〔農化 第 51 巻, 第 6 号, R39~R46, 1977〕

シイタケ (*Lentinus edodes*) における フレーバー発生の酵素化学的研究

(昭和 52 年度農芸化学奨励賞受賞)

岩 見 公 和

(京都大学農学部食品工学教室)

Enzymatic Development of Flavor in *Lentinus edodes*

By Kimikazu IWAMI

Department of Food Science and Technology, Faculty of
Agriculture, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606

一般に食品のフレーバーとは、ある種の前駆体から何段階かの酵素反応および非酵素反応によって生ずる揮発性の匂い成分を意味し、呈味成分やフレーバー前駆体は「不揮発性フレーバー」に含めて表わされることが多い。食品の加工・貯蔵に際して、フレーバー成分の散逸や化学変化は著しく、内在性酵素の活性も往々にして失われている。しかし、このような場合でも不揮発性のフレーバー前駆体は健在であるので、酵素を加えて好ましいフレーバーを再生する試みは以前から行われていた^(1~4)。フレーバーの生成反応に直接的に関与する酵素は「フレーバー酵素」とも呼ばれ⁽¹⁾、カラシやワサビにおけるミロシナーゼ^(5,6)、ニンニクやタマネギにおけるアリイナーゼ^(7~9)がその代表的な例であろう。食品のフレーバー生成に関する従来の研究成果は成書⁽¹⁰⁾や最近の総説⁽¹¹⁾に詳しく述べられている。

近年、人工栽培技術の普及により、食用キノコの生産量は飛躍的に増大した。シイタケは、その独特のフレーバーと薬理的に有効な多くの成分を含むがゆえに、多くの人々に賞味されているわが国の代表的な食用キノコである。最近注目されているシイタケ中の主な薬効成分は、エリタデニン (抗脂血性成分)^(12,13)、レンチナン (抗腫瘍性多糖)⁽¹⁴⁾、インフルエンザに対するインターフェロン誘導物質 (二本鎖 RNA)⁽¹⁵⁾などである。ところで、新鮮シイタケ子実体そのままでは菌類に共通な「菌

体臭」を呈するにすぎず、また旨味も少ない。しかし、乾燥シイタケをぬるま湯に浸しておくと、シイタケに特有なフレーバーが発生する。この現象は、シイタケフレーバーの発生に「フレーバー酵素系」の関与することを推察させるものであった。このとき生成してくる旨味成分は中島ら⁽¹⁶⁾によりグアニル酸が主であることが明らかにされていたが、匂い成分の本体も Morita & Kobayashi⁽¹⁷⁾によって 1,2,3,5,6-ペンタチエパン (慣用名「レンチオニン」) と同定された。

他方、筆者ら⁽¹⁸⁾はシイタケ子実体に含まれる非タンパク性アミノ酸を検索中、従来システイン酸と考えられていた強酸性アミノ酸画分に未知の含イオウアミノ酸類縁化合物の存在することを見出した。本化合物を新鮮子実体より磨砕した上澄液の非透析性成分で処理すると、レンチオニン香気の発生することが認められた。すなわち、本化合物は「不揮発性のフレーバー前駆体」に該当するものであった。

本稿は、フレーバー前駆体および中間体の単離とフレーバー生成反応に関与する酵素の精製、諸性質の検討を通じて明らかにしえた、シイタケにおけるフレーバー発生機構の概要を述べたものである。

1. フレーバー前駆体の単離と化学構造⁽¹⁹⁾

新鮮シイタケ子実体 (10 kg) を 20 l の冷メタノール

第 1 図 フレーバー前駆体の結晶 (ナトリウム塩)

とともに磨砕し、ろ液を減圧濃縮の後、まず Amberlite IRA-410 (OH⁻型) および IR-120 (H⁺型) カラムを通し、ついで Dowex 2×8 (酢酸型) カラムの 0.5 N ギ酸溶出によってイオウ含有量の高い新しいアミノ化合物を分取した。水-メタノールから再結を繰り返し白色沈殿 1.5 g を得た。本品が夾雑物を含まないことは、アミノ酸自動分析法および薄層クロマトグラフ法によって確かめている。写真 (第 1 図) では単離した化合物のナトリウム塩の針状結晶が示されている。元素分析値 C, 29.40; H, 4.62; N, 5.83; O, 32.53; S, 25.88% と蒸気圧法による推定分子量 (およそ 480) より、本化合物の分子式は $C_{12}H_{22}N_2O_{10}S_4$ (mp. 157~158°C 分解) と定められ、これをシイタケの学名 *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. にちなんで「レンチニン酸 (Lentinic Acid, 以下 LA と略記)」と命名した。

LA を、新鮮シイタケ子実体から調製した粗酵素標品 (40~70% 硫安飽和画分) とともにインキュベートすると、反応開始と同時にレンチニン香気が発生し、しだいに増加することが官能的のみならず交流ポーログラフ法によっても確かめられた (第 2 図)。ポーログラム中、-0.63 V にピークを有する波形が、酵素反応により出現した環状ポリチエパン類の S-S 還元によるものである⁽²⁰⁾。酵素処理前の LA 中に S-S 結合が

第 2 図 レンチニン酸より酵素的に生成する環状ポリチエパンの交流ポーログラム

存在しないことはいうまでもないが、定性分析⁽²¹⁾によっても SH 基の存在は見出されなかった。IR スペクトルで示された 1040 cm⁻¹, 1140 と 1320 cm⁻¹ の強い特性吸収から、LA 分子中にスルフィニル基とスルホニル基の存在が証明された。

LA を酸加水分解 (6 N HCl, 110°C, 10 hr) すると、ほぼ等モル量のグルタミン酸と僅少量のシスチンが生じ、過酸酸化-酸加水分解によってもシステイン酸は定量的に回収されなかった。ラネーニッケル触媒にて脱硫後、LA はグルタミルアラニンに変化した。このペプチドを構成するアミノ酸、グルタミン酸とアラニンは共に L 型であった⁽²²⁾。DNP 法⁽²³⁾により LA の N 末端アミノ酸をグルタミン酸と定め、その結合様式を酸-ニヒドリン法⁽²⁴⁾ならびにピリドキサル-ニヒドリン法⁽²⁵⁾によって α-アミノ基がカルボキシル基と隣接した位置、

第 3 図 レンチニン酸ナトリウム塩の NMR スペクトル (D₂O, 60 MHz)

第4図 レンチニン酸の化学構造

すなわち「 γ -結合」であると判断した。

LA-ナトリウム塩の 60 MHz NMR スペクトル (第3図) から, グルタミン基の β , γ -メチレンプロトン (δ 1.9~2.5) とシスティニル基の β -メチレンプロトンおよびグルタミン基の α -メチンプロトン (δ 3.2~4.0), ならびに末端に位置するスルホニル基に結合したメチル基の3個のプロトン (δ 3.3) が帰属可能であった。システィニル基の α -メチンプロトン (δ 4.5~4.8) ならびにその他のプロトン (個数不明) のシグナルは HDO のそれと重複して現われた。

また, アリイン (S-allyl-L-cysteine sulfoxide) の α , β -脱離反応を特異的に触媒するアリイナーゼも, 後述の LA からグルタミン基を除去した中間体 (desglutamyl-lentinic acid) を基質とすることができる。したがって, LA 中のシスティニル S はスルホキシドの形態で存在すると考えるのが妥当であり, LA は CH_3SO_2 と結合した $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2\text{S}_2$ の側鎖が S 位を介して置換された新しい L- γ -glutamyl-L-cysteine sulfoxide の誘導体であることが明らかとなった (第4図)。

2. レンチニン酸分解に関与する酵素^(26,27)

LA をシイタケ子実体から調製した粗酵素液で処理したとき, 酵素反応の初期においてレンチオン生成に対応するカルボニル化合物が生じ, 両者間に密接な相関性が認められた。カルボニル化合物の生成量を指標として LA からのフレーバー生成に関与する酵素の性質を検討した。反応液にあらかじめ適当量のアミノ酸を共存させると, プロリンを除くすべての L- α -アミノ酸に多かれ少なかれカルボニル化合物の生成を促進する効果が見出された。アミノ酸の添加濃度を増すにつれてカルボニル化合物の生成量も増加し, 加えたアミノ酸に対応する γ -グルタミルペプチドが蓄積した。一方, 反応液にヒドロキシルアミン (NH_2OH) を共存させるとカルボニル化

第5図 ヒドロキシルアミン存在(破線), 非存在下(実線)におけるレンチニン酸の酵素的分解

合物の生成すなわちフレーバーの発生は抑えられたが, 第5図に示したように, それにもかかわらず LA 自体の分解は起り, 新しいペプチド (A, γ -glutamyl-lentinic acid) やアミノ酸 (B, desglutamyl-lentinic acid) の出現が認められた。このことは, LA からのフレーバーの生成反応に γ -グルタミン基の転移を触媒する酵素とピリドキサル-5'-リン酸 (PALP) を補酵素とする酵素の関与することを示している。そこで, γ -グルタミルトランスフェラーゼ (γ -GT) に特異的な阻害剤として知られるセリン-ホウ酸混合物⁽²⁸⁾のフレーバー生成に及ぼす影響を調べてみると, 「阻害剤」の添加濃度を増すにつれてフレーバー生成も抑えられ, この濃度-活性曲線は合成基質 γ -グルタミル-L-ニトロアニリドを用いてニトロアニリン遊離量から得られた傾向とよく類似した。このように, LA からフレーバーが生成するためには, γ -GT の作用による γ -グルタミン基の脱離が最初に必要ことが明らかとなった。

3. γ -グルタミルトランスフェラーゼ

(a) 分布と存在形態^(29,30)

γ -GT の活性は食用キノコ中, シイタケに特に高く, その比活性はソラ豆, アスパラガス酵素のそれの数百倍以上に及び, 動物腎の酵素のそれにほぼ匹敵した。シイタケ子実体における本酵素の活性は菌傘上部表層に局在し, 菌褶および菌柄に分布する活性は微弱であった。また, 本酵素は膜と強固に結合しており, 動物腎, 初乳, 小腸のいずれにおいても有効であったパパイン処理による可溶性も成功しなかった。しかしシイタケ菌糸体中の γ -GT はシメジ子実体に含まれる酵素と同じく「可溶性

(cytosol)」であった⁽⁸¹⁾。キノコの γ -GT が菌の種類あるいは生活史の違いによって存在形態の異なることは興味深い。

(b) アニオンによる活性化^(32,33)

ミクロソーム膜結合酵素として部分精製したシイタケ子実体の γ -GT は、動物起源の酵素と同様に γ -グルタミル化合物の水解、転移の両反応を触媒しうる一種の多機能酵素と考えられるが、基質親和性および反応性において顕著な差異が見出された。LA はシイタケ γ -GT の最もよい基質 (グルタミル供与体) であったが、動物腎、小腸の γ -GT の作用をほとんどうけなかった。また、シイタケ γ -GT の活性発現にはある種のアニオンの存在が必要であった。アニオンは $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$, $\text{Br}^- > \text{N}_3^-$, $\text{ClO}_3^- > \text{I}^-$, F^- の順にシイタケ γ -GT を活性化する効果を示した (第 1 表)。しかし、ウシ初乳のスキムミルク膜結合 γ -GT⁽³⁴⁾ にはそのようなアニオン依存性は認められなかった。シイタケ γ -GT を活性化する効果をもつ主なアニオンの反応の速度パラメーターに及ぼす影響を比較検討したところ、各種濃度の SCN^- が $V_{\max}$ をほぼ一定に保ったまま K_m を変化させたのに対し、その他のアニオンは K_m ではなく $V_{\max}$ により大きな影響を与えた。アニオンの種類による作用様式の違いは、酵素の熱失活およびヨードアセトアミドによる失活に対する効果においても見出された。 SCN^- を除く他のアニオン、とくにハライドイオンは、 γ -GT の熱安定性に寄与

第 1 表 γ -グルタミルトランスフェラーゼの
アニオン依存性

Sodium salt (100 mM)	Activity (<i>p</i> -nitroaniline, nmoles/min)	
	<i>Lentinus edodes</i>	Bovine colostrum
NaCl	10.2	10.2
NaF	3.0	9.8
NaBr	9.4	9.6
NaI	3.3	7.7
NaN ₃	5.8	8.4
NaSCN	17.3	8.2
NaClO ₃	5.6	9.4
NaBrO ₃	1.6	9.9
NaNO ₂	0.8	8.2
NaNO ₃	14.0	8.5
NaHCO ₃	1.2	11.7
None	0.2	10.2

Reaction mixture contained per ml; 2 μ moles of substrate, 100 μ moles of sodium salt and 0.01 units of enzyme in 0.1 M Tris-acetate-sodium citrate buffer of pH 8.3. Reaction was carried out at 37°C for 10 min.

するのみならずイオン濃度に応じて活性を制御し、ひいてはフレーバーの生成にも影響を及ぼしていると思われる。

(c) オニオンフレーバー再生への応用⁽³⁰⁾

タマネギ鱗茎中にはアリイナーゼの作用をうけないフレーバー前駆体 (γ -glutamyl-S-propenyl-L-cysteine sulfoxide) が比較的多く含まれている。しかし、休眠中のタマネギに γ -GT の活性は見出されない。乾燥タマネギの水戻しに際しシイタケ γ -GT を加えると、潜在的フレーバー前駆体がアリイナーゼの作用をうける形態に変化し、強いオニオンフレーバーの発生することが認められた。シイタケ γ -GT は、動物 γ -GT のようなまぐさ臭をもたず、かつ基質との親和性も高く安定であるので、フレーバー酵素としての利用に適している。

4. レンチニン酸のデス-グルタミル中間体

(a) 結晶化と構造解析^(35,36)

適当なグルタミル受容体と Cl^- を含む pH 8.6 の緩衝液中で LA に精製 γ -GT を作用させると、デス-グルタミル中間体 (DGLA) が蓄積する。反応液を濃縮後、冷所に放置すると DGLA の柱状結晶が析出した (第 6 図)。収量は 1g の LA よりおよそ 450 mg であった。元素分析値は $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_7\text{N}_1\text{S}_4$ に対する理論値とよく合致した。IR 分析の結果も、アミノ基、カルボニル基とともにスルフィニル基 (1050 cm^{-1}) およびスルホニル基 ($1140, 1280\text{ cm}^{-1}$) の存在を示した。2N DCl における DGLA の 90 MHz NMR 分析により、システィニル部分の α -メチン (δ 4.8~5.0) および β -メチレンプロトン (δ 3.9~4.1) と置換基末端のメチル基プロトン (δ 3.3) のほか、S 置換基に由来する 4 個のプロトンの

第 6 図 デスグルタミル-レンチニン酸の結晶と
元素分析値

シグナルが新たに検出された。 δ 5.10 (J=6 Hz) の 2H シグナルと δ 5.0 付近に分裂線を示す 1H シグナルはスルフィニル基に連結した $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})-$ に、また δ 5.27 の幅広い 1H シグナルはイオウ原子間に挟まれた $-\text{CH}(\text{OH})-$ によるものと考え、DGLA の構造を次のように推定した。

MS スペクトル (20 eV, DI temp. 130°C) から, m/e 354 に M+1 のピークが, m/e 279 には脱アミノ脱炭酸したフラグメントのピークが, また m/e 167 と 149 には前のフラグメントから末端 CH_3SO_2 の開裂したものおよびその脱水フラグメントのピークが見出されたが, 上記の推定構造を確定するには至らなかった。昨年, Höfle *et al.* (37) は *Micromophale perforans*, *Collybia hariolorum* からフレーバー前駆体 “Collybin” (照合の結果 LA と同一物質と判明) を単離し, ^{13}C -NMR ($\delta_{\text{D}_2\text{O}}$) と oxazolidinone 誘導体の 270 MHz-NMR ($\delta_{\text{DMSO}-d_6}$) 分析により括弧内は $-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{S}}}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{S}}}-\text{CH}_2-$ であろうと報告している。以前, Morita & Kobayashi (38) は乾燥シイタケを水戻し後有機溶媒抽出液中に初めて見出されるレンチオニンの前駆体の構造を

第 7 図 デスグルタミン-レンチニン酸とピリドキサル-5'-リン酸の結合による吸収スペクトル変化 (初濃度 2×10^{-4} M, pH 6.9, 30°C, スペクトルは 30 秒ごとに記録)

と定めたが, 今では本化合物も DGLA から生成したとみなすことができるので, DGLA の構造を決定する上でこのことも考慮しなければならない。

(b) ピリドキサル-5'-リン酸との結合能 (36)

DGLA を基質として酵素的分解反応 (フレーバー生成) を検討中, あらかじめ PALP とインキュベートした DGLA が酵素作用をうけなくなる現象が見出された。この原因を追究したところ, DGLA は PALP とすみやかに結合して 330 nm に極大吸収を有するアルダミン型の複合体を形成しており (第 7 図), よって C-S リアーゼの活性中心に位置する補酵素 PALP との親和性を喪失したと思われる。DGLA と PALP との結合定数は 1.2×10^5 と求められた。S-アルキル-L-システインと PALP との間に形成させた「シップ塩基」は 420 nm 付近に極大吸収を示すにすぎないが, 同スルホキシドとの間に形成させた複合体が 330 nm に極大吸収を示し, DGLA 酸化物 ($\text{C}_7\text{H}_{15}\text{N}_1\text{O}_{10}\text{S}_4$, mp. 185°C) が DGLA と同等の複合体形成能を有することは, DGLA-PALP 複合体の構造安定化にシステイン残基の S の酸化状態が重要であることを示唆している。

(c) DGLA-PALP 複合体の B_6 有効性 (39)

DGLA は *in vitro* でトリプトファン-ゼヤトランスアミナーゼの補酵素 PALP を捕獲してそれら B_6 酵素をアポ酵素に転換させる作用を示した。しかし, B_6 欠乏ラットに経口投与した DGLA-PALP 複合体 (DGLA は PALP の 8 倍量) は同濃度の遊離 PALP と同等の効率で利用され, 過剰に共存させた DGLA にも生体内 B_6 酵素レベルに対する影響は観察されなかった。DGLA による PALP の修飾は, その複合体が動物, 微生物にとって有効に利用されるのみならず, 光酸化に対する安定性をも賦与した。

5. C-S リアーゼの精製と基質特性 (35, 40, 41)

S-置換システインスルホキシドに作用してビルビン酸, アンモニア, チオスルフィネートを生成する反応を触媒する“アリナーゼ様の”酵素を, シイタ

第 2 表 C-S リアーゼ (I) の基質特異性

Compounds (2 mM)	Pyruvate formed (nmoles/min)	Ratio (%)
Desglutamyl-lentic acid	144.0	100.0
L-Cysteine	0.43	0.3
L-Cystine (<1 mM)	0.31	0.2
(±)S-Methyl-L-cysteine	0.09	0.1
(±)S-Allyl-L-cysteine	0.05	0.0
(±)S-Methyl-L-cysteine sulfoxide	1.19	0.8
(±)S-Ethyl-L-cysteine sulfoxide	0.79	0.5
(±)S-Methyl-L-cysteine sulfone	1.33	0.9
L-Cysteine sulfinic acid	0.00	0.0
DL-Cystathionine	0.00	0.0
DL-Methionine sulfoxide	0.04	0.0
DL-Methionine sulfone	0.00	0.0
L-Serine	0.00	0.0

ケ子実体より硫酸分画, イオン交換クロマトグラフ法, ゲルろ過法によって精製した。酵素は, システインスルホキシドのほかシステインやシスチンおよびそれらの類縁体にも作用し, 基質特異性の限定されたアリナーゼとはやや性質を異にした。そこで, さらに調製用ディスク電気泳動法によって精製を進め, 主成分C-S リアーゼ (I) とこれより負荷電の少ない微量成分C-S リアーゼ (II) に分離した。両酵素の基質特異性パターンには若干の差違がみられた。しかし, 両酵素の分子量は約 8 万で, PALP 1 個を含む分子量約 4 万のサブユニット 2 個から成っていた。両酵素とも, 特に DGLA に対する親和性が高く (K_m , 60~70 μM), DGLA から生成するピルビン酸の反応初速度を 100 としたとき, その他の基質から生成されるピルビン酸量は 1% にも満たなかった (第 2 表)。DGLA はニンニク, タマネギのアリナーゼによっても作用をうけ, ネギ臭ではなくレンチオンを生成しうが, シイタケ C-S リアーゼの DGLA に対する特に高い反応性は, 本酵素がアリナーゼと呼ばれるには不都合であるばかりかアルキルシスチナーゼやシスチンリナーゼとも異なることを示している。

6. ホルムアルデヒドの生成^(42,43)

干しシイタケを水に浸しておくと著量 (>200 ppm) のホルムアルデヒド (HCHO) が検出されることが食品衛生上の問題となった^(44,45)。筆者ら⁽⁴⁶⁾は以前シイタケ組織中に HCHO は本来ほとんど含まれないにもかかわらず, 定量値には水蒸気蒸留中の酸加水分解によって 2 次

第 8 図 デスグルタミル-レンチニン酸よりホルムアルデヒドの酵素的生成

的に生成した量が含まれることを指摘した。また, LA の酵素反応分解産物中にピルビン酸やアセトアルデヒド様のカルボニル化合物とともに HCHO の存在することを認めていた⁽²⁶⁾。シイタケフレーバー生成に与する酵素の代表的阻害剤セリン-ホウ酸混合物または NH_2OH を加えて磨碎 (新鮮物) または水戻し (乾燥物) すると, HCHO の生成は顕著に抑えられた。すなわち, シイタケの HCHO はフレーバー生成系の酵素作用によって同じ前駆体から生じたものと推察された。そこで, さらに直接的証拠を得るため, DGLA に C-S リアーゼを作用させて生ずる HCHO をアセチルアセトン法によって定量し, ピルビン酸生成量, 基質分解量に対してプロットした (第 8 図)。HCHO, ピルビン酸の生成と DGLA 分解との間にはほぼ完全な相関性の成り立つことがわかった。HCHO 生成を指標として求めた C-S リアーゼの反応特性 (pH 依存性, 速度パラメーター) はピルビン酸生成から求めたものとまったく一致した。したがって, HCHO は DGLA から生じたピルビン酸がさらに分解をうけたものではなく, DGLA の S-置換基部分から直接由来したものと考えられた。なお, シイタケに含まれる HCHO の前駆体は, その後 Fujimoto *et al.*⁽⁴⁷⁾ により単離され, LA と同一であることが確認された。

7. フレーバーの生成機構 (まとめ) とキノコにおける存在意義

均一に精製したシイタケ C-S リアーゼを LA に作用させてもフレーバーを生じないが, γ -GT を共役させる

最近, Gmelin *et al.*⁽⁴⁸⁾ は西ドイツで採取されたキノコ類 *Marasmius alliaceus*, *M. scorodonius*, *M. praiosmus* よりフレーバー前駆体 L- γ -glutamyl-3-(methylthiomethylsulfinyl)-L-alanine を単離し, 本化合物から γ -GT と C-S リアーゼの作用によってニンニク様のフレーバーが生成することを報告した。前駆体の

終りにのぞみ、終始ご指導、ご鞭撻賜りました京都大学農学部教授・満田久輝先生、同助教授・安本教傳先生、ならびに食品工学教室の諸先生方に厚くお礼申し上げます。

- (1) E. J. Hewitt, D. A. M. Mackay, K. S. Konigsbacher and T. Hasselstrom : *Food Technol.*, **10**, 487 (1956).
- (2) K. S. Konigsbacher, E. J. Hewitt and R. L. Evans : *Food Technol.*, **13**, 128 (1959).
- (3) E. J. Hewitt : *J. Agr. Food Chem.*, **11**, 14 (1963).
- (4) S. Schwimmer : *J. Food Sci.*, **28**, 460 (1963).
- (5) G. Reed : "Enzymes in Food Processing," Academic Press, New York, 1966, p.379.
- (6) K. S. Konigsbacher and E. J. Hewitt : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **116**, 705 (1964).
- (7) A. Stoll and E. Seebeck : *Adv. Enzymol.*, **11**, 377 (1951).
- (8) F. Kupiecki and A. I. Virtanen : *Acta Chem. Scand.*, **14**, 1913 (1960).
- (9) S. Schwimmer and M. Mazelis : *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 66 (1963).
- (10) H. W. Schultz, E. A. Day and L. M. Libbey : "The Chemistry and Physiology of Flavors," AVI Publishing, Westport, Connecticut.
- (11) 藤巻正生, 荒井 緑一 : 化学総説 (日本化学会編) **14**, 199 (1976).
- (12) I. Chibata, K. Okuma, S. Takeyama and K. Kotera : *Experientia*, **25**, 1237 (1969).
- (13) K. Kamiya, Y. Sato, M. Hashimoto and H. Seki : *Tetrahedron Letters*, **1969**, 4729.
- (14) G. Chihara, M. Maeda, J. Hamuro, T. Sakai and F. Fukuoka : *Nature*, **222**, 687 (1969).
- (15) A. Tsunoda and N. Ishida : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **173**, 719 (1970).
- (16) 中島寛郎, 市川恒平, 鎌田政喜, 藤田栄一郎 :

- 農化, **35**, 797, 803 (1961).
- (17) K. Morita and S. Kobayashi: *Tetrahedron Letters*, **1966**, 573.
- (18) K. Yasumoto, K. Iwami and H. Mitsuda: The IIIrd International Congress of Food Science and Technology, Washington D. C., August 1970, Abstract of Papers p.78.
- (19) K. Yasumoto, K. Iwami and H. Mitsuda: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1059 (1971).
- (20) Y. Asahi, K. Terada and M. Ishio: *Rev. Polarography*, **14**, 382 (1967).
- (21) G. Toennis and J. J. Kolb: *Anal. Chem.*, **23**, 823 (1951).
- (22) E. Bernt and H. U. Bergmeyer: "Methoden der enzymatischen Analyse," ed. by H. U. Bergmeyer, Verlag Chemie, Weinheim, 1962, p.384, 387.
- (23) F. Sanger and E. O. P. Thompson: *Biochem. J.*, **53**, 353 (1953).
- (24) G. D. Kalyankar and E. E. Snell: *Nature*, **180**, 1070 (1957).
- (25) D. L. Buchanan, E. E. Haley and R. T. Markiw: *Biochemistry*, **1**, 614 (1962).
- (26) K. Yasumoto, K. Iwami and H. Mitsuda: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 2070 (1971).
- (27) K. Iwami, K. Yasumoto, K. Nakamura and H. Mitsuda: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1941 (1975).
- (28) A. Szewczuk and G. E. Connell: *Biochim. Biophys. Acta*, **105**, 352 (1965).
- (29) K. Iwami, K. Yasumoto, K. Nakamura and H. Mitsuda: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1933 (1975).
- (30) 岩見公和, 安本教傳, 満田久輝: 栄養と食糧, **27**, 341 (1974).
- (31) 岩見公和, 安本教傳, 満田久輝: 日農化大会講演要旨, p.232 (1976).
- (32) K. Yasumoto, K. Iwami, T. Yonezawa and H. Mitsuda: *Phytochem.*, **16**, in press (1977).
- (33) 岩見公和, 安本教傳, 米澤俊彦, 満田久輝: 日農化大会講演要旨, p.52 (1977).
- (34) K. Yasumoto, K. Iwami, T. Fushiki and H. Mitsuda: *FEBS Letters*, **67**, 328 (1976).
- (35) K. Yasumoto, K. Iwami and H. Mitsuda: Proceedings of the IXth International Scientific Congress on the Cultivation of Edible Fungi, Tokyo/Kiryu, November 1974, p.371.
- (36) 安本教傳, 岩見公和, 水澤 一, 満田久輝: 農化, **50**, 563 (1976).
- (37) G. Höfle, R. Gmelin, H. H. Luxa, M. N'Galamulume-Treves and S. Hatanaka: *Tetrahedron Letters*, **1976**, 3129.
- (38) K. Morita and S. Kobayashi: *Chem. Pharm. Bull.*, **15**, 988 (1967).
- (39) 安本教傳, 岩見公和, 水澤 一, 満田久輝: 農化, **50**, 613 (1976).
- (40) K. Iwami, K. Yasumoto and H. Mitsuda: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1947 (1975).
- (41) 岩見公和, 水澤 一, 安本教傳, 満田久輝: 日農化大会講演要旨, p.90 (1977).
- (42) 岩見公和, 安本教傳, 満田久輝: 栄養と食糧, **27**, 387 (1974).
- (43) 岩見公和, 安本教傳, 満田久輝: 栄養と食糧, **27**, 393 (1974).
- (44) 矢田光子, 今井田雅示, 小林太郎: 食衛誌, **11**, 171 (1970).
- (45) 岡田敏史, 伊賀宗一郎, 伊阪 博: 衛化, **18**, 353 (1972).
- (46) 安本教傳, 岩見公和, 馬場良雄, 満田久輝: 栄養と食糧, **24**, 463 (1971).
- (47) K. Fujimoto, T. Tsurumi, M. Watari, K. Akama and T. Kaneda: Proceedings of the IXth International Scientific Congress on the Cultivation of Edible Fungi, Tokyo/Kiryu, November 1974, p.385.
- (48) R. Gmelin, H. H. Luxa, K. Roth and G. Höfle: *Phytochem.*, **15**, 1717 (1976).

(昭和 52 年 5 月 2 日受理)