

無機分析による乾しいたけの栽培方法及び原料原産地判別法の再検討

法邑 雄司

Yuji HOMURA

要 約

乾しいたけの栽培方法及び原料原産地判別法について、判別の指標となる無機元素組成は生育環境あるいは生産地や生産量の推移等から変動する可能性があることから、最近生産された産地の由来の確かな試料を収集し、改めて判別法の再検討を行った。

収集した試料を現在の判別モデルにより判別したところ、栽培方法の判別率は、原木栽培品、菌床栽培品でそれぞれ 99 %、100 %であり、原料原産地の判別率は、国産、中国産原木栽培品でそれぞれ 97 %、72 %であった。また、今回収集した試料を含めて新たに構築した原料原産地の判別モデルの国産、中国産の判別率は、それぞれ 97 %、75 %と現在の判別モデルとほぼ同じであったことから、現行の判別法は、更新の必要はなく、現在流通している試料にも十分に適用が可能であることが確認された。

1. はじめに

産地を判別する科学的手法が開発され、産地偽装の抑止力としての効果が期待されるほか、産地表示の真正性を監視する業務において、書類調査を疑義のある対象のみに絞り込むことで効率的な調査が可能となっている。

農作物の無機元素組成は、栽培土壌、水などの生育環境を反映することから、産地判別の指標として有効であり¹⁾、これまでに長ネギ^{2),3)}、タマネギ⁴⁾、乾シイタケ⁵⁾、黒大豆⁶⁾、ニンニク⁷⁾、ショウガ⁸⁾などにおいて、無機元素組成を利用した産地判別技術が開発されている。具体的には、生産、流通状況に即して由来の確かな試料を集め、無機元素組成データを蓄積し、線形判別分析等の統計的手法により判別モデルを構築する。判別技術が開発された後は、事前の試行を通じて得られた知見を踏まえ分析操作から判別方法まで詳細に記載された手順書（マニュアル）が作成され、表示監視業務に利用されている。

また、無機元素組成は、その産地における栽培土壌などの生育環境に反映されるため、生育環境あるいは生産地や生産量の推移等から変動する可能性がある。そのため、定期的に生産地や生産量の推移を調査するほか、由来の確かな試料を収集し改めて判別モデルの性能を検証し、必要な場合は判別モデルを更新することが望まれる。

本調査研究では、乾しいたけの栽培方法及び原料原産地判別法及びそのマニュアル（非公開）について、最近生産された由来の確かな試料を入手し、過去に入手した試料との元素濃度の比較及び判別結果を確認し、判別モデル及びマニュアルの有効性及び更新の必要性を検証した。

(独)農林水産消費安全技術センター本部

2. 実験方法

2.1 試薬及び装置

試料の分解には、61% 高純度電子工業用硝酸(関東化学製)、70% 超高純度過塩素酸(多摩化学工業製)、49% 超高純度フッ化水素酸(関東化学製)を使用した。検量線用標準溶液には単元素標準溶液(Na, Mg, P, K, Ca, Mn, Fe, Zn, Sr及びBa各1000 mg/L: 関東化学製)及び混合標準溶液(XSTC-1, XSTC-8, XSTC-331: SPEX製)を適宜希釈して調製した。また、Inの単元素標準溶液(1000 mg/L: 関東化学製)を内標準溶液として希釈調製し、検量線用標準溶液及び試料溶液に添加した。水は超純水製造装置(Milli-Q Element A10: 日本ミリポア製)により製造した超純水(> 18 MΩcm)を用いた。

誘導結合プラズマ発光分析(ICP-OES)には、日本ジャーレルアッシュ製 IRIS Advantage DUOを用い、誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)には、Agilent Technologies製 HP-4500を用いた。

2.2 試料

国産原木栽培品 57 試料、中国産原木栽培品 17 試料及び中国産菌床栽培 10 試料の計 84 試料を収集した。国産原木栽培品については、判別モデルを構築するための試料には含まれていない生産量の少ない県も含め(10 t以上の生産量がある28県のうち、26県を収集。)、収集した。試料は2008年に収集したものであり、産年はほとんどが2007年から2008年であった。内訳は表1に示した。

表1 試料の内訳と判別結果

国産原木栽培品			中国産原木栽培品			中国産菌床栽培品		
産地	栽培方法	判別結果 原料原産地 (原木栽培品)	産地	栽培方法	判別結果 原料原産地 (原木栽培品)	産地	栽培方法	判別結果 原料原産地 (原木栽培品)
岩手	原木	国産	愛媛	原木	国産	中国	原木	中国産
岩手	原木	国産	愛媛	原木	国産	中国	原木	中国産
岩手	原木	国産	愛媛	原木	国産	中国	原木	中国産
岩手	原木	国産	高知	原木	国産	中国	原木	中国産
岩手	原木	国産	福岡	原木	国産	中国	原木	中国産
宮城	原木	国産	大分	原木	国産	中国	原木	中国産
宮城	原木	国産	大分	原木	国産	中国	原木	中国産
宮城	原木	国産	大分	原木	国産	中国	原木	中国産
福島	原木	国産	大分	原木	国産	中国	原木	中国産
群馬	原木	国産	大分	原木	国産	中国	原木	中国産
埼玉	原木	国産	大分	原木	国産	中国(安徽省)	原木	中国産
千葉	原木	国産	宮崎	原木	国産	中国(湖北省)	原木	中国産
新潟	原木	国産	宮崎	原木	国産	中国(陝西省)	原木	国産
石川	原木	国産	宮崎	原木	国産	中国(陝西省)	原木	国産
長野	原木	国産	宮崎	原木	国産	中国(陝西省)	原木	国産
静岡	原木	国産	宮崎	原木	国産	中国(陝西省)	原木	国産
静岡	原木	国産	宮崎	原木	国産	中国(四川省)	原木	国産
静岡	原木	国産	宮崎	原木	国産			
三重	原木	国産	熊本	原木	国産			
三重	原木	国産	熊本	原木	国産			
三重	原木	国産	熊本	原木	国産			
島根	原木	国産	熊本	原木	国産			
島根	原木	国産	長崎	原木	国産			
島根	原木	国産	長崎	原木	国産			
島根	原木	国産	鹿児島	原木	国産			
鳥取	原木	国産	鹿児島	原木	国産			
山口	原木	国産	鹿児島	菌床	中国産			
山口	原木	国産						
山口	原木	国産						
広島	原木	国産						

2.3 試料の前処理及び無機元素組成の測定

マニュアルに従い、試料の前処理及び無機元素組成の測定を行った。詳細は以下のとおりである。

各試料から1個体を抜き取り、調製した。抜き取った個体は木片や菌床培地の混入を避けるため柄部と傘裏面のヒダ部をセラミック製かみそりで除去し傘部のみとし、105℃で2時間乾燥した。その後、試料をポリエチレン製袋に入れ、袋の上から乳棒により叩いて粉碎し、乾燥粉末試料とした。

粉末試料約0.5gをヒータブルビーカーに秤量したのち、61%硝酸10mLを加え、時計皿でふたをしてホットプレート上で150℃まで徐々に温度を上げながら加熱した。途中で試料が気泡を含み膨張した場合は、ホットプレートから降ろし、膨張がおさまるまで室温にて分解を進めた。

褐色のガスが発生する激しい反応が収まったら、70%過塩素酸を2.5mL加え、200℃まで徐々に温度を上げながら加温した。分解液が無色あるいは淡黄色になったら、50%フッ化水素酸を2mL加え、100℃で40分間加熱した。

その後、時計皿をはずし、230℃まで温度を上げて完全に分解液を蒸発乾固させた後、1%硝酸を加え、ビーカー内の残留物をホットプレート上で溶解した。内標準元素としてInを定容後10µg/Lになるように添加した50mL容全量フラスコに、1%硝酸により定容した。試料及び試料を加えないで同様の操作をした空試験ともに3点併行で行った。

また、試料の1つにおいて、添加後の各元素の濃度が添加前の約2倍（添加前の濃度が検出下限以下など低い場合は約3倍から10倍）となるように単元素標準溶液を加えた試料を別途調製することで、標準添加回収試験を行い、回収率が70～130%の範囲内に入ることを確認した。

さらに、操作の安全性や前処理の簡略化のため、フッ化水素酸を添加しない前処理法を検討した。国産及び中国産原木栽培品各1試料について、上述の方法のほか、フッ化水素酸の添加を省略した前処理も併せて行った。

試料溶液は、ICP-OESによりNa, Mg, P, K, Ca, Mn, Fe, Zn, Sr及びBaの10元素を、ICP-MSによりLi, Al, V, Co, Ni, Cu, Rb, Y, Mo, Cd, Cs, La, Ce, Nd, Sm, Gd, W, Tl及びPbの19元素を測定した。ICP-OESとICP-MSの測定条件は既報⁵⁾に従い設定した。マニュアルでは判別に用いる10元素(Mg, P, Zn, Li, Al, Co, Cu, Mo, La, Ce)を測定しているが、今回は、モデルを構築するために測定したすべての元素を測定した。なお、測定値は、乾重量当たりの各元素濃度(mg/kg)に換算した。

2.4 統計処理

基本的な統計処理及び線形判別分析は、統計解析ソフト(STATISTICA Pro 03J(stattsoftジャパン製))により行った。

3. 結果及び考察

3.1 フッ化水素酸を使用しない前処理法の検討

国産及び中国産原木栽培品各1試料について、前処理法におけるフッ化水素酸の添加の有無による29元素の濃度を比較した結果を表2に示す。国産原木栽培品では、フッ化水素酸の添加の有無で全29元素の濃度に1%の水準で有意な差は見られなかったが、中国産原木栽培品では、原料原産地の判別に用いるAlなど数元素で有意差が見られた。中国産原木栽培品にフッ化水素酸を添加しない前処理法を適用すると、判別に用いる元素濃度に影響し、判別結果に影響を与えることが考えられることから、フッ化水素酸の添加を省略した前処理法は適用できないと判断した。

表2 フッ化水素酸(HF)の添加の有無による元素濃度(mg/kg)の比較

	Ba	Ca	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	Sr	Zn
国産原木栽培品										
HF添加あり	0.06	20	11	16,200	924	9.96	31	5,620	0.038	26.0
HF添加なし	0.05	20	11	16,300	935	10.0	32	5,700	0.038	26.7
中国産原木栽培品	*									*
HF添加あり	0.76	224	33	15,300	1,320	12.2	47	1,860	0.527	12.4
HF添加なし	0.50	202	30	14,600	1,280	10.7	38	1,780	0.422	11.4
	Li	Al	V	Co	Ni	Cu	Rb	Y	Mo	Cd
国産原木栽培品										
HF添加あり	ND	2.2	ND	ND	ND	4.6	89.2	ND	0.006	0.95
HF添加なし	ND	2.3	ND	ND	ND	4.7	89.3	ND	0.009	0.96
中国産原木栽培品		*		*		*				
HF添加あり	0.07	59.3	ND	0.11	0.21	3.6	35.4	ND	0.052	0.38
HF添加なし	0.05	54.8	ND	0.06	0.24	4.1	34.7	ND	0.052	0.34
	Cs	La	Ce	Nd	Sm	Gd	W	Tl	Pb	
国産原木栽培品										
HF添加あり	0.63	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
HF添加なし	0.64	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
中国産原木栽培品										
HF添加あり	0.48	0.029	0.054	0.026	ND	ND	0.017	ND	ND	
HF添加なし	0.45	0.023	0.042	0.022	ND	ND	0.011	ND	ND	

* 有意差あり(1%)

3.2 無機元素組成の経年変動の調査

収集した試料(国産原木栽培品)について、判別技術開発時に収集した試料の元素濃度と比較することにより、無機元素組成の生育環境あるいは生産地や生産量の推移等による経年変動を調査した。比較の対象として2002年に収集した検証用個体試料の無機元素データを選択した。結果を表3に示す。今回及び判別技術開発時に収集した試料の平均濃度の間で1%の水準で有意差が見られたのは、29元素中2元素(P, Ni)のみで、Pが約1.2倍増加したのに対し、Niは約6分の1に減少した。それ以外の元素では、大きな変動は見られなかった。

表3 国産原木栽培試料（2002年及び2008年収集）の平均元素濃度 (mg/kg) の比較

	Ba	Ca	Fe	K	Mg	Mn
国産原木栽培品(2002年収集)(n=30)	0.56±0.41	91±41	21±14	19,400±3,900	1,060±230	14.0±4.8
国産原木栽培品(2008年収集)(n=57)	0.41±0.39	73±42	17±12	20,100±3,900	1,090±170	14.3±6.2
	Na	P*	Sr	Zn	Li	Al
国産原木栽培品(2002年収集)(n=30)	50±23	2,580±720	0.408±0.227	29.9±11.0	0.01±0.03	22.8±22.1
国産原木栽培品(2008年収集)(n=57)	49±24	3,140±1,020	0.281±0.194	30.5±9.9	0.01±0.02	12.1±15.7
	V	Co	Ni*	Cu	Pb	Y
国産原木栽培品(2002年収集)(n=30)	0.00±0.0	0.04±0.06	0.12±0.12	5.7±3.0	62.9±33.4	0.00±0.01
国産原木栽培品(2008年収集)(n=57)	0.00±0.0	0.02±0.03	0.02±0.03	6.0±4.5	74.0±38.8	0.00±0.00
	Mo	Cd	Cs	La	Ce	Nd
国産原木栽培品(2002年収集)(n=30)	0.034±0.027	1.15±1.23	0.62±0.62	0.008±0.009	0.016±0.015	0.006±0.008
国産原木栽培品(2008年収集)(n=57)	0.031±0.028	1.07±1.08	0.80±0.96	0.003±0.007	0.003±0.006	0.003±0.006
	Sm	Gd	W	Tl	Pb	
国産原木栽培品(2002年収集)(n=30)	0.000±0.002	0.000±0.001	0.001±0.005	0.00±0.01	0.0±0.0	
国産原木栽培品(2008年収集)(n=57)	0.000±0.000	0.000±0.000	0.002±0.004	0.00±0.00	0.0±0.0	

* 有意差あり(1%)

3.3 判別マニュアルによる判別の中率の検証

判別モデルの有効性を検証するため、各試料から抜き取った1個体の乾重量当たりの元素濃度 (mg/kg) を、判別マニュアルにおける栽培方法（原木、菌床）を判別する式(a)及び原木栽培品における原料原産地（国産、中国産）を判別する式(b)に代入し判別した。A > 0であれば原木栽培品、A < 0であれば菌床栽培品と、B > 0であれば国産、B < 0であれば中国産と判別した。

$$A = -0.00638[P]+1.82[Cu]-0.520[Zn]-89.6[Mo]+82.7[La]+55.2 \dots\dots\dots (a)$$

$$B = -208[Li]-0.0230[Mg]+0.198[Al]-81.0[Co]-80.3[Mo]-180[Ce]+49.0 \dots\dots (b)$$

判別結果を表1に示す。乾しいたけの栽培方法の判別では、菌床栽培10試料中10試料（判別の中率100%）を、原木栽培74試料中73試料を正しく判別（判別の中率99%）した。

原木栽培の場合の原料原産地の判別では、国産原木栽培品57試料中56試料を正しく判別（判別の中率98%）し、モデルを構築するための試料において含まれていなかった県の試料も正しく判別した。一方、中国産原木栽培品17試料については、9試料を正しく判別し、8試料の誤判別があった（判別の中率53%）。

マニュアルに記載されている判別技術を開発した時の検証結果では、栽培方法（原木、菌床）の判別モデルによる判別の中率が100%（60/60）、原木栽培品における原料原産地（国産、中国産）の判別モデルによる国産原木栽培品の判別の中率が93%（28/30）、中国産原木栽培品の判別の中率が93%（14/15）であり、中国産原木栽培品を除いて判別の中率に大きな変化はなかった。

3.4 判別モデルの更新の検討

新たに収集した試料を含めた原木栽培品の原料原産地（国産、中国産）判別モデルを

線形判別分析により新たに構築し、現在の判別モデルと判別率を比較することで、現在の判別モデルの更新の必要性を検討した。

現在の判別モデルは、各試料から 10 個体など複数個体を混合（コンポジット）した試料により構築しているが、判別モデルの検証や実際の表示監視業務では、国産品と中国産品の混ぜ合わせなどに対応し、個体ごとに分析し、判別結果を出しているため、元素濃度はコンポジットした試料のものに加え個体による変動が加わり、判別結果に影響を及ぼす可能性がある。

そこで、今回は、個体試料を用いてモデルを構築した。試料として、今回収集した試料（国産原木栽培品 57 試料、中国産原木栽培品 17 試料）のほか、判別技術開発時に用いた検証用個体試料（国産原木栽培品 30 試料、中国産原木栽培品 15 試料）を用い、モデルは下記の①及び②の方法により構築した。モデルの評価は、クロスバリデーション（10-fold cross validation）により行った。

- ① 29 元素から後進ステップワイズ法(Fout 値を 19.0 に調整)により、4 元素（Ni, Mo, La, Ca）選択した。

$$C = -3.45[\text{Ni}] - 38.7[\text{Mo}] - 36.0[\text{La}] - 0.00252[\text{Ca}] + 7.37 \dots\dots\dots (c)$$

- ② Welch の t 検定により国産、中国産間で 1 %水準で有意差があった 16 元素から後進ステップワイズ法により、6 元素（Al, Co, Ni, Mo, Ce, Ca）を選択した。

$$D = 0.0604[\text{Al}] - 17.0[\text{Co}] - 2.99[\text{Ni}] - 42.0[\text{Mo}] - 61.6[\text{Ce}] - 0.0369[\text{Ca}] + 9.24 \dots (d)$$

それぞれの判別モデルのクロスバリデーションによる判別結果を表 4 に示した。

検証方法は異なるが、現マニュアルの判別モデルによって検証用試料（判別開発時に用いた試料を含む）を判別した結果（国産原木栽培品 87 試料中 84 試料的中、中国産原木栽培品 32 試料中 23 試料的中）と比較して、①の方法により構築した判別モデルは、ほぼ同じ的中率であり、②の方法により構築した判別モデルは、中国産原木栽培品では的中率が高く、国産では低くなっているが、全体として同じ的中率であった。現在のマニュアルの判別モデルと比較して、個体試料の判別率の高い判別モデルを構築することはできなかった。

表 4 判別結果の比較

	国産原木栽培品	中国産原木栽培品
現在の判別モデル	97 % (84/87)	72 % (23/32)
①により構築した判別モデル	97 % (84/87)	75 % (24/32)
②により構築した判別モデル	94 % (82/87)	81 % (26/32)

4. まとめ

乾しいたけの栽培方法及び原料原産地判別法について、判別の指標となる無機元素組成は生育環境あるいは生産地や生産量の推移等から変動する可能性があることから、新たに

由来の確かな試料（国産原木栽培品 57 試料、中国産原木栽培品 17 試料及び中国産菌床栽培 10 試料）を収集し、無機元素組成の経年変動の調査及び判別モデルの性能の再検証を行った。

判別開発時に用いた試料（国産原木栽培品：2002 年収集）と、29 元素の平均濃度を比較したところ、2 元素（P, Ni）で 1 %の水準で有意差が認められ、それ以外の元素では認められなかった。また、現マニュアルの栽培方法の判別の中率は、判別開発時に用いた検証用試料を含めると、原木栽培品、菌床栽培品でそれぞれ 99 %、100 %であり、原料原産地の判別の中率は、国産、中国産原木栽培品でそれぞれ 97 %、72 %であった。

今回収集した試料を含めて新たに構築した原料原産地の判別モデルの判別の中率は、国産、中国産でそれぞれ 97 %、75 %と現在の判別モデルとほぼ同じであることから、現マニュアルの判別モデルは、更新の必要はなく現在流通している試料にも十分に適用が可能であることが確認された。

5. 文 献

- 1) Ariyama,K., Nishida,T., Noda,T., Kadokura,M. and Yasui,A., *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3341-3350 (2006).
- 2) Ariyama,K., Horita,H., and Yasui,A., *Anal. Sci.*, **20**, 871-877 (2004).
- 3) Ariyama,K., Horita,H., and Yasui,A., *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5803-5809 (2004).
- 4) Ariyama,K., Aoyama,Y., Mochizuki,A., Homura,Y., Kadokura,M. and Yasui,A., *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 347-354 (2007).
- 5) 門倉雅史, 臼井裕一, 有山薫, 日本食品科学工学会誌, **53**, 489-497 (2006).
- 6) 法邑雄司, 鈴木忠直, 小阪英機, 堀田博, 安井明美, 日本食品科学工学会誌, **53**, 619-626 (2006).
- 7) 門倉雅史, 有山薫, 農林水産消費安全技術センター調査研究報告, **31**, 1-7 (2007).
- 8) 門倉雅史, 有山薫, 農林水産消費安全技術センター調査研究報告, **31**, 8-15 (2007).