

— ノート —

## 果実によるタンパク質分解酵素の活性検査

森内安子

Examination of the Activation of Enzyme Decomposition in Fruits

Yasuko Moriuchi

### 要 旨

果実に含まれているタンパク質分解酵素の活性法として、授業時間内に酵素を分離精製しないで測定できる方法を検討した結果、基質にカゼインを用いたペーパーディスク法が有効であることがわかった。

パイナップル、キウイフルーツの2種類の果実のタンパク質分解酵素の活性は、ゼラチンのゲル化方法の結果からゲル化に要する時間に差はあるものの、キウイフルーツのほうが早くゲル化した。これは、パイナップルは水分量が多いので粘性が低くなり、その酵素が動きやすくなったためではないかと考えられた。しかし、果汁の上澄み液を酵素試料に用いたペーパーディスク法の結果から、果汁の粘性にかかわらずパイナップルはキウイフルーツよりタンパク質分解酵素の活性が高いことが明らかとなった。

**キーワード** プロテアーゼ protease  
ペーパーディスク法 paper disk method  
カゼイン casein  
果実 fruit

### はじめに

タンパク質分解酵素を含む果実はパイナップル、キウイフルーツ、イチジク、パパイヤなどが一般的によく知られている。

パイナップルには果汁や葉から作られるタンパク質分解酵素ブロメリンが、キウイフルーツにはアクチニジンが存在している。アクチニジンはキウイフルーツに含まれるタンパク質の50%を占めるが、ゴールデン種のキウイでは含有量が少なく緑色のキウイフルーツに存在する。イチジクには白い乳液に強力なタンパク質分解酵素フィシンが細胞中の液胞に存在している。パパイヤにはパパインが存在しているが、パパインはまだ熟していない青パパイヤに含まれ、熟したパパイヤにはほとんど含まれていない<sup>1)2)</sup>。

このような、果実に含まれるタンパク質分解酵素の定性方法として、授業でゼラチンを用いてゲル化の状態を観察している。本来、酵素実験は果実から酵素を分離精製して用いるべきであり、酵素以外の物質の影響を受けない方法が適切である。しかしながら、酵素の分離精製は操作が煩雑であるうえさらに長時間を要する。そこで、授業ではタンパク質分解酵素の活性を確認できる方法として、果肉、果汁を用いてゼラチンゾルからゲル化へ変化する状態を観察している。

ところで、それぞれの果実によるタンパク質分解酵素の活性はゼラチンのゲル化状態より判定できるが、活性力の定量まではできない。以前より、著者は酵素を分離精製せずに活性力を数値で示すことはできないものかと模索し、本研究ではペーパーディスク方法が有効な方法であると考え検討を試みた。

なお、果実は四季を通じて入手が可能であるパインアップルとキウイフルーツを試料に用いて実験を行った。

## 実験方法と結果および考察

まず、授業で実施しているゼラチンのゲル化状態の観察方法を説明する。

＜ゼラチンのゲル化方法＞

### 1. 試料, 試薬

粉ゼラチン, 粉寒天, 果実 (パインアップル, キウイフルーツ)

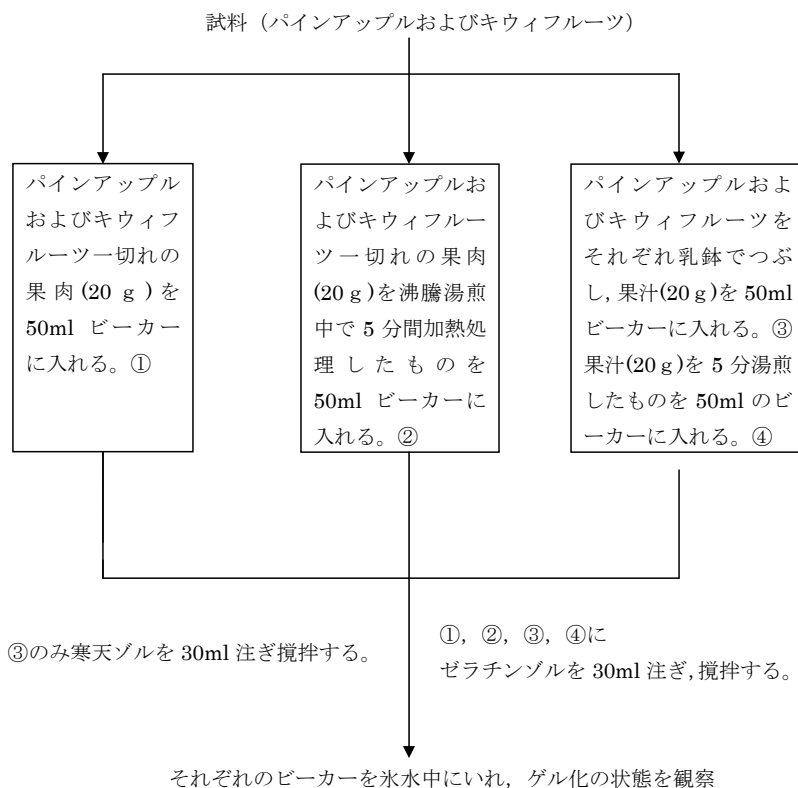
### 2. 操作方法

ゼラチン 8 g および寒天 3 g をそれぞれ 300 ml ビーカーにとる。それらに純水 200 ml を加え、加温溶解し、ゼラチンおよび寒天のゾルを調整する。パインアップルおよびキウイフルーツを準備し、図 1 の要領で実験を行った。実験はいずれも 5 回ずつ行った。

### 3. ゲル化状態の結果および考察

果実に含まれるタンパク質分解酵素は、タンパク質であるゼラチンを分解することにより、タンパク質であるゼラチンゾルのゲル化を阻止し、凝固時間に違いを生じる。

パインアップルとキウイフルーツに含まれるタンパク質分解酵素の活性力は図 2, 3 に示した。最もゲル化しにくかった生果汁においてパインアップルが 20 分以内ではゲル化しなかったのに比べキウイフルーツは 11 分 27 秒～15 分 47 秒にゲル化し、パインアップルはキウイフルーツよりもゲル化に要する時間が多い。これは果実に含まれるタンパク質分解酵素が強く働いているためと推察される。また、パインアップル果汁はキウイフルーツに比べて粘性が少なかった。このことからパインアップル果汁に含まれる酵素は粘性が低いためゼラチンへより効率的に浸透したのではないかと考えられた。また、同じ果実に含まれる酵素であっても、ゲル化に要する時間は生果汁と生果肉ではパインアップル、キウイフルーツともに生果汁のほうがゲル化に要する時間が多く、生果汁と生果肉との違いにより分解酵素の働きに差が生じた。これは果



**図1 果実のタンパク質分解酵素の活性法**

肉に比べ果汁の酵素がゼラチンゾルへの接触面が多くなることで、より効率的に酵素が働いたと考えられる。さらに、加熱処理したものはいずれも生果実よりもゲル化に要する時間が少なくなるのは、周知のことであるが加熱により酵素が失活したためである。ところが、加熱処理した場合は、パイナップル果肉4分56秒～7分52秒、キウイフルーツ果肉1分34秒～5分23秒、に比べてパイナップル果汁4分20秒～6分7秒、キウイフルーツ果汁1分26秒～4分16秒と果汁の方がゲル化に要する時間が少なくなっている。これは、果汁が果肉に比べて接触面が多いため果肉より強く加熱処理され、酵素が失活したためと考えられる。

一方、寒天は、酵素が働きやすい生果汁を用いても、寒天ゾルからゲル化の凝固に要する時間がゼラチンに比べてかなり少なくなっている。これは、寒天がタンパク質でなく食物繊維であるため、タンパク質分解酵素の影響を受けずにゲル化したためである。

ゲル化の方法は、ゲル化に要する時間を測定することでそれぞれの果実に含まれるタンパク質分解酵素活性の高低は分かる。ところが、この方法は、測定時間中に氷水の温度が変化するためと考えられるが、ゲル化に要する時間にかかなりの差が生じるという欠点がある。そこで、著者は、一定の温度を保つ恒温層内で酵素活性を測定できるペーパーディスク法がこの欠点を補い、かつ酵素を分離精製しなくて用いることが可能な方法と考え実験を試みた。

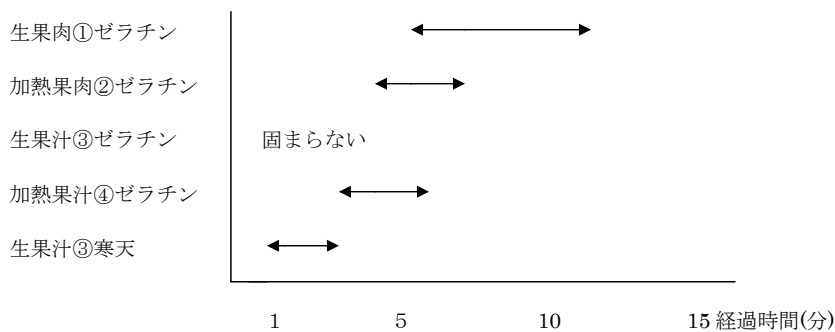


図2 氷水に入れてからゲル化に要した経過時間 (パイナップル)

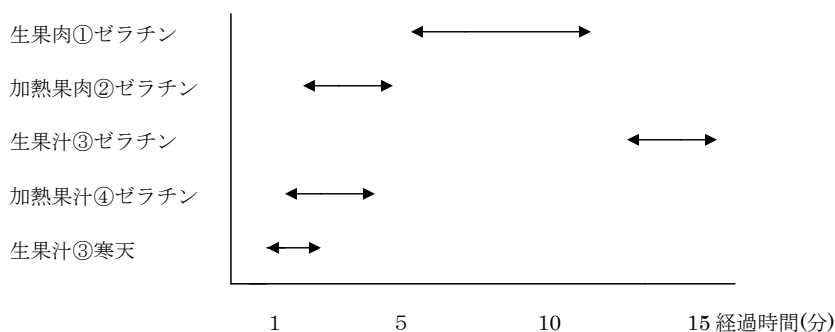


図3 氷水に入れてからゲル化に要した経過時間 (キウイフルーツ)

### <ペーパーディスク法>

#### 1. 実験の基本操作<sup>3)</sup>

- 1) 調整した基質溶液に、寒天1.5%を加えて加温溶解し、これを直径9 cmのペトリ皿に約20ml 流し込んで固化させ、寒天平板とする。
- 2) 使用するペーパーディスクは東洋濾紙製の直径8 mmのもので、これをそれぞれの被検酵素溶液に浸したのち、濾紙上において余分の試料液を取り除いておく。
- 3) この試料ディスクを、先に用意した基質含有の寒天平板上に貼り付け、37℃の恒温槽内に一定時間静置する。
- 4) 試料ディスクに含まれた酵素は、その濃度に応じて周囲に拡散しながら寒天平板内の基質に作用していく。作用域は当然のことながら円形に広がるので、寒天平板上に酸を注ぐと平板上に明瞭な作用円が現出する。

#### 2. 果実に含まれるタンパク質分解酵素の検出

##### 1) 酵素と基質

酵素試料はパイナップルとキウイフルーツの果汁を用いた。ペーパーディスクはそれぞれの果汁に1分間浸漬したのち、濾紙上で余分の果汁を取り除いて使用した。基質はカゼインお

よびゼラチンを用い、いずれも基質濃度が1%となるように溶解して基質溶液とした。なお、カゼインは純水では溶解しないため、①1MのNaOHを含む純水に溶解後、1MのHClでpH7.0に調整したもの、②0.1Mリン酸緩衝液(pH7.6)に溶解したものと2種類の基質溶液を用いた。

## 2) 実験操作

基本操作に基づいて基質寒天平板を作成したのち、各果汁の酵素溶液を含ませたディスクを平板上に貼り付ける。これを37℃の恒温槽内に20時間静置して酵素反応を進行させた。

いずれも各実験に寒天平板を5枚ずつ用意した。

## 3) 作用円の検出

寒天平板上で、未分解のタンパク質と加水分解産物とが識別できる酢酸を寒天平板上に注ぎ、作用円を検出し、この作用円の直径を測定する。なお、今回は酢酸のみでは明瞭な作用円が検出できなかったためアルコールと酢酸を用いた。

## 3. ペーパーディスク法の結果および考察

果汁そのままを酵素試料とした作用円の検出反応の結果を図4に示した。

基質として2種類のカゼイン溶液とゼラチン溶液を用いた結果は、カゼインがいずれもキウイフルーツに比べてパイナップルの作用円は大きく現れていた。しかし、ゼラチンの結果はカゼインと異なり、キウイフルーツの作用円が大きく現れていた。

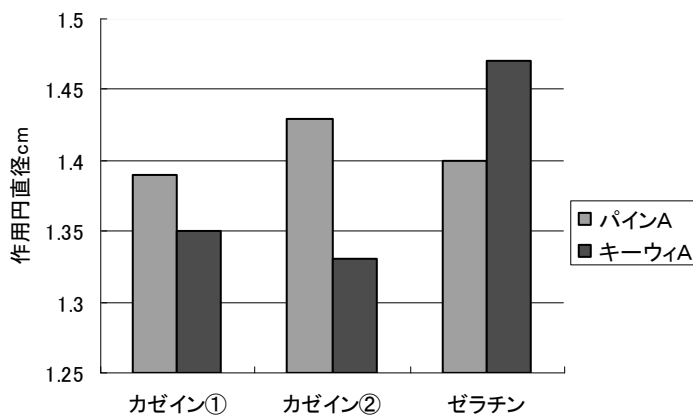


図4 基質の違いによる検出結果

ゼラチンの作用円は、ペーパーディスクの周りが透明で次に半透明、外側が白濁という3層になっていた。また、透明な部分と半透明な部分の境界線がわかりにくいというマイナス面が生じ、キウイフルーツのほうがその傾向は顕著であった。その結果、半透明までを作用円として測定するとキウイフルーツの作用円がパイナップルに比べ大きくなった。ゼラチンの作用円が3層に検出した原因は今後検討することとし、今回はカゼインを基質に用いて実験を進めることにした。

次に、パイナップル果汁とキウイフルーツ果汁の粘性に違いがあるため、果汁そのままではペーパーディスクへの浸透が悪いのではないかと考え、果汁を3000回転で10分間遠心分離した上澄み液を酵素試料としたときの作用円と比較してみた。その結果は図5, 6に示した。

同量の果汁を遠心分離した結果、上澄み液の量はパイナップルに比べてキウイフルーツは

約1/2であった。果汁が同量であれば水分量が多いと酵素活性が低くなると考えられそうだが、図4の結果より水分量の多いパインアップルのほうがキウイフルーツよりカゼイン①の場合3.0%、カゼイン②の場合7.5%といずれも高くなっている。これは、水分が多い分、果汁の粘性が低くなることで酵素が動きやすくなり、ディスクへよく浸透したため活性が高くなったと考えられた。しかし、上澄み液を酵素試料として用いた活性は、パインアップルはキウイフルーツより図5

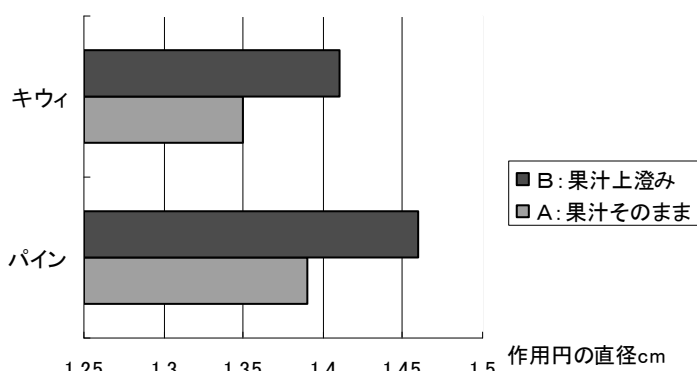


図5 酵素果汁抽出による検出結果 (カゼイン①)

から3.5% (カゼイン①)、図6より6.5% (カゼイン

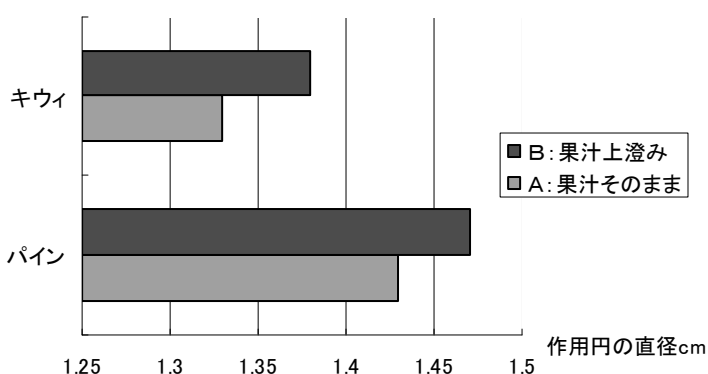


図6 酵素果汁抽出による検出結果 (カゼイン②)

②)といずれも高く、果汁そのままを用いた場合と同様に、パインアップルがキウイフルーツより活性は高い結果となった。この結果から、果実による酵素活性の差は果汁の粘性ではなく、果実に含まれる酵素によることが明らかとなった。

さらに、果汁そのままと上澄み液を酵素試料に用いた場合の酵素活性は、図5, 6よりパインアップルは5.0% (カゼイン①)と2.8% (カゼイン②)、キウイフルーツは4.4% (カゼイン①)と3.8% (カゼイン②)、といずれも果汁の上澄み液は果汁そのままに比べて高い結果となった。上澄み液の果汁酵素がペーパーディスクへ効率的によく浸透したと考えられる。よって、ペーパーディスクによる酵素活性の測定は、遠心分離をかけた上澄み液を用いるほうが望ましいと考える。

次に、pHが果実による酵素活性に影響を及ぼすと考えられたのでpHを調べた。その結果、パインはpH3.2、キウイフルーツはpH3.1でパインアップルとキウイフルーツとの差はなかったため、pHの影響はないと考える。

## まとめ

果実に含まれているタンパク質分解酵素活性の方法として、授業時間内に酵素を分離精製しなくて測定できる方法を検討した結果、基質にカゼインを用いたペーパーディスク法が有効であることがわかった。なお、ペーパーディスク法では、果汁酵素の浸透性がよくなるため遠心分離した果汁の上澄み液を酵素試料として用いるほうが望ましいと考えられる。

今回用いたパイナップル、キウイフルーツの2種類の果実のタンパク質分解酵素の活性は、ゼラチンのゲル化方法の結果からゲル化に要する時間に差はあるものの、キウイフルーツのほうが早くゲル化した。これは、水分が多いパイナップルは粘性が低くなったため、果汁の酵素が動きやすくなったのではないかと考えられた。しかし、果汁の上澄み液を酵素試料に用いたペーパーディスク法の結果から、果汁の粘性にかかわらずパイナップルはキウイフルーツよりタンパク質分解酵素の活性が高いことが明らかとなった。

## 参考資料

- 1) 桜井芳人編：総合食品事典，東京同文書院，(1982)
- 2) 輸入食品事典研究会：総説輸入食品事典，(1996)
- 3) 森内安子：ペーパーディスク法による消化酵素の活性検査，神戸女子短期大学論攷，第38巻，p 109-112 (1993)