松茸に関する生化学的研究 (第3報)

Biochemical Studies on *Armillaria Matsutake* Mushrooms (Part 3)

良質茸の不良化 (腐敗) に伴う窒素成分の変動

Quantitative Variation of Nitrogenous Component with the Putrefaction of Matsutake Mushrooms

(昭和36年8月22日受理)

井 上 伊 造
(Izoh Inoue)

A young and fresh matsutake mushroom of pH 6.5 soon began to corrupt with the lowering of pH to the minimum of 5.7, then turned to alkaline as the putrefaction proceeded.

Among the water soluble components in the mushroom, total nitrogen, amino-nitrogen, nonprotein-nitrogen increased in quantity at the early stage of putrefaction, but they soon diminished and disappeared gradually. The amount of protein-nitrogen, however, showed a clear contrast with them.

The author considered that the young and fresh matsutake mushroom had especially low pH, and was ready to suffer from the autolysis. The rapidly increasing free amino-acids seemed to accelerate the decarboxylation activities.

緒 言

さきに良質茸と不良質茸の成分上の差異を、離離アミノ酸、乾物量、全窒素量、蛋白態窒素量などから比較したが、質的にも量的にも、両者の間にかなりの相異が認められたので、1, 2報¹⁾²⁾で報告した。

本報では出発を同一にした良質茸を、一定の条件下において不良化 (腐敗) したとき、どのように窒素成分が変化するかを調べるほか、これに伴う乾物質やpHなどの変化についても併せて調べることにより、松茸の自家消化や腐敗の時期についても知ろうとした。

また前に推定した遊離アミノ酸や、アミンが良質茸の不良化 (腐敗) の過程においても確認されるか、その再現性を考慮して系統的な処理や分析を試みた。

実 験 方 法

1. 試料の採集

- 1) 採集日時……昭和34年10月23日 晴天 朝8時
- 2) 採集場所……滋賀県多賀町大字一円 堂の谷山地
- 3) 採集方法……数叢群より 最良質 蕾松茸、大茸 (140g) ~ 小茸 (50g) のものを採集した。(写真1)。

2. 試料の調製方法

- 1) 松茸の土やごみを刷毛で軽く落とし、手早く縦に細

写真1. 試 料 茸

く裂き、各試料が均質になるよう注意しつつ第1~第9試料に配分した。

2) 処理条件

(A)……アルコールに浸漬し酵素作用を停止する。濃度は、試料100g当り99%アルコール200cc)

(B)……19~20°Cの暗室に7日間放置し、自家消化茸を作り、後(A)と同様に処理する。

(C)……25°C, RH80%の恒温室で、不良茸となるような条件を与えて一定期間貯蔵し、人工不良質茸を作り、後(A)と同様に処理する。

(D)……乳鉢ですり、ガーゼに包んで汁液をしぼりだす。

(E)……アルコール添加試料茸のままミキサーにかけ
る。

(F)……遠心分離(約 4,000 rpm, 15分)。

(G)……吸引濾過。

(H)……減圧濃縮。

(I)試料を 30°C の温水 200 cc, 200 cc, 100 cc を用
いて3回, 各20分宛抽出し, 液層の分離は(F)のように
して行ない, 最後の沈澱物は3回洗滌する。

(J)……10%トリクロール酢酸をもはや沈澱物を生じ
なくなるまで加えて, (試料 100 g 当り 60cc 添加) 除蛋
白³⁾する。

(K)……燐タンゲステン酸を加えて, (調製試料100cc
当り濃塩酸 18 cc, および燐タンゲステン酸 15 g の 20%
溶液を加え, 水で 200cc に希釈した後, 48時間放置して
結晶性粒状沈澱を作り, 沈澱は 0°C にした 1% 塩酸を
含む 2.5% 燐タンゲステン酸溶液 100~150cc で洗滌) 塩
基または塩基性アミノ酸を沈澱⁴⁾する。

(L)……45°C 減圧乾燥して秤量。

3. 分析方法

(イ)……全窒素: キルダール法による。

(ロ)……アミノ態窒素: バンスライク法による。

(ハ)……蛋白態窒素: 全窒素より(J)処理後の濾液中
の窒素を差引いて算出する。

(ニ)……乾物量: (L)による。

(ホ)……水分: 全量より乾物量を差引いたものを水分
とする。

(ヘ)……pH: E. Merck, pH 試験紙による。

(ト)……揮発性塩基窒素: 第 4 図の装置により発生す
る塩基性窒素を N/50-硫酸に吸収せしめた後, N/50-カ
セイソーダで滴定する。腐敗を促がすため水分を含んだ
空気を送った。

(チ)……水溶液中の揮発性塩基窒素: 水蒸気蒸溜して
得た溜分について行なう。

4. 処理方法: 処理方法は第 1 表と第 2 図に示す。また
写真 2 は処理した試料茸の一部である。

第 1 表 処 理 方 法

試 料		処 理	
番号	主 な 目 的		
1	良質茸に遊離状ア ミノ酸の存否	4; =; A→E	
2	自家消化茸につい て, 貯蔵中の蛋白 分解酵素の作用	B 7 日	=; A→E
3	人工不良質茸と良 質茸と比較	C 8 日	=; A→E
4	同 上	C 14 日	=; A→E
5	腐敗時の揮発性塩 基窒素の測定	C 63 日	=; ト; A→E
6	同 上	C 95 日	ト; A→E
7	腐敗時の pH 変化	C→D→ヘ	
8	温水による抽出条 件の設定	A→E	

5. 試料の保存法: 調製中 または調製した試料は, 冷蔵
庫(0°C)内で貯えた。

実験結果および考察

1. 窒素成分の抽出条件について: 実験に先だち 試料
8 について 30°C 温水による抽出条件を検討したところ

第 1 図 腐敗中に発生する揮発性塩基窒素の測定装置

写真2 処理 松 茸

(試料2): 自家消化茸

(試料3): 人工不良質茸 8 日目

(試料4): 人工不良質茸 14 日目

第3図に示すような結果を得た。

VIの抽出段階にて7.93%の抽出量を見るが、残渣中の窒素をニンヒドリン反応が陰性になるまで完全に抽出するには、長時間を要し、変質のおそれがあるので、Vの段階にて抽出を止め、すべて(I)の方法によった。

2. 良質松茸茸(生)の主成分

試料1について主成分を測定し、第2表のような分析値を得た。

第2図 処理 方法

(生松茸) 各 100 g

第3図 30℃ 温水による窒素成分の抽出条件

第2表 良質松茸茸(生)の主成分測定値(%)

総窒素量(粗蛋白)	水 分	そ の 他
0.34 (2.14)	90.22	7.64

3. 腐敗時における乾物量の変化

試料1と(C)の方法にて腐敗せしめた試料3,4,5について、それぞれ乾物量を測定したところ第3表のような結果を得た。

4. 自家消化および腐敗時におけるpHの変化

腐敗は自然界に広く存在する微生物の営む生活作用の結果によるものであるが、新鮮なキノコ類では、広い意味から腐敗の前段階と考えられるものに自家消化⁵⁾があ

第3表 松茸の乾物量測定値(%)

試料	1	3	4	5
経過日数	0	8	14	63
乾物量	9.78	8.28	8.12	6.16

る。すなわち採集後も生活機能を有し、時日の経過と共に組織中に存する諸種の酵素作用をうけ、自ら自体の組織成分を分解するもので、腐敗茸と異なり外見上は健全で良質茸と変わらない。これらの自家消化茸を含め、腐敗時のpH変化を試料7について前述の処理と方法で搾汁液について測定し、第4図のような結果を得た。また試料1～6のそれぞれ水溶液のpHを測定し第4表のような結果を得た。

良質茸のpHは弱酸性で、自家消化および初期の腐敗時にはさらに酸性に傾き、腐敗の進行につれて急に弱ア

ルカリ性に変化するもので、このことは水溶液についてもその傾向をみた。なお蓄茸よりも、自家消化の進んでいると思われる健全な中開茸の(A)処理したものについてのpHは5.8であり、蓄茸より酸性側に傾っていることを認めた。

第4図 松茸の腐敗とpHの変化

第5図 経過日数と発生した揮発性塩基窒素(腐敗生産物)の関係

第 4 表 水 溶 液 の pH

試 料	番 外	1	2	3	4	5	6
試 料 の 名 件	中 A 処 理	A 處 理	C 處 理	D 處 理	D 處 理	E 處 理	E 處 理
経 過 日 数	即 日	即 日	7 日	8 日	14 日	63 日	95 日
pH	5.8	6.1	5.7	7.3	7.0	6.8	7.2

(注) (I) により抽出した水溶液 1000 cc について測定する。

5. 腐敗と揮発性塩基窒素の生成

腐敗の程度を判定するため⁹⁾ 揮発性塩基窒素を第1図に示す装置により(C)処理した試料5,6について(トの1)の方法で測定した。良質茸蓄を95日間腐敗した時、発生した総揮発性塩基窒素は157.5mgで、良質茸((C)処理前)の全窒素の45.9%を示した。腐敗の経過日数と発生した揮発性塩基窒素(腐敗生産物)の量の関係は第5図のようであり、略々S字形曲線になるのを認めた。これは有機物が細菌によって分配されるとき曲線⁸⁾にしたがっており、1分子自己触媒反応の速度を示す式より導いた $\log \frac{Y}{A-y} = K(t-t_1)$ で表わすことができ、第6図のようになる。

一般に腐敗を速めるものに、細菌数や温度が考えられるが、前者はある時間後には増殖して一定恒数を取り、また恒数に達するまでの時間も、最初に存在した細菌数に関係なくほぼ一定とされているので⁹⁾ 最初の細菌数の

多少はほとんど影響がないとみなした。また後者については、細菌の増殖、酵素の作用に関係が多く、ある範囲内では高いほど旺盛で、低いほど緩慢となり、魚肉では至適温度付近(25°C付近)¹⁰⁾で最も速やかに腐敗するといわれている。この場合自家消化の至適温度のいかに拘わらず、細菌の利用のみでよいと考えられているので¹²⁾ 松茸の腐敗においても自然温(19°C付近)より高い25°Cで腐敗せしめた。このようにして腐敗した時発生する揮発性塩基窒素(腐敗生産物)の量より腐敗速度を考察しようとした。すなわち松茸が細菌により腐敗し分解するときの揮発性塩基窒素(腐敗生産物)の総量A、腐敗速度恒数K、腐敗が半分完結するまでの時間 t_1 の三定数を吟味すると第5表の関係がある。

松茸の腐敗はbに達して急に分解するが、Kの値が比較的小さいことは後に緩慢な分解が持続し、平衡状態に達するのがおそいと思われる。一般に食品を貯蔵す

第6図 経過日数(t)と発生した揮発性塩基窒素($\log \frac{Y}{A-y}$)の関係

第5表 松茸の腐敗と三定数の関係

試料	5	6
A	150 mg	
t_1	25日	31日
K	0.0209	0.0229

るにはKの値をできるだけ小さく t_1 の値を大にするとよいといわれているが¹¹⁾、松茸ではCに達したものはもはや食用しないので、松茸中毒症の発現もb前後の時期にあると考える。いま分解が半分完結した点を終点とし、 $\log \frac{Y}{A-y}$ とtの関係を試料6についてみると、第7図のようになり、三定数の関係は第6表のようになり、Kの値は非常に大きい。このことは松茸の初期腐敗、変質は極めて旺盛であることを知る。

第6表 腐敗が半分完結した時の三定数の関係

試料	6
A	75mg
t_1	22日
K	0.1252

6. 自家消化および腐敗に伴う各種可溶性窒素の変化

試料1～5について、処理方法の項で述べた系統分離を行ない、

①……可溶性全窒素 ②……可溶性アミノ態窒素 ③……除蛋白液中の窒素 ④……可溶性蛋白態窒素 (①-③) ⑤……除蛋白液中のアミノ態窒素 ⑥……リンタングステン酸沈澱液中の窒素 ⑦……塩基および塩基性ア

ミノ酸(塩基性窒素という)(③-⑥)の量をそれぞれ測定し第7表の結果を得た。

自家消化および腐敗に伴う各種窒素量の変化をみるに、試料2の自家消化茸では、一般に可溶性全窒素は増加するが試料3以下の腐敗茸になると減少する。また可溶性蛋白態窒素はこれと全く逆にあることを知る。試料5は(C)処理後(ト)を測定した残渣について測定したもので、腐敗による液化がはなはだしく、水に可溶性の窒素量を増大しているものと思われる。

第7表 自家消化および腐敗時における各種窒素量の測定値(mg%)

試料	1	2	3	4	5
経過日数 即日	7日目	8日目	14日目	63日目	
①	187.8	212.1	165.3	123.9	139.0
②	73.0	87.8	47.6	22.8	23.8
③	176.9	206.9	151.2	86.7	61.0
④	10.9	5.2	14.1	37.2	78.0
⑤	72.5	176.3	41.5	17.2	21.7
⑥	102.8	113.8	78.3	50.1	12.7
⑦	74.1	93.1	72.9	36.7	48.3

良質茸中の全窒素に対する可溶性窒素の百分率は第8表、可溶性窒素に対するアミノ態窒素、蛋白態窒素、塩基性窒素、非蛋白態窒素の百分率は第9表、非蛋白態窒素に対する非蛋白態アミノ態窒素、塩基性窒素の百分率は第10表のそれぞれのものであり、また非蛋白態アミノ態窒素(1)に対する塩基性窒素の比は第11表のごとくである。表8～11より自家消化茸は、可溶性全窒素が増大し、そのうち特に非蛋白態アミノ態窒素の増大はめだ

第7図 腐敗の初期における経過日数(t)と発生した揮発性塩基性窒素($\log \frac{Y}{A-y}$)の関係

つが、可溶性蛋白態窒素は減少がみられ、腐敗茸では逆に可溶性蛋白態窒素は増大し、他の窒素は減少の傾向にある。ただし塩基性窒素は自家消化茸では増大し、腐敗の初期より減少し末期にいたり増加の傾向を見るが、第11表に見るがごとく、非蛋白態アミノ態窒素に対する比は自家消化茸で減少し、その値も最少であるが、腐敗に伴い増大することを知る。

第8表 試料（良質茸）中の全窒素に対する可溶性窒素の百分率

試 料	1	2	3	4	5
測定窒素					
可 溶 性 全 窒 素	54.8	61.9	48.2	36.1	40.5
ア ミ ノ 態 窒 素	21.3	25.6	13.9	6.6	6.9
蛋 白 態 窒 素	3.2	1.5	4.1	10.8	22.7
塩 基 性 窒 素	21.3	27.2	21.3	10.7	14.1
非 蛋 白 態 窒 素	51.6	60.3	44.1	25.3	17.8
非 ア ミ ノ 態 窒 素	21.1	51.4	12.1	5.0	6.3

第9表 可溶性窒素に対するアミノ態窒素、蛋白態窒素、塩基性窒素、非蛋白態窒素の百分率

試 料	1	2	3	4	5
測定窒素					
ア ミ ノ 態 窒 素	38.9	41.4	28.8	18.3	17.0
蛋 白 態 窒 素	5.8	2.4	8.5	29.6	56.0
塩 基 性 窒 素	38.9	43.9	44.2	29.6	34.8
非 蛋 白 態 窒 素	94.2	97.6	91.5	70.4	44.0
非 ア ミ ノ 態 窒 素	38.5	83.0	25.1	13.6	15.6

第10表 非蛋白態窒素に対する非蛋白態アミノ態窒素、塩基性窒素の百分率

試 料	1	2	3	4	5
測定窒素					
非蛋白態アミノ態窒素	40.9	85.2	27.4	19.8	35.4
塩 基 性 窒 素	41.3	45.1	48.3	42.3	79.2

第11表 非蛋白態アミノ態窒素（1）に対する塩基性窒素の比

試 料	1	2	3	4	5
塩 基 性 窒 素	1.01	0.53	1.76	2.14	2.24

要 約

自生する良質松茸茸の pH は 6.1 の弱酸性であるが、腐敗の初期に 5.7 の最低となり、腐敗が進むと逆に増加

をたどりアルカリ性となる。すでに酸性側にある松茸の自家消化は、他の場合より促進されやすい状態にありこれが進むにつれて遊離アミノ酸は増加する。松茸が自家消化するとき、酸性アミノ酸の増加や Kendall¹²⁾ らのいう Proteinsparing effect がおこって、含有する糖質の分解により有機酸が生成したと考えられ、pH は低下をたどり、環境は酸性側に傾き、それにつれて存在している細菌は増殖しつつ種々の脱炭酸能を獲得したものと思われる。脱炭酸酵素は、細菌の増殖時に培地が pH 5.0~6.0 にあると活性となり、アミンの形成能ははなはだ強くなるといわれており¹³⁾、アミノ酸に相当する各種アミン類の生成や、オキシ酸、アンモニアの生成によりアルカリ性になると考えられる。

一般にアルカリ性の培地では、細菌による分解が旺盛で、腐敗は進行しやすく、アミノ基脱離は pH 7.5~8.5 において最も旺盛であるといわれている¹⁶⁾。このことよりアミノ基脱離とカルボキシル基脱離は時間を異にしておこると考えられるので、松茸の腐敗において、初期の段階で、アミノ基脱離は考えられない。松茸を食品として利用するとき、極度に腐敗したものは食用としないことより、松茸中毒が腐敗の初期段階においておこると思われるので、アミノ基脱離の結果できた産物による松茸中毒は考えられない。また Kendall によると、糖質が存在するときは蛋白質やアミノ酸などの窒素化合物の分解は抑制されるといわれており、極度の腐敗による蛋白質やアミノ酸の分解産物による中毒も公算は少ない。

松茸中毒が腐敗の第1段階といえる初期におこることは、恐らく自家消化により、すでに存在する遊離アミノ酸の脱炭酸でアミンの生成がおこるためであろう。

本実験は内地留学として、滋賀大学学芸学部へ派遣され研究したもので、御指導を賜わり、また御校閣下さった理学博士堀太郎教授に深謝します。

文 献

- 1) 井上 伊造：栄養と食糧，14，251（1961）
- 2) 井上 伊造：同 上，14，255（1961）
- 3) 江上：標準生化学実験，33（1953）（文光堂）
- 4) 東大農芸化学教室：農芸化学分析書（下），522（1950）（朝倉書店）
- 5) 岩出亥之助：キノコ類の培養法 p. 295（1958）（地球出版）
- 6) 安藤 宗八：化学，8，46（1954）
- 7) 遠山祐三ほか：食品衛生ハンドブック 169~170（1961）（朝倉書店）
- 8~11) 木俣 正夫：食品腐敗学 p. 72, 85, 83, 75（1942）（河出書房）
- 12) Kendall: *J. Inf. Dis.* 32, 362（1923）; *Physiol. Rev.* 3, 438（1923）
- 13) 安藤 宗八：化学，8，42（1954）
- 14) 木俣 正夫：食品腐敗学，p. 65（1942）（河出書房）（滋賀県立彦根西高校）