貯蔵シイタケの褐変およびそれに関与する フェノールオキシダーゼ

龔 一平*・上田悦範*・阿部一博*・茶珍和雄*

Study of Phenol Oxidases on Browning of Shiitake (*Lentinus edodes* Sing.) Mushroom

Yiping GONG*, Yoshinori UEDA*, Kazuhiro ABE*
and Kazuo CHACHIN*

*College of Agriculture, University of Osaka Prefecture,
Gakuen, Sakai, Osaka 593

It has been known that phenol oxidase (monophenol oxidase, *o*-diphenol oxidase and laccase) activities in shiitake mushroom were inhibited by internal and external ethyl alcohol. In this paper, proteins from shiitake were separated by gel electrophoresis and stained with CBB or phenolic substrates. Monophenol oxidase, *o*-diphenol oxidase and laccase were detected four different isozymes each at the same Rms, and their activity changes occurred during browning of shiitake. The enzyme bands of browned shiitake packaged in perforated polyethylene bags were thicker and larger than those of shiitake packaged in airtight polyethylene bags. The inhibition of phenol oxidase activities was also observed on the enzyme bands of shiitake exposed to ethyl alcohol vapor during storage. When the slices of shiitake were treated with an inhibitor of protein synthesis (cycloheximide 0.1 mM), browning and *o*-diphenol oxidase activity in the slices were definitely inhibited. From these results, it was considered that ethyl alcohol was produced in the tissue of shiitake under an anaerobic atmosphere, and then it affected synthesis of phenol oxidases, therefore browning of shiitake was inhibited.

(Received Oct. 18, 1993)

貯蔵シイタケ (*Lentinus edodes* Sing.) の褐変はポリフェノールオキシダーゼの作用によることが報告されているが、既報¹⁾では、シイタケのフェノールオキシダーゼにはモノ、オルトジ及びパラジフェノールを酸化する酵素が存在する可能性が示され、ポリエチレンフィルムの密封包装により、それらの酵素活性が抑制されることがわかった。また、著者ら²⁾は、密封包装によるフェノールオキシダーゼ活性の抑制機構について検討し、嫌気条件下ではシイタケの組織中にエチルアルコールが蓄積することにより、フェノールオキシダーゼの活性の増加や褐変が抑制されることを報告した。

電気泳動法を用い、マッシュルームのフェノールオキシダーゼについて、酵素のアイソザイムを活性染色によ

りモノフェノールオキシダーゼ (MPO: EC 1.14.18.1) とオルトジフェノールオキシダーゼ (oDPO: EC 1.10.3.1) の差異を分析し、菌種間の差異および成長中の変化を調べた報告がある^{3) 4)}。シイタケのフェノールオキシダーゼには MPO, oDPO とラッカーゼ (LA: EC 1.10.3.2) の3種の酵素が存在する可能性があることから、それらの酵素タンパク質について貯蔵中の褐変に伴う変化やポリエチレンフィルム包装の影響などを検討する必要がある。

これらを明らかにするために、本研究では電気泳動法を用い、シイタケのフェノールオキシダーゼのアイソザイムを調べるとともにポリエチレンフィルム密封包装およびエチルアルコール処理による褐変や酵素活性の抑制

* 大阪府立大学農学部 (〒593 堺市学園町 1-1)

機構を検討した。

実験材料および方法

供試材料のシイタケは堺市中央卸売市場で購入し、厚さ 0.03 mm ポリエチレンフィルム袋 (270×180 mm) を用い、一袋当たり 6 個体のシイタケを入れ、密封ならびに有孔包装をした。有孔ポリエチレン包装は上記のフィルム袋の両面に直径 7 mm の孔を 12 個開けたものを使用して行い、包装したシイタケは 20℃ で貯蔵した。

シイタケのエチルアルコール処理は既報²⁾と同様に、容量 7 リットルのデシケーターに空気あるいは O₂ (1%) : CO₂ (10%) : N₂ (89%) の混合ガスを 200 ml/min の流速で通気し、流入したガスは容器底部の溶液 (蒸溜水あるいは 1.5% エチルアルコール水溶液) にバブリングすることによって行なった。このような条件下でデシケーター内に 20 個体のシイタケをいれ、20℃ で貯蔵した。

シイタケの酵素タンパク質は、低温下で冷アセトンにより作製したシイタケのアセトンパウダーから、0.1 M リン酸 Buffer (pH 7.0) により抽出した。この抽出液について飽和濃度 80% の硫酸で酵素タンパク質を沈殿させ、透析により脱塩処理してさらにポリエチレングリコール 9000 を用いて濃縮したものを電気泳動用試料とした。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (100V 一定、泳動時間 16 時間) は、4% から 30% までグラジェントさせたスラブ型ゲルを用いて実施した。ゲルの支持体はアクリルアミドモノマー (30~4%)、ビス (0.75~0.1%) とした。試料のタンパク質の 30 μg を電気泳動法で分離した。CBB タンパク染色および活性染色により、酵素タンパク質を検出し、貯蔵中の変化を調べた。

分離されたゲル上の酵素の活性染色は、0.01 M フェノール基質を含むリン酸 Buffer (pH 4.5 あるいは pH 3.5) に泳動したゲルを浸漬し、室温下で反応させることにより行なった。反応基質は MPO と oDPO にはそれぞれチロシンと DOPA (pH 4.5) とし、LA には p-フェニレンジアミン (pH 3.5) を使用した。

タンパク質合成阻害剤 Cycloheximide 処理がシイタケの褐変に及ぼす影響をつぎのような方法によって調べた。有孔ポリエチレンフィルム (厚さ : 0.03 mm) で包装し、20℃ 下で貯蔵したシイタケを貯蔵 2 日もしくは 4 日に包装から取りだし、菌傘について厚さ 1~2 mm の切片を作った。その切片を 0.1 mM の Cycloheximide に入れ減圧浸透処理した。処理後の切片は再び 20℃ で貯蔵し、貯蔵中の色調の変化および oDPO 活性の変化を既

報¹⁾と同様の方法で測定した。

実験結果および考察

1. シイタケのフェノールオキシダーゼのアイソザイム

硫酸沈析により得たシイタケのタンパク質を電気泳動により分離し、CBB 染色と酵素活性染色法により得られたバンドの位置からフェノールオキシダーゼのアイソザイムを調べた結果を Fig. 1 に示した。

CBB 染色の場合では、約 25 本のバンドが検出され、ほぼ中央に最も濃いバンドが 1 本みられた。チロシン、DOPA およびパラフェニレンジアミンによる活性染色の場合には、MPO (図中 B), oDPO (図中 C) ならびに LA (図中 D) は、それぞれ CBB で最も濃く染色されたバンドの上下 2 ヲ所ずつ合計 4 ヲ所にバンドが観察されそれぞれ 4 種類のアイソザイムを認めた。

2. 貯蔵中におけるシイタケのフェノールオキシダーゼの変化

ポリエチレンフィルム袋で包装貯蔵したシイタケから抽出したタンパク質を電気泳動により分離し、活性染色

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of phenol oxidase isozymes from shiitake

A, Shiitake proteins stained with CBB; B, MPO; C, oDPO; D, LA.

Enzyme activities were located by staining with tyrosine (B), DOPA (C) and p-phenylenediamine (D).

Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of MPO, oDPO and LA from shiitake packaged in polyethylene film bags

Enzyme activities were located by staining with tyrosine (MPO), DOPA (oDPO) and *p*-phenylenediamine (LA).

PE, Airtight polyethylene package ;

Pf. PE, Perforated polyethylene package.

Days of storage : 0 day (A), 4 days (B) and 6 days (C)

による酵素の存在を示すバンドは Fig. 2 に示した。

チロシンにより染色された MPO と DOPA により染色された oDPO の両酵素の染色度合いはほぼ同じで、貯蔵に伴い強くなるため、両酵素の活性増加が推定され、特に有孔包装では、下の 2 つのバンドが著しく濃くなった。パラフェニレンジアミンの染色でも、密封より有孔包装したもので染色が強く、上の 2 つのバンドは濃くなった。この結果から MPO と oDPO の活性増加は主に 4 つのアイソザイムのうち分子量がやや小さなアイソザイムにより、LA の活性増加は主に分子量がやや大きな 2 つのアイソザイムによっているものと考えられる。

タンパク染色により得られたゲル上のバンド (Fig. 3) では、褐変した有孔包装の貯蔵 6 日のものを貯蔵 0 日と貯蔵 6 日の密封包装のものと比較すると、最も濃いバンドの上下それぞれに 1 本ずつ濃いバンドが出現した (図中矢印)。これは Fig. 2 の活性染色により検出された酵素活性の出現箇所と一致した。

これらの結果から、シイタケの褐変におけるフェノールオキシダーゼ活性の発現はそのアイソザイムの変化によるものであり、ポリエチレンフィルムの密封包装によるシイタケの褐変の抑制はフェノールオキシダーゼのアイソザイムの変化が抑制されることによるものと推察した。

FLURKEY⁴⁾は電気泳動法によりマッシュルームの異なる成長段階におけるフェノールオキシダーゼのアイソザ

Fig. 3 Polyacrylamide gel electrophoretic patterns stained with CBB
PE, Airtight polyethylene package ;
Pf. PE, Perforated polyethylene package.
The arrow shows changes of pattern.

イムを調べ、成長に伴い変化のあることを報告したが、褐変との関係を検討しなかった。CHEN⁵⁾は伊勢エビ (*Panulirus argus*) 肉の *o*ODP 活性に及ぼす CO₂ (1 atm.) 処理の影響を調べたところ、CO₂ 処理 (30 min) した場合に酵素活性は減少したが、電気泳動ゲル上のパターンには変化がなかったため彼らは CO₂ 処理による肉 pH の変化が酵素活性を低下させる原因と推察した。本研究では貯蔵中のシイタケの褐変はフェノールオキシダーゼのタンパク合成、あるいはアイソザイムの合成が促進されるために進行するものと考えられる。つまり密封包装によるシイタケの褐変の抑制は、これらアイソザイムの合成が抑制されたためと考えられる。

3. エチルアルコール処理によるシイタケのフェノールオキシダーゼ活性の抑制

既報²⁾では、貯蔵環境ガス中にエチルアルコールを混入した場合にはシイタケの褐変が少なく、*o*DPO 活性の増加が抑制されることを報告した。また低濃度 (0.1%) エチルアルコールの存在下の粗酵素—基質反応系ではエチルアルコールによる酵素活性の抑制作用が認められず、エチルアルコールの存在しない反応系と同様の反応速度で基質が酸化され、反応液は褐色化することを認めた。このことは、エチルアルコールによる褐変抑制はエ

Fig. 4 Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of phenol oxidase from shiitake treated with ethyl alcohol vapor in a glass jar

Enzyme activities were located by staining with tyrosine (MPO), DOPA (*o*DPO) and *p*-phenylenediamine (LA).

CA : CO₂ 10%, O₂ 1%

Days of storage : 0 day (A), 6 days (B)

チルアルコールのフェノールオキシダーゼに対する直接的な作用によるものでなく、おそらく酵素合成の過程に影響を与えることによって生じるものと考えられる。

そこで電気泳動法を用い、エチルアルコールによるシイタケのフェノールオキシダーゼの発現に及ぼす影響を調べた。電気泳動ゲル上の活性染色により MPO, *o*DPO および LA とも活性染色の強さの増加が抑制されることが認められた (Fig. 4)。しかも、その抑制効果は O₂ (1%) : CO₂ (10%) : N₂ (89%) のガス条件下でも、対象区 (空気) と同様にみられた。

これらの結果から、貯蔵環境ガス中のエチルアルコールの存在あるいは密封包装シイタケにおけるエチルアルコールの蓄積はフェノールオキシダーゼの合成を抑制し、褐変を抑制するものと推定した。

4. タンパク質合成阻害剤処理によるシイタケ切片の褐変抑制

有孔包装で貯蔵 2 日もしくは 4 日後のシイタケから調製した切片をタンパク質合成阻害剤 Cycloheximide (0.1 mM) 水溶液で処理し、その後経時的にシイタケ切片

Fig. 5 Changes in browning index (A) and *o*DPO activity (B) of shiitake slices treated with cycloheximide (CH, 0.1 mM) during storage at 20°C

....., Treatment after 2 days of storage at 20°C ;

——, Treatment after 4 days of storage at 20°C.

の褐変と *o*DPO 活性の変化を調べた。

シイタケ切片の色調の変化は褐変指数として Fig.5-A に示した。貯蔵 2 日に調製・処理した切片は、処理後 1 日までは両区とも変化が少なかったが、その後対照区は急激に褐変した。阻害剤処理区では褐変が著しく抑制された。貯蔵 4 日に調製・処理した切片でも、対照区は急速に褐変指数が増大し、処理区でも褐変指数は少し増加した。

処理した切片の *o*DPO 活性の変化は Fig. 5-B に示した。貯蔵 2 日に調製・処理した切片は、褐変指数の変化と同様に処理後 1 日までは両区とも変化が少なく、その後対照区の *o*DPO は急激に増加したものの処理区はほとんど変化しなかった。貯蔵 4 日に調製・処理した場合には、対照区では増加の傾向がみられたのに対して、処理区では活性増加が抑制された。有孔包装で貯蔵 4 日の時点では、*o*DPO の活性はすでにあるレベルに増加しており、タンパク合成阻害剤処理で酵素合成が抑制されても、シイタケ切片の褐変はある程度進行したものと考えられる。

これらの結果は、さきに述べた密封包装中あるいは貯蔵環境ガス中にエチルアルコールが存在する場合のシイタケの褐変抑制がフェノールオキシダーゼの合成抑制によることを支持するものと考えられる。

要 約

ポリエチレンフィルム密封包装によるシイタケの褐変抑制機構を明らかにするため、電気泳動法によりフェノールオキシダーゼのアイソザイムを調べた。またガス組成が活性に及ぼす影響を調べるとともに酵素タンパク

質合成と褐変抑制の関連性を調べた。

シイタケのフェノールオキシダーゼの活性染色により MPO, *o*DPO ならびに LA にはいずれも 4 種のアイソザイムの存在が明らかになった。

シイタケの褐変にともない、アイソザイムの変化がみられ、褐変した有孔包装のシイタケのフェノールオキシダーゼのバンドは密封包装のシイタケのバンドより濃くかつ大きかった。

貯蔵環境ガスにエチルアルコールを添加したシイタケでは、活性染色によりフェノールオキシダーゼ活性の増加が認められなかった。

シイタケ切片をタンパク合成阻害剤 (cycloheximide 0.1 mM) で処理することにより、切片の褐変および *o*DPO 活性の増加は顕著に抑制された。

これらの結果より、密封包装条件下でシイタケに生成される内生エチルアルコールあるいは外から導入したエチルアルコールはフェノールオキシダーゼの発現の抑制に作用し、褐変を軽減するものと考えられる。

文 献

- 1) 龔 一平・阿部一博・茶珍和雄：日食低温誌, 19, 74 (1993).
- 2) 龔 一平・阿部一博・茶珍和雄：日食工誌, 印刷中
- 3) MOORE, B.M. and FLURKEY, W.H.: *J. Food Sci.*, 54, 1377 (1989).
- 4) FLURKEY, W.H.: *J. Food Sci.*, 59, 93 (1991).
- 5) CHEN, J.S., BALABAN, M.O., WEI, C.I., GLEESON, R. A. and MARSHALL, M.R.: *J. Sci. Food Agric.* 61, 253 (1993).

(平成 5 年 10 月 18 日受理)