

博士（栄養学）学位論文

論文題目

食品の鑑別的研究

—化学的成分組成の多変量解析によるキノコ類の
原産地および栽培法の判別について—

Study of Clarification of Foods

—Discrimination of the Country of Origin and Different Cultivation Methods of
Mushrooms by applying Multivariate Analysis based on Chemical Composition—

2000年

指導教員 菅原龍幸教授

氏名 奥崎政美

OKUZAKI, Masumi

女子栄養大学

①

博士（栄養学）学位論文

論文題目

食品の鑑別的研究

— 化学的成分組成の多変量解析によるキノコ類の
原産地および栽培法の判別について —

Study of Clarification of Foods

— Discrimination of the Country of Origin and Different Cultivation Methods of
Mushrooms by applying Multivariate Analysis based on Chemical Composition —

2000年

指導教員 菅原龍幸教授

氏名 奥崎政美

OKUZAKI, Masami

女子栄養大学

目次

Summary	i ~ iv
序章 緒論	1
第1章 乾シイタケの遊離アミノ酸、レンチニン酸およびミネラル組成に基づいた産地—日本産と中国産—判別	2
第1節 試料および方法	2
1-1 試料	
1-2 化学的成分分析	
1-1-2 遊離アミノ酸およびレンチニン酸	
1-2-2 ミネラル	
1-3 統計解析	
第2節 結果および考察	7
第1項 判別に有効な変数の選択	8
1. 遊離アミノ酸を変数とした場合	
2. 遊離アミノ酸とレンチニン酸を変数とした場合	
3. ミネラルを変数とした場合	
4. 遊離アミノ酸とミネラルを変数とした場合	
5. 遊離アミノ酸、レンチニン酸とミネラルを変数とした場合	
第2項 判別関数と適合性の検討	11
第3節 要約	14
第2章 乾シイタケの ¹ H NMR 検出スペクトルから抽出したシグナルに基づいた産地—日本産、中国産—判別；簡易法としての有効性の検討	15

第1節	試料および方法	15
1-1	試料	
1-2	試料調製	
1-3	^1H NMR スペクトルの測定	
1-4	^1H NMR スペクトルの同定と定量	
1-5	統計解析	
第2節	結果および考察	16
第3節	要約	18
第3章	乾シイタケの DNA 解析による種菌および産地の判別	19
第1節	試料および方法	19
1-1	試料	
1-2	方法	
1-2-1	DNA の抽出	
1-2-2	Inter-SSR(Simple Sequence Repeats) PCR 法	
1-2-3	rDNA PCR 法	
1-3	統計解析	
第2節	結果および考察	22
第1項	Inter - SSR PCR 法による多型パターンの分類	22
1-1	2種類のプライマーによる分類	
1-2	4種類のプライマーによる分類	
第2項	rDNA の多型パターンによる分類	23
第3項	Inter - SSR PCR 法と rDNA の多型パターンによる分類	24
第3節	要約	25

第4章 マツタケの遊離アミノ酸とミネラル組成に基づいた産地—日本産、中国産、韓国産—の判別	26
第1節 試料および方法	26
1-1 試料	
1-2 成分分析	
1-3 多変量解析	
第2節 結果および考察	27
第1項 2群判別	27
1-1 日本産と中国産の判別	27
A. 遊離アミノ酸を変数とした場合	
B. ミネラルを変数とした場合	
C. 遊離アミノ酸およびミネラルを変数とした場合	
1-2 日本産と韓国産の判別	28
A. 遊離アミノ酸を変数とした場合	
B. ミネラルを変数とした場合	
C. 遊離アミノ酸およびミネラルを変数とした場合	
1-3 中国産と韓国産の判別	29
A. 遊離アミノ酸を変数とした場合	
B. ミネラルを変数とした場合	
C. 遊離アミノ酸およびミネラルを変数とした場合	
第2項 3群判別	30
2-1 日本産、中国産および韓国産の判別	30
A. 遊離アミノ酸を変数とした場合	
B. ミネラルを変数とした場合	
C. 遊離アミノ酸およびミネラルを変数とした場合	

第3節 要約	32
第5章 生シイタケの遊離アミノ酸、レンチニン酸およびミネラル組成 に基づいた異なる栽培法—原木栽培品と菌床栽培品—の判別	34
第1節 試料および方法	34
1-1 試料	
1-2 成分分析	
1-3 統計解析	
第2節 結果および考察	35
2-1 遊離アミノ酸を変数とした場合	
2-2 遊離アミノ酸とレンチニン酸を変数とした場合	
2-3 ミネラルを変数とした場合	
2-4 アミノ酸、レンチニン酸およびミネラルを変数とした場合	
第3節 要約	37
第6章 総括	38
謝辞	42
参考文献	42
表および図	

Summary

Mushrooms, and particularly dried Shiitake mushrooms, have been a traditional food since ancient times. Amidst a considerable increase in the demand for fresh mushrooms in reflection of changing dietary preferences, domestic production volume has decreased due to the presence of inexpensive imported dried Shiitake mushrooms from China, resulting in an increasingly difficult situation for dried Shiitake mushrooms producers. However, domestic dried Shiitake mushroom producers are striving to increase consumption through differentiation of their products by taking advantage of improved product quality, and as a result of mandatory labeling of the country of origin, are seeking a more objective evaluation of quality and accurate identification of raw materials so that domestic mushrooms are distinguished from imported mushroom in terms of appearance, ingredients and other factors.

The objective of this study was to examine whether or not it is possible to discriminate the country of origin between Japan and China by applying multivariate analysis, namely linear discriminant analysis(LDA), based on chemical composition of free amino acids, lentinic acid and mineral of dried Shiitake mushrooms. In the application of linear discriminant analysis, analysis was performed by a method in which the original variables are reduced by principal component analysis (PCA) to sufficiently satisfy conditions for the number of samples and number of variables as well as avoid problems with multicollinearity, after the principal component scores of the resulting principal components are used as new variables (PCA-LDA method). Training samples were used to determine the effective variables for discrimination along with the discriminant function based on those variables, while 10 Japanese dried Shiitake mushroom samples and 7 Chinese dried Shiitake mushroom samples were used as standard samples that were cultivated on log. Evaluation of the analytical accuracy of the discriminant function was performed on the basis of percent of correctly

classified, probability of incorrectly classified and correlation ratio. Evaluation of the compatibility of this discriminant function was performed by an external validation method. More specifically, evaluation was performed on the basis of percent of correctly classified of 18 and or 58 test samples for which the country of origin was known and 8 blind samples (for which the country of origin was concealed and only unveiled after analysis). As a result, although discriminant functions were obtained using as variables consisting of 21 free amino acids, free amino acids and lentinic acid or 9 mineral, respectively, the discriminant function that incorporated a total 31 variables consisting of 21 free amino acids, lentinic acid and 9 mineral, namely $z = 1.1138 - 0.9248 \times \text{PC2 score} + 1.1585 \times \text{PC4 score}$, was judged to be the most effective. Moreover, efficacy was able to be confirmed since application of this discriminant function to 10 blind samples yield a 100 % of correctly classified.

A simple discrimination of country of origin between Japan and China was examined by applying the PCA-LDA method to 21 signals selected from the ¹H-NMR spectrum of dried Shiitake mushrooms. Although the accuracy of the resulting discriminant function was not as good as in the case of using chemical analysis values, efficacy was observed when used as a primary screening method.

A study of discrimination of species and country of origin was conducted by analyzing the base sequence patterns of Inter-SSR(Simple Sequence Repeats) PCR method for DNA, and rDNA extracted from the dried Shiitake mushroom. 12 species of Japanese dried Shiitake mushrooms were classified into 10 types, while 16 Chinese samples, for which the species was unclear, were classified into 7 types, with a total of 15 types being classified overall, based on the appearance patterns of two types of primers, namely SSR4 and SSR5, by Inter-SSR PCR method. When two more primers consisting of SSR9 and SSR11 were added and classification was performed based on the appearance patterns of these four types primers, the

overlapping types were further divided resulting in a total of 16 types being classified overall. The dried Shiitake mushrooms were classified into a total of 9 types based on the appearance patterns of rDNA, consisting of 6 types of Japanese species and 6 types of Chinese samples. When the appearance patterns of Inter-SSR PCR method and rDNA were combined, all 12 Japanese species were classified into 12 different types and the 16 Chinese samples were classified into 9 types, resulting in the classification of a total of 19 types. Moreover these appearance patterns were examined for similarity between species and country of origin by scoring the appearance patterns by type III quantification and performing cluster analysis. Discrimination was possible at the species level for Japanese dried Shiitake mushrooms, and similarity was observed between species of the same variety. In the case the Chinese samples, although the species were unknown, in addition to it being possible to categorize production areas within China, it was strongly suggested that importation of species from Japan was being carried out widely based on the existence of similarity with Japanese Species.

The PCA-LDA and CA multivariate analysis techniques for chemical composition applied to discrimination of country of origin of dried Shiitake mushrooms were applied to discrimination of four countries of origin of Matsutake mushrooms and discrimination of different cultivation methods of raw Shiitake mushrooms to assess the universality of this technique.

For discrimination of the country of origin of Matsutake mushrooms, linear discriminant analysis was applied to two-group discrimination, while canonical discriminant analysis was applied to three-group and four-group discrimination, using free amino acids and mineral as variables for Japanese, Chinese, Korean and Canadian samples. The case of using 30 variables consisting of 21 free amino acids and 9 mineral yield the best discriminant function. Although the Japanese, Chinese and Korean samples, which are considered taxonomically to be the same species, were discriminated

between the Japanese and Chinese samples for both two-group and three-group discrimination, a portion of the Korean samples overlapped with the Japanese and Chinese samples, and clear discrimination was difficult. In addition, three-group discrimination by canonical discriminant analysis was indicated to demonstrate more accurate discrimination of Japanese and Chinese samples. Canadian Matsutake mushrooms, which are of a different species, were clearly discriminated from Chinese samples, but either approached or partially overlapped Japanese and Korean samples, making discrimination somewhat difficult.

For discrimination of different cultivation methods of raw Shiitake mushrooms, the case of using 29 variables consisting of 19 amino acids, lentinic acid and 9 mineral yield the best discriminant function of $z = 3.0426 + 1.4826 \times \text{PC1 score} - 1.8371 \times \text{PC2 score}$, and Shiitake mushrooms cultivated on log were able to be clearly discriminated from those cultivated on medium.

On the basis of these results, it was suggested that country of origin and cultivation method can be discriminated for mushrooms by principal component analysis and discriminant analysis based on chemical composition.

序章 緒 論

日本におけるシイタケの原木栽培による人工栽培は 1600 年代の中頃から始められ、乾シイタケとして利用されてきた¹⁻²⁾。キノコ類の科学的栽培技術の確立により原木栽培による乾シイタケの国内生産量は 1984 年の 16,685 t にまで増加してきた³⁾。近年、原木やほだ場の減少や生産者の高齢化にともなう後継者不足といった生産基盤の変化と、1960 年頃より生シイタケの栽培が本格化し、生鮮品への嗜好の変化と相俟って周年栽培が可能で収穫も比較的安定である菌床栽培への転換が急速に進んできていること⁴⁾、また、80 年代の終わりから中国産を中心とした安価な輸入品の増加なども大きな要因であると言われている。1998 年には 5,552 t にまで減少している³⁾。

中国におけるシイタケの人工栽培の歴史は日本より古いとされているが⁵⁾、合理的で能率的な技術的裏づけをもった人工栽培の試みは 1960 年代以後のことであり、その中心地域は浙江省の慶元、龍泉および景寧県地域で原木栽培（中国での呼称は段木栽培）が始められ、以後長江以南の福建省、湖南省、湖北省、四川省、雲南省などに広がり、更に長江以北の河南省、甘肅省、遼寧省、吉林省へと拡大した⁶⁻⁸⁾といわれている。日本における本格的な人工栽培の普及に大きく遅れをとっていたが、1987 年に福建省古田県において菌床栽培（中国での呼称は木屑（袋）栽培）が成功し^{6,8)}、飛躍的に生産量を上げ、それと共に日本への輸出が増大し、特に乾シイタケは 1996 年には中国からの輸入量が日本の生産量を上回り 1998 年には 9,000 t 台に達している^{3,9,10)}。しかし、これらの発展は日本から種菌や栽培技術、鮮度保持および乾燥技術等の積極的導入があったことも見逃せないところである^{5,8)}。現在、中国は日本、韓国、アメリカおよびヨーロッパへのシイタケの最大の輸出国になっている。

このような変化の中で、国内の乾シイタケ生産業界にあっては、品質の向上^{4,11)}、特に輸入品との差別化に腐心しており、1996年に原産国表示が義務付けられ¹²⁾、さらに「原木」表示マークの貼付など消費者への宣伝を活発に展開している。しかし、一方では中国からの輸入原価が安いことから消費現場においては中国産を日本産と偽ったり、日本産に中国産を混入したりするケースがあるとされており¹³⁾、産地間の差異を客観的に鑑別する方法が求められている。しかし、キノコ類、中でもシイタケの化学的成分についての分析的研究は数多くあるが¹⁴⁻²⁴⁾、乾シイタケの銘柄²⁵⁻²⁸⁾、品種²⁹⁻³⁰⁾、栽培法³¹⁻³⁴⁾および産地³⁵⁾間の差異について重点的に検討した研究は少ない。

食品の鑑別（鑑定）は品質の評価と真偽の判断、例えば種あるいは品種、生産地ないし原産地、生産方法、熟成段階ないし生産段階、加工食品の原料あるいは配合割合など多岐に亘る。その方法は外観の肉眼的観察といった一部職人的勘による判断に依存する場合もあるが、表面および内部構造、物性、成分特性あるいは遺伝的特性などにより客観的に即ち科学的に鑑別することが必要である³⁶⁾。

これまで食品の品種（種）、銘柄、産地や熟成度、あるいは混ぜ物の鑑別的研究は多くある。特に食品の物理的・化学的成分を基に多変量解析主として主成分分析、判別分析やクラスター分析手法を用いてその食品の特性を構造的に明かにし、その類似性や差異を検討するパターン認識の手法が“ケモメトリックス”として一領域を形成するまでになっている³⁷⁻⁴⁶⁾。この多変量解析においては多成分を同時に組み込んで解析を進めることが出来るので、一度に多数の化学分析値が得られるガスクロマトグラフィー（GC）およびGC-MSや高速液体クロマトグラフィーによる香気成分や脂肪酸、フラボノイド、有機酸や遊離アミノ酸、原子吸光光

度計や誘導プラズマ発光光度計によるミネラル、近赤外分光計や核磁気共鳴吸収測定装置などによる検出波長および化学的成分の機器分析データに適用され、ワイン⁴⁷⁻⁵³⁾、リンゴやかんきつ類などの果物⁵⁴⁻⁵⁷⁾、ミルク⁵⁸⁻⁵⁹⁾、チーズ⁶⁰⁻⁶²⁾、植物油⁶³⁻⁶⁷⁾、醤油⁶⁸⁾、小麦粉⁶⁹⁻⁷⁰⁾、ジャガイモ⁷¹⁾、蜂蜜⁷²⁻⁷³⁾、砂糖⁷⁴⁾、海苔⁷⁵⁾、イカ⁷⁶⁾、獣肉⁷⁷⁾など多くの食品の鑑別的解析に用いられてきている。

また、近年のDNA解析技術の発達に伴いDNAの塩基配列の差異を増幅させるPCR法による食肉製品の肉種⁷⁸⁻⁷⁹⁾、魚種⁸⁰⁾、米の品種⁸²⁻⁸⁵⁾や遺伝子組み換え大豆⁸⁶⁾など食品の鑑別への応用が進められつつある。キノコ類においてもシイタケをはじめヒラタケ、ナメコ、エノキ、キクラゲなど菌株(菌糸体)のmtDNAやrDNAの塩基配列の多型パターンの解析による系統や地理的差異について報告されている⁸⁷⁻⁹⁰⁾。

本研究においては乾シイタケの子実体の化学的成分組成およびDNA解析結果に多変量解析を適用し有効な産地判別法を開発することを目的とした。更にマツタケの産地、生シイタケの異なる栽培法の判別への適用の可能性を検討した。

第1章 乾シイタケの遊離アミノ酸、レンチニン酸およびミネラル組成
に基づいた産地—日本産と中国産—の判別

第1節 試料および方法

1-1. 試料:

解析に用いた乾シイタケは、収集し、成分分析に供した 98 試料とデータベース²⁹⁾より分析値を利用した 18 試料の合計 116 試料である。これらの試料は以下のように分類した (Table 1)。

1. トレーニング試料 17 試料 (産地判別の基になる判別関数を得る:
基準となる原木栽培品)
 - A. 日本産 10 試料 (J1; 森 MM1、J2; 森 121、J3; 森 290、J4; 森ゆう次郎、J5; 秋山 817、J6; 秋山 567、J7; 秋山、J8; 菌興 115、J9; 菌興 241、J10; 菌興 368)
 - B. 中国産 7 試料 (C1; 江西省、C2; 河南省、C3; 江西省、C4; 河南省、C5; 江西省、C6; 不明、C7; 不明)
2. テスト試料 76 試料 (得られた判別関数の適合性を評価する: 産地の判明しているもの)
 - A. 中国産 (栽培法不明) 15 試料 [Ca; 福建省、Cb; 福建省、Cc; 福建省、Cd; 浙江省、Ce; 湖北省、Cf; 湖北省、Cg; 広西壮族自治区、Ch; 広西壮族自治区、Ci; 不明 (上海市内購入)、Ck~Cp (昆明市内購入)]
 - B. 中国産菌床栽培品 1 試料 Cj
 - C. 日本産原木栽培品 1 試料 Jz および中国産原木栽培品 1 試料 Cz
 - D. 日本産原木栽培品 40 試料 [静岡産 17、大分産 12、宮崎産 11]²⁸⁾
 - E. 日本産原木栽培品 15 試料と中国産菌床栽培品 3 試料 (データベース)²⁹⁾

3. ブラインド試料 18 試料 (有効と判断された判別関数の精度およびその適合性を評価する:産地を伏せ、解析終了後に試料提供者より産地を明かにされたもの)
- A. 日本産原木栽培品 4 試料 U1、U2、U4、U5 および中国産原木栽培品 2 試料 U3、U7、菌床栽培品 2 試料 U5、U8
 - B. 日本産原木栽培品 1 試料 U14 および中国産原木栽培品 4 試料 U10 ~U13、菌床栽培品 1 試料 U15
 - C. 中国産 (栽培法不明) 1 試料 U9
 - D. 中国産 (栽培法不明) 3 試料 U16 から U18 (安徽省)
4. 判別予測試料 5 試料 (日本産として疑わしいもの) P1~P5

1-2. 化学的成分分析:

1-2-1. 遊離アミノ酸およびレンチニン酸

佐藤ら¹⁸⁾および青柳ら¹⁴⁾の方法に準じ、試料 0.5 g を 70%エタノール溶液で加熱還流後、抽出液を脱脂し、次いで pH2.2 クエン酸リチウム緩衝液で定容し、試験液とした。アミノ酸自動分析計 (HITACHI 835 および L8500A 日立製作所) を用い、生体液分析法により非タンパク性アミノ酸 11 種類を含む 31 種類の遊離アミノ酸とレンチニン酸を定量した。

1-2-2. ミネラル

Na、K は堤ら⁹⁾の方法に準じ試料 1g を 1%塩酸溶液で抽出し、炎光光度法および原子吸光法 (10AL 型炎光光度計 日本電子、HITACHI170-50A 原子吸光分析計 日立製作所)、Ca、P、Mg、Fe、Cu、Zn、Mn は 550°C 乾式灰化物を希塩酸抽出したものを誘導結合プラズマ発光分光法 (Leeman Labs Plasma Spec ICP2.5 型および DRE 型 Leeman Labs. INC) で測定

した。

1-3. 統計解析

単量解析⁹²⁻⁹³⁾ : 各成分について平均値の差の検定 (Welch の t - 検定) を行なった。

多変量解析⁹⁴⁻⁹⁷⁾ : 各成分 (変数) を基に産地判別に有効な判別関数を求め、成分および試料間の相互関係を検討するために主成分分析 Principal Component Analysis (PCA)、線形判別分析 Linear Discriminant Analysis (LDA) およびクラスター分析 Cluster Analysis (CA) を行なった。まず、主成分分析により変数の数を減らし (縮約)、得られた固有値 >1.0 の主成分の主成分得点を新たな変数セットとし線形判別分析およびクラスター分析を実行した⁹⁸⁻¹⁰⁶⁾。この手順は判別分析を実行する場合、変数の数に対して試料数が3倍以上を必要とする条件を満たす。また、主成分同士は互いに直交する関係 (無相関) にあり多重共線性 (Multicollinearity) を回避することができる^{37-38,107)}。

主成分分析は成分分析値を基準化し、その相関行列に対して実行した。主成分の選択は固有値 (Eigen Value) >1.0 とし、固有ベクトル (Eigen Vector)、寄与率 (% of Variance)、累積寄与率 (% of Accumulative Variance)、主成分負荷量 (Principal Component Loading)、主成分得点 (Principal Component Score) を求めた。

線形判別分析はトレーニング試料に対して実行した主成分分析により得られた固有値 >1.0 の主成分の主成分得点を変数として変数増減 (ステップワイズ) 法により実行した。2 群の変数間の分散・共分散行列の等分散性をボックス M 検定により、また、選択された判別係数 (Discriminant Coefficient) の有効性を F 値及び p 値による有意差検

定によりそれぞれ確認した。得られた線形判別関数 (Linear Discriminant Function) から各試料の判別得点 (Discriminant score) を求め、判別的中率 (% of Correctly Classified)、誤判別の確率 (Probability of Incorrectly Classified)、相関比 (Correlation Ratio) を基にその分析精度を検討した。次にテスト試料について判別の中率 (% of Correctly Classified) を、またブラインド試料について判別の中率 (% Correctly Classified) を求め、得られた線形判別関数の適合性について検討した。同時に各試料のマハラノビスの汎距離 (Mahalanobis' Generalized Distance) と判別群への帰属の確率を求め、各試料の判別群内の空間的位置関係を確認した。

クラスター分析は判別分析により選択された主成分の各試料の主成分得点を変数としてマハラノビスの汎距離を基にウォード法 (Ward Method) により実行した。階層的手法 (Hierarchical Clustering) により作図された 樹形図 (Dendrogram) について試料間の相互関係を検討した。

統計ソフトは EXCEL 多変量解析 Ver. 4.0 ((株) エスミ) およびエクセル統計 97 ((株) 社会情報サービス) を用いた。

第2節 結果および考察

トレーニング試料の遊離アミノ酸 (タンパク性遊離アミノ酸即ち、アスパラギン酸 Asp、スレオニン Thr、セリン Ser、アスパラギン Asn、グルタミン酸 Glu、グルタミン Gln、プロリン Pro、グリシン Gly、アラニン Ala、バリン Val、メチオニン Met、イソロイシン Ile、ロイシン Leu、チロシン Tyr、フェニルアラニン Phe、トリプトファン Trp、リジン Lys、ヒスチジン His、アルギニン Arg と含有量の多い非タンパク性遊離アミ

ノ酸のオルニチン Orn、と γ -アミノ酪酸 γ -Aba を加えた 21 種類)、レンチニン酸およびミネラル (ナトリウム Na、カリウム K、カルシウム Ca、銅 Cu、鉄 Fe、マグネシウム Mg、リン P、亜鉛 Zn、マンガン Mn、の 9 種類) の含有量および t-検定による有意差の検定結果を Table 2 に示した。日本産は遊離アミノ酸の Asp、Gln、Gly、ミネラルの Na と Ca、中国産は遊離アミノ酸の Pro、 γ -Aba とレンチニン酸、ミネラルの Fe と Mg がそれぞれ有意に高く、産地間に成分に差異がみられ、産地判別の可能性が示唆された。しかし、この有意差のあった成分を変数として直接線形判別分析を行ったが有効な判別関数を得ることは出来なかった。そこで以下のように有効な判別関数を得るために取りこむ変数について検討した。

第 1 項 判別に有効な変数の選択

産地判別に有効な判別関数を得るために変数として化学的分析値を 1. 遊離アミノ酸、2. 遊離アミノ酸とレンチニン酸、3. ミネラル
4. 遊離アミノ酸とミネラル 5. アミノ酸、レンチニン酸とミネラルの 5 群に分けそれぞれについて検討した。これら変数と試料の組合せを Table 3 に、また解析結果を Table 4 に示した。

1. 遊離アミノ酸を変数とした場合

トレーニング試料の主成分分析によって抽出された固有値 >1.0 の主成分は 4 主成分でその寄与率はそれぞれ 47.0、22.7、11.8 及び 5.7% でその累積寄与率は 87.1%であった。判別分析の結果、選択された主成分は PC2 と PC4 (累積寄与率 28.4%) であった。日本産 1 試料が誤判別されたが、判別的中率は 94.1%、誤判別の確率は 4.6%、相関比は 0.76 であ

り、良い分析精度であった。

テスト試料 A、B、C 18 試料の判別結果は全て一致し、判別的中率 100% であったが、D と E の 58 試料の判別の中率は 96.6% であった。

ブラインド試料 A の判別結果は 2 試料を日本産と誤判別し、判別の中率は 75.0% であった。

2. 遊離アミノ酸とレンチニン酸を変数とした場合

トレーニング試料の主成分分析により抽出された固有値 >1.0 の主成分は 4 主成分でその寄与率はそれぞれ 45.2、23.4、11.4、6.7% で累積寄与率は 86.8% であった。判別分析の結果、選択された変数は PC2 と PC3 (累積寄与率 34.8%) であった。日本産 1 試料を誤判別し、判別の中率は 94.1%、誤判別の確率は 2.1%、相関比は 0.82 で良い分析精度であった。テスト試料 A、B、C の 18 試料の判別結果は全て一致し、100% の判別の中率であったが D、E の 58 試料の判別の中率は 96.6% であった。

ブラインド試料 A の判別結果は 2 試料を日本産と誤判別し、判別の中率は 75.0% であった。

3. ミネラルを変数とした場合

トレーニング試料の主成分分析により抽出された固有値 >1.0 の主成分は 4 主成分でその寄与率はそれぞれ 32.9、26.5、13.9、11.6% で累積寄与率は 84.9% であった。判別分析の結果、選択された変数は PC2 と PC4 (累積寄与率 38.1%) であった。判別の中率は 100%、誤判別の確率は 3.8%、相関比は 0.78 で良い分析精度であった。

テスト試料 A、B、C 18 試料の判別結果は、誤判別は 5 試料で、その判

別的中率は 72.2%であった。ブラインド試料 A の判別結果は全て日本産と判別し、判別中率は 50.0%であった。

4. 遊離アミノ酸とミネラルを変数とした場合

トレーニング試料の主成分分析により抽出された固有値 >1.0 の主成分は 6 主成分でその寄与率はそれぞれ 35.6、22.3、11.4、9.1、4.9 及び 3.8%で累積寄与率は 87.1%であった。判別分析の結果、選択された変数は PC2、PC3、PC4 と PC5 (累積寄与率 48.0%) であった。判別中率は 100%、誤判別の確率は 0.006%、相関比は 0.96 と良い分析精度であった。

テスト試料 A、B、C 18 試料の判別結果は全て一致し、判別中率は 100%であった。ブラインド試料 A の判別結果は 3 試料を日本産と誤判別し、判別中率は 62.5%であった。

5. アミノ酸、レンチニン酸とミネラルを変数とした場合

トレーニング試料の主成分分析により抽出された固有値 >1.0 の主成分は 7 主成分でその寄与率はそれぞれ 34.9、22.7、11.1、9.0、5.2、3.9 及び 3.3%で累積寄与率は 90.1%であった。判別分析の結果、選択された変数は PC2 と PC4 (累積寄与率 31.9%) であった。判別中率 100%、誤判別の確率 3.8%、相関比 0.78 であり、良い分析精度であった。

テスト試料 A、B、C 18 試料の判別結果は全て一致し、判別中率は 100%であった。ブラインド試料 A の判別結果は 1 試料を日本産と誤判別したが、判別中率は 87.5%であった。

第2項 判別関数と適合性の検討

アミノ酸、ミネラル及びレンチニン酸あるいはその組合せを変数とした主成分分析結果を基に判別分析を行った場合はそのどのケースも第1主成分(PC1)は選択されず、PC2以下の組合せとなった。これはPC1はアミノ酸及びミネラルの総含有量の大小を示す尺度となっていると解釈され、判別には総量は変動が大きく、産地間の判別の決め手にはならないことを示していると考えられる。変数の主成分負荷量をみると遊離アミノ酸を変数とした場合、PC2は正にProと γ -Abaが、負にAspとGlnが関連し、PC3は正にAla、Argおよび γ -Abaが、負にMet、GlyとTrpが関連し、判別に寄与しているものと考えられる。また、遊離アミノ酸にレンチニン酸を組合せるとPC2は正にレンチニン酸が関連し判別に寄与していると考えられ、相関比がやや高くなり分析精度が改善される。主成分得点分布をみると中国産はほぼ一群として第1象限に位置づけられ第2、3、4象限に分布する日本産と明確に分かれる。

ミネラルを変数とした場合、主成分負荷量をみると選択されたPC2は正にCaとNaが、負にMnとMgがそれぞれ関連し、PC4は正にCuが負にFeがそれぞれ関連し判別に寄与しているものと考えられる。PC2とPC4に対する主成分得点分布からみると日本産は第1、2、4象限に広く分布し、中国産はほぼ第3象限に位置し、日本産と分離した。しかし、テスト試料A、B、C 18試料の判別的中率は72.2%、ブラインド試料Aの判別的中率は50%であり良い精度とはいえない。

遊離アミノ酸にミネラルを組合せた場合、固有値 >1.0 の主成分数は5と多くなり、少数の変数に縮約させることが困難であるとともに、ブラインド試料に対する判別の中率が62.5%と悪く、判別関数の適合

性が低いと判断される。

アミノ酸にレンチニン酸とミネラルを組合せた場合、元の 31 変数は 7 主成分に、また判別に選択された主成分は 2 つに縮約され、判別の中率及び相関比ともに高く、テスト試料 A、B、C 18 試料の判別の中率は 100% であり、ブラインド試料 A の判別の中率も 87.5% と最も良い成績であった。判別分析によって選択された PC2 と PC4 における変数の主成分負荷量の散布図を Fig. 1 に示した。PC2 に対しては正に γ -Aba、Mg、Pro とレンチニン酸が、負に Asp、Gln、Gly、Na が相関し、PC4 に対しては正に Trp と Tyr が、負に Ala が相関し、それぞれ判別に寄与しているものと考えられる。トレーニング試料 17 試料の主成分得点の PC2 と PC4 に対する散布図 (Fig. 2) をみると日本産 (J1 から J10) は第 1、2、3 象限に分布し、中国産 (C1 から C7) はほぼ第 4 象限に単一の群を作り、明確に日本産と分かれている。PC2 と PC4 に対するトレーニング試料 17 試料にテスト試料 A、B、C 18 試料 (Ca から Cp) とブラインド試料 A 8 試料 (U1 から U8) の主成分得点を重ね合わせた散布図 (Fig. 3) をみると、テスト試料の中国産 Ca から Cp の 16 試料は全て第 4 象限のトレーニング用中国産試料と重なり、日本産 Jz および中国産 Cz もそれぞれの群に分かれている。また、ブラインド試料 A の U1、2、3、4 および 6 は日本産群に、U5、7、8 は中国産群とに分かれており、この内原点近くにある U3 が中国産を日本産と誤判別したものである。

トレーニング試料のクラスター分析によって得られた樹形図を Fig. 4 に示した。主成分得点散布図でみられた結果と同様に日本産と中国産の大きな 2 つのクラスターを形成している。日本産試料の森系 (J2、J3)、秋山系 (J5、J6) および菌興系 (J8、J10) はそれぞれ近接するサブクラスターを形成し、また、中国産試料で中国内産地が判明している、江西

省 (C1、C5) と河南省 (C2、C4) の試料についても近接サブクラスターを形成している。更にトレーニング試料 17 試料、テスト試料 A、B、C 18 試料およびブラインド試料 A 8 試料のクラスター分析によって得られた樹形図を Fig. 5 に示した。ここでも日本産と中国産の 2 つの大クラスターが形成されており、また、日本産の同系の種菌および中国産の同一産地試料はそれぞれが近接サブクラスターを形成する傾向があることが分かる。また、種菌あるいは産地不明試料については連結および近接するサブクラスターから種菌ないしは産地をある程度推定することは可能である。しかし、全てが一致しているわけではなく、また中国産については種菌が明らかではないので、このことが種菌による成分組成の違いを反映しているものなのかどうかは即断することは出来ない。この点については DNA 解析の章でもう一度触れる。

このように遊離アミノ酸 21 種類、レンチニン酸およびミネラル 9 種類の合計 31 変数を取りこんだ判別関数が最も有効であると考えられ、得られた線形判別関数は Table 5 に示したように、

$$z = 1.1138 - 0.9248 \times \text{PC2 score} + 1.1585 \times \text{PC4 score} \text{ となる。}$$

この式より判別得点、 $z > 0$ の場合が I 群即ち日本産、 $z < 0$ の場合が II 群即ち中国産と判別される。また、各試料のマハラノビスの汎距離による判別とその確率により、各試料の各群への帰属の程度が判り、判別の境界に位置する試料の判断を検討する上で有用である。

得られた判別関数の適合性を評価するために更にブラインド試料 B、C、D の 10 試料を用いて判別を行なった。その結果、判別の中率は 100% (Table 4) で、その適合性を再確認できた。

また、乾シイタケの生産業界の関係者により市場から回収された日本産と表示されているが中国産を混ぜていると思われる贈答用パックから

2人の鑑別の専門家により外観即ち乾シイタケの菌傘の色や輝きおよび菌褶の形状等から中国産ではないかと選別された5試料（判別予測試料P1～P5）の提供を受け本判別関数を適用した。その結果、3試料（P1、P2、P5）が中国産、2試料（P3、P4）が日本産と判別された。この内、日本産と判別されたP4は2人の鑑別者で意見が分かれた試料であった。

以上のように本研究において乾シイタケの産地判別にその多成分の化学的成分に多変量解析手法即ち主成分分析による変数の縮約後、判別分析を適用する方法が有効であり、実用上の有用性をもつ判別関数を開発することができたと考えられる。

尚、判別関数を求めるトレーニング試料の試料総数17が先行させる主成分分析に際し、特に遊離アミノ酸、レンチニン酸およびミネラルの組合せて変数とした場合、多変量解析の主旨から考えると変数（成分）31に対して少ない（少なすぎる）事が結果の信頼性に若干の疑義が生じる事が予想されるが、相関行列による主成分分析においては数学的に問題は無く、テスト試料18およびブラインド試料18による判別関数の適合性を検討した結果であり、従って本章では試料数53を用いて解析したものと見える。

第3節 要約

乾シイタケの遊離アミノ酸、レンチニン酸およびミネラル含有量を基に多変量解析手法即ち主成分分析による変数の縮約後、判別分析およびクラスター分析を行なう方法によって産地の判別が可能かどうかについて検討した。トレーニング試料に対して遊離アミノ酸およびミネラル組成をそれぞれ単独に解析の変数とした場合、共に精度の良い判別関数を得ることはできたが、テスト試料およびブラインド試料によるこの判別

関数の適合性に関する評価の結果は必ずしも充分とは言えなかった。しかし、遊離アミノ酸、レンチニン酸およびミネラルの 31 成分 (変数) を基にすると 2 主成分に縮約された有効な判別関数

$$z = 1.1138 - 0.9248 \times \text{PC2 score} + 1.1585 \times \text{PC4 score}$$

が得られた。更に別のブラインド試料および判別予測試料への適用の結果からも実用上の有効性を示すことができた。

第 2 章 乾シイタケの ^1H NMR スペクトルから抽出したシグナルに基づいた産地—日本産、中国産—の判別 ; 簡易法としての有効性の検討

第 1 節 試料および方法 ¹⁰⁸⁻¹⁰⁹⁾

1-1. 試料

解析に用いた試料は第 1 章、第 1 節 1-1 の試料の項のうち、トレーニング試料 17 試料、テスト試料 A、B、C 18 試料、ブラインド試料 A、B、C 15 試料である。

1-2. 試料調製

各乾シイタケの粉末試料 3g を 15 倍量の蒸留水に 4 °C で 15 時間浸漬後、ろ過し、そのろ液を測定液とした。

1-3. ^1H NMR スペクトルの測定

^1H NMR の測定は日本電子製 JEOL EX270 超伝導磁石フーリエ変換 (FT) NMR 分光測定装置を用い 270MHz でホモゲートデカップリング法で行なった。測定液に 10% の D_2O (内部標準として 0.01ml/1 DDS* を含む) を

加え、スキャン回数 64 回、室温で測定した。

* DDS トリメチルシリルプロパンスルホン酸ナトリウム塩

1-4. ^1H NMR スペクトルから抽出したシグナルの同定と定量

成分の同定即ちスペクトルのシグナルの帰属はシイタケに多く含まれるアミノ酸、有機酸および糖類について標品の NMR スペクトルを測定し、化学シフトの位置と形状を基に同定した。定量値は各スペクトルのピーク高と内部標準 DDS のピーク高との相対値として表した。

1-5. 統計解析

統計解析は第 1 章 第 1 節 1-3 統計解析の項と同じ。

第 2 節 結果および考察

乾シイタケ、ナメコ、マツタケ、ナラタケの水抽出溶液の ^1H NMR スペクトルを Fig. 6 に示した。 ^1H NMR スペクトルのプロフィールは食品の種類により異なり成分組成の差異を示し、各シグナル高の差異は成分含有量の差異に相当するものであり、キノコの種類によってもそのプロフィールの差異とシグナル高の差異が視察された。乾シイタケの水抽出溶液の ^1H NMR 分析により検出されたもののうち解析に用いたシグナルは 21 個である。各シグナルの成分への帰属ができたものは遊離アミノ酸のロイシン Leu (0.98ppm)、バリン Val (1.02ppm)、アラニン Ala (1.48ppm)、オルニチン Orn (1.70 と 2.95ppm)、グルタミン酸 Glu (2.08 と 2.32ppm)、フェニルアラニン Phe (7.33ppm)、有機酸のリンゴ酸 (2.65ppm) とフマル酸 (6.50ppm)、糖類のトレハロース (3.47 と 5.20ppm) とマンニトール (3.91ppm) およびレンチニン酸 (3.30ppm) とコリン (3.19ppm) であ

り、帰属が不確定のものは Uk1 (1.90ppm)、Uk2 (2.11ppm)、Uk3 (2.41ppm)、Uk4 (3.21ppm) と Uk5 (8.24ppm) であった。これらのトレーニング試料の平均値と標準偏差および平均値の差の検定結果を Table 6 に示した。中国産はレンチニン酸、コリン、帰属不明 Uk1 (1.90ppm) が有意に高くやや日本産との違いがみられた。

これら 21 シグナルを変数として多変量解析を行なった結果を Table 7 に示した。トレーニング試料の主成分分析により抽出された固有値 >1.0 の主成分は 3 主成分でその寄与率はそれぞれ 71.4、11.2、7.0% で累積寄与率は 89.6% であった。判別分析の結果、選択された変数は PC2 と PC3 (累積寄与率 18.2%) であった。判別的中率は 88.2%、誤判別の確率は 21.6%、相関比は 0.40 と分析精度は良くなく、テスト試料 A、B、C 18 試料の判別の中率も 61.1% (誤判別 7 試料) で適合性も良いとはいえなかった。そこで固有値 0.71 の PC4 を加えて (PC2、PC3、PC4 累積寄与率 21.6%) 判別分析を行った。判別の中率は 88.2%、誤判別の確率は 15.2%、相関比は 0.54 とやや改善された。これによるテスト試料 A、B、C 18 試料の判別の中率は 83.3% (誤判別 3 試料) であった。ブラインド試料 A の判別結果は 3 試料を誤判別し判別の中率は 62.5%、試料 B の 7 試料の判別の中率は 85.7%、全体では 78.8% であった。

主成分負荷量の散布図 (Fig. 7) をみると PC2 は正に Uk3 が、負にレンチニン酸が相関し、PC3 は正に Uk4 が、負にトレハロース 1、2 が相関し判別に寄与していると考えられる。また、PC4 は強く相関するものはないが判別精度をある程度上げる因子となっていると考えられる。PC2 と PC3 に対する主成分得点の散布図 (Fig. 8) をみると中国産の C3 と C5 が日本産群と重なっており、また、PC2、PC3 および PC4 の主成分得点を基にしたクラスター分析によって得られた樹形図 (Fig. 9) をみて

も、日本産と中国産の2大クラスターに分離していないことから分析精度が必ずしも良くないことが分かる。

今回の解析結果は分析精度において化学分析による成分を変数にした場合に比べ劣っていたが、判別の一次スクリーニングとしての有効性は示された。分析精度のよい判別関数が得られなかったのはNMRそのものの分解能に関連しており、成分特性シグナルの重なり、特にアミノ酸類のシグナルが糖類と重なり化学分析により得られる成分数（変数の数）まで取り出すことができなかつたことが大きな要因であると考えられる。従って今回使用したものより分解能の高い装置（例えば800MHz）による解析から得られるより多くのシグナルを用いることにより分析精度を高めることは可能であり、本研究により乾シイタケの ^1H NMRスペクトルから抽出したシグナルを用いての判別の簡易法としての有効性を示すことができた。

第3節 要約

乾シイタケの ^1H NMRスペクトルの多数のシグナルを変数とした多変量解析即ち主成分分析と判別分析手法による産地判別を試み、簡易法としての有効性を検討した。化学的分析による分析値を用いる場合に比べ、その分解能が低いことも一因し、分析精度の良い判別関数を得ることはできなかつた。しかし、高分解能装置の利用などさらに改善の余地はあり、産地判別の簡易法としての有効性を示すことができた。

第3章 乾シイタケのDNA解析による種菌および産地の判別

第1節 試料および方法¹¹⁰⁻¹¹¹⁾

1-1. 試料

DNA解析に用いた試料は第1節 1-1で用いた種菌の明かな日本産原木栽培品9試料(J1; 森MM1、J2; 森121、J3; 森290、J4; 森ゆう次郎、J5; 秋山817、J6; 秋山567、J8; 菌興115、J9; 菌興241、J10; 菌興368,)と新たな菌床栽培品3試料(J11; 森MA1、J12; 松原清流、J13; 北研600)、種菌が不明の中国産原木栽培品6試料(C1~C6)および菌床栽培品1試料(Cj)と中国上海市内購入の種菌および栽培法不明の9試料(Ca~Ch)、ブラインド試料Aの日本産原木栽培品4試料(U1、U2、U4、U6)と中国産原木栽培品2試料(U3、U7)および菌床栽培品2試料(U5、U8)の合計36試料である。

1-2. 方法

1-2-1. DNAの抽出

シイタケ子実体の菌褶部約30mgを酵素溶液SCE* 0.5ml、Zymolyase1000-T 1ml、Chitinase-GODO 5ml(生化学工業)中で24時間インキュベート(室温)。Proteinase K(Promega SP. Act.>30u/mg) 50mg、10% SDS 5 μ lを加え、55°Cで3時間インキュベート。10,000rpm 5分間の遠心(室温)。水相400 μ lを200 μ lずつ2本の新しい1.5mlチューブに移し、等量のフェノール・クロロホルム混合液を加え転倒混和(5分間)。15,000rpm 5分間の遠心(室温)。水相を新しいチューブに移し、3M酢酸ナトリウム20 μ l、ethachinmate(日本ジーン)2 μ l、エタノール500 μ l(2.5倍量)を加え、転倒混和した後、-80°Cで30分間、-20°C

で 60 分間静置。15,000rpm 5 分間遠心 (4°C)。上清を捨て 70%エタノールを加え、15,000rpm 2 分間遠心 (2°C)。沈殿物を凍結乾燥。乾燥試料を 200 μ l の TE に溶解。QIAamp DNA Blood mini kit (キアゲン) を用い、血液および体液からのスピンプロトコールに従って精製し、Tris buffer-EDTA 混液 (pH7.0~8.0) 50 μ l で DNA を溶出。

* SCE の組成 : 1 M ソルビトール、0.1M クエン酸ナトリウム、
10mM EDTA (pH5.8)

1-2-2 Inter-SSR(Simple Sequence Repeats) PCR 法

a. Inter-SSR PCR 反応液組成

PCR 反応液 : 20 μ l、鋳型 DNA : 約 20ng、d-NTP : 各 100 μ M (最終濃度)、
プライマー : 1 μ M (最終濃度)、Taq DNA polymerase (BOEHRINGER
MANNHEIM) : 1 μ unit、PCR reaction buffer (BOEHRING MANNHEIM) :
2 μ l

b. プライマー

SSR4(GACA)₄、SSR5(ACTG)₄、SSR9(ATCC)₄、SSR11(AGAC)₄

c. PCR 温度条件

95°C - 3 分の後、(95°C - 1 分、45°C - 1 分、70°C - 5 分) を 35 回、
最後に 70°C - 3 分 : 使用機器 ; GeneAmp PCR System 9600(Perkin Elmer)

d. 電気泳動および検出

PCR 産物 5 μ l を 8%ポリアクリルアミドゲルにアプライし、200V の定電圧で 1 時間電気泳動の後、エチジウムブロマイドにより染色し UV 照射下で検出

1-2-3 rDNA PCR 法

a. 反応液組成

PCR 反応液 : 25 μ l (鋳型 DNA : 2.0 μ l、 10 \times Taq Polymerase Buffer
2.5 μ l、 25 mM MgCl₂ 1.5 μ l、 10mM 各 d NTP * 0.4 μ l、 primer
sense (25pmol/ μ l) 0.3 μ l、 primer antisense (25 pmol/ μ l) 0.3 μ l、
Taq DNA polymerase (5U/ μ l) 0.15 μ l、 MQ 17.85 μ l)

*10mM dATP、 dTTP、 dGTP、 dCTP

b. プライマー

PCR primer : *S. Cerevisiae* の塩基配列に基づく配列

Small subunit;

SSJ 5'-CTGGTTGATCCTGCCAGTAG forward primer

SST 5'-ACGGAACCTTGTTACGACT reverse primer

large subunit;

LS1 5'-AGTACCCGCTGAACTTAAG forward primer

LSD 5'-GGAACCTTCCCCACTTC reverse primer

ITS 領域

IT5 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG forward primer

IT4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC reverse primer

c. PCR 温度条件

95 $^{\circ}$ C - 3 分後、 (94 $^{\circ}$ C - 0.5 分、 53 $^{\circ}$ C - 0.5 分、 72 $^{\circ}$ C - 1 分) を 40 回、
最後に 72 $^{\circ}$ C - 3 分 : 使用機種 ; Perkin Elmer 2400

d. シークエンス解析

sequence primer

b. の primer および

SS2 5'-AATTCCAGCTCCAATAGCGT、 SS3 5'- TCAGCCTTGCGACCATACTC

SS7 5'-ACTTTCGATGATGTTTGGGTAGT、 SSU 5'-GTAATTCCAGCTCCAATAGC

SSG 5'-CCAAGAATTTACCTCTGAC、 SS5 5'-GTGCTGGGGATAGAGCATTG

SS6 5'-CAATGCTCTATCCCCAGCAC、SS8 5'-CATCGAAAGTTGATAGG

ITS3 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC、ISC 5'-GCCTTAGTAACGGCGAGTG

LS4 5'-TTGTGCGCTATCGGTCTC

Thermo Sequenase II dye terminator cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech) でシーケンス解析を行なった。

1-3 多変量解析

PCR 法によって得られた塩基配列の多型パターンを林の数量化Ⅲ類により試料の類似性を得点化し、相関係数 >0.5 の軸を用いて⁹⁶⁾クラスター分析を行ない、試料間の類似性について検討した。

統計ソフトは EXCEL 多変量解析 Ver 4.0 および EXCEL 数量化理論 Ver 1.0 (株式会社 エスミ) を用いた。

第2節 結果および考察

第1項 Inter-SSR PCR 法による多型パターンの分類

1-1 2種類のプライマーによる分類

Fig. 10 に SSR5 の電気泳動パターンを示した。SSR4 は4バンド、SSR5 は5バンドが識別された。結果を Table 8 に示した。日本産 12 試料は 10 タイプ、中国産 16 試料は 7 タイプに分類され、日本産および中国産 28 試料では 15 タイプに分類された。これらの数量化Ⅲ類による各試料の類似得点をもとにクラスター分析を行なった結果を Fig. 11 に示した。上記のように最大 15 クラスターに分類される。日本産原木栽培品の森 MM1 (J1) と菌興 241 (J9) は中国産原木栽培品 C1、C3、C5、C6 と栽培法不明 Ca、Cc、Cd、Ce、Ch との大きな一つのクラスター (T1) は、T6 (森ゆう次郎 (J4) と菌興 368 (J10)) と T12 (日本産菌床栽培品松原

清流 (J2)) および T7 (原木栽培品森 121 (J3)) が連結し、更に T3 (日本産菌床栽培品北研 600 (J13) と中国産 (Cf)) と T8 (森 290 (J3))、T14 (中国産 (Cb)) が連結する。即ち日本産 12 試料中 8 試料、66.7%、中国産 16 試料中 11 試料、68.8%がこのクラスターに含まれる。このクラスターより遠い位置に日本産原木栽培品の秋山系 T4 (J5)、T13 (J6) および中国産の残りのものがそれぞれサブクラスターを形成している。また、Table 8 に示したようにブラインド 8 試料の解析結果をみると、中国産 U5、U7、U8 がタイプ 1 に、日本産 U1 がタイプ 8 に更に日本産 U2、U6 がタイプ 10 に分類され、新たにタイプ T16 に中国産 U3 とタイプ T17 に日本産 U1 が分かれた。これらの試料を含めたクラスター分析の結果を Fig. 12 に示した。新たなタイプ T16 (中国産 U3) は日本産と中国産の混在する最大クラスター T1 に連結しており、この試料を第 1 章で日本産と誤判別したと何らかの関連があるのではないかと考えられる。

1-2 4 種類のプライマーによる分類

1-1 の SSR4 および SSR5 に加え SSR9 (1 バンド)、SSR11 (1 バンド) を加えて解析した結果を Table 8 に示した。ここでは日本産 J4 と J10 が分かれ全体で 16 タイプに分類された。

これらの数量化Ⅲ類による各試料の類似得点についてクラスター分析を行なったが、前記のように最大 16 クラスターに分類され、形成されたサブクラスター間の関係は第 1 項の結果とほぼ同じであった。

第 2 項 r DNA の多型パターンによる分類

r DNA の塩基配列パターンは Table 9 に示したように 9 タイプ (A~I) に分類された。タイプ A は日本産森系 (J1、J2、J4) および秋山系 (J8)

と中国産 8 試料が含まれる最も大きなグループとなっている。タイプ D も日本産菌興系 (J9) は森系 (J1) と分かれ中国産 3 試料と混在するタイプ D となった。

第 3 項 Inter - SSR PCR 法と rDNA の多型パターンによる分類

Inter - SSR PCR 法と rDNA の多型パターンを組合せた結果を Table 10 に示した。日本産 12 試料は 12 タイプ、中国産 16 試料は 9 タイプにそれぞれ分かれ、全体では 19 タイプに分類された。複数の試料が混在するのは日本産原木栽培品森系 (J1) と中国産原木栽培品で江西省の C1、C3、C5 および栽培法・種菌不明の 3 試料のタイプ T1、菌興系 (J9) と中国産産地 (上海市購入 Cd、Ce)・種菌不明の 3 試料のタイプ T2 であった。クラスター分析による樹形図 (Fig. 13) をみると森系の T1 (J1)、T9 (J4)、T10 (J2) はより近接するクラスターを形成し、中国産の一部を含んでおり、また、他の日本産種菌試料もそれぞれ中国産試料と連結するものがみられた。

日本におけるシイタケの品種は種菌業者により市販されているだけでも 115 種¹¹²⁾、種苗法による登録数¹¹³⁾も 92 種を数えるなど多様である。これらは栽培される地理的・気候的条件や生育経過など用途により全国的に分布している。また、当然ながら中国においては独自の種菌による栽培が行なわれている。しかし、日本からの育種技術の導入と併せ国内の優良種菌が持ち込まれており、それが単独で使用されたり、交配による新種の作出が行なわれていると考えられる。中国側の資料には菌興 241 および森系統の使用が明記されており⁶⁻⁸⁾、また、日本のシイタケ栽培関係者による中国のシイタケ栽培視察報告書¹¹⁴⁾にも更に北研 (株) や富士種菌 (株) の種菌系が導入されている実情が明らかにされており、

本研究による Inter - SSRP RCR 法および r-DNA の解析結果からみても日本の種菌が広範囲に使用されその製品が日本に逆輸入されていることが強く示唆される。また、現在、国内のシイタケ消費市場は中国への原木栽培用の原木の輸出や中国で調製した植菌済みの菌床の輸入⁹⁾など益々混迷の状況を生み出しているともいわれており、日本産と中国産の識別を更に難しくさせていくものと考えられる。

第3節 要約

乾シイタケ子実体の菌褶部から抽出した DNA に対する Inter - SSR PCR 法および r DNA の多型パターンの解析により、2種類のプライマーを用いた Inter-SSR PCR 法による多型パターンからは 17 タイプ、4種類のプライマーを用いた Inter - SSR PCR 法による多型パターンからは 16 タイプ、r DNA の多型パターンからは 9 タイプ、Inter - SSR PCR 法と r DNA との多型パターンの組合せからは 19 タイプに分類することができた。特に日本産の種菌の明らかな 12 種類は 12 タイプに完全にわかれ種菌レベルでの分類はある程度可能であることが分かった。また、数量化Ⅲ類とクラスター分析によりこれらのタイプ間の類似性を考察し、種菌の明かでない中国産の試料についてもこの DNA 解析によるタイプ分類から中国内生産地間の関係および日本産との類縁関係を推定できる結果を得た。

第4章 マツタケの遊離アミノ酸とミネラル組成に基づいた産地—日本産、中国産、韓国産—の判別

第1節 試料および方法¹¹⁵⁾

1-1 試料

試料は Table 11 に示したように、1993年から1995年に東京築地市場で、また、日本産および韓国産の一部は現地で入手した日本産13試料、韓国産13試料、中国産10試料およびカナダ産5試料を用いた。各試料は入手直後に一部は水分の測定を行い、残りは真空凍結乾燥し、遊離アミノ酸およびミネラルの分析試料とした。

1-2. 成分分析

遊離アミノ酸およびミネラルの分析は第1章 第1節 1-2-1および1-2-2の項と同じ。

1-3. 多変量解析

多変量解析は第1章 第1節 1-3と同様、主成分分析により変数の縮約を先行させ2群判別は線形判別分析(LDA)をまた3ないし4群判別については正準判別分析(Canonical Discriminant Analysis CDA)により実行した。使用した統計ソフトは第1章 第1節 1-3と同じである。

解析の変数として遊離アミノ酸はアスパラギン酸 Asp、スレオニン Thr、セリン Ser、アスパラギン Asn、グルタミン酸 Glu、グルタミン Gln、プロリン Pro、グリシン Gly、アラニン Ala、バリン Val、シスチン Cys、メチオニン Met、イソロイシン Ileu、ロイシン Leu、チロシン

Tyr、フェニルアラニン Phe、トリプトファン Trp、リジン Lys、ヒスチジン His、アルギニン Arg、オルニチン Orn の 21 種類およびミネラルは Na、K、Ca、Mg、P、Fe、Cu、Zn および Mn の 9 種類を用いた。

第 2 節 結果および考察

解析に用いた同一種とみなされる日本、中国および韓国産のマツタケの遊離アミノ酸 21 種類とミネラル 9 種類の含有量の平均値、標準偏差、一元配置による分散分析 (ANOVA) および最小有意差検定 (LSD) 結果を Table 12 に示した。日本産は遊離アミノ酸の Pro、Trp、Arg および Orn の含有量が高く、中国産は遊離アミノ酸の Gln、Pro および Gly とミネラルの Ca、Fe および Mn の含有量が高く、韓国産は Gln、Gly および Arg とミネラルの Fe と Mn の含有量が高い傾向にあった。

第 1 項 2 群判別

日本産 13 試料、中国産 10 試料および韓国産 13 試料をトレーニング試料として用いた。解析の結果を Table 13 に示した。

1-1. 日本産と中国産の判別

A. 遊離アミノ酸を変数とした場合

主成分分析によって抽出された固有値 >1.0 の主成分は 5 主成分でその寄与率はそれぞれ 33.7、20.3、13.6、9.5 および 7.7% でその累積寄与率は 84.7% であった。判別分析の結果、選択された主成分は PC2、PC3 および PC4 (累積寄与率 43.4%) であった。判別的中率は 95.6%、誤判別の確率は 3.0%、相関比は 0.79 で良い分析精度であった。

B. ミネラルを変数とした場合

主成分分析によって抽出された固有値 >1.0 の主成分は3主成分でその寄与率はそれぞれ41.9、22.2および11.3%で累積寄与率は75.5%であった。判別分析の結果、選択された変数はPC1、PC2およびPC3（累積寄与率75.5%）であった。判別的中率は95.7%、誤判別の確率は8.1%、相関比は0.68で良い分析精度であった。

C. 遊離アミノ酸およびミネラルを変数とした場合

主成分分析によって抽出された固有値 >1.0 の主成分は7主成分でその寄与率は28.1、19.2、13.1、9.2、6.3、5.9および4.9%で累積寄与率は87.0%であった。判別分析の結果、選択された変数はPC1、PC2およびPC4（累積寄与率56.5%）であった。判別的中率は100%、誤判別の確率は2.5%、相関比は0.80で良い分析精度であった。

1-2. 日本産と韓国産の判別

A. 遊離アミノ酸を変数とした場合

主成分分析によって抽出された固有値 >1.0 の主成分は5主成分でその寄与率はそれぞれ49.3、15.0、8.2、7.1および4.8%で累積寄与率は84.5%であった。判別分析の結果、選択された変数はPC2とPC3（累積寄与率23.2%）であった。判別の中率は80.8%、誤判別の確率は21.4%、相関比は0.40で良い分析精度とはいえなかった。

B. ミネラルを変数とした場合

主成分分析によって抽出された固有値 >1.0 の主成分は3主成分でその寄与率は34.7、21.0および17.2%で累積寄与率は72.9%であった。判別分析の結果、選択された変数はPC1とPC3（累積寄与率57.5%）で

あった。判別的中率は 73.1%、誤判別の確率は 30.3%、相関比は 0.22 で良い分析精度とはいえなかった。

C. 遊離アミノ酸およびミネラルを変数とした場合

主成分分析によって抽出された固有値 >1.0 の主成分は 7 主成分で寄与率はそれぞれ 38.4、15.4、12.0、6.9、6.5、4.0 および 3.4% で累積寄与率は 86.6% であった。判別分析の結果、選択された変数は PC2、PC4 および PC7 (累積寄与率 25.7%) であった。判別の中率は 88.5%、誤判別の確率は 11.0%、相関比は 0.62 でやや良い分析精度であった。

1-3. 中国産と韓国産の判別

A. 遊離アミノ酸を変数とした場合

主成分分析によって抽出された固有値 >1.0 の主成分は 4 主成分でその寄与率はそれぞれ 54.3、11.3、10.0 および 6.2% で累積寄与率は 81.9% であった。判別分析の結果、選択された変数は PC3 と PC4 (累積寄与率 16.2%) であった。判別の中率は 60.9%、誤判別の確率は 35.4%、相関比は 0.13 であり、良い分析精度とはいえなかった。

B. ミネラルを変数とした場合

主成分分析によって抽出された固有値 >1.0 の主成分は 3 主成分でその寄与率はそれぞれ 32.6、24.7 および 15.6% で累積寄与率は 73.0% であった。判別分析の結果、選択された変数は PC2 と PC3 (累積寄与率 40.3%) であった。判別の中率は 65.2%、誤判別の確率は 31.8%、相関比は 0.19 で良い分析精度とはいえなかった。

C. 遊離アミノ酸およびミネラルを変数とした場合

主成分分析によって抽出された固有値 >1.0 の主成分は 6 主成分でその寄与率はそれぞれ 42.9、15.4、8.6、7.9、5.8 および 4.0% で累積寄与率は 84.4% であった。判別分析の結果、選択された変数は PC4、PC5 および PC6 (累積寄与率 17.7%) であった。判別的中率は 73.1%、誤判別の確率は 25.9%、相関比は 0.31 で良い分析精度とはいえなかった。

第 2 項 3 群判別

日本産 13 試料、中国産 10 試料および韓国産 13 試料をトレーニング試料として用いた。解析の結果を Table 14 に示した。

2-1 日本産、中国産および韓国産の判別

A. 遊離アミノ酸を変数とした場合

主成分分析によって抽出された固有値 >1.0 の主成分は 4 主成分でその寄与率はそれぞれ 45.9、13.6、8.7 および 8.6% で累積寄与率は 77.1% であった。変数群間に等分散・共分散性が成立せず正準判別分析による有効な変数を見出すことはできなかった。

B. ミネラルを変数とした場合

主成分分析によって抽出された固有値 >1.0 の主成分は 3 主成分でその寄与率はそれぞれ 32.9、20.2 および 17.5% で累積寄与率は 70.6% であった。正準判別分析の結果、選択された変数は PC1 と PC3 (累積寄与率 40.4%) であった。正準相関は第 1 軸に対しては 0.64、第 2 軸には 0.006 であった。判別的中率は群 1 (日本産) は 76.9%、群 2 (中国産) は 70.0%、群 3 (韓国産) は 46.2% で、全体では 63.9% であった。

C. 遊離アミノ酸およびミネラルを変数とした場合

主成分分析によって抽出された固有値 >1.0 の主成分は7主成分でその寄与率はそれぞれ 34.9、15.2、12.0、7.2、6.5、4.6 および 3.5%で累積寄与率は 83.9%であった。正準判別分析の結果、選択された変数は PC2、PC4、PC6 (累積寄与率 27.0%) であった。正準相関は第1軸に対しては 0.85、第2軸には 0.21 であった。判別的中率は群1 (日本産) は 92.3%、群2 (中国産) は 90.0%、群3 (韓国産) は 53.8%で、全体では 77.8%で良い分析精度であった。

2群および3群判別ともに遊離アミノ酸とミネラルを変数とした場合が最も良い判別関数を得ることができた。2群判別では日本産と中国産との間の判別が最も良く、中国産と韓国産との間の判別が悪かった。これは韓国産マツタケの成分組成が日本産と中国産マツタケのそれぞれに近いものであることを示していると考えられる。日本産と中国産との間について線形判別分析によって選択された PC1 と PC2 および PC2 と PC4 に対する主成分得点の散布図 (Fig. 14) をみると日本産の J3 と J4 (Fig. 14a)、J2 と J8 (Fig. 14b) が中国産群に重なっていたり近接しておりやや判別関数の適合性に問題を残すところである。これに対して正準判別分析を用いた3群判別によって得られた判別得点 (正準変量) CV1 と CV2 の散布図 (Fig. 15) みると日本産と中国産は CV1 に対して正と負に明確に分かれ、韓国産は日本産と中国産に一部重なるが原点周辺に第3群として分布していることがわかる。従って、日本産と中国産の判別には線形判別分析による2群判別法よりも正準判別分析による3群判別法を用いる方が有効であると考えられる。

また、カナダ産と日本、中国および韓国産との関係について正準判別分析による4群判別として解析した結果は、遊離アミノ酸とミネラルを

変数とした場合に判別関数が得られ、主成分分析によって抽出された固有値 > 1.0 の主成分は7主成分でその寄与率はそれぞれ 39.0、13.8、11.2、7.1、5.6、4.3 および 3.4%、累積寄与率は 84.4%であった。正準判別分析によって選択された変数は PC 2、PC 4 および PC 6（累積寄与率 25.2%）であった。判別率の割合は群 1（日本産）92.3%、群 2（中国産）90.0%、群 3（韓国産）15.4% および 群 4（カナダ産）60.8%、全体で 63.4%であり、カナダ産は中国産とは重なることはないがその多くは韓国産と重なり、一部日本産と重なっていた。

第3節 要約

日本産と日本の市場に広く出回っている代表的な中国、韓国およびカナダ産マツタケについて、先ず、やや形態的に異なるが同一種 (*Tricholoma matsutake* S. Ito & Imai, Sing.) であるとされている日本、中国および韓国産の産地判別が可能であるかどうかを目的に第1章で用いた主成分分析 (PCA) - 線形判別分析 (LDA) および正準判別分析 (CDA) により行なった。また、同様に種の異なるカナダ産 (*Tricholoma ponderosum*) について正準判別分析を行ない前3か国産との関係を検討した。

日本、中国および韓国産マツタケの判別において2群および3群ともに有効な判別関数を得ることができた。2群判別の結果は日本産と中国産については明確に判別できるが、韓国産は日本産および中国産と一部重なり明確な判別は困難であった。3群判別の結果は同様に日本産と中国産は明確に分かれたが韓国産は中国産との重なりが大きく、また一部日本産との重なりがみられた。特に、日本産と中国産との判別については2群判別よりも3群判別法を用いる方がより有効であることが示され

た。カナダ産は中国産とは明確に分かれたが、韓国産および日本産との重なりがみられた。

第5章 生シイタケの遊離アミノ酸、レンチニン酸およびミネラル組成 に基づいた異なる栽培法—原木栽培品と菌床栽培品—の判別

第1節 試料および方法¹¹⁶⁾

1-1. 試料

試料の生シイタケは1988年から1990年に国内各生産地で生産されたもので原木栽培品は北海道4、岩手県2、福島県3、群馬県3、栃木県3、千葉県1、静岡県2、岐阜県3、三重県1、兵庫県2、徳島県3、大分県3の33試料、菌床栽培品は宮城県2、福島県3、新潟県3、群馬県3、富山県1、福島県3、岡山県3、島根県3の21試料をそれぞれ生産者より入手した。各生産者よりクール宅配便で送られたものを一部は水分測定用試料とし、残りを直ちに真空凍結乾燥して粉碎し成分分析用試料とした。

1-2. 成分分析

遊離アミノ酸、レンチニン酸およびミネラルの分析は第1章 第1節 1-2の項に同じ。

1-3. 統計解析

統計解析は第1節 1-3.の項に同じである。

解析の変数として遊離アミノ酸はアスパラギン酸 Asp、スレオニン Thr、セリン Ser、アスパラギン Asn、グルタミン酸 Glu、グルタミン Gln、プロリン Pro、グリシン Gly、アラニン Ala、バリン Val、イソロイシン Ile、ロイシン Leu、チロシン Tyr、フェニルアラニン Phe、リジン Lys、ヒスチジン His、アルギニン Arg、 γ -アミノ酪酸 γ -Aba、オル

ニチン Orn の 19 種類、レンチニン酸およびミネラルは Na、K、Ca、Mg、P、Fe、Cu、Zn および Mn の 9 種類を用いた。

第 2 節 結果および考察

多変量解析にあたり原木栽培品 33 試料および菌床栽培品 21 試料から無作為にそれぞれ約 1/5 にあたる 6 試料と 4 試料を取りだしテスト試料とした。

トレーニング試料の遊離アミノ酸、レンチニン酸およびミネラル含有量の平均値、平均偏差および平均値の差の検定結果を Table 15 に示した。遊離アミノ酸は原木栽培品では総含有量、Thr、Glu、Gln、Gly、Val、Ileu、Leu、Tyr、Phe および His とレンチニン酸が、菌床栽培品では Asn と γ -Aba が有意に高かった。ミネラルは原木栽培品では Ca と Cu が、菌床栽培品では総含有量、K、P および Zn が有意に高く原木栽培品と菌床栽培品との間に成分組成の差異が見られた。

2-1 遊離アミノ酸を変数とした場合

主成分分析により抽出された固有値 >1.0 の主成分は 5 主成分でその寄与率はそれぞれ 36.6、14.9、12.3、6.7、5.6% で累積寄与率は 76.2% であった。しかし、等分散性が成立せず有効な判別関数を得ることは出来なかった。

2-2 遊離アミノ酸とレンチニン酸を変数とした場合

トレーニング試料の主成分分析によって抽出された固有値 >1.0 の主成分は 5 主成分でその寄与率は 36.8、14.2、11.9、6.7 および 5.6% で累積寄与率は 75.2% であった。しかし、等分散性が成立せず有効な判別

関数を得ることは出来なかった。

2-3 ミネラルを変数とした場合

トレーニング試料の主成分分析によって抽出された固有値 >1.0 の主成分は3主成分でその寄与率はそれぞれ 29.5、23.8 および 14.6%で累積寄与率は 67.9%であった。判別分析の結果、選択された変数は PC1 と PC2 (累積寄与率 53.3%) であった。判別的中率は 86.4%、誤判別の確率は 13.6%、相関比は 0.55 であまり良い分析精度とはいえなかった。また、テスト試料の判別結果は原木栽培品を全て菌床栽培品と誤判別し判別の中率は 20.0%で適合性も悪かった。

2-4 アミノ酸、レンチニン酸およびミネラルを変数とした場合

トレーニング試料の主成分分析によって抽出された固有値 >1.0 の主成分は8主成分で寄与率はそれぞれ 27.9、14.1、10.1、8.1、5.5、4.5、4.2 および 3.6%で累積寄与率は 78.0%であった。判別分析の結果、選択された変数は PC1 と PC2 (累積寄与率 42.0%) であった。判別の中率は 100%、誤判別の確率は 0.88%、相関比は 0.85 で良い分析精度であった。テスト試料の判別結果は原木栽培品 2 試料を誤判別したが判別の中率は 80.0%であった。

判別分析によって選択された PC1 と PC2 における変数の主成分負荷量の散布図 (Fig. 16) をみると PC 1 は正に Leu、Phe、Ile、Gln が、負に γ -Aba が、PC 2 は正に Asn と K が強く相関し判別に寄与していると考えられる。トレーニング試料 40 試料の主成分得点の PC1 と PC2 に対する散布図 (Fig. 17) をみると原木栽培品は第 1、3、4 象限に広く分布し、菌床栽培品は第 2 と 3 象限に一群を形成し明確に分かれ判別が容易

である。従って得られた判別関数は有効であることが示され、その判別関数は $z = 3.0426 + 1.4826 \times \text{PC1 score} - 1.8371 \times \text{PC2 score}$ であった。

第3節 要約

第1章の乾シイタケの産地判別で有効であった多変量解析即ち主成分分析 (PCA) - 線形判別分析 (LDA) 手法を生シイタケについて異なる栽培法 - 原木栽培と菌床栽培 - の判別に適用し判別が可能かどうか検討した。遊離アミノ酸および遊離アミノ酸とレンチニン酸を変数とした場合は有効な判別関数は得られなかった。ミネラルを変数とした場合には判別関数は得られたがその分析精度および適合性が悪く有効な判別関数とはいえなかった。遊離アミノ酸、レンチニン酸およびミネラルの29成分を変数とした場合、主成分分析によって元の変数は8主成分に縮約され、PC1 と PC2 を変数とした判別関数 $z = 3.0426 + 1.4826 \times \text{PC1 score} - 1.8371 \times \text{PC2 score}$ が得られ、栽培法の違いを判別できることが示された。

第6章 総括

キノコ類、特に古来からの伝統的食材である乾シイタケは、食嗜好の変化によって生鮮シイタケへの需要が大幅に伸びるなかで、中国からの安価な輸入品により国内生産量は減少し、生産者の困窮はますます大きくなっているといわれている。しかし、国内生産者は生産物の品質向上を計りその差別化により消費拡大を目指しており、輸入品との外観や含有成分などからのより客観的な品質評価や原材料の真偽鑑別を求めている。

本研究においては、乾シイタケの遊離アミノ酸、レンチニン酸およびミネラルの化学的成分組成に多変量解析即ち線形判別分析(LDA)を適用し原産地(日本および中国)の判別が可能かどうかについて検討した。線形判別分析の適用にあたっては試料数と変数の数との十分条件を満たし、多重共線性の問題を回避するために主成分分析(PCA)により元の変数を縮約し、得られた主成分の主成分得点を新たな変数とする方法(PCA-LDA)によって解析を試みた。判別に有効な変数とそれに基づく判別関数を求めるために、トレーニング試料;標準試料を原木栽培品として日本産10試料と中国産7試料を用いた。判別関数の分析精度の評価は判別的中率、誤判別の確率および相関比を基に行なった。この判別関数の適合性の評価は外的評価法により行なった。即ち、テスト試料;産地の判別している18ないしは58試料の判別的中率、ブラインド試料(産地が伏せられ解析後に明かにされたもの)8試料の判別的中率を基に行なった。その結果、遊離アミノ酸21種類、遊離アミノ酸21種類とレンチニン酸あるいはミネラル9種類をそれぞれ変数としても判別関数は得られたが、遊離アミノ酸21種類、レンチニン酸およびミネラル9種類の合計31変数を取りこんだ判別関数 $z = 1.1138 - 0.9248 \times \text{PC2 score} +$

1.1585×PC4 score が最も有効であると判断された。更にこの判別関数を別のブラインド試料 10 試料に適用しその判別率中率が 100%であったことから有効性を再確認できた。

乾シイタケの¹H NMR スペクトルから抽出した 21 シグナルに対して PCA-LDA 法を適用し日本産と中国産の簡易的産地判別について検討した。得られた判別関数は化学的分析値を用いた場合に比べ良い分析精度ではなかったが一次スクリーニング法としての有効性は認められた。今後、化学分析に対応するシグナルをより多数抽出すること（例えば、スペクトルの自動読み取り）や高分解能装置を用いたりすることで判別関数の分析精度を上げることが可能であり、試料調製の容易さと短時間の測定により食品の含有成分に帰属する多数のシグナルが得られる¹N NMR 解析の利点を生かした簡易法として有効であることを示唆することができた。

乾シイタケの菌褶部から抽出した DNA に対する Inter-SSR (Simple Sequence Repeats) PCR 法および rDNA の塩基配列パターンの解析を行ない種菌および産地の判別を検討した。Inter-SSR PCR 法によるプライマー-SSR 4 と SSR 5 の 2 種類の塩基の多型パターンからは日本産 12 種菌は 10 タイプに、種菌が明らかではない中国産 16 試料は 7 タイプに、全体で 15 タイプに分類された。

プライマー-SSR 9 と SSR 11 を加えた 4 種類の塩基の多型パターンからは更に重複していたものが分かれ全体で 16 タイプに分類された。rDNA の塩基の多型パターンからは日本産種菌は 6 タイプに、中国産は 6 タイプに全体で 9 タイプに分類された。Inter-SSR PCR 法と rDNA の塩基の多型パターンの組合せからは日本産種菌 12 種類は全て異なる 12 タイプに分かれ、中国産 16 試料は 9 タイプに、全体で 19 タイプに分類された。更に、これらの出現パターンを数量化Ⅲ類により得点化し、クラスター分

析を行ない種菌間および産地間の類縁関係について検討した。日本産では種菌レベルでの判別が可能であり、また系統の同じ種菌間の類縁性がみられた。中国産試料では、種菌は不明ではあるが中国の国内生産地間の類別が可能であると同時に日本の種菌との類似性が推察され日本からの種菌の移入が広く行われていることが強く示唆された。

乾シイタケの産地判別に適用した化学的成分組成への主成分分析 (PCA) - 線形判別分析および正準判別分析 (LDA および CDA) およびクラスター分析 (CA) の多変量解析手法をマツタケ 4 産地の判別と生シイタケの異なる栽培法の判別に適用し、この手法の汎用性を検討した。

マツタケの産地判別は日本、中国、韓国およびカナダ産試料の遊離アミノ酸とミネラルを変数として 2 群判別は線形判別分析、3 群および 4 群判別は正準判別分析を適用した。判別の変数は遊離アミノ酸 21 種類とミネラル 9 種類の 30 変数を用いる場合が最も良い判別関数を得ることができた。分類学上同一種とみなされる日本、中国および韓国産の試料は 2 群および 3 群判別ともに日本産と中国産は明確に判別されたが、韓国産は日本産と中国産の群に一部重なり明確な判別は困難であった。また、日本産と中国産との判別には正準判別分析による 3 群判別法の方がより明確な判別が可能であることが示された。種の異なるカナダ産は中国産とは明確に判別され、日本および韓国産とは近接するか一部重なり判別はやや困難であった。

生シイタケの異なる栽培法の判別は遊離アミノ酸 19 種類とレンチニン酸およびミネラル 9 種類の 29 変数を用いる場合が最も良い判別関数
$$z = 3.0426 + 1.4826 \times \text{PC1 score} - 1.8371 \times \text{PC2 score}$$
 が得られ、原木栽培品と菌床栽培品を明確に判別できた。

これらのことよりキノコ類の化学的成分組成に基づいた主成分分析

(PCA) - 判別分析 (LDA および CDA) 法による原産地や栽培法の判別が可能であることを示すことができた。

謝 辞

終わりに臨み、本研究に関し、ご指導賜りました農学博士 菅原龍幸
女子栄養大学教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文をまとめるにあたり、NMR 解析をはじめ多くのご助言を賜りま
した理学博士 立屋敷哲女子栄養大学助教授に心から感謝致します。

常にご協力戴きました農学博士 青柳康夫女子栄養大学短期大学部教
授、博士（栄養学）佐々木弘子女子栄養大学専任講師、博士（栄養学）
根岸由紀子女子栄養大学栄養科学研究所専任講師に深く感謝致します。

また、DAN 解析にご協力戴きました（株）三菱化学ビーシーエルの島
津光伸氏、内藤嘉磯氏および戸澤史子女史に感謝致します。

実験にご協力戴きました生物無機化学研究室の刈屋妙子さんをはじめ
食品化学研究室の卒業研究生および栄養科学研究所の皆様感謝致しま
す。

最後に本研究で用いた乾シイタケをご恵与いただきました日本特用林
産振興会および日本原木乾しいたけを進める会に感謝致します。

参考文献

- 1) 中村克哉：シイタケ栽培の史的研究，東宣出版，p.502 (1983)
- 2) 菅原龍幸編：キノコの科学，朝倉書店，p.198 (1997)
- 3) きのこ年鑑編集部編：2000 年版きのこ年鑑，農村文化社，p.401
(2000)
- 4) 日本特用林産振興会編：菌床によるきのこ栽培の現状—子実体・培
地成分と経営分析，p.236 (1991)
- 5) 黄年来主編：中国食用菌百科，農業出版社，p.448 (1993)
- 6) 潘崇環 編著：新編香菇 優質高産栽培技術中国農業出版社 p. 144

(1998)

- 7) 季長喜・季 巨・楊瑛霞 編著：香菇優質高產栽培新技術 中原農民出版社 p.174 (1998)
- 8) 要身茂・王松・ 編著：香菇栽培新法 p. 153, 中国農民出版社 (1999)
- 9) 日本特用林産振興会： 特用林産物海外事情調査－中国におけるきのこの生産・流通事情－ p. 22 (1999)
- 10) 特産情報：12, 農村文化社 (2000.5)
- 11) 日本特用林産振興会編：平成 10 年度高品質・高収量きのこの種菌開発事業成果概要, 3(1999)
- 12) 農林水産省：農林水産省告示 第 1452 (1996)
- 13) 特産情報：農村文化社, 13 (1999.10)
- 14) 青柳康夫, 佐々木弘子, 菅原龍幸：農化, 54, 253 (1980)
- 15) 阿部宏喜, 後藤砂智子, 青山昌照：栄養と食糧, 33, 169 (1980)
- 16) 倉沢新一・菅原龍幸・林 淳三：日食工誌, 29, 400 (1982)
- 17) 吉田博, 菅原龍幸, 林淳三：日食工誌, 29, 451-459 (1982)
- 18) 佐藤恵理・青柳康夫・菅原龍幸：日食工誌, 32, 509 (1985)
- 19) 数野千恵子・西島基弘・天川英子・坂井千三・鴨居郁三：日食工誌, 34, 42 (1987)
- 20) 川井英雄, 菅原龍幸, 藤代聡子, 松沢睦子, 青柳康夫, 細貝祐太郎：日食工誌, 37, 468 (1990)
- 21) 桐渕壽子：42, 415 (1991)
- 22) 関沢憲夫, 遠山良, 関村照吉：日食工誌, 39, 72 (1992)
- 23) 吉田博, 佐々木弘子, 藤本水石, 菅原龍幸：日菌報, 37, 51 (1996)
- 24) 佐々木弘子：女子栄養大学栄養科学研究所年報, 4, 63 (1996)
- 25) 菅原龍幸・新井静子・青柳康夫・國崎直道：栄養と食糧, 128, 477

(1975)

- 26) 吉田 博, 林 淳三, 青柳康夫, 菅原龍幸: 日食工誌, 26, 221 (1979)
- 27) 吉田 博, 菅原龍幸, 林 淳三: 日食工誌, 26 (8) 32 (1979)
- 28) 奥崎政美・佐々木弘子・青柳康夫・菅原龍幸: 日本食生活学会誌,
7 (3), 58 (1996)
- 29) 春日敦子, 藤原しのぶ, 青柳康夫: 日食工誌, 46, 692 (1999)
- 30) 春日敦子, 藤原しのぶ, 青柳康夫: 日食工誌, 47, 347 (2000)
- 31) 青柳康夫, 春日敦子, 佐々木弘子, 松沢睦子, 伝川裕子, 川井英雄:
日食工誌, 40, 771 (1993)
- 32) 菅原龍幸・佐々木弘子・根岸由紀子・奥崎政美: 日本食生活学会誌,
9 (3), 33 (1998)
- 33) 藤原しのぶ, 春日敦子, 菅原龍幸, 橋本浩一, 清水豊, 中沢武, 青
柳康夫: 日食工誌, 47, 191 (2000)
- 34) Sugahara T., Sasaki H., Negishi Y. and Okuzaki M. :
日本食生活学会誌, (印刷中)
- 35) 奥崎政美, 菅原龍幸: 日本食生活学会第 20 回大会, (2000)
- 36) 日本水産学会編: 水産食品の鑑定, 恒星社厚生閣, p.130 (1979)
- 37) 相島鐵郎: ケモメトリックスー新しい分析化学, 丸善株式会社,
p.165 (1992)
- 38) 宮下芳勝, 佐々木慎一: ケモメトリックス 科学パターン認識と多
変量解析, 共立出版株式会社, p.188 (1995)
- 39) 田村真八郎, 大沢文江: 栄養と食糧, 22, 58 (1969)
- 40) 田村真八郎: 化学と生物, 17, 34 (1979)
- 41) 佐藤信: 化学と生物, 20, 390 (1982)
- 42) Brown S. D. : Anal. Chem. 62, 84 (1990)

- 43) Brown S. D., Bear R. S., Jr. Blank T. B.: *Anal. Chem.*, 64, 22 (1992)
- 44) Brown S. D., Blank T. B., Sum S. T. and Weyer L.G.: *Anal. Chem.*, 66, 315 (1994)
- 45) Brown S. D., Sum S. T., Despagne F.: *Anal. Chem.*, 68, 21 (1996)
- 46) Lavine B. K.: *Anal. Chem.*, 70, 209 (1998)
- 47) Etievant P., Schlich P., Bertrand A., Symonds P. and, Bouvier J-C. : *J. Sci. Food Agric.*, 42, 39 (1988)
- 48) Etievant P., Schlich P., Bouvier J-C., Symonds P. and Bertrand A.: *J. Sci. Food Agric.*, 45, 25 (1988)
- 49) Vogels, J. T. W. E., Tas, A. C., van den Berg, F. and van der Greef, J.A: *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems: Laboratory Information Manegement*, 21,21. 249 (1993)
- 50) Moret I., Scarponi G, and Cescon P.: *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1143. (1994)
- 51) Latorre M. J., Garcia-Jares C., Medina B. and Herrero C.: *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1451(1994)
- 52) Day M.P., Zhang B. and Martin G. J.: *J Sci. Food Agric.*, 67, 113 (1995)
- 53) Pena R. M., Latorre M. J., Garcia S., Botana A. M. and Herrero C.: *J. Sci. Food Agric.*, 79, 2052 (1999)
- 54) McRae K. B., Lidster P.D., DeMarco A. C., and Dick A.J.: *J. Sci. Food Agric.*, 50, 329 (1990)
- 55) Vogels, J. T. W. E., Terwel, L., Tas, A. C., van den Berg, F., Dukel, F. and van der Greef, J.: *J. Agric. Food Chem.*, 44, 175 (1996)

- 56) 金子勝芳, 長谷川美典, 矢野昌充 : 日本食品低温保存学会誌, 22, 235 (1996)
- 57) Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K. and Yano, M.: J. Agric. Food Chem., 47, 3565. (1999)
- 58) Favretto L. G., Marletta G. P., Bogoni P. and Favretto L.: Z. Lebensm Unters Forsch, 189, 123 (1989)
- 59) Vallejo-Cordoba, B. and Nakai, S. : J. Agric. Food Chem., 42, 9893 (1994)
- 60) Pham Anne-Marie, and Nakai S.: J. Dairy Sci., 67, 1390 (1984)
- 61) Rohm H. : Z. Lebensm. Unters. Forsch., 194, 527 (1992)
- 62) Frau M., Simal S., Femenia A., Sanjuan E. and Rossello C.: Eur. Food Res. Technol., 210, 73 (1999)
- 63) Alberghina G., Caruso L., Fisichella S. and Musumarra G.: J. Sci. Food Agric., 91, 445 (1991)
- 64) Shaw A. D., di Camillo A., Vlahov G., Jones A., Bianchi G., Rowland J. and Kell D.B.: Analytica Chimica Acta., 348, 357 (1997)
- 65) Sacchi R., Mannina L., Fiordiponti P., Barone P., Paolillo L., Patumi M. and Segre A. : J. Agric. Food Chem., 46, 3947 (1998)
- 66) Martin-Carratala, M. L., Llorens-Jorda C., Berenguer-Navarro V. and Grane-Teruel N.: J. Agric. Food Chem., 47, 3688 (1999)
- 67) Stefanoudaki, E., Kotsifaki, F., and Koutsaftakis, A. : J. Sci. Food Agric., 80, 381 (2000)
- 68) 飯山悟, 池田知宏, 都甲潔, 八尋美希 : 日食工誌, 44, 615 (1997)
- 69) 千葉実, 南澤正敏, 河野澄夫, 岩元睦夫 : 日食工誌, 42, 796 (1995)

- 70) Sacco A., Bolsi I. N., Massini R., Sgraul M., Humpfer E. and Ghelli S.: *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4242 (1998)
- 71) Anderson, K. A., Magnuson, B. A., Tschirgi, M. L. and Smith, B.: *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1568 (1999)
- 72) Crecente R. P., Latorre C. H.: *J. Agric. Food Chem.*, 41, 560 (1993)
- 73) Sanz, S., Perez, C., Herrera, A., Sanz, M. and Juan, T.: *J. Sci. Food Agric.*, 69, 135 (1995)
- 74) Martin G.J, Danho D. and Vallet C.: *J. Sci Food Agric.*, 56, 419 (1991)
- 75) 玉野まり子, 北村廣志, 佐々木裕, 番場康夫, 横山栄司, 田中季幸, 野田宏行 : *日食工誌*, 39, 357 (1992)
- 76) Kagawa M., Matsumoto M. and Hatae K. : *J. Home Econ. Jpn.*, 50, 1245 (1999)
- 77) Osama Al-Jowder, Defernez M., Kemsley K., Wilson E. R. H.: *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3210 (1999)
- 78) 津村明宏, 出島博文, 岡野敬一, 小堀和之 : *日食工誌*, 39, 60 (1992)
- 79) 松永孝光, 柴田清弘, 山田順一, 新村裕 : *日食工誌*, 46, 187 (1999)
- 80) Bossier P.: *J. Food Sci.*, 64, 189 (1999)
- 81) Carrera E., Garcia T., Cespedes A., Gonzalez I., Fernandez A., Hernandez P. E, and Martin R.: *J. Food Sci.*, 64, 410 (1999)
- 82) 大坪研一, 藤井剛, 橋野陽一, 豊島英親, 岡留博司, 中村澄子, 川崎信二 : *日食工誌*, 44, 386 (1997)
- 83) 大坪研一, 藤井剛, 橋野陽一, 豊島英親, 岡留博司, 中村澄子, 布施隆, 川崎信二 : *日食工誌*, 46, 117 (1999)
- 84) 吉橋忠, 中村澄子, 藤井剛, 川崎信二, 大坪研一 : *日食工誌*, 46,

250 (1999)

- 85) 大坪研一, 中村澄子, 諸岡宏, 藤井剛, 布施隆, 川崎信二: 日食工誌, 46, 262 (1999)
- 86) 松岡猛, 川島よしみ, 穠山浩, 三浦裕仁, 合田幸広, 瀬畑環, 一色賢司, 豊田正武, 日野明寛: 食衛誌, 40, 149 (1999)
- 87) Sunagawa, M., Tamai, Y., Neda, H., Miyazaki, K. and Miura, K.: Mokuzaï Gakkaishi, 41, 945 (1995)
- 88) Sunagawa, M., Neda, H. and Miyazaki, K.: Mokuzaï Gakkaishi, 41, 949 (1995)
- 89) 森田正晶, 斎藤春絵: 食品判別法としての遺伝子解析技術の検討, 農林水産演算技術センター調査研究報告, 22, 87 (1998)
- 90) 馬場崎勝彦: 微生物遺伝資源利用マニュアル(5) - 栽培きのこ菌株の直接凍結維持法及びDNA判別法 -, 農業生物資源研究所, 21 (1999)
- 91) 堤 忠一, 小泉英夫, 吉川誠次, 小林 純: 食品総合研究所報告, 34, 132 (1979)
- 92) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (藤井宏一訳): 生物統計学, 共立出版株式会社, p.449 (1983)
- 93) 石居 進: 生物統計学入門, 培風館, p.288 (1975)
- 94) 奥野忠一, 芳賀敏郎, 矢島敬二, 奥野千恵子, 橋本茂司, 古河陽子: 続多変量解析法, 日科技連出版社, p.299 (1976)
- 95) 河口至商: 多変量解析入門II, 森北出版株式会社, p.163 (1979)
- 96) 菅 民郎: 初心者がらくらく読める多変量解析の実際(下), 現代数学社, p.257 (1993)
- 97) 菅 民郎: ホントにやさしい多変量統計分析, 現代数学社, p.326

(1996)

98) Vallejo-Cordoba, B. and Nakai, S. : J. Agric. Food Chem., 42, 994

(1994)

99) Lai Y. W., Kemsley E. K. and Wilson R. H.: J. Agric. Food Chem.,
42, 1154 (1994)

100) Panja A. R. Ramanoelina, Josette Viano, Jean-P. Bianchini and
Gaydou E. M.: J. Agric. Food Chem., 42, 1177 (1994)

101) 草間豊子, 阿部英幸, 河野澄夫, 岩元睦夫: 日食工誌, 44, 569 (1997)

102) Caselli.M., De Giglio A., Mangone A. and Traini A.: J. Sci. Food
Agric., 76, 533 (1998)

103) Sivertsen, H. K., Holen, B., Nicolaysen, F. and Risvik, E.: J. Sci.
Food Agric., 79, 107 (1999)

104) Shaw, P. E., Moshonas, M. G., Buslig, B. S., Barros, S. M. and
Widmer, W. W.: J. Sci. Food Agric., 79, 1949 (1999)

105) König, T. and Schreier, P.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. A., 208,
130 (1999)

106) Nogueira, J. M. F. and Nascimento A. M. D.: J. Agric. Food
Chem., 47, 566 (1999)

107) Hoogerbrugge R., Willig S J. and Kistemaker P. G.: Anal. Chem.,
55, 1710 (1983)

108) 立屋敷哲, 佐々木弘子, 辻村 卓: 女子栄養大学栄養科学研究所
年報, 6, 85 (1998)

109) 立屋敷哲, 刈屋妙子, 奥崎政美, 佐々木弘子, 石井 和, 辻村 卓:
女子栄養大学栄養科学研究所年報, 7, 61 (1999)

110) 内藤嘉磯, 島津光伸, 戸澤史子, 奥崎政美, 根岸由紀子, 菅原龍

- 幸：日本食生活学会第 19 回大会一般講演要旨集 日本食生活学会誌， 10 (4)， p.125 (1999)
- 111) 内藤嘉磯，島津光伸，戸澤史子，奥崎政美，根岸由紀子，菅原龍幸：日本食品科学工学会第 47 回大会講演集， p.124 (2000)
- 112) きのこ種菌一覧/平成 9 年版，全国食用きのこ種菌協会 東京， (1997)
- 113) 種苗法に基づく品種登録，農林水産省農産園芸局種苗資料，1998 年 4 月 24 日現在
- 114) 高畠幸司：富山の林業，第 563 号 (2000)
- 115) 奥崎政美・根岸由紀子・佐々木弘子・菅原龍幸：日本食生活学会誌， 10 (3)， 43 (1999)
- 116) 奥崎政美，佐々木弘子，青柳康夫，菅原龍幸：日本食品科学工学会第 42 回大会講演集， p.6 (1995)

Table 1. Summary of Japanese and Chinese dried Shiitake mushrooms

1. Training set 17	
A. Japanese : On log 10	1998-1999 (Cultivators)
J1; Mori MM1	J2; Mori 121 J3; Mori 290 J4; Mori Yuujirou J5; Akiyama 817 J6; Akiyama 567
J7; Akiyama	J8; Kinko 115 J9; Kinko 241 J10; Kinko 368
B. Chinese : on log 7 1999 (Japan Special Forestry Promotion Association)	
C1; Jiangxi	C2; Henan C3; Jiangxi C4; Henan C5; Jiangxi C6; Unknown C7; Unknown
2. Test set 76	
A. Chinese : Unknown 15 1999	
Ca; Fujian	Cb; Fujian Cc; Fujian Cd; Zhejiang Ce; Hubei Cf; Hubei Cg; Guangxi Zhuangzu Ziiizhiqu
Ch; Guangxi Zhuangzu	Zizhiqu Ci; Unknown (purchased in Shanghai)
Ck-Cp	(purchased in Kunming)
B. Chinese : On Medium 1; Cj 1999 (Japan Special Forestry Promotion Association)	
C. Japanese : On log 1; Jz Chinese : On log : Cz 1999 (purchased in Japan)	
D. Japanese : On log 40; Shizuoka 17 Ohoita 12 Miyazaki 11 1983-1990 (Cultivators)	
E. Japanese : On log 15 Chinese : On medium 3 1999 (Data base)	
3. Blind set 18	
A. Japanese : On log 4; U1, U2, U4, U6 Chinese : On log 2; U3, U7 Chinese : On medium 2; U5, U8 1999 (Japan Special Forestry Promotion Association)	
B. Japanese : On log 1; U14 Chinese : On log 4; U10-U13 On medium 1; U15 1999(purchased in Japan)	
C. Chinese : Unknown 1; U9 1999 (purchased in Beijing)	
D. Chinese : Unknown 3; U16-U18 2000 (purchased in Huang Shan)	
4. Prediction set 5	
A. (Chinese) : Unknown 5; P1-P5 2000 (Japan Special Forestry Promotion Association)	

Table 2. Chemical composition of training set from Japanese and Chinese dried Shiitake mushroom

	(mg/100g on dry matter)	
	Japanese	Chinese
<u>Free amino acids¹⁾</u>		
Asp	88.4±34.8*	54.9±10.8
Thr	89.6±17.0	75.0±20.9
Ser	70.0±14.9	66.3±11.9
Asn	61.8±20.6	56.0±10.1
Glu	316.8±89.6	350.2±122.2
Gln	558.7±187.0**	301.9±69.6
Pro	29.9±8.0	39.6±6.9**
Gly	50.6±13.2**	31.4±7.1
Ala	111.5±20.3	108.1±6.7
Val	47.8±12.6	55.3±18.6
Met	8.2±2.1	9.8±2.1
Ileu	28.3±7.4	30.3±10.2
Leu	40.7±10.0	45.8±13.5
Tyr	44.2±19.1	46.4±13.3
Phe	46.0±11.4	39.0±12.0
Trp	19.6±5.2	14.0±7.1
Lys	98.0±46.4	87.6±19.2
His	40.5±8.0	35.4±7.7
Arg	143.8±96.9	126.8±36.7
γ-Aba	26.3±15.1	150.2±15.8**
Orn	221.7±145.8	173.7±43.7
Total	2142.6±631.5	1897.6±329.6
<u>Lentinic acid</u>	730.6±251.8	1408.3±620.6*
<u>Mineral</u>		
Na	12.7±5.9*	9.0±1.1
K	1975.5±382.7	2278.9±380.5
Ca	34.7±26.4*	13.3±4.6
Cu	0.8±0.2	0.6±0.4
Fe	3.6±1.9	5.5±1.7*
Mg	114.9±13.2	151.0±22.0**
P	423.6±170.8	406.1±147.4
Zn	4.9±2.0	4.2±1.8
Mn	1.4±0.4	1.6±0.2
Total	2572.1±548.3	2870.3±537.5

¹⁾ see in the text.

* p<0.05 ** p<0.01

Table 3. Variables and sample sets for Multivariate Analysis

Variables	Training set	Test set	Blind set	Prediction set
F.A.A.	17	76	8	-
F.A.A. + L.A.	17	76	8	-
M.	17	18	8	-
F.A.A. + M.	17	18	8	-
F.A.A. + L.A. + M.	17	18	18	5

F.A.A. : Free Amino Acids L.A. : Lentinic Acid M. : Mineral

Table 4. Results of principal component analysis(PCA) and linear discriminant analysis(LDA) for samples and variables from Japanese and Chinese dried Shiitake mushrooms.

	Variables	F.A.A.	F.A.A. + L.A.	M.	F.A.A. + M.	F.A.A. + L.A. + M.
PCA	Eigen Value > 1.0	PC 1,2,3,4	PC 1,2,3,4	PC 1,2,3,4	PC 1,2,3,4,5,6	PC 1,2,3,4,5,6,7
	% of Accumulative Variance	87.1	86.8	84.9	87.1	90.1
LDA	Selected Variables(PC)	PC 2,4	PC 2,3	PC 2,4	PC 2,3,4,5	PC 2,4
	% of Accumulative Variance	28.4	34.8	38.1	48.0	31.9
Training set	% of Correctly Classified	94.1	94.1	100	100	100
	Prob. of Incorrectly Classified	4.6	2.1	3.8	0.006	3.8
	Correlation Ratio	0.76	0.82	0.78	0.96	0.78
Test sets						
A, B, C (n=18)	% of Correctly Classified	100	100	72.2	100	100
D, E (n=58)	% of Correctly Classified	96.6	96.6	-	-	-
Blind set						
A (n=8)	% of Correctly Classified	75.0	75.0	50.0	62.5	87.5
B, C, D (n=10)	% of Correctly Classified	-	-	-	-	100

F.F.A. : Free Amino Acids L.A. : Lenticinic Acid M. : Mineral

Table 5. Result of principal component analysis and linear discriminant analysis based on free amino acids, lentinic acid and mineral from Japanese and Chinese dried Shiitake mushrooms

	Eigen vector	
	PC2	PC4
Asp	-0.3218	-0.1700
Thr	-0.1075	0.0631
Ser	-0.0435	-0.0211
Asn	-0.1636	-0.1226
Glu	-0.0211	-0.1675
Gln	-0.2772	-0.0098
Pro	0.2966	0.0683
Gly	-0.2493	0.0968
Ala	-0.1226	-0.3401
Val	0.1482	0.0311
Met	0.1699	-0.2235
Ileu	0.1362	0.1596
Leu	0.1566	0.1046
Tyr	0.1460	0.3351
Phe	-0.0455	0.1274
Trp	-0.0515	0.3519
Lys	-0.0639	-0.0368
His	-0.1223	0.1528
Arg	-0.1406	-0.2101
γ -Aba	0.3039	-0.2086
Orn	-0.1879	-0.0327
Lentinic acid	0.2305	-0.1802
Na	-0.2468	-0.2115
K	0.1814	-0.2771
Ca	-0.1741	0.0826
Cu	-0.0167	0.1103
Fe	0.1180	-0.2286
Mg	0.3014	-0.1269
P	0.0613	-0.1940
Zn	-0.0040	-0.1861
Mn	0.2032	0.1647

	Discriminant coefficient	F value	p value
PC 2	-0.9248	38.8774	2.18E-0.5
PC 4	1.1585	9.6369	0.0078
Constant	1.1138		

Linear discriminant function

$$z = 1.1138 - 0.9248 \times \text{PC2score} + 1.1585 \times \text{PC4score}$$

$z > 0$ (I ; Japanese) $z < 0$ (II ; Chinese)

Table 6. Peak heights of the ^1H NMR signals of training set from Japanese and Chinese dried Shiitake mushrooms.

Signal(ppm)	Component	Japanese	Chinese
0.98	Leu	0.63 ± 0.24	0.74 ± 0.41
1.02	Val	0.41 ± 0.12	0.47 ± 0.27
1.30	Lactic acid	0.42 ± 0.14	0.63 ± 0.43
1.48	Ala	0.64 ± 0.21	0.66 ± 0.34
1.70	Orn1	0.28 ± 0.09	0.31 ± 0.16
1.90	Unkown1	0.48 ± 0.17	$0.78 \pm 0.35^*$
2.08	Glu1	0.29 ± 0.11	0.31 ± 0.17
2.11	Unkown2	0.33 ± 0.11	0.36 ± 0.18
2.32	Glu2	0.38 ± 0.14	0.49 ± 0.29
2.41	Unkown3	0.44 ± 0.18	0.30 ± 0.24
2.65	Malic acid	0.19 ± 0.10	0.18 ± 0.08
2.95	Orn2	0.28 ± 0.10	0.27 ± 0.13
3.19	Choline	0.12 ± 0.43	$0.19 \pm 0.77^*$
3.21	Unkown4	0.80 ± 1.06	0.58 ± 0.64
3.30	Lentinic acid	0.07 ± 0.02	$0.13 \pm 0.07^*$
3.47	Trehalose1	1.46 ± 0.67	1.89 ± 1.28
3.91	Mannitol	2.42 ± 1.05	3.26 ± 2.00
5.20	Trehalose2	1.75 ± 0.82	2.33 ± 1.73
6.50	Fumaric acid	0.56 ± 0.20	0.67 ± 0.36
7.33	Phe	0.11 ± 0.03	0.12 ± 0.05
8.24	Unkown5	0.05 ± 0.02	0.07 ± 0.03

* $p < 0.05$

Table 7. Results of principal component analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA) based on 21 ¹H NMR signals from Japanese and Chinese dried Shiitake mushrooms.

PCA	Eigen Value > 1.0 % of Accumulative Variance	PC 1, 2, 3 89.6	
LDA	Selected Variables(PC)	PC 2, 3	PC 2, 3, 4*
	% of Accumulative Variance	18.2	21.6
Training set	% of Correctly Classified	88.2	88.2
	Prob. Of Incorrectly Classified	21.6	15.2
	Correlation Ratio	0.40	0.54
Test set (n=18)	% of Correctly Classified	61.1	83.3
Blind set A (n=8)	% of Correctly Classified	50.0	62.5
B, C (n=7)	% of Correctly Classified	85.7	85.7
Overall (n=33)	% of Correctly Classified	63.6	78.8

* PC 4 ; Eigen Value > 0.71

Linear discriminant function

$$z = 0.3717 + 0.5799 \times \text{PC2score} + 1.4524 \times \text{PC3score} - 2.0311 \times \text{PC4score}$$

Table 8. Results of Inter-SSR PCR method for dried Shiitake mushroom fruit body

Type		Sample ¹⁾	SSR4				SSR5					SSR9	SSR11
SSR4-5	SSR4-11		1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	1
1	1	J1			○	○			○	○	○		
		J9			○	○			○	○	○		
		C1			○	○			○	○	○		
		C3			○	○			○	○	○		
		C5			○	○			○	○	○		
		C6			○	○			○	○	○		
		Ca			○	○			○	○	○		
		Cc			○	○			○	○	○		
		Cd			○	○			○	○	○		
		Ce			○	○			○	○	○		
Ch			○	○			○	○	○				
2	2	C4			○	○		○	○	○			
3	3	J13			○	○					○		
		Cf			○	○					○		
4	4	J5			○	○		○	○				
5	5	J11			○	○		○					
6	6	J10			○			○	○				
	7	J4			○			○	○		○		
7	8	J2			○	○		○	○		○		
8	9	J3			○			○	○	○	○		
9	10	Cg	○		○		○	○			○		○
		Cj	○		○		○	○			○		○
10	11	J8	○					○	○	○		○	
11	12	C2		○				○					
12	13	J12			○	○							
13	14	J6					○		○				
14	15	Cb			○								
15	16	Ci						○					
8	-	U1			○			○	○	○			
10	-	U2	○					○	○	○			
16	-	U3			○				○				
17	-	U4		○						○			
1	-	U5			○	○			○	○	○		
10	-	U6	○					○	○	○	○		
1	-	U7			○	○			○	○	○		
1	-	U8			○	○			○	○	○		

¹⁾ see in the text, J : Japanese samples, C : Chinese samples, U : Blind A samples
 ○: appearance of the band

Table 9. Results of rDNA analysis for dried Shiitake mushroom fruit body

Type	Sample ¹⁾	rDNA ²⁾		
		nt439	nt475	nt649
A	J1	-	G	C/T
	J2	-	G	C/T
	J4	-	G	C/T
	J8	-	G	C/T
	C1	-	G	C/T
	C3	-	G	C/T
	C4	-	G	C/T
	C5	-	G	C/T
	C6	-	G	C/T
	Ca	-	G	C/T
	Cc	-	G	C/T
	Cg	-	G	C/T
B	J6	-	G	C
	J11	-	G	C
	J12	-	G	C
C	J3	-	G	T
	J10	-	G	T
D	J9	-	A	C/T
	Cd	-	A	C/T
	Ce	-	A	C/T
	Ch	-	A	C/T
E	Cj	-	G/A	C/T
F	Cf	T/-	G	C/T
	C2	T/-	G	C/T
G	Ci	T/-	G	T
H	J5	T/-	A	T
	Cb	T/-	A	T
I	J13	T/-	A	C/T

¹⁾ see in the text.

²⁾ A : Adenine, G : Guanine, C : Cytosine, T : Thymine

Table 10. Results of Inter-SSR PCR method and rDNA analysis of dried Shiitake mushroom

Type	Type combined with Inter-SSR PCR method and rDNA analysis	Sample ¹⁾
1	1-A	J1, C1, C3, C5, C6, Ca, Cc
2	1-D	J9, Cd, Ce, Ch
3	2-A	C4
4	3-F	Cf
5	3-I	J13
6	4-H	J5
7	5-B	J11
8	6-C	J10
9	7-A	J4
10	8-A	J2
11	9-C	J3
12	10-A	Cg
13	10-E	Cj
14	11-A	J8
15	12-F	C2
16	13-B	J12
17	14-B	J6
18	15-H	Cb
19	16-G	Ci

¹⁾ see in the text.

Table 11. Summary of Matsutake mushrooms *Tricholoma matsutake*

Nation			Nation		
Collected Weight(g)			Collected Weight(g)		
year			year		
<u>Japan</u>			<u>Korea</u>		
J1. Hokkaido	1995	206	K1.	1993	424
J2. Iwate	1993	347	K2.	1994	90
J3. Iwate	1994	280	K3.	1994	116
J4. Iwate	1995	498	K4.	1994	156
J5. Yamagata	1994	87	K5.	1995	112
J6. Fukushima ¹⁾	1994	174	K6.	1995	128
J7. Fukushima ¹⁾	1994	128	K7.	1995	134
J8. Fukushima ¹⁾	1994	231	K8.	1995	358
J9. Nagano	1993	272	K9. Kanguondo ¹⁾	1995	600
J10. Nagano	1994	390	K10. Chunchongnamdo ¹⁾	1995	655
J11. Hiroshima	1995	156	K11.	1995	248
J12. Hiroshima	1995	166	K12.	1995	376
J13. Yamaguchi	1995	130	K13.	1995	286
<u>China</u>			<u>Canada</u>		
C1. Sichuan	1993	1383	Ca1	1993	431
C2. Sichuan	1994	1615	Ca2	1993	220
C3. Sichuan	1994	313	Ca3	1994	291
C4. Sichuan	1995	394	Ca4	1994	330
C5. Sichuan	1995	376	Ca5	1995	228
C6. Sichuan	1995	392	¹⁾ purchased at the spot		
C7. Sichuan	1995	555			
C8. Yunnan	1995	390			
C9. Yunnan	1995	620			
C10. Yunnan	1995	250			

Table 12. Content of free amino acids and mineral in Japanese, Chinese and Korean Matsutake mushroom

(mg/100g on dry matter)					
	Japanese	Chinese	Korean	F value	p value
<u>Free amino acids</u> ¹⁾					
Asp	218.6±119.3	247.0±94.4	239.6±130.3		
Thr	100.5±17.6	116.5±21.9	109.6±42.9		
Ser	136.5±21.5	147.4±18.3	132.6±50.5		
Asn	86.7±29.5	73.1±18.7	75.2±45.2		
Glu	463.6±136.1	430.1±171.2	498.9±170.1		
Gln	360.2±133.9 ^b	539.1±135.3 ^a	435.4±187.8 ^{ab}	3.41	0.05
Pro	114.6±24.2 ^a	98.0±22.2 ^{ab}	92.6±28.4 ^b	2.40	ns
Gly	41.6±8.4 ^b	67.3±16.2 ^a	54.0±23.8 ^{ab}	5.66	0.01
Ala	237.7±133.8	259.7±133.7	218.0±142.3		
Val	36.4±9.7	48.7±12.3	49.4±25.4		
Cys	30.1±6.7	26.2±5.6	26.3±6.6		
Met	7.6±8.3	5.2±3.0	8.8±8.2		
Ileu	22.2±8.4	27.5±7.4	31.3±16.3		
Leu	61.7±18.3	68.7±17.4	76.3±42.3		
Tyr	65.1±10.2	58.0±13.2	60.8±21.9		
Phe	89.2±17.6	77.0±22.0	82.4±29.2		
Trp	23.8±7.8 ^a	13.9±6.2 ^b	14.6±4.5 ^b	8.44	0.01
Lys	165.3±40.4	135.6±32.0	158.1±54.5		
His	108.5±24.2	105.2±23.3	109.0±33.5		
Arg	438.0±129.9 ^a	286.0±66.4 ^b	373.4±164.7 ^{ab}	3.50	0.05
Orn	671.8±174.1 ^a	454.4±160.1 ^{bc}	482.5±201.0 ^{bc}	4.80	0.05
Total	3479.8±684.1	3284.6±648.3	3328.8±1008.0		
<u>Mineral</u>					
Na	76.0±34.1	104.4±49.8	90.7±45.2		
K	3409±821	4192±1530	3536±726		
Ca	12.3±4.8 ^c	33.0±9.9 ^a	23.0±9.8 ^b	16.01	0.001
P	421.0±188.8	479.6±142.1	465.6±224.1		
Fe	30.2±17.5 ^b	117.3±48.3 ^a	107.7±82.2 ^a	8.01	0.05
Mg	72.0±29.1	82.1±12.9	98.3±61.7		
Cu	3.5±1.0	4.2±1.2	3.5±1.0		
Zn	7.8±2.7	8.4±1.9	7.5±2.3		
Mn	1.8±2.1 ^b	4.5±2.3 ^a	4.2±2.8 ^a	3.92	0.05
Total	4033.4±992.3	5025.1±1558.2	4336.6±853.3		

¹⁾ see in the text

F and p value : one way ANOVA

^{a-c} Mean values with the same superscript within rows are not significantly different at < 0.05 (Least significant difference)

Table 13. Results of principal component analysis(PCA) and linear discriminant analysis(LDA) for variables from Japanese, Chinese and Korean Matsutake mushrooms.

	Japan-China				Japan-Korea			China-Korea		
	F.F.A.	M.	F.F.A. + M.	F.F.A.	M.	F.F.A. + M.	F.F.A.	M.	F.F.A. + M.	
	PC 1, 2, 3, 4, 5	PC 1, 2, 3	PC 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	PC 1, 2, 3, 4, 5	PC 1, 2, 3	PC 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	PC 1, 2, 3, 4	PC 1, 2, 3	PC 1, 2, 3, 4, 5, 6	
PCA	84.7	75.5	87.0	84.5	72.9	86.6	81.9	73.0	84.4	
LDA	PC 2, 3, 4	PC 1, 2, 3	PC 1, 2, 4	PC 2, 3	PC 1, 3	PC 2, 4, 7	PC 3, 4	PC 2, 3	PC 4, 5, 6	
	43.4	75.5	56.5	23.2	57.5	25.7	16.2	40.3	17.7	
	% of Accumulative Variance	% of Accumulative Variance(PC)	% of Accumulative Variance	% of Correctly Classified	Prob. of Incorrectly Classified	Correlation Ratio				
	95.6	95.7	100	80.8	73.1	88.5	60.9	65.2	73.1	
	3.0	8.1	21.4	30.3	11.0	35.4	31.8	25.9		
	0.79	0.68	0.80	0.40	0.22	0.62	0.13	0.19	0.31	

F.F.A. : Free amino acids M : Mineral

Table 14. Results of principal component analysis(PCA) and canonical discriminant analysis(CDA) based on free amino acids and mineral from Japanese, Chinese and Korean Matsutake mushrooms.

	F.F.A.	M.	F.F.A. + M.
PCA Eigen Value > 1.0	PC 1, 2, 3, 4	PC 1, 2, 3	PC 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
% of Accumulative Variance	77.1	70.6	83.9
CDA Selected Variables(PC)	-	PC 1, 3	PC 2, 4, 6
% of Accumulative Variance	-	40.4	27.0
% of Correctly Classified			
Japanese	-	76.9	92.3
Chinese	-	70.0	90.0
Korean	-	46.2	53.8
Overall	-	63.9	77.8

F.F.A. : Free amino acids M. : Mineral

Table 15. Content of free amino acids and mineral of training set from raw Shiitake mushrooms.

	(mg/100g on dry matter)	
	On log	On medium
<u>Free amino acids¹⁾</u>		
Asp	73.8±60.2	83.2±40.1
Thr	120.1±41.8*	98.4±24.1
Ser	79.6±27.4	77.6±22.7
Asn	86.3±35.5	132.5±47.5**
Glu	280.9±75.6**	138.6±66.7
Gln	407.3±233.5**	68.8±56.6
Pro	55.8±15.4	50.4±29.1
Gly	75.6±27.1**	52.0±31.5
Ala	241.0±65.6	237.4±70.1
Val	99.7±104.9*	60.2±36.6
Ileu	51.2±12.5**	25.3±16.2
Leu	79.6±18.4**	24.7±18.8
Tyr	68.7±17.8**	53.1±17.7
Phe	61.8±13.8**	26.0±19.9
Lys	115.7±51.7	105.5±22.1
His	50.8±19.8**	32.2±9.0
Arg	149.2±66.0	173.8±38.0
γ-Aba	47.2±45.4	383.1±108.7**
Orn	549.9±714.1	319.2±92.9
<u>Total</u>	<u>2694.1±952.2**</u>	<u>2140.5±339.9</u>
<u>Lentinic acid</u>	<u>929.1±540.6**</u>	<u>353.5±87.6</u>
<u>Mineral</u>		
Na	81.1±10.8	82.8±12.6
K	1940.4±202.5	2213.4±316.8**
Ca	37.1±22.1**	14.7±11.0
Mg	120.8±17.7	128.6±19.7
P	429.1±78.7	605.4±146.1**
Fe	3.7±1.5	3.3±0.7
Cu	1.0±0.3*	0.9±0.2
Zn	4.2±1.2	6.1±1.7**
Mn	2.2±0.6	2.3±0.7
<u>Total</u>	<u>2620.0±217.0</u>	<u>3057.5±385.8**</u>

¹⁾ see in the text.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

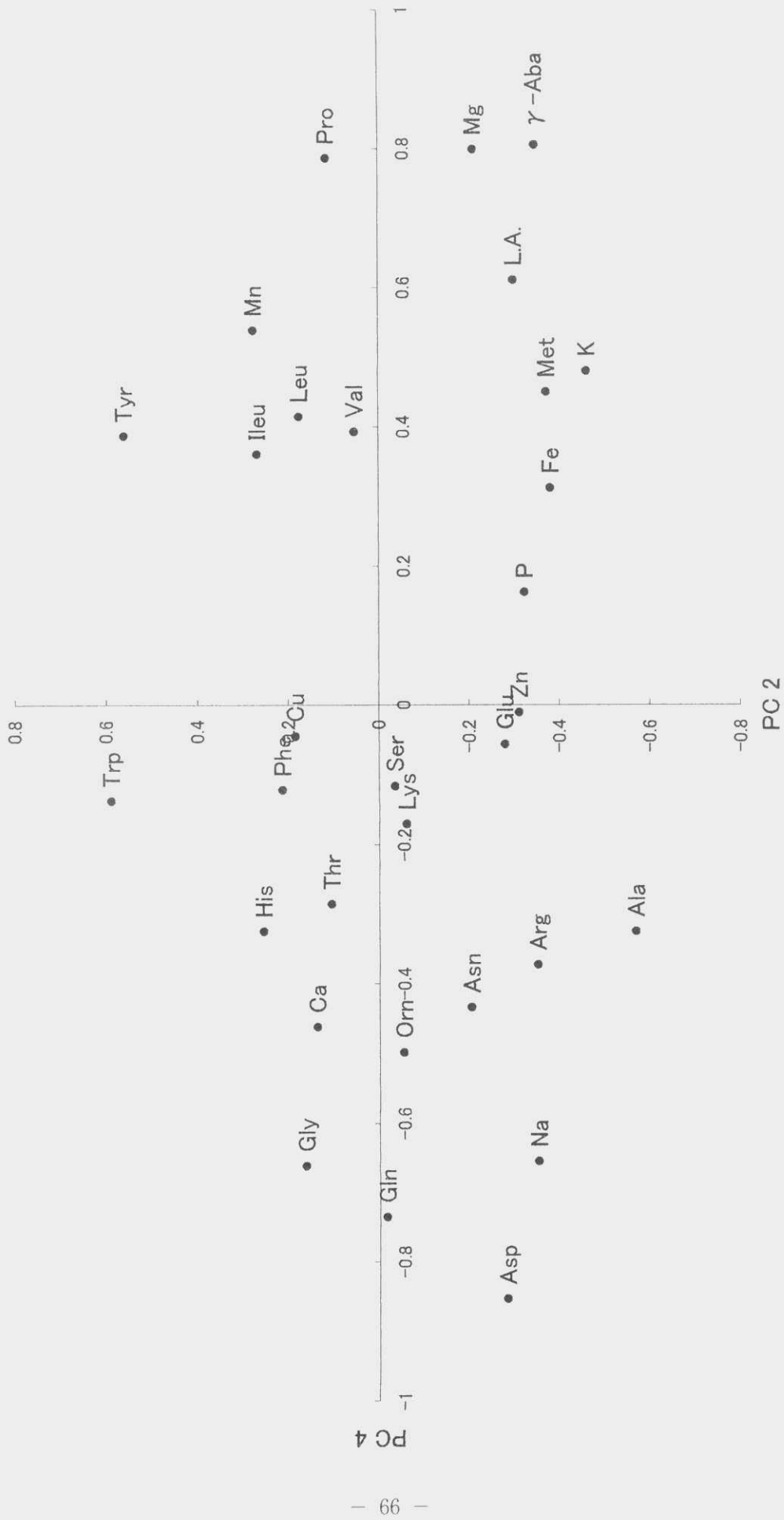


Fig. 1. Scatter plot of loadings for PC 2 and PC 4 of training set from Japanese and Chinese dried Shiitake mushrooms

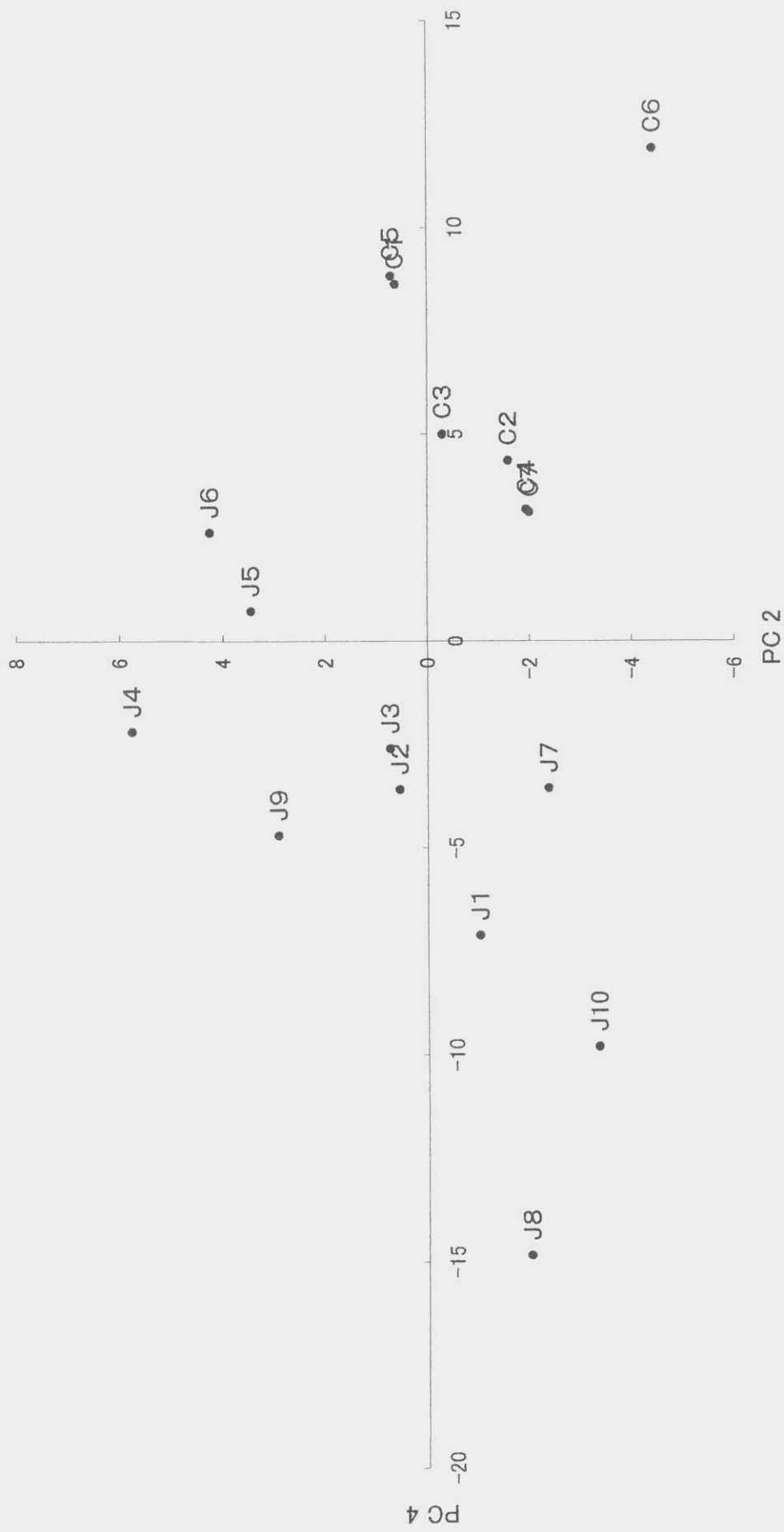


Fig. 2. Scatter plot of PC scores for PC2 and PC4 of training set from Japanese and Chinese dried Shiitake mushrooms.

J : Japanese samples, C : Chinese samples

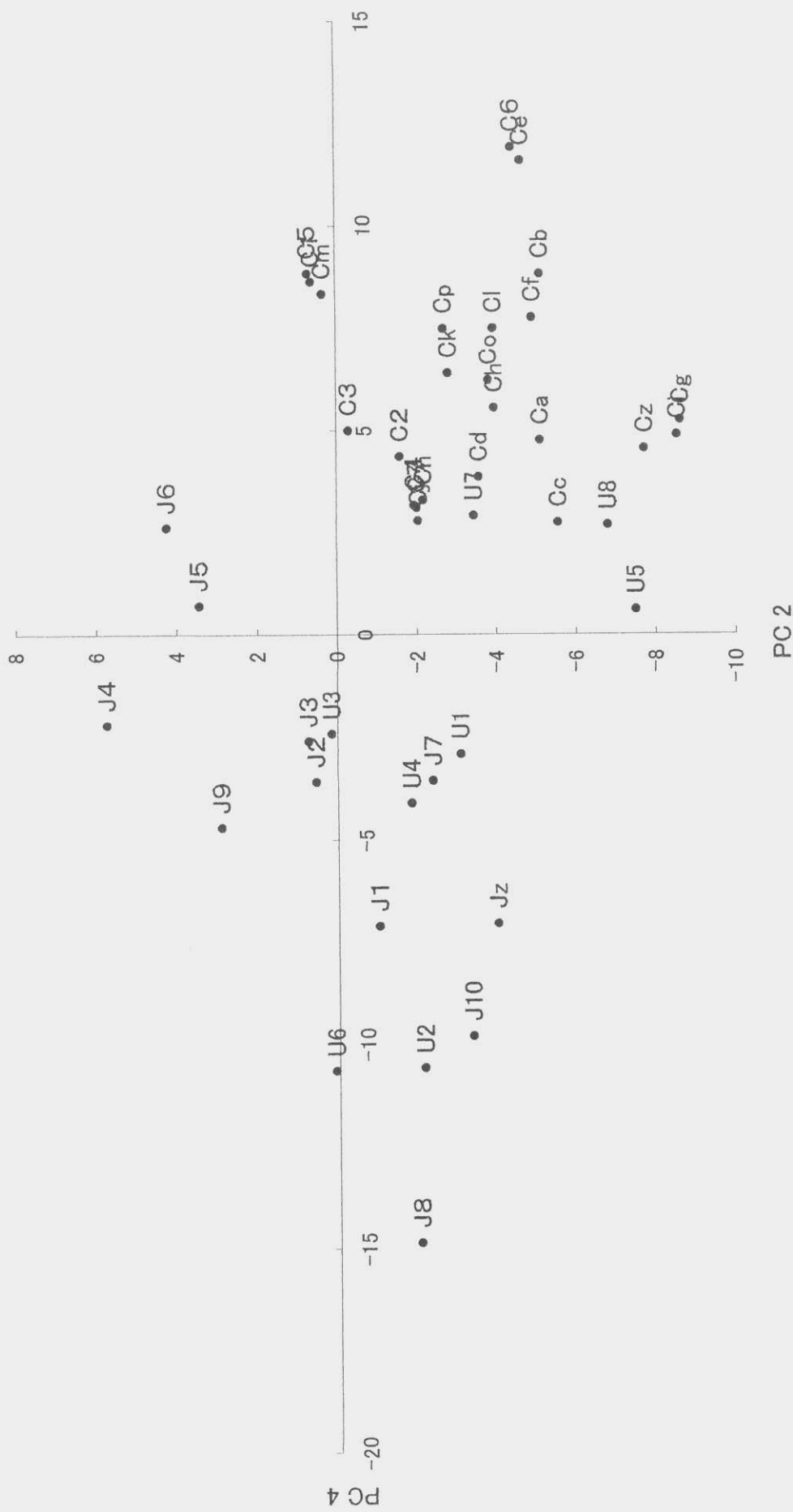


Fig. 3. Scatter plot of PC scores for PC2 and PC4 of training, test and blind set from Japanese and Chinese dried Shiitake mushrooms.

J : Japanese samples, C : Chinese samples, U : Blind samples

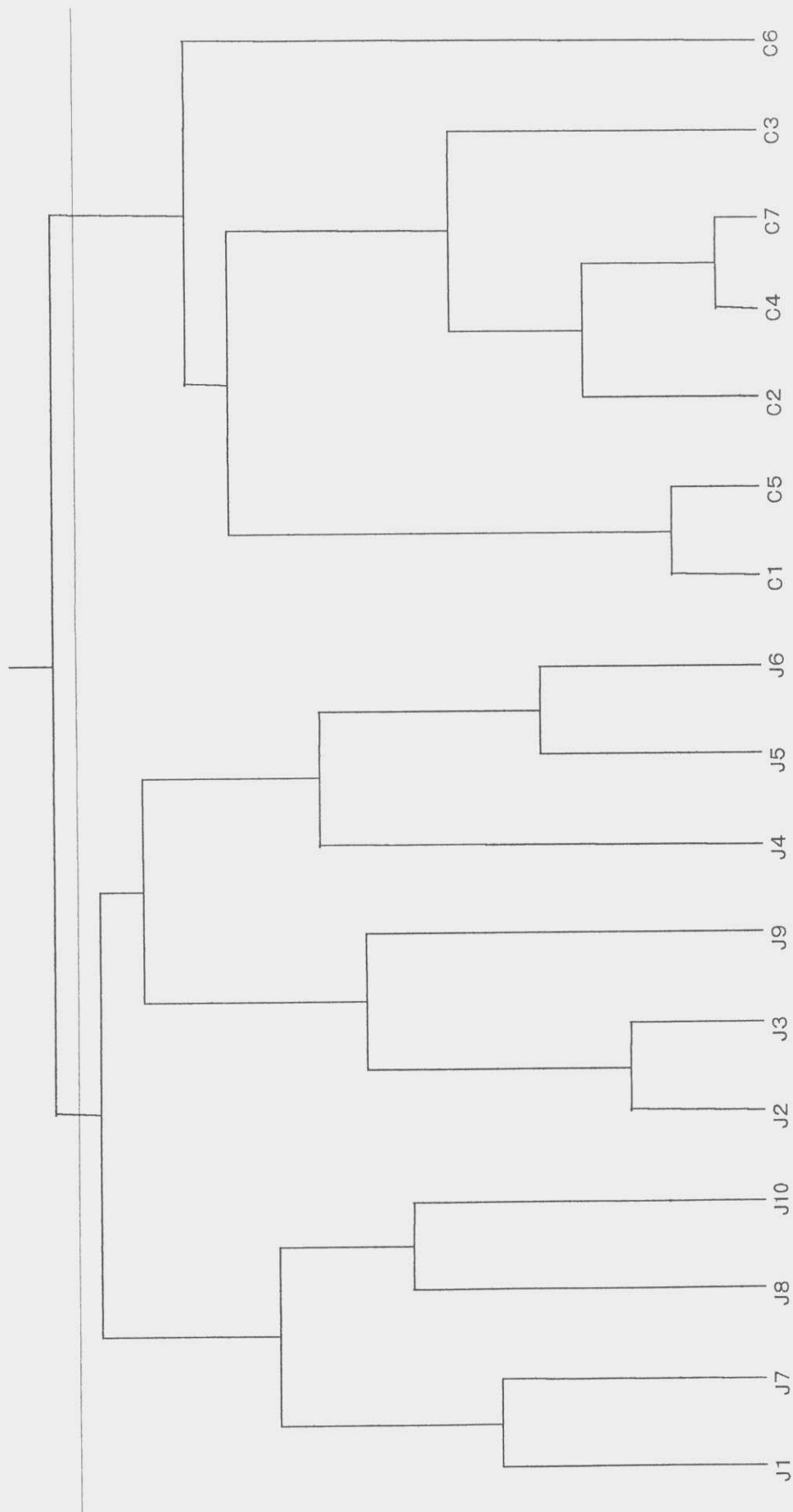


Fig. 4. Dendrogram of clustering for PC2 and PC4 scores of training set from Japanese and Chinese dried Shiitake mushrooms.
 J : Japanese samples, C : Chinese samples

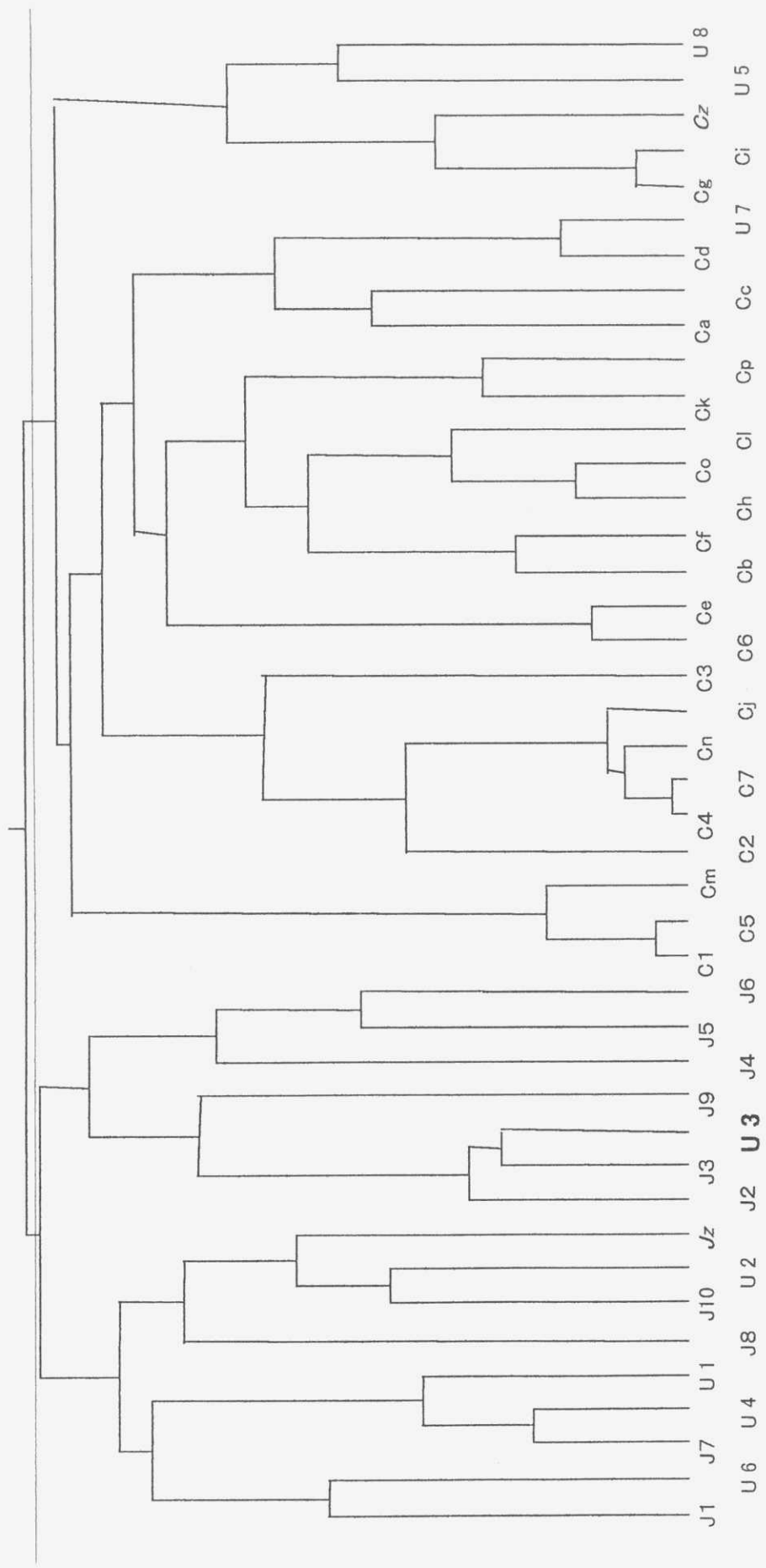


Fig. 5. Dendrogram of clustering for PC2 and PC4 scores of training, test and blindA set from Japanese and Chinese dried Shiitake mushrooms
 J : Japanese samples, C : Chinese samples, U : Blind samples

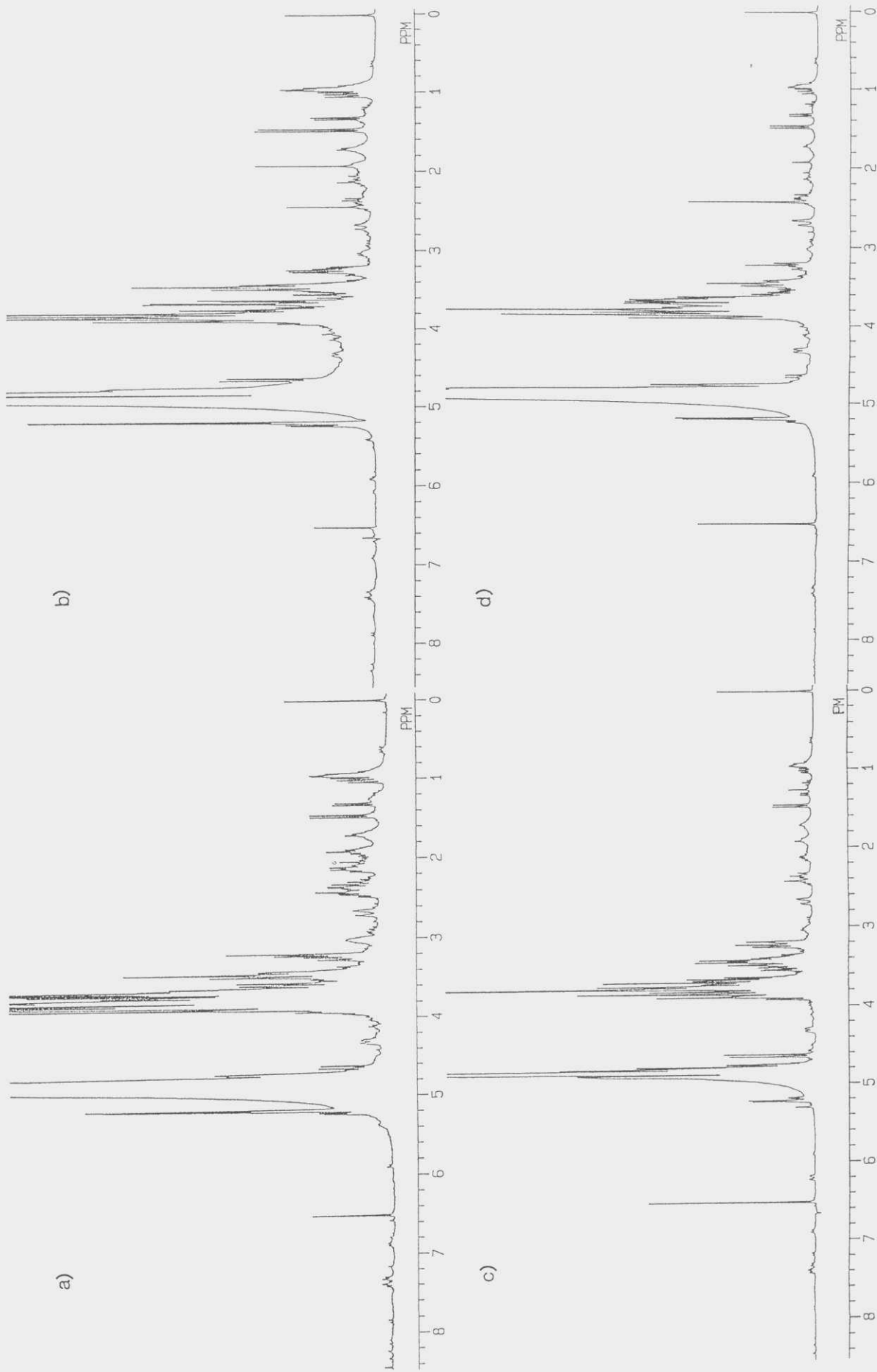


Fig. 6. ^1H NMR spectra of (a) dried Shiitake *Lentinus edodes*, (b) Nameko *Pholiota nameko*, (c) Matsutake *Tricholoma matsutake* and (d) Naratake *Armillariella mellea*.

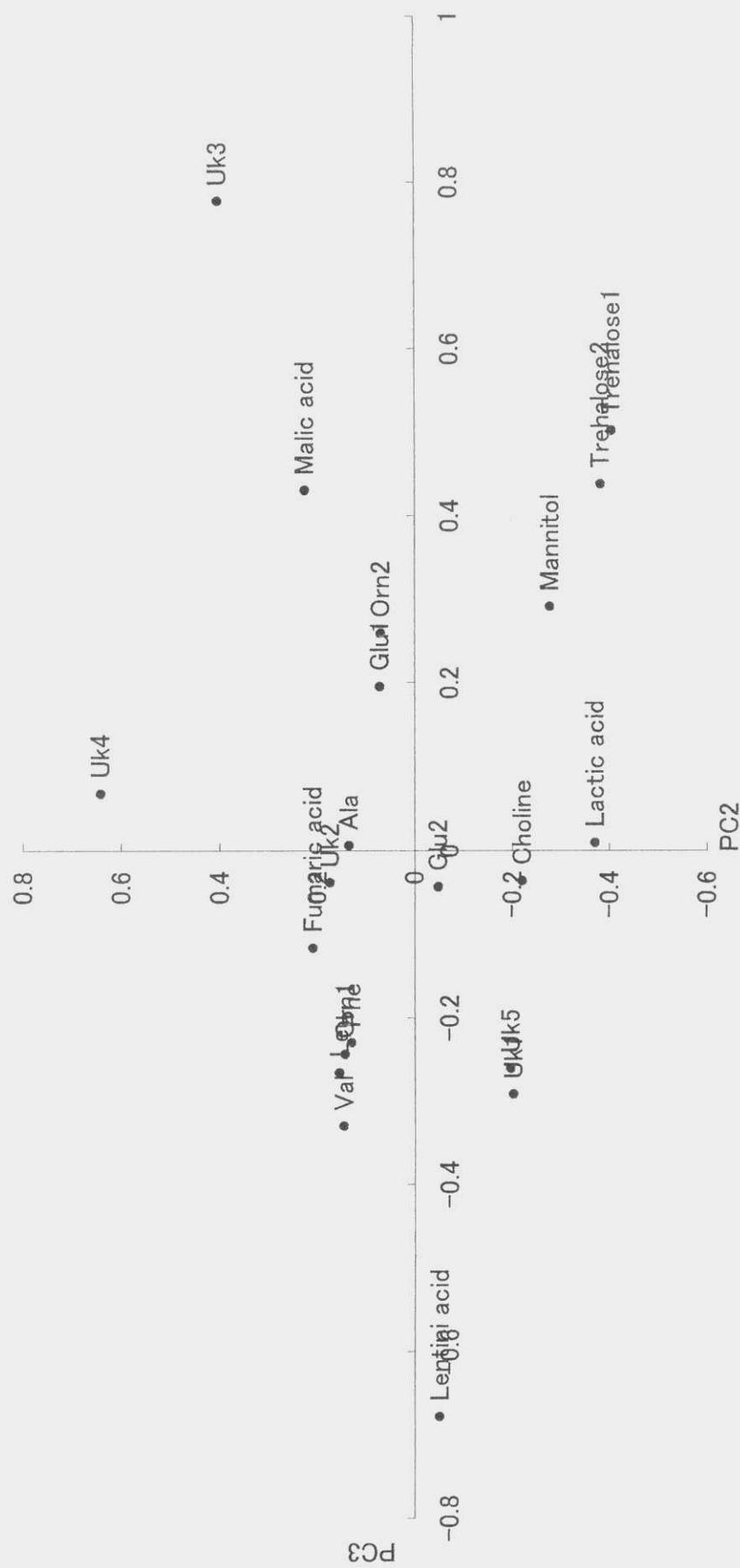


Fig. 7. Scatter plot of loadings for PC2 and PC3 of training set based on 21 ¹H NMR signals from Japanese and Chinese dried Shiitake mushrooms.

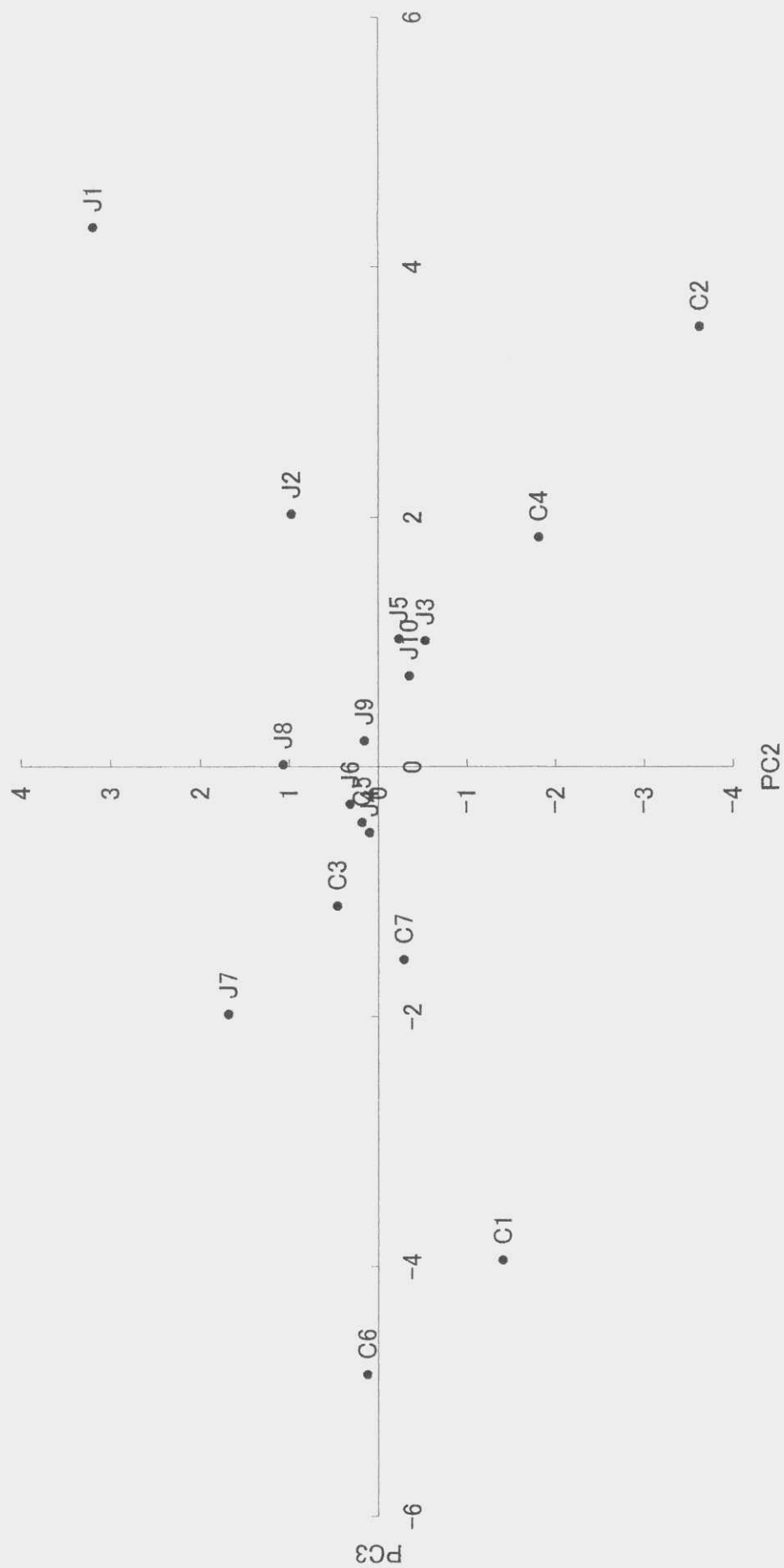


Fig. 8. Scatter plot of PC scores for PC2 and PC3 of training set based on 21 ^1H NMR signals from Japanese and Chinese dried Shiitake mushrooms.

J : Japanese samples, C : Chinese samples

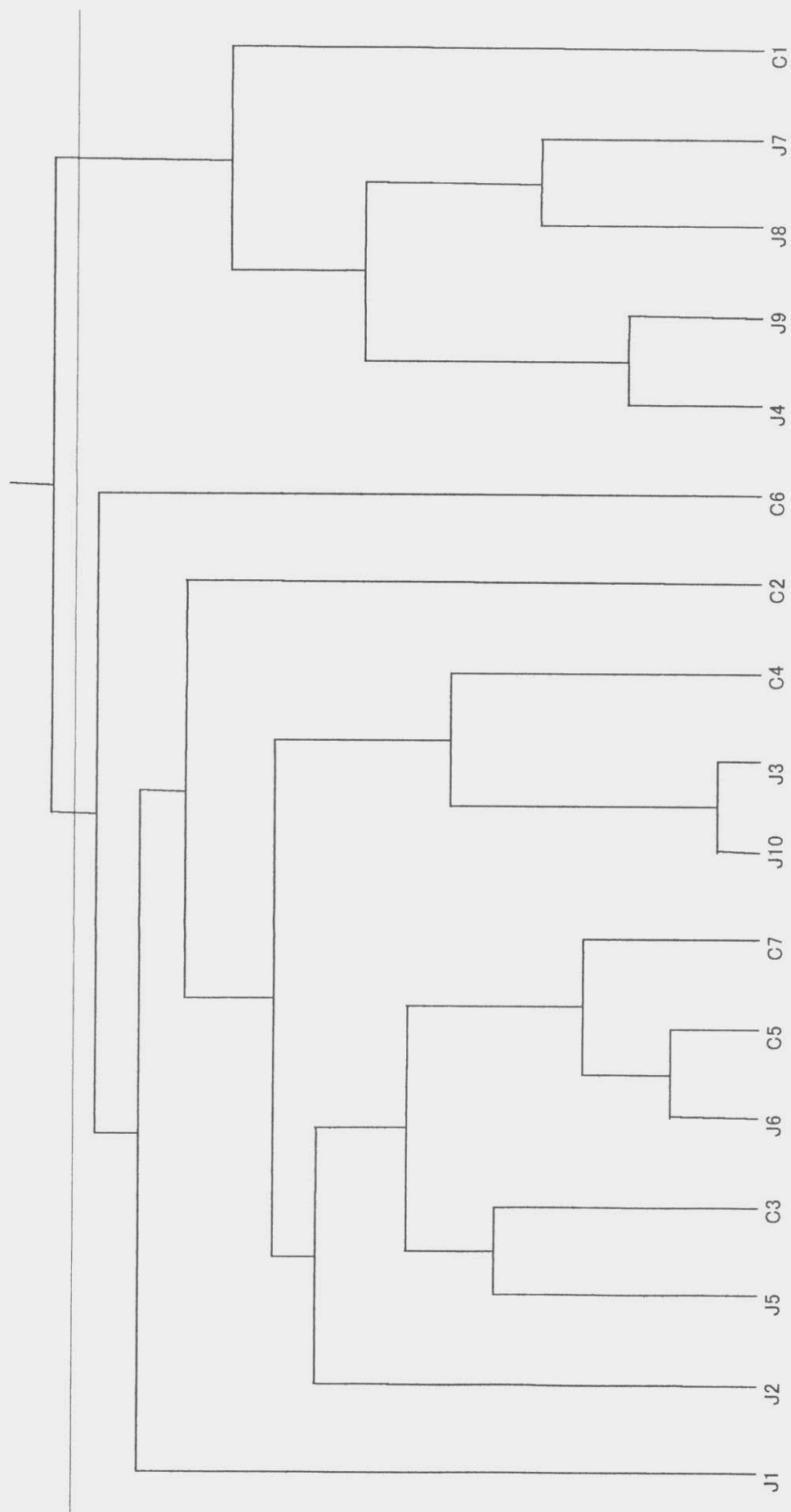
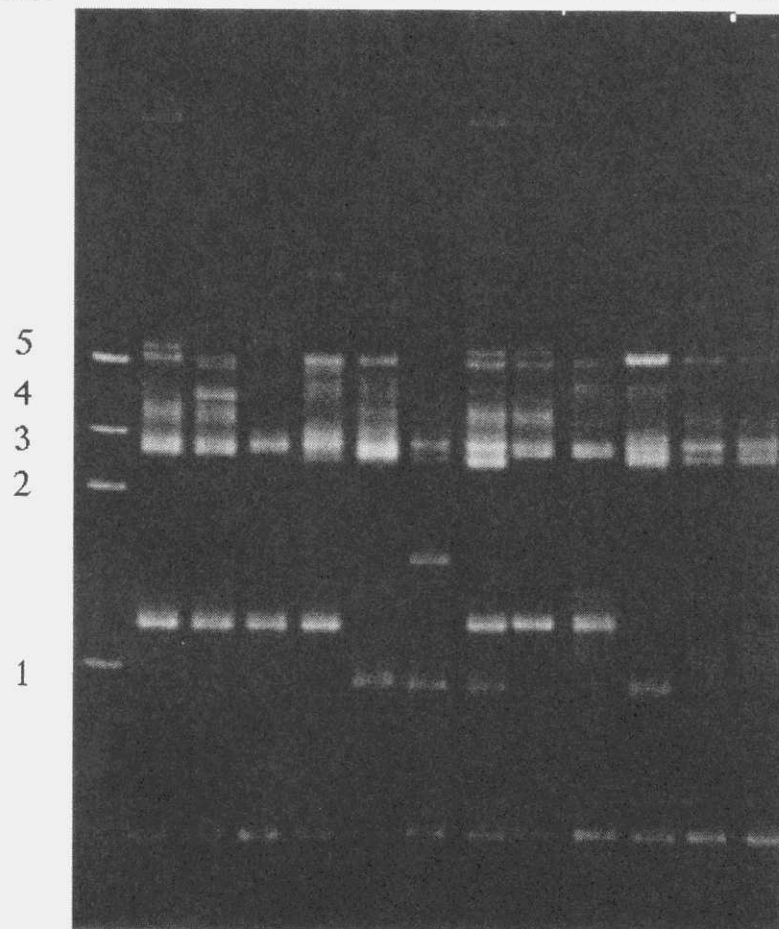


Fig. 9. Dendrogram of clustering for PC2, PC3 and PC4 of training set based on 21 ¹H NMR signals from Japanese and Chinese dried Shiitake mushrooms.

J : Japanese samples, C : Chinese samples

Band
No. M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



primer : SSR5 (ACTG)₄

1: J1, 2: J2, 3: J3, 4: J4, 5: J5, 6: J6, 7: J8,
8: J9, 9: J10, 10: J11, 11: J12, 12: J13

Fig.10. Electrophoretic patterns of Inter SSR5 PCR products from Japanese dried Shiitake mushrooms

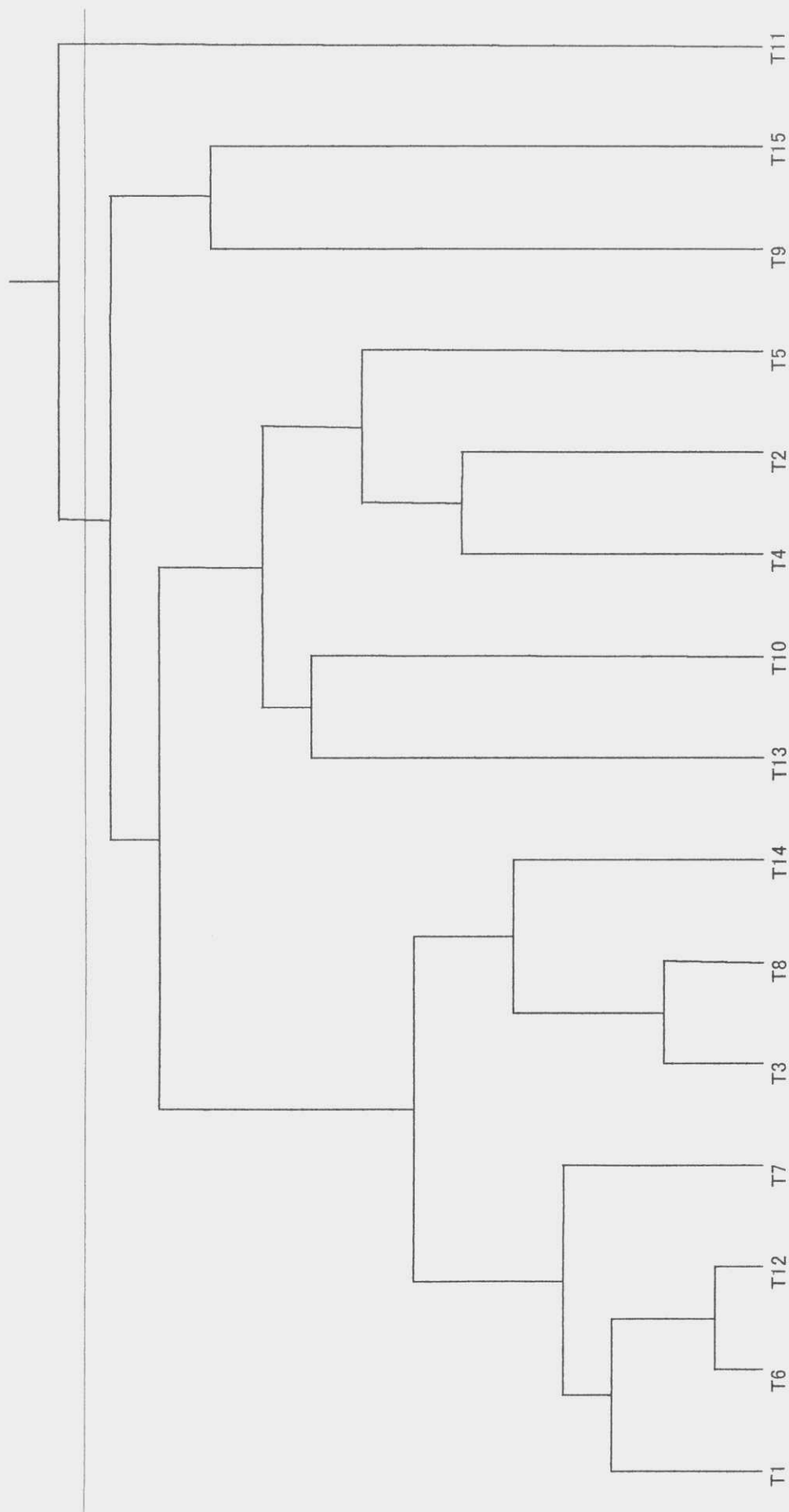


Fig. 11. Dendrogram of clustering based on 15 types from Inter-SSR PCR method to Japanese and Chinese dried Shiitake mushrooms.

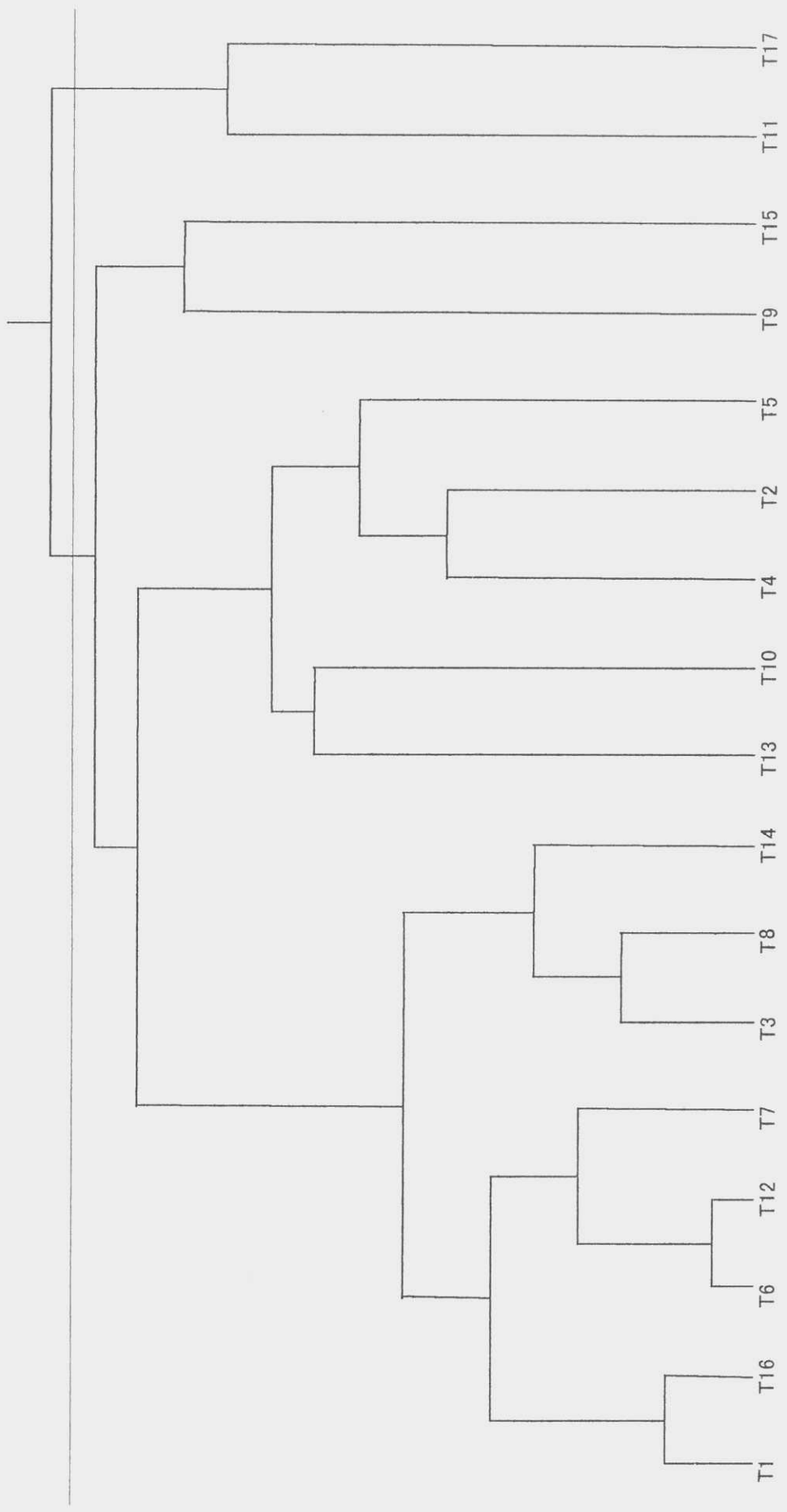


Fig. 12. Dendrogram of clustering based on 17 types from Inter-SSR PCR method to Japanese and Chinese dried Shiitake mushrooms.

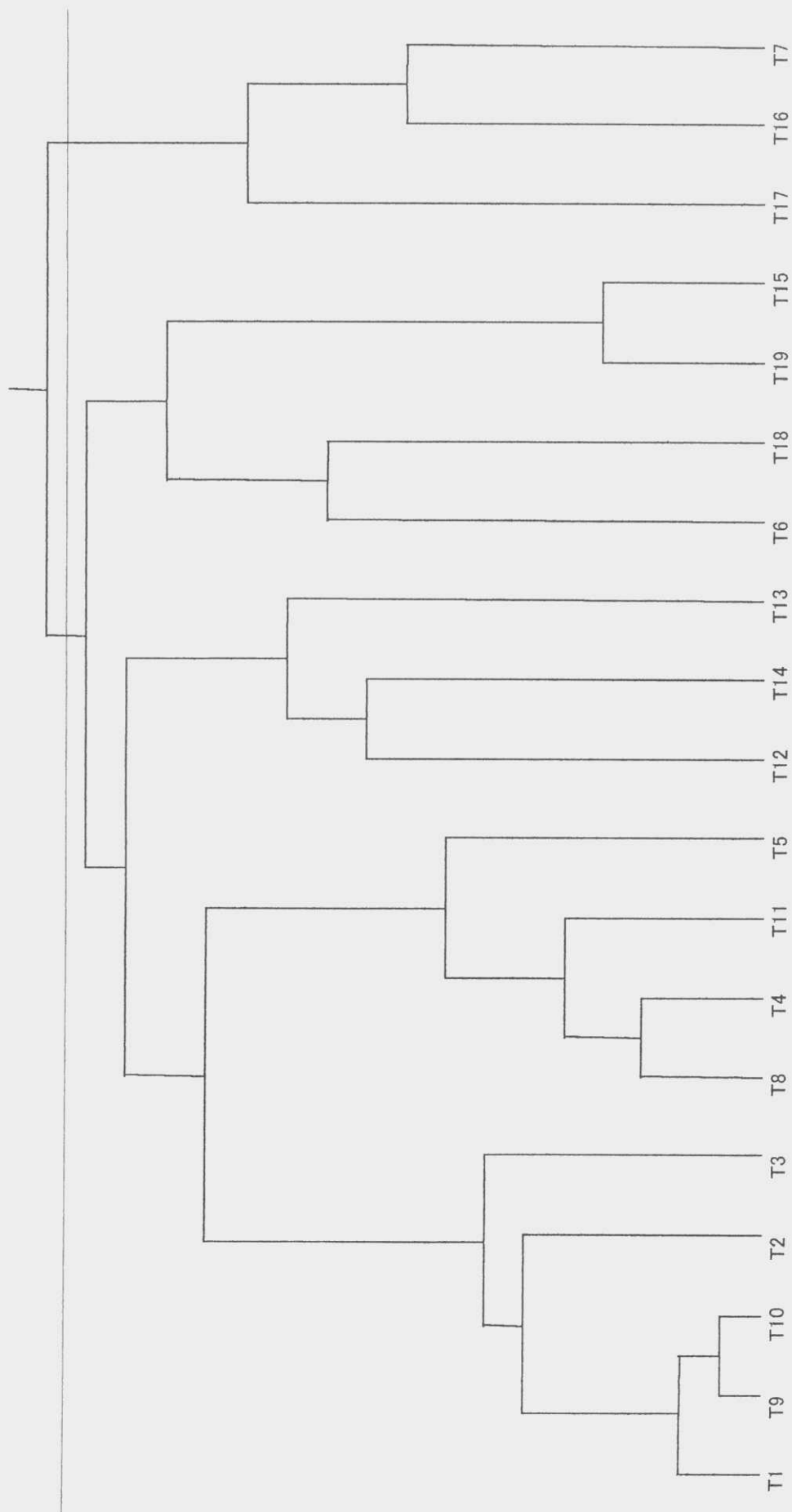


Fig. 13. Dendrogram of clustering based on 19 types from Inter-SSR PCR method and rDNA analysis to Japanese and Chinese dried Shiitake mushrooms.

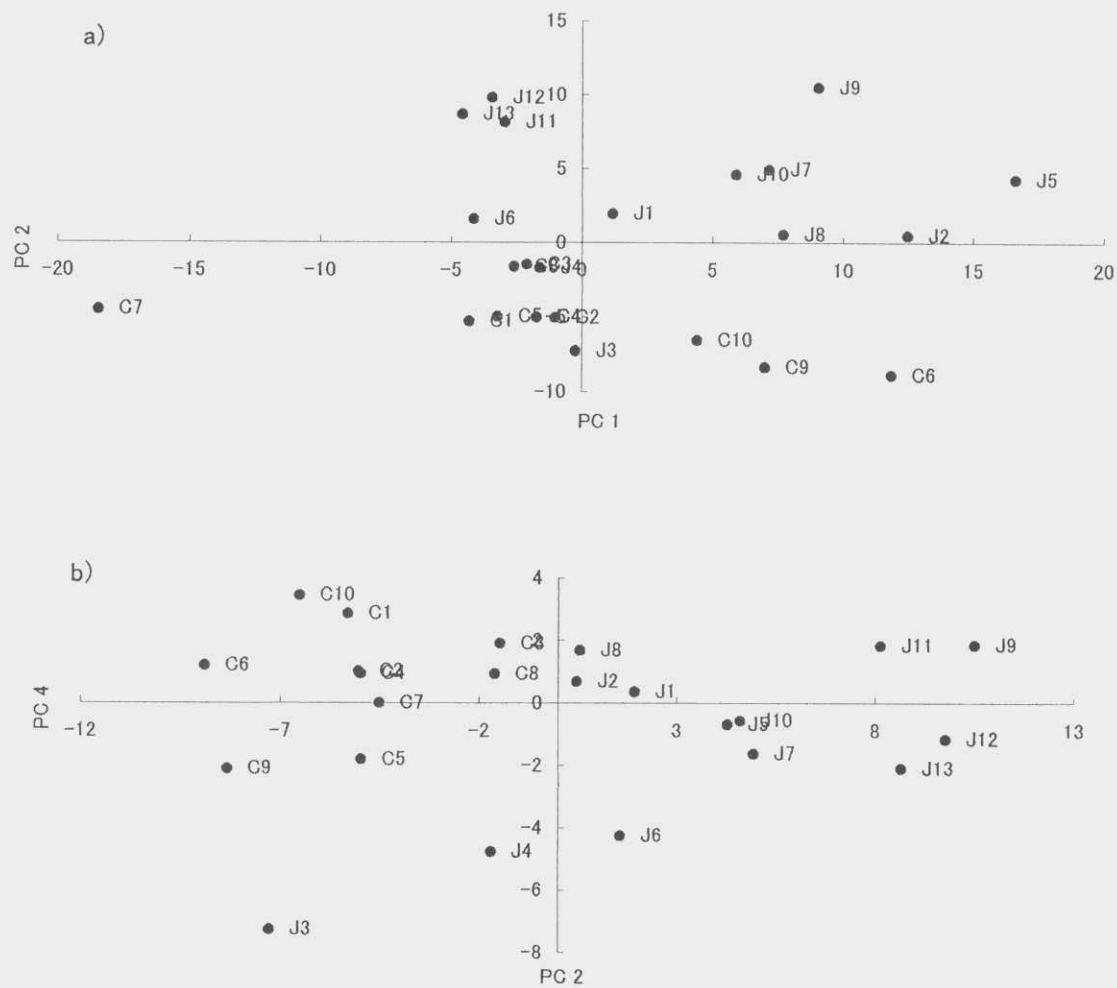


Fig. 14. Scatter plot of PC scores for a) PC1 and PC2, and b) PC2 and PC4 from Japanese and Chinese Matsutake mushrooms.
 J : Japanese samples, C : Chinese samples

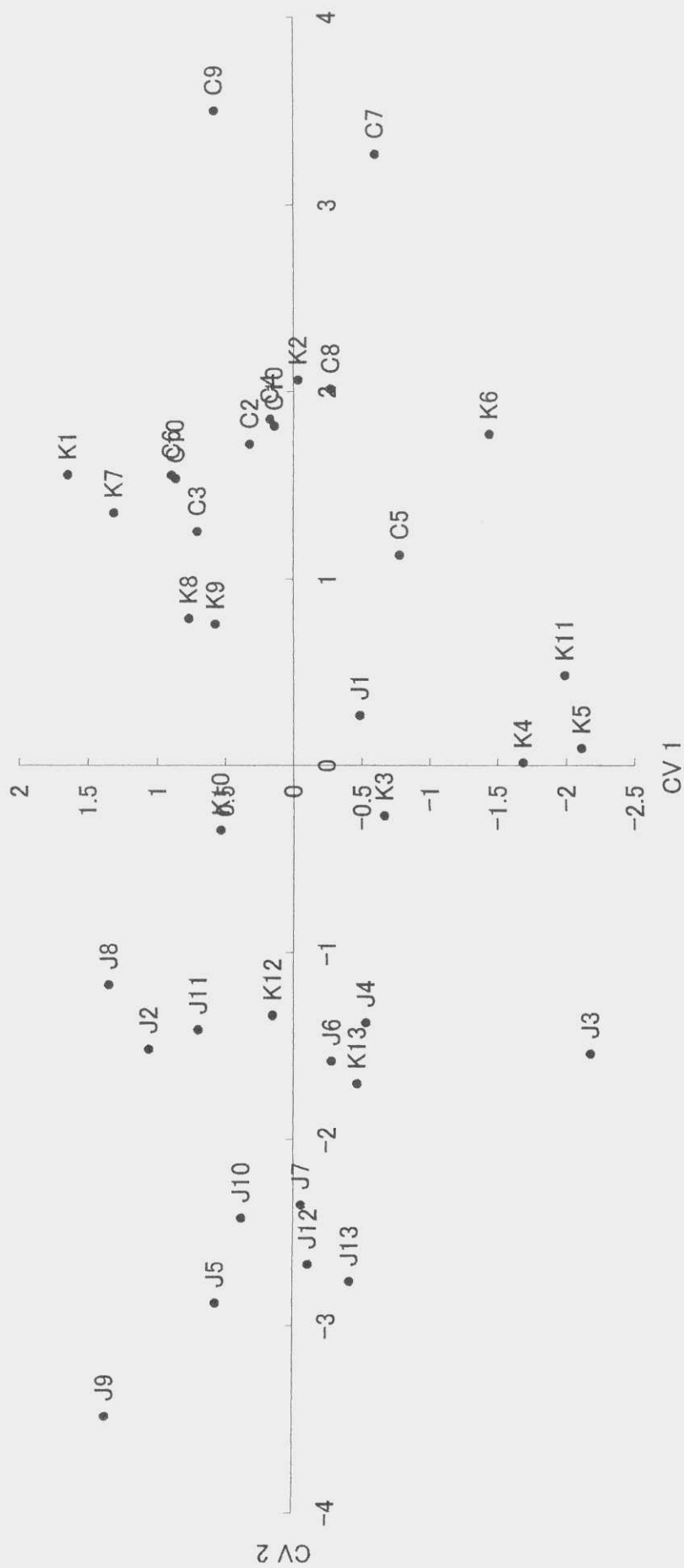


Fig. 15. Scatter plot of canonical variates for CV1 and CV2 from Japanese, Chinese and Korean Mutsutake mushrooms.
 J : Japanese samples, C : Chinese samples, K : Korean samples

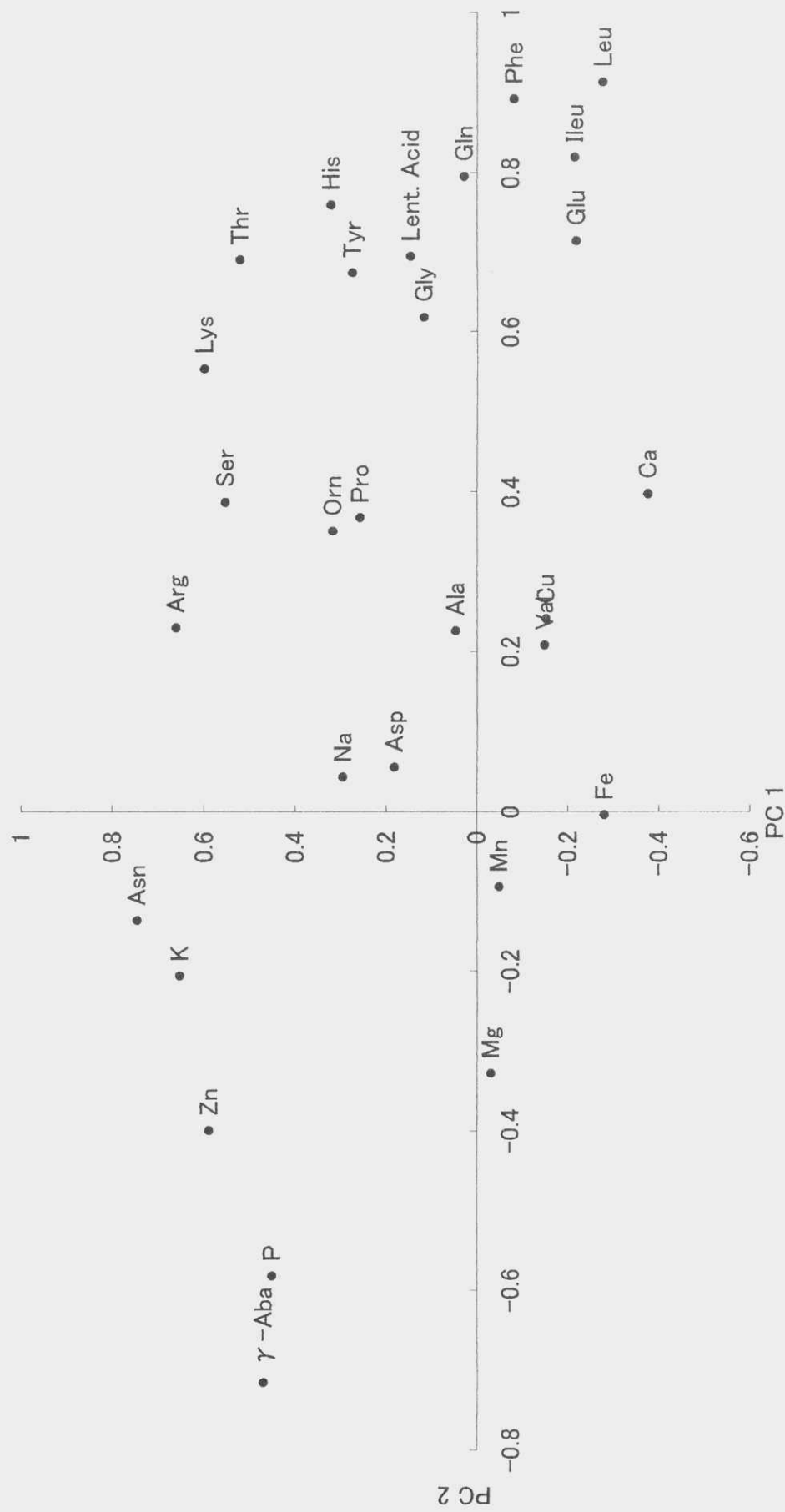


Fig. 16. Scatter plot of loadings for PC1 and PC2 of training set from the different cultivated raw Shiitake mushrooms.

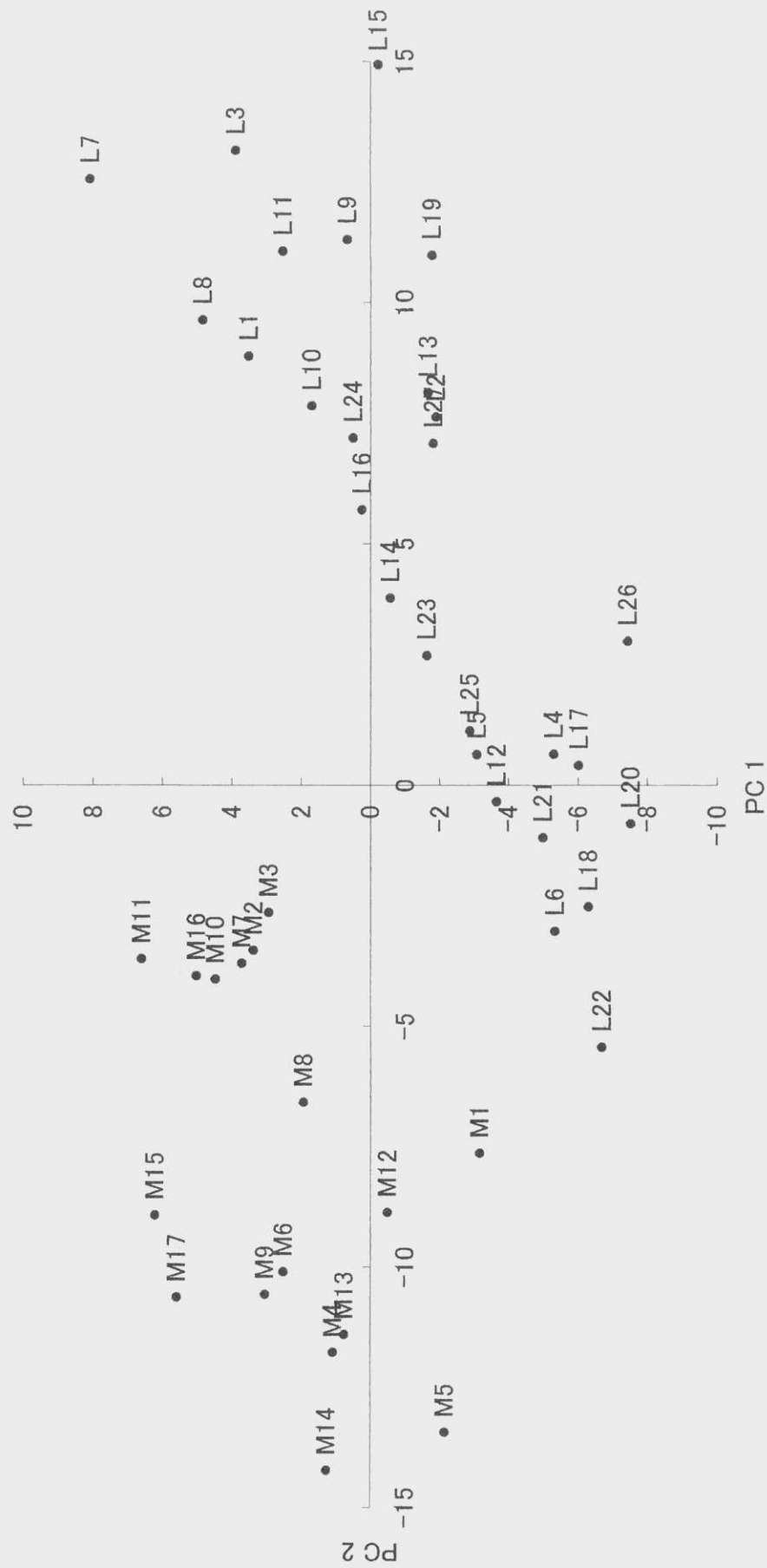


Fig. 17. Scatter plot of PC scores for PC1 and PC2 of training set from the different cultivated raw Shiitake mushrooms.

L : on log, M : on medium

