

## マッシュルームチロシナーゼ反応への温度、酸素濃度の影響

青山 好男, 井上 竜一, 遠田 智江

### Influence of Temperature and Oxygen Concentration on Browning of Mushroom by Tyrosinase Reaction

Yoshio Aoyama, Ryuichi Inoue and Tomoe Enda

Browning is one of the quality deterioration of mushroom. The main cause of browning is enzymatic browning by tyrosinase. Influence of temperature and oxygen concentration on tyrosinase reaction was examined. Tyrosinase showed maximal activity at 45°C and had slight activity even at low temperatures. When it assumed activity at 45°C as 100%, it was 10.7% at 10°C and 4.4% at 5°C. Michaelis constants (Km) for oxygen were almost same at 5, 10 and 25°C, about 2%. The tyrosinase reaction progress in other conditions was calculated from the data acquired. The influence of low temperatures and low oxygen concentration on the quality of mushroom slices during preservation were examined in practice. Appearance and firmness of mushroom were kept as them of at first stage after 6 day in the atmosphere of 2% oxygen concentration at 5°C, although browning of mushroom slices was observed after 2-3 day under atmosphere (oxygen concentration 21%) at 5°C.

**Key words:** mushroom, browning, enzyme reaction, tyrosinase, temperature, oxygen, Km, preservation

近年、流通条件が整備されてきたため、生鮮食品が新鮮な状態で入手できるようになってきた。カット野菜のように、生鮮食品をほとんど加熱処理無しで流通することも増加してきた。また、できるだけ品質のダメージが少ない最小限の加熱加工を行うことが食品に一般的なこととなってきている。このように食品材料が全く加熱処理を受けなかったり、受けても非常に軽微な場合には、材料中の酵素活性が残存することになる。したがって、食品材料中の酵素の低温における活性に関する情報が重要になってきている。

ここでは酵素的褐変の代表であるマッシュルームのチロシナーゼの反応に及ぼす温度と酸素濃度の影響を調べた。チロシナーゼはチロシンを酸化し、*o*-キノンを生成し、そのキノンが重合し褐変色素を生じる酵素的褐変の代表的な酸化酵素である。酸素は基質の1つであり、その酵素反応は酸素濃度の影響を直接受ける。したがって酸素濃度を制御すれば、酵素的褐変を防止できる。低温と低酸素濃度で、マッシュルームの褐変をどの程度防ぐことができるかは、マッシュルーム保存において重要な課題である。ここでは、低温と酸素濃度のチロシナーゼ反応に対する影響を把握することを目的とした。また実際にマッシュルームスライスを用いて、温度と酸素制御でどの程度褐変が防止できるかを調べた。

### 実験方法

#### 1. 実験材料

チロシナーゼ (E.C.1.14.18.1)<sup>1)</sup> はシグマ社のマッシュルーム給源のものを用いた。活性は 1000 unit/mg solid 以上のもの (1 unit :  $\Delta A_{280}0.001/\text{min}$  pH 6.5, 25°C) である。マッシュルームはホワイト種でボタン型のものを用いた。これは現在の市場ではホワイト種が主であること、ブラウン種よりも褐変が起りやすいためである。扇港興産(株)生産のものを収穫後冷蔵保存のものを 1~2 日以内に使用した。重量は  $20 \pm 2.2$  g であった。

#### 2. 酵素活性の測定

1 mM のチロシン溶液 2.7 ml に対して酵素溶液 0.1 mg/ml 0.3 ml を混合して反応させた。緩衝液は 50 mM リン酸緩衝液, pH 7.0 を用いた。酵素反応は、島津製作所 (株) 分光光度計 UV-2200 (恒温セルホルダー付置) によってセル内を一定温度に保持し行った。チロシンからの *o*-キノン生成による 280 nm の吸光度の増加を経時的に追跡し、吸光度増加の初期の直線部分の傾きを反応初速度として求めた。

酸素濃度の反応への影響は分光セル内に種々の酸素濃度の混合ガスを導入することにより行った。分光セルはスクリーキャップ型で、オープントップの天面に穴が開いたものを用い、セプタムゴムを設置、このゴムに注射針を 2 つ取り付け、一つから酸素、窒素の混合ガスを導入、別の

一つはガスの排出口である。酵素反応液中の溶存酸素濃度が一定に達するのに十分な時間のガスフローを行った。溶存酸素濃度が一定になるために必要な30分間の混合ガスのバブリングを行い、溶存酸素濃度が一定に達した後、セルの気相部にガスフローしながらセル内の基質溶液にシリンジを用いて酵素液を注入し、反応を開始した。

### 3. 酵素の耐熱性

酵素溶液（緩衝液 pH 7.0）を恒温槽に浸漬、所定温度に10分間保持した後、水道水に浸漬し室温に戻した。残存酵素活性は25℃で酵素反応を行い、その反応速度から求めた。

### 4. マッシュルームの褐変に対する温度、酸素濃度の影響

低温、低酸素濃度がマッシュルームの褐変にどのように影響するかを調べた。マッシュルームを5mm厚にスライスし、保存中の乾燥を防ぐために水を含ませたろ紙を底におき、ろ紙に直接当たらないようにスライスをセットした。それらの作業はすべて真空グローブボックス（井内盛栄堂SGV-65V型）内で行った。真空グローブボックス内の酸素濃度は2%であった。嫌気パウチに収容し、シールした後、それらのサンプルを取り出し、保存試験に供した。保存温度は5, 20, 35℃の3条件である。コントロールとして作業をすべて大気下で行い、そのまま大気に開放状態で保存したものを用いた。肉眼での観察と同時に、ミノルタ色彩色差計CR200でL\*a\*b\*表色系で色評価した。スライスの菌傘中心部表面を3点測定し、その平均値をとった。色差計測定値から算出された $\Delta E$ が最もよく褐変を反映していたため、保存開始時点の測定値を標準に $\Delta E$ でマッシュルームの色を評価した。

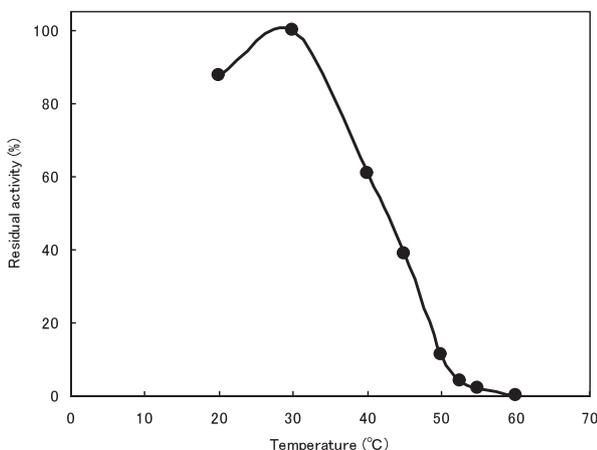


Fig. 1 Heat-stability of tyrosinase : residual activity after heat treatment for 10min. at different temperatures

## 実験結果と考察

### 1. マッシュルームチロシナーゼ活性への温度、酸素濃度の影響

#### 1) 酵素の耐熱性

酵素の耐熱性は所定温度に10分間保持し、常温に戻して酵素反応、その反応速度から求められた。Fig. 1は20～60℃で10分間保持した後の酵素反応速度を測定した結果である。最も活性の高かった30℃での反応速度を100としたパーセント表示である。45℃で、40%と活性はかなり低下しており、耐熱性はあまり高くなかった。

#### 2) 活性に対する温度の影響

大気下、酸素21%での実験結果をFig. 2に示す。45℃付近で最大の反応速度を示している。50℃あたりから急激に不可逆的な失活が起こっているものと考えられる。最大活性を示す45℃での反応速度を100とすると、5℃で4.4%、10℃で10.7%となった(Fig. 2)。

#### 3) 反応速度に対する酸素濃度の影響

酸素0%のガスをフローした時の分光セル内の反応液の変化を調べた結果をFig. 3に示す。酸素21%の空気をフローしたものは10分で褐色になり、酸素0%のものをキャップで密封したものは1日放置後も褐色していない。

チロシナーゼ反応への酸素濃度の影響を、5, 10, 25℃で調べた結果をFig. 4に示す。横軸に基質濃度（酸素濃度）、縦軸に酵素反応速度をプロットしたものである。酸素濃度は、気相の酸素濃度で表現した。反応は液相で起こっているが、褐変抑制という観点では気相酸素濃度でモニターするのが実用的であり、実際の測定値も気相酸素濃度であるので、気相酸素濃度で表現している。

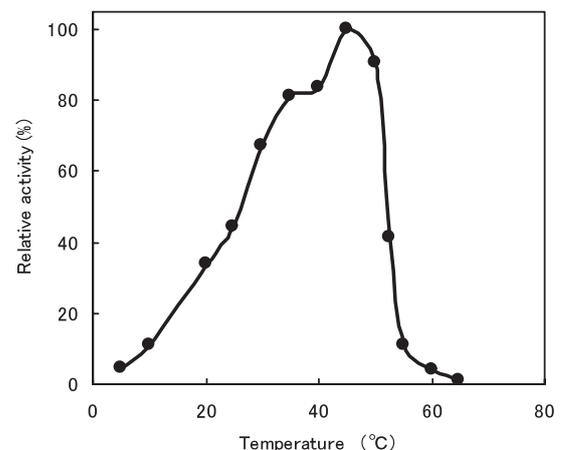
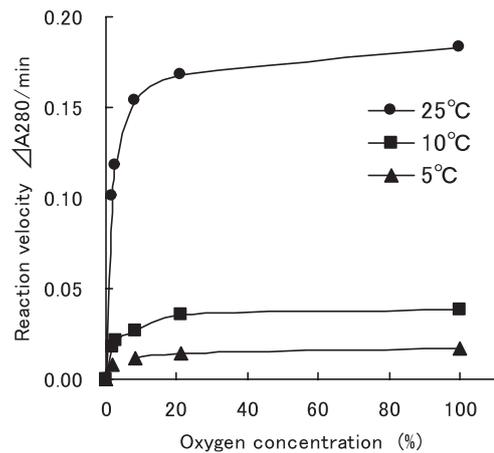


Fig. 2 Influence of temperature on tyrosinase activity



**Fig. 3** Browning reaction by tyrosinase  
Left: O<sub>2</sub> 21% Right: O<sub>2</sub> 0%



**Fig. 4** Influence of oxygen concentration on the tyrosinase reaction at different temperatures

Km 値は最大反応速度の1/2を与える基質濃度（酸素濃度）であるが、酸素濃度を2%程度、大気中の酸素濃度の1/10にしたときに反応速度は半分になっている。酸素濃度を1/10にしてやっと反応速度が半分であり、比較的Km 値が小さく、酵素との親和性が強いといえる。5～25℃での Km 値に大きな差はなかった。なお Km 値は Hofstee プロット<sup>2)</sup> から求めた。ここには示していないが、良好な直線性が得られている。

Km 値を求めたものと同じグラフ、酸素濃度と酵素反応速度の関係のグラフの外挿により、酸素のより低濃度の領域での反応速度を計算により求め、種々の温度における、種々の酸素濃度での反応速度を算出した (Table 1)。この表の数値は25℃、酸素21%での反応速度を100とした場合で表している。5℃で気相酸素濃度を0.1%にした場合0.5%となる。この逆数は200となり、25℃酸素21%の場合の反応の進行に比べて同じ量の反応進行に200倍時間がかかることになる。

低温と低酸素の反応抑制効果をみると、温度25℃から

5℃へ低下させることで1/12 (8.7%) となり、酸素を21%から0.1%へ低下させた効果は1/17 (5.8%) と見積もられる。この両者の効果を合わせると1/204となる。これは0.5% (1/200) に近い値である。低温と低酸素の相乗的な反応抑制効果は特になくということになる。

## 2. マッシュルームの褐変に対する温度、酸素濃度の影響

マッシュルームスライスを酸素制御雰囲気下（酸素2%）に5, 20, 35℃で保存した場合の変化（褐変）を、大気中で保存したものと比較した (Fig. 5)。35℃では液がしみ出した状態になっていた。一般にキノコ類は酵素活性が高く自己消化しやすいといわれているが、それが起こっていると考えられる。20℃、酸素2%では、褐変程度は非常に小さく、大気下との差が明らかであった。また5℃、酸素2%では、いずれもほとんど褐変しておらず、初期の状態に近い外観、かたさを保持していた。6日後でも褐変はわずかで良好な状態であった。それに比べて大気下では5℃でも2～3日でかなり褐変が見られていた。

**Table 1** Tyrosinase reaction velocity at different temperatures and oxygen concentration (calculated figures from Km-value)  
(reaction velocity at 25℃ and oxygen concentration 21%: 100%)

		Oxygen concentration (%)					
		0.10	0.20	0.50	1.00	2.00	21.00
Temperature (°C)	5	0.5	0.9	2.1	3.3	4.4	8.7
	10	0.9	1.7	3.8	6.4	9.8	20.3
	25	5.8	11.0	23.9	39.1	55.1	100

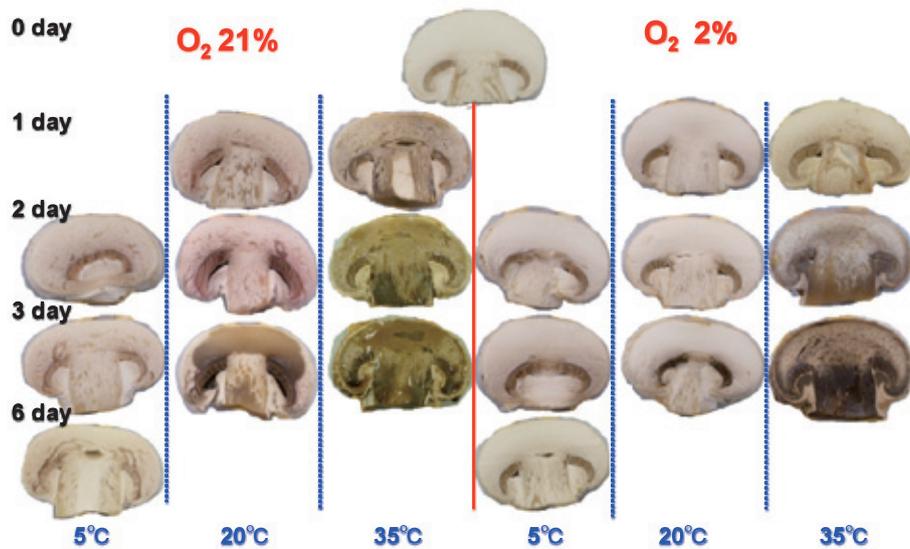


Fig. 5 Changes in mushroom slices during storage

Left: O<sub>2</sub> 21%, Right: O<sub>2</sub> 2%

なお予備試験では、酸素濃度 0.2%, 20°C, 2-3 日の保存ではガス発生があり、アルコール臭も感じられ、嫌気呼吸が進行したと思われる状態となっていた。

色差計で測定した結果が Fig. 6 である。保存開始時点、0 日区のマッシュルームスライスを基準にした、色差  $\Delta E$  である。酸素制御下では大気下に比べて褐変が抑制されていることが  $\Delta E$  から明らかである。酸素 2% では、 $\Delta E$  はいずれも 5 以下であった。しかしながら大気下では 10 前後であった。20°C では、酸素 2% と大気下のものとの色差の違いはより明確である。マッシュルームスライスの褐変防止に酸素低減は有効であった。マッシュルームチロシ

ナーゼ反応への影響をみた Table 1 から、5°C, 酸素濃度 2% では、25°C, 酸素濃度 21% に比べて反応速度は 4.4% であり、常温、大気下では 25 倍早く進行することになる。

## 文献

- 1) 八木達彦, 福井俊郎, 一島英治, 鏡山博行, 虎谷哲夫: 酵素ハンドブック, 朝倉書店, 2008.
- 2) 大西正健: 酵素反応速度論実験入門, 学会出版センター, 1987.

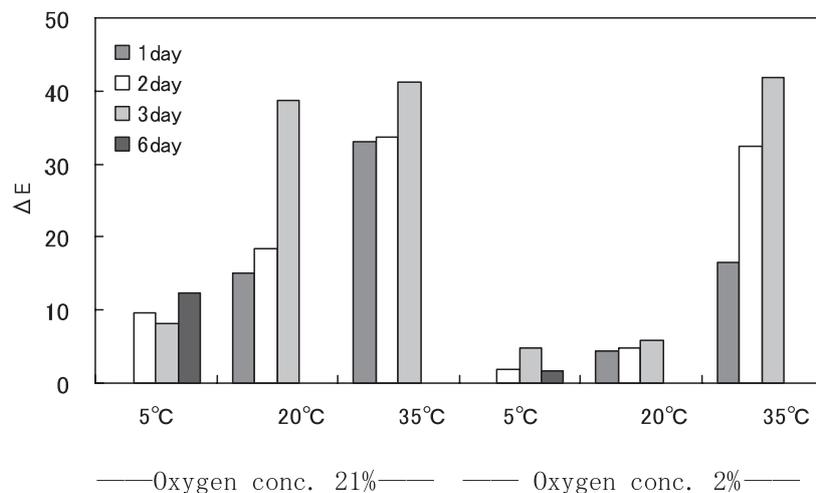


Fig. 6 Changes in  $\Delta E$  of mushroom slices during storage under atmosphere and low oxygen concentration (2%)