

マッシュルーム (*Agaricus bisporus*) 中の phenylhydrazine 及び aniline 誘導体の定量と 調理条件下における挙動について

岡 芳 子

(四国大学家政学部)

平成 4 年 12 月 9 日受理

Determination of Unusual Aromatic Compounds in the Mushroom, *Agaricus bisporus* and Their Behaviour under the Cooking Condition

Yoshiko Oka

Faculty of Home Economics, Shikoku University, Tokushima 771-11

The particular compounds, γ -L-glutamyl-4-hydroxymethylphenylhydrazine (Agaritine) and γ -L-glutamyl-4-hydroxyaniline (GHA) in the mushroom (*Agaricus bisporus*) were colorimetrically determined.

The contents of Agaritine and GHA are estimated to be 1.64 μ mol (0.438 mg)/g.f.w. and 3.16 μ mol (0.752 mg)/g.f.w., respectively.

The behaviour of both the compounds in the fruiting bodies were investigated under the cooking conditions (boiling).

About 60-70% of Agaritine and GHA were extracted with water or 1% NaCl solution at 90°C for 10 min, but about 20% of these compounds still remained unchanged in the fruiting bodies after 30 min-boiling. GHA was more extractable than Agaritine with 1.0% NaCl solution but GHA in the saline was rather labile to be decomposed by oxidation.

Agaritine and GHA could be detected in the soup of the 3 years-stored canned mushroom, but not in the fruiting bodies. It was assumed that the degradation might be inhibited with the reducing agents used for the prevention from enzymatic coloring.

(Received December 9, 1992)

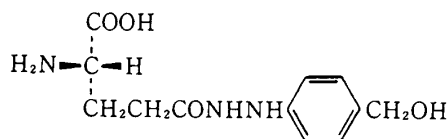
Keywords: mushroom マッシュルーム, *N*- γ -L-glutamyl-4-hydroxymethylphenylhydrazine (Agaritine) *N*- γ -L-グルタミル-4-ヒドロキシメチルフェニールヒドラジン, *N*- γ -L-glutamyl-4-hydroxyaniline (GHA) *N*- γ -L-グルタミル-4-ヒドロキシアニリン.

1. 緒 言

広く食用に供されている栽培キノコ、マッシュルーム(つくりたけ, *Agaricus bisporus*)の子実体には、タンパク質構成アミノ酸以外に、キノコ類に特徴的な非タンパク構成アミノ酸類をはじめとして、数多くのニンヒドリン陽性化合物が存在する^{1)~3)}。特にマッシュルームの属する *Agaricus* 属のキノコ類には、特徴的な芳香族化合物である 4-hydroxymethylphenylhydrazine 及び 4-hydroxyaniline が、 γ -L-glutamyl 誘導体 (Fig. 1) として蓄積することが知られている。Agaritine の名で知られ

る γ -L-glutamyl-4-hydroxymethylphenylhydrazine [I] は、天然のヒドラジン誘導体として、興味ある化合物の一つである。Toth ら⁴⁾⁵⁾によると Agaritine より遊離する 4-hydroxymethylphenylhydrazine の *N*'-acetyl 誘導体のマウスによる経口投与実験において腫瘍の発生を認めたとの報告もある。橋田ら⁶⁾はマウスを用いて Agaritine の発癌性を検討しているが、マッシュルームのエタノール抽出濃縮物を直接用いたとしていることから、分解しやすい Agaritine そのものの影響については明らかでない。日常摂取する量での Agaritine そのものの経

[I]



[II]

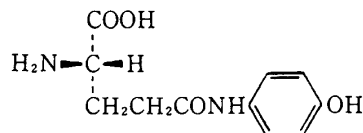


Fig. 1. Structure of *N*- γ -L-glutamyl-4-hydroxymethylphenylhydrazine (Agaritine) (I) and *N*- γ -L-glutamyl-4-hydroxyaniline (GHA) (II)

口摂取による生体への影響は確認されていない。著者らは食品化学的見地から、天然の aniline 誘導体である γ -L-glutamyl-4-hydroxyaniline [II] (GHA) が、マッシュルームにおける酵素的褐変の主要な基質となっていることを立証すると共に³⁾、キノコ類が与える独特の風味との関連を明らかにする目的で、マッシュルーム中の特殊な結合型アミノ酸類の子実体形成期における蓄積の過程につき詳細な研究を行ってきた^{7)~9)}。しかしながら、これら子実体中に存在する遊離アミノ酸類が調理・加工時にどのような挙動をとるかにについてはほとんど明らかにされていない。本研究においては、調理科学的見地から、マッシュルーム中の特殊な芳香族化合物に注目し、加熱調理条件下での挙動を明らかにすることを目的として実験を行った。特に本研究においては上記化合物の定量法そのものを検討し、従来、定量法としてアミノ酸分析計³⁾に頼っていた定量に代わる Agaritine 及び GHA に選択的であり、かつ簡便な比色定量法を確立した。この測定法を用いて、マッシュルーム子実体中の Agaritine 及び GHA の加熱調理時における溶出挙動を検討した。

2. 実験方法

(1) 実験材料

本実験にはマッシュルーム (*Agaricus bisporus*) のホワイト種を用いた。試料とした子実体は、Hammond ら¹⁰⁾の定義による stage 2 に相当するもので、食用として市販され、また缶詰加工用として使用されている傘の直径約 2~3 cm の子実体 (新鮮重量 3~5 g) であり、栽培農家の菌床より直接採取したものを使用した。

(2) 実験方法

1) 試薬

Agaritine: マッシュルームより Kelly ら¹¹⁾の方法により抽出、単離した結晶標品³⁾を標準試料とした。

4-aminophenol: Sigma 社より購入したものを、水/エタノールより再結晶を繰り返し、純化して使用した。

2) 試料の調製

マッシュルームは、子実体の個体差を考慮して、スライス (菌糸に平行に 2 mm 幅の薄切り) として縮分し、試料の均質化をはかった。

3) 窒素の測定

全窒素の測定は Kjeldahl 法¹²⁾に従った。

4) 遊離アミノ酸の分析

遊離アミノ酸類の分析は、前報³⁾に従い、エタノール抽出液より調製したアミノ酸画分を、アミノ酸自動分析計により、生体成分分析法に準じて分析・定量した。

5) Agaritine の比色定量

Agaritine の定量は Agaritine より酸加水分解によって生じた 4-hydroxymethylphenylhydrazine を、以下に示す方法で酸化によりジアゾニウム塩に導いたのち、ジアゾカップリング法¹³⁾によりアゾ色素として測定した。即ち、試料 1.0 ml に 2N HCl 1.0 ml を加え、100°C 封管中にて 25 分間加水分解を行った後、100 mM SeO₂ 1.0 ml を加えて 3 分間放置後、0.3% *N*-1-naphthylethylenediamine/ethanol 1 ml を加え、室温に 20 分間保ち、生成した色素の 545 nm における吸光度により測定した。本法における 4-hydroxymethylphenylhydrazine より生成するアゾ色素の 545 nm におけるモル吸光係数は、 $\epsilon = 2.31 \times 10^4$ である。

6) GHA の比色定量

GHA の定量は GHA の酸加水分解によって生成する 4-hydroxyaniline をインドフェノール色素に誘導し測定した¹⁴⁾。即ち、試料 1.0 ml に 2N HCl 1.0 ml を加え、100°C 1 時間の加水分解後、5% phenol を含む 2.5 N NaOH 0.8 ml と 2.5 N Na₂CO₃ 0.4 ml を加えて室温に 30 分間保った後、生成した indophenol 色素を 600 nm における吸光度により測定した。本法における indophenol の 600 nm におけるモル吸光係数は、 $\epsilon = 2.15 \times 10^4$ である。

7) 加熱調理条件の設定と溶出率の測定法

加熱調理の温度条件を 90°C に設定し、媒体として水及び 1% 食塩水を用いた。各媒体はあらかじめ 90°C に予熱して使用した。加熱条件下でのマッシュルームからの Agaritine 及び GHA の溶出率は、上述のスライス

マッシュルーム中の phenylhydrazine 及び aniline 誘導体の定量と調理条件下における挙動

状マッシュルーム約 10 g を、10 倍容の 90℃ の媒体を入れたビーカー中にて、ウォーターバス上にて湯浴し、所定時間ごとに溶液の一部 (0.8–1.0 ml) を取り出し、溶出された化合物を上述の測定法で定量した。また、子実体に残存する Agritine 及び GHA は、試料を 75 % エタノールにてま碎抽出し、抽出液を上述の方法による測定に供した。

8) 缶詰加工されたマッシュルーム中の Agritine 及び GHA

調理加工品の一つとして、マッシュルーム水煮 (スライス) 缶詰の 1 年及び 3 年保存品を用い、缶詰状態にあるマッシュルーム中の Agritine 及び GHA の煮汁への溶出量と子実体における残存量を測定した。

3. 実験結果及び考察

(1) Agritine 及び GHA の比色定量

Agritine の酸加水分解によって生じた 4-hydroxy-methylphenylhydrazine をジアゾ法¹³⁾を用いて測定した時の検量線を Fig. 2 に示した。本実験に応用した測定法においては、Agritine 0.2 μ mol までの検量線は良好な直線性を示した。また標準 Agritine の添加実験においても、定量的に回収されることが示された。なお、本法で用いた定量法では、遊離ヒドラジンのみがアゾ色素として定量される。マッシュルームには Agritine 以外の遊離あるいは結合型の芳香族のヒドラジン化合物は存在せず、他の夾雑物の測定値への影響は無視しうる。

インドフェノール法¹⁴⁾による GHA 定量の検量線は Fig. 3 に示すように 0.2 μ mol までは良好な直線性を示した。本法はフェノール (あるいはアンモニア) の定量法として応用されている方法であるが、アルカリ性条件下で直接フェノールと反応してインドフェノール色素を形成する化合物はマッシュルーム中には存在せず、したがって目的とする GHA より遊離する 4-hydroxyaniline を選択的に定量することが可能であり、他の夾雑物の影響も無視しうる。

上述した Agritine 及び GHA の定量法は共に比色定量に必要な発色団の安定性、吸光係数は十分高く、定量法として満足すべきものであることが示された。

(2) マッシュルーム中の窒素の存在状態

Stage 2 のマッシュルーム新鮮重量 1 g 当たりの総窒素量は 7.42 mg を示し、この内 75 % エタノール可溶性窒素は 1.68 mg であった。一方、アミノ酸分析計により同定・定量したニンヒドリン陽性化合物に由来する総窒素量は 1.40 mg であった。また今回の実験で、Aga-

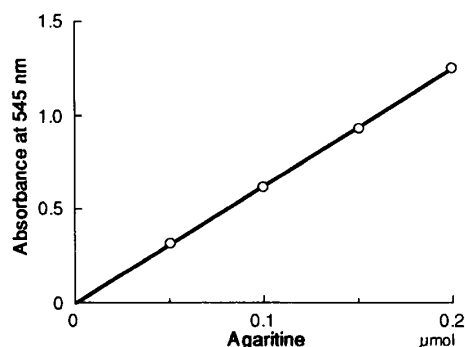


Fig. 2. Standard curve of Agritine by diazo-dye method

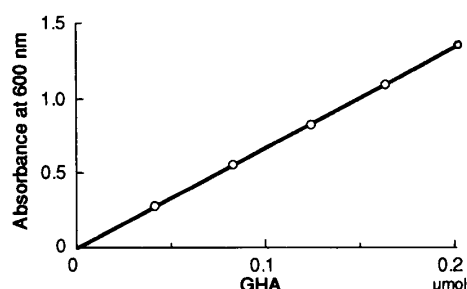


Fig. 3. Standard curve of GHA by indophenol method

ritine 及び GHA 量は、新鮮重量 1 g 当たりのおおの 1.64 μ mol (0.438 mg) 及び 3.16 μ mol (0.752 mg) と測定された。この結果は、両化合物に由来する窒素は、エタノール可溶性窒素の約 11 % を占めることになり、マッシュルーム中の主要な含窒素化合物であると共に、その特殊な構造からも食品化学的見地から注目すべき化合物であることを示している。

(3) マッシュルーム中の全遊離アミノ酸及び Agritine, GHA の加熱調理条件下における溶出挙動

1) 遊離アミノ酸類の挙動

90℃ 熱水中でのマッシュルームからのアミノ酸関連化合物の溶出挙動を検討した。Agritine と GHA を除いた遊離アミノ酸 43 種について、アミノ酸分析計により測定した溶出率は、全てのアミノ酸についてはほぼ一定しており、その平均値は、加熱 10 分後で 66 %, 30 分後では 95 % と、アミノ酸類は容易に加熱汁中へ溶出されることが示された。

2) Agritine 及び GHA の溶出挙動

水あるいは 1 % 食塩水中にて加熱したマッシュルームからの Agritine 及び GHA の、溶液中への経時的な溶出挙動を Fig. 4 及び Fig. 5 に示した。

Agritine の溶出は Fig. 4 に示したごとく、2 種の異

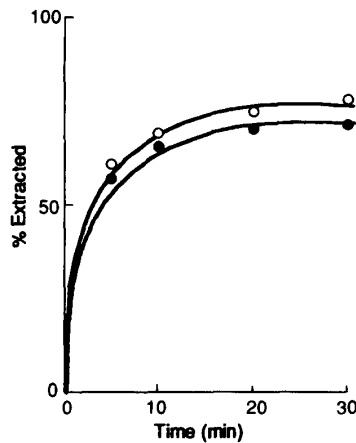


Fig. 4. Elution behaviour of Agaritine in H₂O and 1% NaCl solution at 90°C

—○— H₂O, —●— 1% NaCl.

なる媒体においてはほぼ共通の挙動を示し、子実体中の Agaritine は、最初の 10 分間で速やかに溶出がおり、熱水中では 69%，加熱 1% 食塩水中では 66% が溶出されたが、その後 30 分までの溶出は徐々に進行し、30 分後の溶出率はそれぞれ 78%，71% であった。最初の 10 分間における溶出の挙動は、上述の遊離アミノ酸類の溶出挙動とほぼ一致するが、30 分経過後の総溶出量は他のアミノ酸類に比較して約 10% 低い値を示した。Table 1 に 30 分加熱後のマッシュルームを、実験方法で述べた抽出法により抽出を行い、残存する Agaritine を測定した結果を示した。ほぼ理論値の Agaritine がマッシュルーム中に残存することから、加熱時の Agaritine の溶出挙動は、他の遊離アミノ酸類と異なることが示された。

GHA に関しては、Fig. 5 に示したごとく熱水中では Agaritine と類似した溶出挙動を示し、10 分、30 分後の溶出率はそれぞれ 51% 及び 61% であった。加熱 1% 食塩水中における溶出は、熱水に比べて非常に速やかであり、10 分間の加熱で、溶出量は最大値に達し、約 84% の GHA が溶液中に遊離することを示したが、30 分後の溶出量は、10 分後の溶出量に対して、見かけ上 20% の減少を示した。

以上の結果は、両化合物が他の遊離アミノ酸類と同様

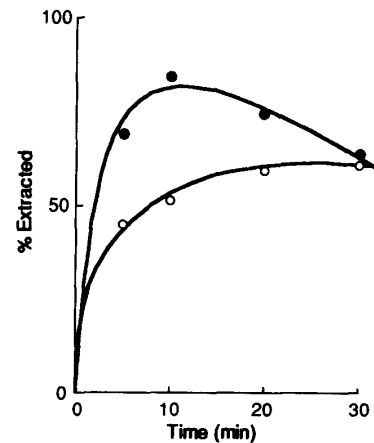


Fig. 5. Elution behaviour of GHA in H₂O and 1% NaCl solution at 90°C

—○— H₂O, —●— 1% NaCl.

に比較的速やかにキノコの組織より溶出することを示している。しかし、Agaritine に関しては 30 分加熱後も不完全な溶出結果を示したことは、その分布に局在性があり、マッシュルーム組織の加熱変性にともない、これらの化合物が組織中に閉じこめられるものとも考えられる。一方、GHA の場合は、1% 食塩水において加熱 10 分以後の GHA の見かけの溶出量が減少するのは、溶出液が着色する現象が観察されたことから、一旦溶出した GHA の酸化による褐変（重合）が進行し、インドフェノール法によっては測定されなくなったものと考えられる。

(4) マッシュルーム缶詰中の Agaritine 及び GHA 量

スライスしたマッシュルームの水煮缶詰中の Agaritine 及び GHA 量を Table 2 に示した。缶詰加工工程中の加熱処理により、マッシュルーム中の Agaritine 及び GHA は共に溶液中に溶出され、3 年後においても一部分解されずに残存することを示したが、子実体中にはほとんど検出することはできなかった。この理由としては、加工時において褐変防止に使用される還元剤（アスコルビン酸等）の存在が、両化合物の分解を抑えているものと考えられる。

Table 1. Agaritine in the fruiting bodies before and after cooking

Condition		Agaritine ($\mu\text{mol/g.f.w.}$ (%))
Before treatment	Fruiting bodies	1.64 (100)
After treatment	Fruiting bodies	0.33 (20)
at 90°C for 30 min	Soup	1.28 (78)

マッシュルーム中の phenylhydrazine 及び aniline 誘導体の定量と調理条件下における挙動

Table 2. Determination of Agaritine and GHA in canned mushroom*

Sample	Year	Agaritine (μ mol/g or ml)	GHA
Fruiting bodies	1	+	—
Soup		0.166	0.276
Fruiting bodies	3	+	—
Soup		0.139	0.132

* Sliced mushroom in water. + Detectable, — Not detectable.

以上の結果より考察すると、マッシュルーム中の特殊な芳香族化合物類は、30分間の加熱調理によって約80%は、煮汁中に溶出されることが明らかとなった。この結果は橋田ら⁶⁾が観察しているマッシュルームからの Agaritine の溶出挙動とも一致する。また食塩の存在は GHA の溶出を促進するが、分解をも促進することが示された。これらの事実から、ゆで汁を廃棄すれば、これらの化合物の約80%は除去され、摂取する機会ほとんどないと考えられる。しかし一方で、これらの化合物は、キノコの風味に直接関与することが予想される他のアミノ酸類とも同一の挙動を示すことから、加熱調理時の煮汁の除去は、キノコ特有の呈味性の保持という点において、適切な方法ではないと考えられる。

4. 要 約

(1) マッシュルーム (*Agaricus bisporus*) に存在する特殊な芳香族化合物、 γ -L-glutamyl-4-hydroxymethyl-phenylhydrazine (Agaritine) と γ -L-glutamyl-4-hydroxyaniline (GHA) を定量する目的で、簡便な比色法として、ジアゾ法及びインドフェノール法を確立した。

(2) 本実験で確立したジアゾ法とインドフェノール法で測定した Agaritine 及び GHA は、新鮮重量1g当たりおのおの $1.64 \mu\text{mol}$ (0.438 mg), $3.16 \mu\text{mol}$ (0.752 mg) であった。

(3) 加熱調理条件下におけるマッシュルーム中の Agaritine 及び GHA の 90°C 加熱下での水及び1%食塩水中への溶出挙動を検討した。Agaritine は両媒体中にてほぼ同一の挙動を示し、10分間で約60%が速やかに溶出され、その後30分間の加熱で約80%が溶液中に徐々に溶出した。GHA は熱水中では Agaritine と類似

した挙動を示したが、食塩の存在は GHA の溶出を促進するが、一方で分解を伴うことが示された。30分の加熱においても Agaritine は約20%子実体中に残存した。またマッシュルームに含まれる Agaritine, GHA 以外の遊離アミノ酸を主体とする可溶性窒素化合物は、 90°C , 30分の加熱でその約90%が溶出されることが示された。

(4) 市販のマッシュルーム水煮缶詰において、3年間保存した缶詰中の溶液にも Agaritine 及び GHA が検出された。この事実は、Agaritine 及び GHA の分解が、加工時に使用される還元剤の存在で抑えられたためと考えられる。しかしマッシュルーム本体には、両化合物は検出されなかった。

本実験に際し、徳島大学医学部栄養学科食品学講座の皆様のご協力をいただきました。ここに深く感謝致します。

引 用 文 献

- 1) Oka, Y., Ogawa, T. and Sasaoka, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1995 (1979)
- 2) Oka, Y., Ogawa, T. and Sasaoka, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1959 (1980)
- 3) Oka, Y., Tsuji, H., Ogawa, T. and Sasaoka, K.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **27**, 253 (1981)
- 4) Toth, B.: *Cancer Res.*, **35**, 3693 (1975)
- 5) Toth, B., Nagel, D., Patil, K., Erickson, J. and Antonson, K.: *Cancer Res.*, **38**, 177 (1978)
- 6) 橋田ちせ, 林 和夫, 李 傑, 芳賀佐和子, 桜井美代子, 清水英佑: 日公衛誌, **37**, 400 (1990)
- 7) Ogawa, T., Oka, Y. and Sasaoka, K.: *Phytochem.*, **23**, 684 (1984)
- 8) Oka, Y., Ogawa, T. and Sasaoka, K.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **30**, 27 (1984)
- 9) Ogawa, T., Oka, Y. and Sasaoka, K.: *Phytochem.*, **24**, 1837 (1985)
- 10) Hammond, J.B.W. and Nichols, R.: *J. Gen. Microbiol.*, **93**, 309 (1976)
- 11) Kelly, R.B., Daniels, E.G. and Hinman, J.W.: *J. Org. Chem.*, **27**, 3229 (1962)
- 12) AOAC: Method of analysis of AOAC, 13th Ed., 14 (1980)
- 13) Levenberg, B.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 2267 (1964)
- 14) Mieyal, J.J. and Blumer, J.L.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 3442 (1976)