ抽出物を効率よく得ることができる。
- [0042] すなわち、本発明によれば、エノキタケ子実体をアルコールに浸漬した後に前記アルコールから分離することと、分離した前記エノキタケ子実体を80℃以上の水に浸漬した後に上澄みを抽出物として得ることと、を備えるため、比較的多くのヒドロコピンを含む抽出物を有害な薬品を使用しなくても効率よく得ることができる。また、安全性の高いエノキタケ子実体を材料として使用し且つ有害な薬品を使用しなくてもよいため、安全性の高い抽出物を得ることができる。
- [0043] 前記エノキタケ子実体を酸性溶液に浸漬しその後に前記酸性溶液から分離することを、備えることで、より多くのヒドロコピンを含む抽出物が得られる。
- [0044] 前記酸性溶液が前述のようなpHの範囲である場合には、より、多くのヒドロコピンを含む抽出物が得られる。
- [0045] 前記酸性溶液が酢酸溶液である場合には、安全性が高い酸であるため好ましい。
- [0046] 本発明によれば、安全性が高く、比較的多くのヒドロコピンを含むエノキタケ抽出物を得ることができる。
- [0047] さらに、本発明によれば、安全性の高いエノキタケを材料とし且つ有害な薬品を使用しないで得られたヒドロコピンを含む抽出物を含む、安全性が高い食品添加剤が得られる。
- [0048] 尚、本実施形態にかかるエノキタケ抽出物の製造方法、エノキタケ抽出物および食品添加剤は以上のとおりであるが、今回開示された実施形態はすべての点で例示であって制限的なものではないと考えられるべきである。本発

明の範囲は前記説明ではなくて特許請求の範囲によって示され、特許請求の範囲と均等の意味および範囲内でのすべての変更が含まれることが意図される。

実施例

[0049] 以下に、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

[0050] 《抽出物の収量》

(実施例 1)

エノキタケの子実体の粉末をヘキサン中に懸濁した後、4℃、12時間以上放置した懸濁液を濾紙（No. 1、ADVANTEC社製）で濾過することで得られた固形成分を試料として準備した。

前記試料 2 g を、10%酢酸溶液 20 ml に懸濁させた後に、遠心分離（25000×g、4℃、15分）して沈殿物を得た。かかる沈殿物 2.5 g をさらに10%酢酸溶液 20 ml に懸濁させた後に遠心分離（25000×g、4℃、15分）して沈殿物を得た。

次に、前記沈殿物 2.5 g を、エタノール（−20℃）20 ml 中に入れ、遠心分離（25000×g、15分間）を2回繰り返して洗浄し、ドラフトチャンバー内で完全にエタノールを揮発させた沈殿物を、100℃の水の中に30分間浸漬した後、40℃になるまで冷却し、混合して、遠心分離（25000×g、4℃、15分）した上澄みをエノキタケ抽出物として得た。

[0051] (実施例 2)

前記実施例 1 と同様の試料を、酢酸溶液に懸濁させる処理を行わない以外は、実施例 1 と同様に処理して得られたエノキタケ抽出物を実施例 2 とした。

[0052] (比較例 1)

前記実施例 1 の 10%酢酸溶液を、Washing Buffer 液（0.1 M Tris-HCl、pH 8.0、10 mM MgSO₄、1 mM P

MSF（フッ化フェニルメチルスルホニル）の超純粋溶液）に5%（質量%）となるようにトリクロロ酢酸を溶解したものに代え、100℃の水に代えて100℃のドデシル硫酸ナトリウム水溶液（2質量%）で浸漬した以外は、実施例1と同様の方法で得たエノキタケ抽出液を比較例1とした。

[0053]（比較例2）

前記実施例1のエタノールによる処理を行わない以外は、実施例1と同様の方法で得たエノキタケ抽出液を比較例2とした。

[0054]（比較例3）

前記実施例1の100℃の水による処理を行わない以外は、実施例1と同様の方法で得たエノキタケ抽出液を比較例3とした。

[0055]（比較例4）

前記実施例1と同様の試料2gを100℃の水の中に30分間浸漬した後、遠心分離（25000×g、4℃、15分）した上澄みを比較例4のエノキタケ抽出物として得た。

[0056] 前記実施例1、2および比較例1乃至4のエノキタケ抽出液中からタンパク質濃度を以下の方法で測定した。

[0057] [タンパク質量測定方法]

本実施例においてタンパク質量の測定はLowry法に従い測定した。

Lowry法用のキットとしては、RCDCプロテインアッセイ（バイオラッド社製）を用いた。

使用試薬は、前記キット中のDCプロテインアッセイ試薬のA試薬250μl、同S試薬5μlを混合したA'試薬を用いた。

前記A'試薬と、実施例1乃至比較例4のエノキタケ抽出液を50μlとを、ボルテックスミキサーで1分間混合した後に、さらに前記DCプロテインアッセイ試薬のB試薬を2.0ml添加してボルテックスミキサーで1分間混合した。

この試薬と混合した試料について、分光光度計（U-2001 Spectrophotometer 日立製作所社製）で750nmでの吸光度を

測定した。ブランクとして、超純水（M i l l e r Q）を用いた。

標準液としてB S A（牛血清アルブミン）溶液を用いて検量線を作成し、かかる検量線から実施例1乃至比較例4のタンパク質濃度を算出した。

結果は、以下のとおりであった。

[0058]	実施例1	: 0.86	質量%
	実施例2	: 0.30	質量%
	比較例1	: 1.50	質量%
	比較例2	: 0.018	質量%
	比較例3	: 0.0079	質量%
	比較例4	: 0.046	質量%

[0059] 実施例1、2は、S D Sを用いなくても、比較的多くのタンパク質が抽出されている。特に、実施例1は比較例1と同等程度のタンパク質が抽出されている。

また、比較例2乃至4では、実施例1および2に比べ少量のタンパク質しか抽出されなかった。

[0060] 《乳化活性試験1》

前記実施例1のエノキタケ抽出物の乳化活性を試験した。

乳化活性は、乳化指標（ E_{24} ）を用いた方法で評価を行なった。

まず、前記実施例1で得られたエノキタケ抽出物を、1.00mg/ml、0.63mg/ml、0.42mg/ml、0.31mg/ml、0.21mg/ml、0.16mg/ml、0.13mg/mlの各濃度になるように超純水で希釈した。

各濃度のエノキタケ抽出物1ml、ケロシン1mlを、テフロンパッキン付きネジ蓋付き試験管に入れ、ボルテックスミキサーで60秒間攪拌した。その後、4℃、30℃、37℃でそれぞれ24時間放置後、液面までの全高さと、エマルジョンの高さを測定し、全高さに占めるエマルジョンの高さを E_{24} （乳化活性指標）として算出した。

結果を図1に示す。

[0061] 図1に示すように、実施例1のエノキタケ抽出物はいずれの濃度においても E_{24} は40%を超えており、高い乳化活性を示している。

[0062] 《乳化活性試験2》

前記乳化活性試験1のケロシンに代えて、紅花油、米油、コーン油、大豆油、ゴマ油、菜種油、オリーブ油の各油1mlと、前記実施例1で得られたエノキタケ抽出物（濃度0.31mg/ml）1mlとを混合して、前記 E_{24} を測定した結果を図2に示す。

[0063] 図2に示すように、実施例1のエノキタケ抽出物はいずれの油に対しても、乳化活性を示している。

特に、従来の生物由来系の乳化剤では乳化させにくいオリーブ油に対しても、エノキタケ抽出物は高い乳化活性を示している。

[0064] 《乳化活性試験3》

前記乳化活性試験1のケロシンに代えて、オリーブ油1mlと、前記実施例1で得られたエノキタケ抽出物をタンパク質濃度175 μ g/mlになるように希釈したもの1mlとを混合して、前記 E_{24} を測定した。

エノキタケ抽出物中のタンパク質濃度は前述したタンパク質量の測定方法と同様に測定した。

尚、前記Lowry法で用いたブランクの超純粋（Milli-Q）に代えて、希釈に用いた0.3M NaClを含む20mM KH_2PO_4 （pH7）を用いた。

[0065] 比較として、エノキタケ抽出物に替えて市販の各界面活性剤と、オリーブ油1mlとを混合したものの前記 E_{24} を同様に測定した。

尚、使用した市販の界面活性剤は以下の3種類である。

[界面活性剤]

界面活性剤1：ポエムDL-100、理研ビタミン社製 100 μ g/ml
I（ジグリセリンモノラウレート）

界面活性剤2：ポエムDP-100、理研ビタミン社製 100 μ g/ml

I (グリセリン脂肪酸エステル)

界面活性剤 3 : ポエム M-300、理研ビタミン社製 100 μ g/ml

(グリセリン脂肪酸エステル)

[0066] 結果は以下のとおりである。

エノキタケ抽出物 : E₂₄ 62.1%

界面活性剤 1 : E₂₄ 0.00%

界面活性剤 2 : E₂₄ 0.00%

界面活性剤 3 : E₂₄ 0.00%

[0067] 以上のように、エノキタケ抽出物は、市販の界面活性剤では乳化しにくいオリーブ油に対しても高い乳化活性を示している。

[0068] 《多糖類に対する反応性（結合性）試験》

前記実施例 1 のエノキタケ抽出物の多糖類に対する反応性（結合性）を試験した。

前記実施例 1 のエノキタケ抽出物 (0.16 mg/ml) を 0.1 ml と、多糖類としてヒドロキシプロピルセルロース (HPC)、ペクチン、ワキシコーンスターチ (各 0.5 質量%) をそれぞれ 1.0 ml とを混合した混合物、エノキタケ抽出物単体、各多糖類単体を、GPC 装置 (HLC-8320 GPC (RI 検出器内蔵)、東ソー社製) を用いて UV280 における分子量のピークを測定した。

使用カラムは TSK_{g_el} GMPW_{x_l} (7.8 mm I. D. × 30 cm × 2 本) を使用し、緩衝液は 0.15 mM NaCl と、Tris-HCl とを使用した。流速は 1.0 ml/min で測定した。

測定した結果を示す GPC クロマトグラムを図 3 ~ 図 5 に示す。

[0069] 図 3 ~ 図 5 に示すように、いずれの GPC クロマトグラムでも、エノキタケ抽出物単体および多糖類単体と、各多糖類との混合物とでは異なる位置 (時間) にピークを示している。

このことから、エノキタケ抽出物は、各多糖類に対する結合性を有しており、各混合物中では多糖類とエノキタケ抽出物との結合体が形成されている

ことが判る。

[0070] また、前記乳化活性試験1～3および多糖類に対する反応性（結合性）試験から、実施例で得られたタンパク質は、乳化活性、および多糖類に対する結合性を示すヒドロフォビングラスIIを含むタンパク質であることが判る。

[0071] 《タンパク質及び無機粒子に対する結合性試験》

以下のような方法で、前記実施例1のエノキタケ抽出物のタンパク質及び無機粒子に対する結合性を試験した。

エノキタケ抽出物との結合性を試験するタンパク質及び無機粒子の試料としては、下記のものを使用した。

[試料]

ケラチン：羊毛、東京化成社製

コラーゲン：Type I、SIGMA社製

酸化チタン：製造専用品、和光純薬社製

酸化亜鉛：和光純薬社製

酸化第二鉄：和光純薬社製

[0072] まず、前記実施例1のエノキタケ抽出物中のタンパク質濃度を前述したLowry法と同様に測定したところ205.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。このエノキタケ抽出物をさらに2、3、4、5倍希釈と5段階の濃度になるようにエノキタケ抽出物を希釈した。

尚、前記Lowry法で用いたブランクの超純粋（Milli-Q）に代えて、希釈に用いた0.3M NaClを含む20mM KH_2PO_4 （pH7）を用いた。

[0073] 次に、前記実施例1のエノキタケ抽出物を1mlと、前記試料用のタンパク質及び無機粒子を含む各試料0.05gとを混合した混合物を、30℃の恒温室において振盪機（NR-2、TAITEC社製）で3時間振盪させた。その後、遠心分離機（CF16RX、HITACHI社製）を用い10000 $\times g$ 、10分間遠心分離し、上澄みを採取した。

採取した上澄み中のタンパク質濃度（B：単位 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を前記Lowry法によって測定した。

尚、前記Lowry法で用いたブランクの超純粋（Milli-Q）に代えて、希釈に用いた0.3M NaClを含む20mM KH_2PO_4 （pH7）を用いた。

[0074] さらに、コントロールとして、エノキタケ抽出物の代わりに、1mlのイオン交換水と各試料0.05gとを混合した混合物を前記と同様の方法で上澄みを採取し、同様にタンパク質濃度（C：単位 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を測定した。

さらに、前記実施例1のエノキタケ抽出物1mlを、前記と同様の方法で上澄みを採取し、同様にタンパク質濃度（d：単位 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を測定した。該エノキタケ抽出物の上澄みのタンパク質濃度（d）とエノキタケ抽出物中のタンパク質濃度（A）との差（D）を算出した。

[0075] 各測定値及び算出値を以下の算出式にあてはめ、接着率を算出した。

$$\text{接着率 (\%)} = [\{ A - (C + D) \} - B] \div \{ A - (C + D) \}$$

[0076] 前記接着率と、各試料と混合するエノキタケ抽出物の濃度との関係を図6のグラフに示す。

図6に示すように、いずれの試料に対してもエノキタケ抽出物中のたんぱく質は、高い接着率を示した。特に、酸化チタン、酸化亜鉛、酸化鉄に対してはすべての濃度の範囲でも安定して高い接着率を示した。

すなわち、エノキタケ抽出物は、タンパク質及び無機質に対して高い結合性を有していることが明らかである。

[0077] 《界面活性の向上性試験》

前記実施例1のエノキタケ抽出物（タンパク質濃度 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を6.5mlと、市販のシャンプー液（商品名「Super Mild」、資生堂社製）6.5mlとを、メスシリンダーにいれて25℃の条件で手動で1分間攪拌し、10分毎に泡の高さを測定した。

比較として、水6.5mlと、前記シャンプー液とを用いた混合物でも同様に泡の高さを測定した。

泡の高さの測定方法は、メスシリンダーの側方から定規を用いて測定した。

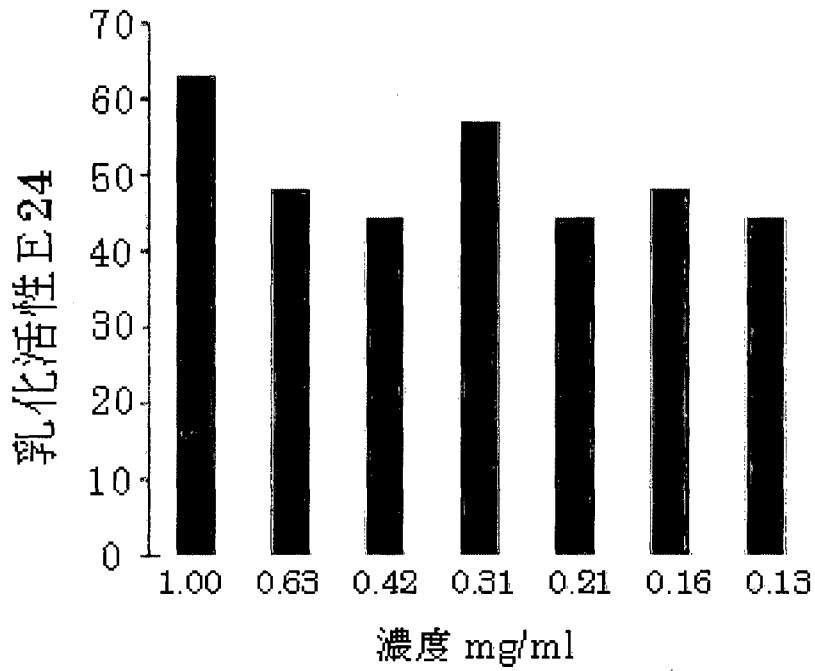
結果を図7のグラフに示す。

[0078] 図7のグラフに示すように、いずれも攪拌時間においても、エノキタケ抽出物と混合した場合、泡の高さは、水と混合するよりも高くなっており、この結果からエノキタケ抽出物はシャンプー液の界面活性作用を向上させることが明らかであった。

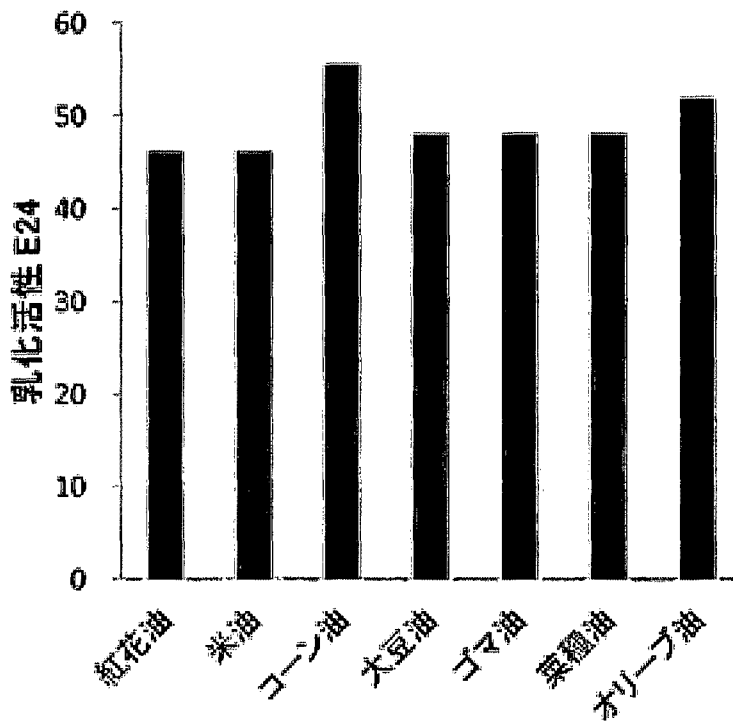
請求の範囲

- [請求項1] エノキタケ子実体をアルコールに浸漬した後に前記アルコールから分離することと、
分離した前記エノキタケ子実体を80℃以上の水に浸漬した後に上澄みを抽出物として得ることと、を備えるエノキタケ抽出物の製造方法。
- [請求項2] 前記エノキタケ子実体をアルコールに浸漬する前に、前記エノキタケ子実体を酸性溶液に浸漬しその後に前記酸性溶液から分離することを、備える請求項1に記載のエノキタケ抽出物の製造方法。
- [請求項3] 前記酸性溶液はpH1.0～3.0である請求項2に記載のエノキタケ抽出物の製造方法。
- [請求項4] 前記酸性溶液は酢酸溶液である請求項2または3に記載のエノキタケ抽出物の製造方法。
- [請求項5] エノキタケ子実体をアルコールに浸漬した後に前記アルコールから分離し、
分離した前記エノキタケ子実体を80℃以上の水に浸漬することで抽出されたエノキタケ抽出物。
- [請求項6] 請求項5に記載のエノキタケ抽出物を含む食品添加剤。

[図1]



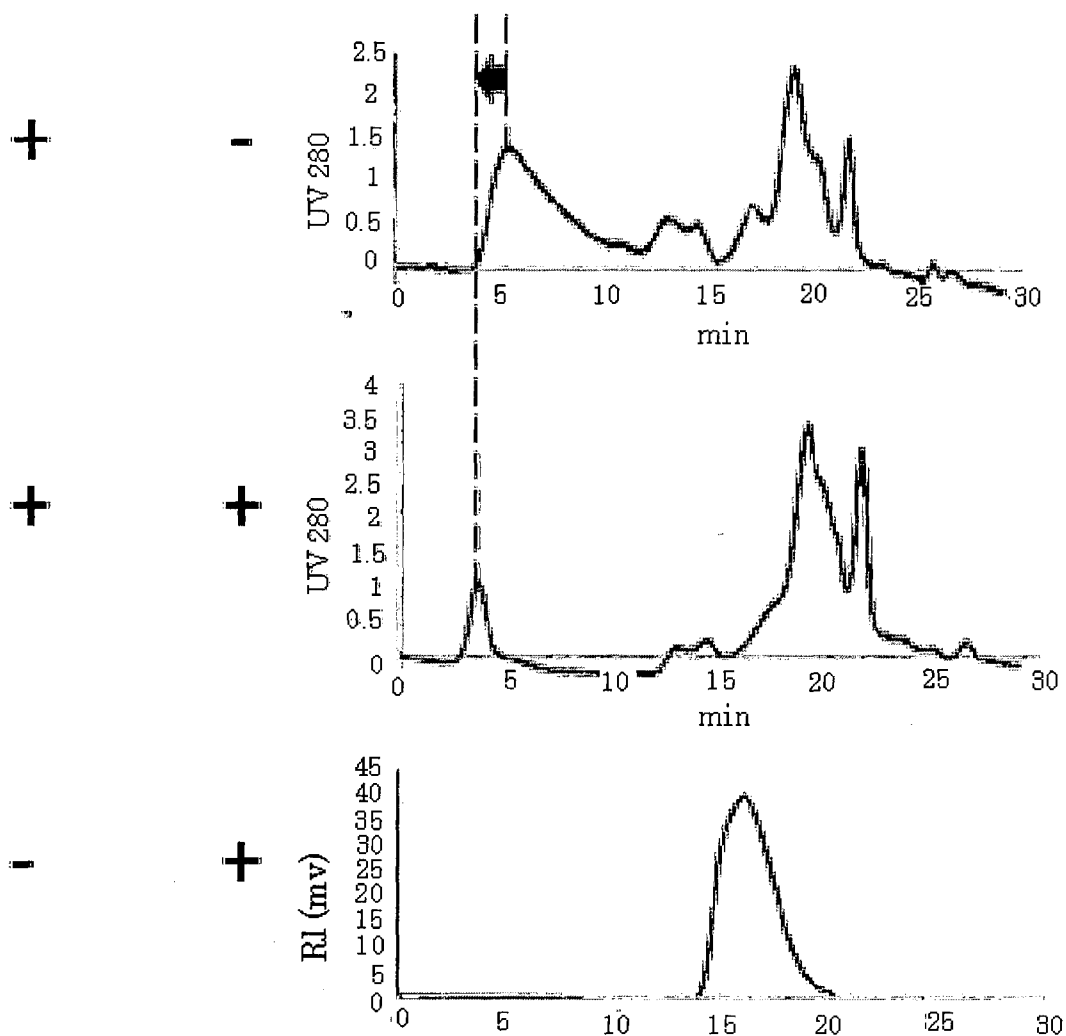
[図2]



[図 3]

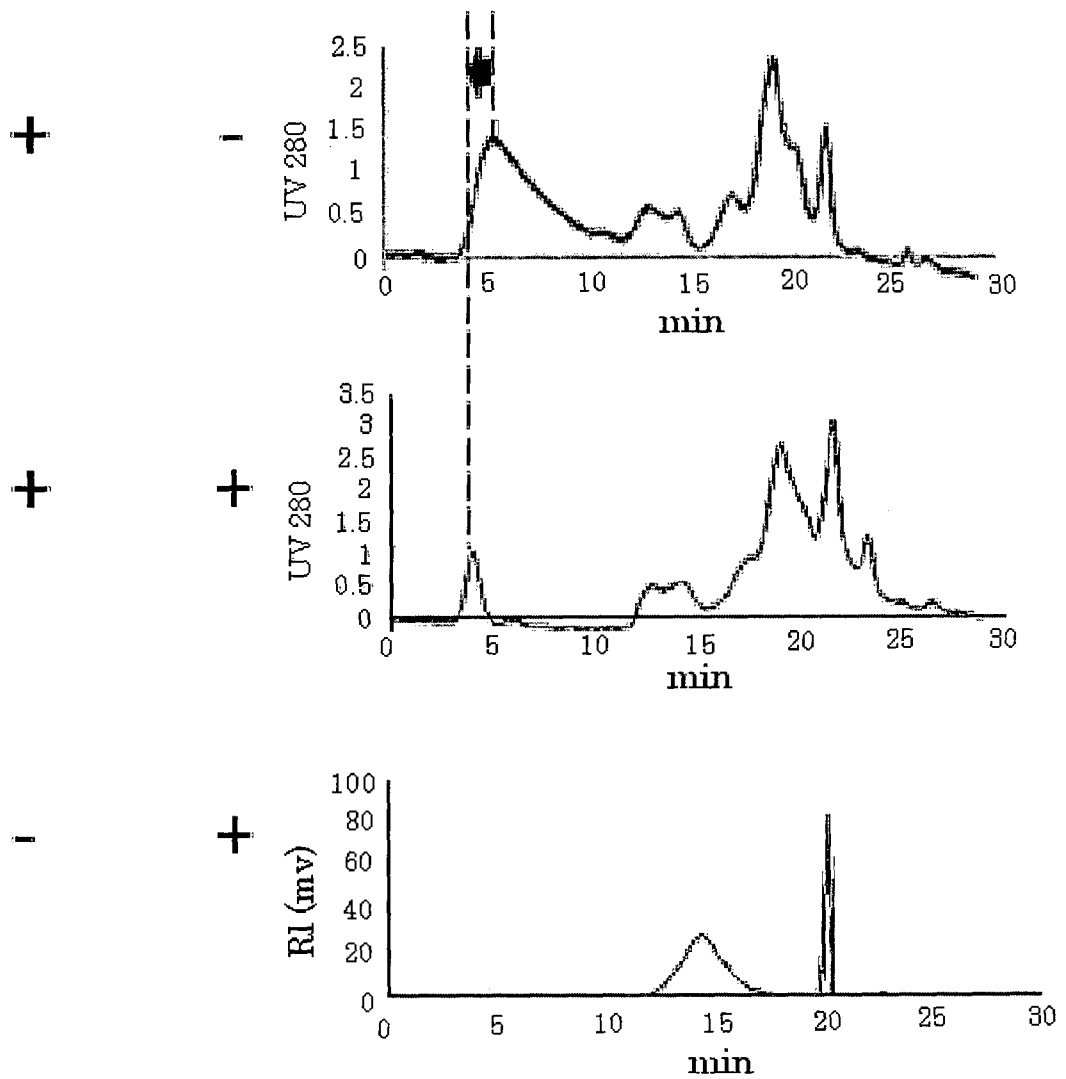
エノキダケ抽出物 HPLC

GPCクロマトグラム

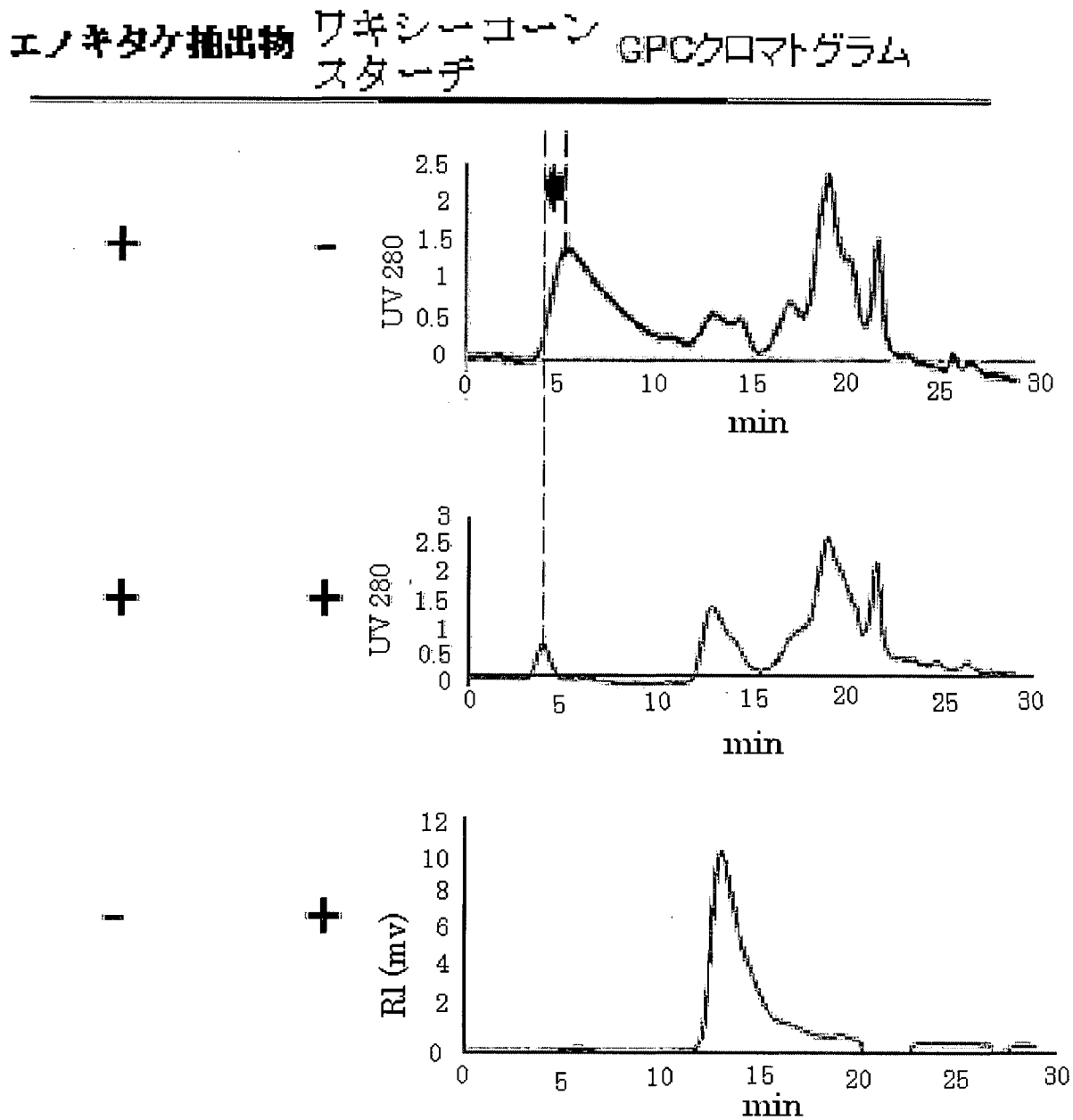


[図 4]

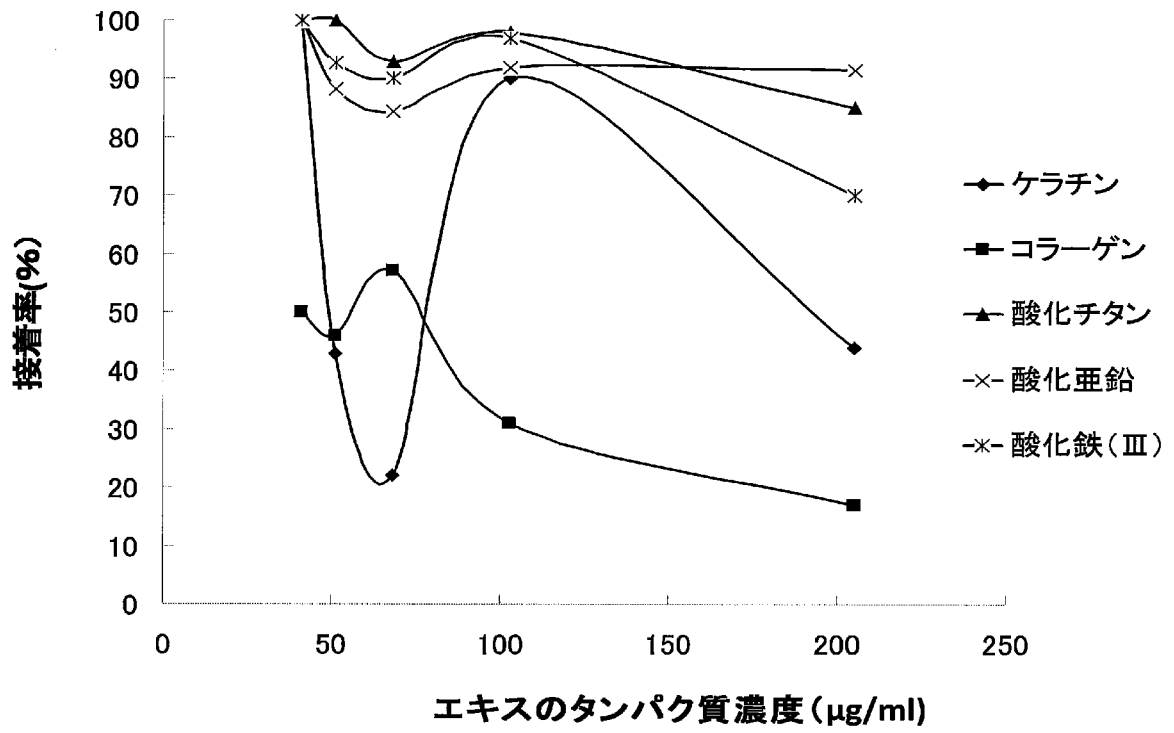
エノキタケ抽出物 ペクチン GPCクロマトグラム



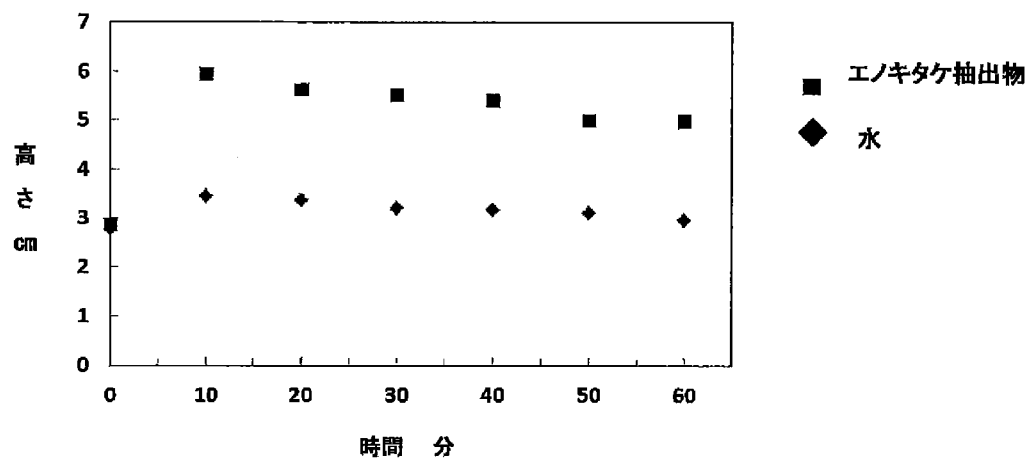
[図 5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/063296

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23L1/28(2006.01) i, A23L1/30(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23L1/28, A23L1/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), Thomson Innovation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-300438 A (Nippon Flour Mills, Co., Ltd.), 28 October 2004 (28.10.2004), claims 1, 7 (Family: none)	1-6
A	JP 9-056362 A (Biox Corp., Tokiwa Phytochemical Co., Ltd.), 04 March 1997 (04.03.1997), claim 1; paragraphs [0023] to [0025] (Family: none)	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 August, 2013 (05.08.13)

Date of mailing of the international search report
13 August, 2013 (13.08.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/063296

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAMADA, M. et al., Cloning and characterization of a gene coding for a hydrophobin, Fv-hyd1, specifically expressed during fruiting body development in the basidiomycete Flammulina velutipes., Appl. Microbiol. Biotechnol., 2005.04, Vol.67, No.2, pp.240-6	1-6
A	ANDO, A. et al., A gene encoding a hydrophobin, fvh1, is specifically expressed after the induction of fruiting in the edible mushroom Flammulina velutipes., Curr. Genet., 2001.05, Vol.39, No.3, pp.190-7	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A23L1/28(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A23L1/28, A23L1/30		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2013年 日本国実用新案登録公報 1996-2013年 日本国登録実用新案公報 1994-2013年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), Thomson Innovation		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2004-300438 A (日本製粉株式会社) 2004. 10. 28, 【請求項1】、【請求項7】 (ファミリーなし)	1-6
A	JP 9-056362 A (株式会社バイオックス/株式会社常磐植物化学研究所) 1997. 03. 04, 【請求項1】、【0023】 - 【0025】 (ファミリーなし)	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 05.08.2013	国際調査報告の発送日 13.08.2013	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 幸田 俊希 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 4671

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	YAMADA, M. et al., Cloning and characterization of a gene coding for a hydrophobin, Fv-hyd1, specifically expressed during fruiting body development in the basidiomycete <i>Flammulina velutipes</i> ., <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , 2005.04, Vol.67, No.2, pp.240-6	1-6
A	ANDO, A. et al., A gene encoding a hydrophobin, fvhl, is specifically expressed after the induction of fruiting in the edible mushroom <i>Flammulina velutipes</i> ., <i>Curr. Genet.</i> , 2001.05, Vol.39, No.3, pp.190-7	1-6