

## キウイフルーツ果実の追熟中のプロテアーゼ活性とその分布

橋永文男・福留哲朗\*・伊藤三郎

(青果保蔵学研究室)

昭和60年7月31日 受理

### Activity and Distribution of Protease in Kiwifruit during Ripening

Fumio HASHINAGA, Tetsuro FUKUDOME\* and Saburo ITOO

(Postharvest Physiology and Preservation of Fruits and Vegetables)

#### 緒 言

キウイフルーツ (*Actinidia chinensis* Planch.) の生産量が急増し、生食以外に加工利用への要望が高まっている。キウイフルーツ果実にはタンパク分解酵素が存在し<sup>1)</sup>、肉の軟化に利用されるが、このタンパク分解酵素の果実内における消長や分布に関する研究は少なく、また酵素自身の性質もまだ十分に解明されていない。

そこでキウイフルーツ果実の粗酵素としての性質を研究し、先に報告したパッションフルーツ果実のプロテアーゼ<sup>3,4)</sup>と同様に酸性領域に最適活性を有する2種のプロテアーゼを見出したので、これら酵素の諸性質を調べるとともに果実内のタンパク分解酵素の分布を測定した。

#### 材 料 と 方 法

材料: 福岡県立花町産の品種ヘイワードを用い、部位別酵素活性の測定に1982年11月の収穫果を使用した。果実は20°Cで追熟し、各熟度段階で、未熟、適熟I、適熟II、過熟に分けた。各区5個ずつを用い、それぞれ果肉部、種子周辺部、果心部分け、各部位1gにつき20mMクエン酸緩衝液(5mMシステイン、3mMEDTAを含む、pH6.5)20mlを加えて破碎し、3,500rpmで10分間遠沈した上澄みを酵素液とした。

また酵素の性質を調べるために、追熟軟化した果実を剥皮後搾汁し、常法にしたがってアセトン粉末を調製した。100倍量の上記20mMクエン酸緩衝液にアセトン粉末を溶かし、4°Cで1時間抽出後、遠沈し、その上澄みを粗酵素液とした。

酵素活性の測定: 5mlの1.2%カゼイン溶液に1

mlの酵素液を入れ、38°Cで1時間反応後、0.4Mトリクロロ酢酸5mlを加えて反応を停止させ、ろ液の275nmの吸光度からプロテアーゼ活性を測定した。

果実の品質: タンパク質は銅-フォリン法<sup>5)</sup>によって測定し、酸は0.1N水酸化ナトリウムでpH8.0まで滴定してクエン酸パーセントとして表した。硬度はユニバーサル硬度計(12×10mmの円錐形プランジャー)で果実の赤道部を測定した。

#### 結 果

##### 1. 粗酵素の性質

pH依存性: Fig. 1に示したようにキウイフルーツ・プロテアーゼのpH依存性をみると3.9と6.5の酸性側に2つの活性ピークが存在した。それぞれの酵素をKFP-I (Kiwifruit protease-I)とKFP-IIと略称した。

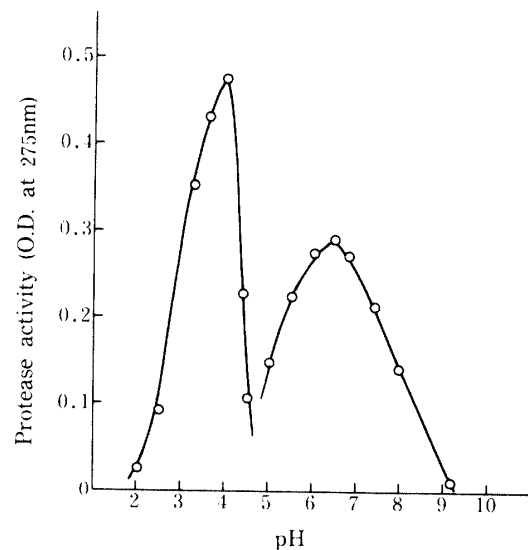


Fig. 1. Effect of pH on the protease activity in kiwifruit.

\* 現在 鹿児島県庁 Kagoshima Prefectural Office

温度依存性: KFP-I が 45°C で最大活性を示し, 55°C 以上で急に活性が低下したのに対し, KFP-II は 40°C で最大活性を示した (Fig. 2).

温度安定性: Fig. 3 から明らかなように上記緩衝液中で各温度に 5 分間処理したとき KFP-I は 60°C まで安定であり, それ以上の温度で活性が急減した. いっぽう KFP-II は 40°C より温度が高くなるにしたがって徐々に活性が低下し, 両者とも 80°C でほとんど活性が消失した.

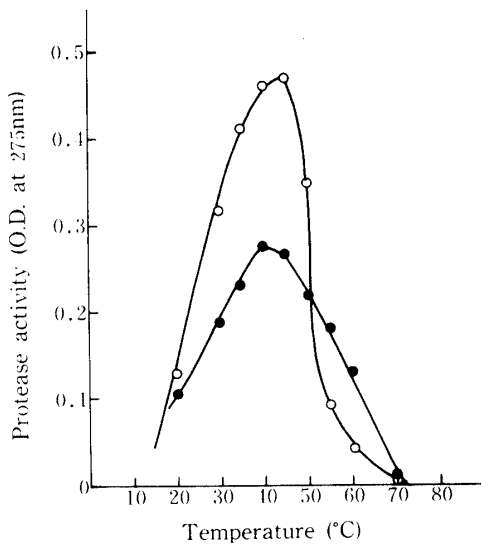


Fig. 2. Effect of temperature on the protease activities in kiwifruit.

○—○: KFP-I, ●—●: KFP-II

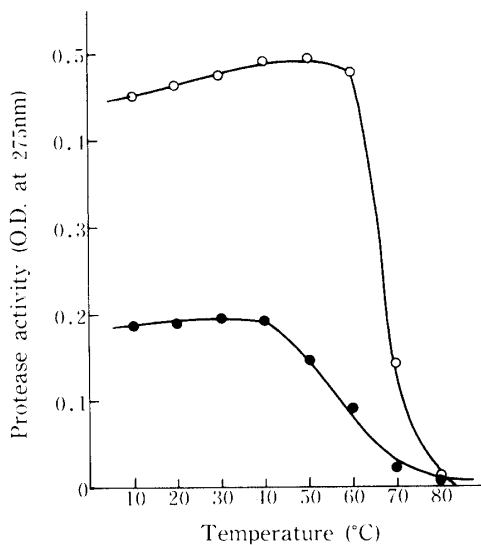


Fig. 3. Effect of temperature on the stability of protease activities in kiwifruit.

○—○: KFP-I, ●—●: KFP-II

pH 安定性: 室温で 3 時間各 pH に酵素液を保ったのち, 残存活性を最適 pH で測定した結果, 両酵素とも pH 6-7 で最も安定であったが, pH 2 以下ではほとんど失活した (Fig. 4). しかし KFP-I はアルカリ側でも比較的安定であった.

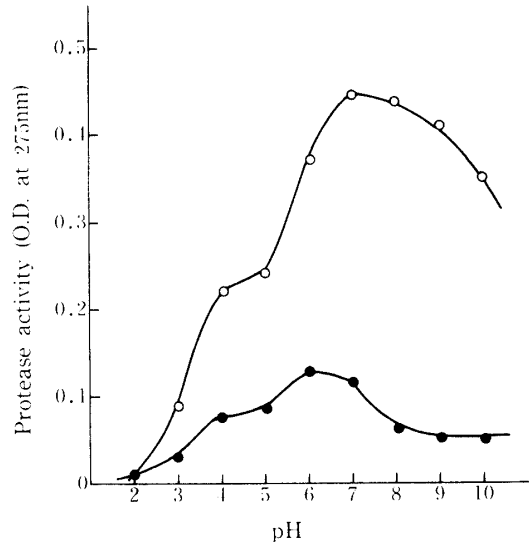


Fig. 4. Effect of pH on the stability of protease activities in kiwifruit.

○—○: KFP-I, ●—●: KFP-II

金属イオンの影響: Table 1 に示したように両酵素とも  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Hg}^{++}$  によって活性が阻害され, KFP-II はさらに  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Cd}^{++}$  によっても活性が著しく低下した.

試薬による影響: キウイフルーツ・プロテアーゼはパラクロロマーキュリー安息香酸, モノヨード酢酸

Table 1. Effect of metal salts on the protease activities in kiwifruit

Metal salts (1 mM)	Relative activities (%)	
	KFP-I	KFP-II
—	100	100
$\text{MgSO}_4$	98	108
$\text{CuSO}_4$	6	16
$\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$	88	92
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2$	94	103
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	97	86
$\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$	101	95
$\text{AgNO}_3$	0	0
$\text{SnCl}_2$	101	99
$\text{ZnCl}_2$	99	36
$\text{CaCl}_2$	99	80
$\text{HgCl}_2$	0	5
$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$	88	5

によって失活した (Table 2)。KFP-I は KFP-II に比べ、システインにより活性が高まり、KFP-II の方はメルカプトエタノールで活性化され易かった。またセリンプロテアーゼや金属プロテアーゼ等の活性阻害剤で阻害効果が認められなかった。

2. 果実中のプロテアーゼ分布

果実の品質：果実の平均硬度は追熟するにつれ 2.99 から 0.61 kg/cm<sup>2</sup> まで低下した (Table 3)。酸は熟度が進むにつれて減少し、果心では他の部位の半分であった。タンパク質は適熟のときに最も含量が高く、いずれの部位でも 2% を越えていた。

プロテアーゼの果実内分布：Fig. 5 から明らかのように果心のプロテアーゼ活性は低く、熟度による差もあまり認められなかった。未熟果 (未追熟果) では果肉のプロテアーゼの方が種子周辺部のプロテアーゼ活性よりわずかに高かった。KFP-II は追熟が進むにつれて果肉部、種子周辺部ともに減少した。いっぽう

Table 2. Effect of various compounds on the protease activities in kiwifruit

Chemicals (1mM)	Relative activities (%)	
	KFP-I	KFP-II
—	100	100
2-Mercaptoethanol	95	158
Potassium cyanide	117	118
EDTA* <sup>1</sup>	111	99
L-Cysteine	171	112
Monoiodoacetic acid	5	11
PCMB (0.01mM)* <sup>2</sup>	30	11
TPCK (0.01mM)* <sup>3</sup>	103	100
TLCK* <sup>4</sup>	94	83
PMSF* <sup>5</sup>	103	108
Trypsin inhibitor (0.1%)	104	107

\*<sup>1</sup> Ethylenediaminetetraacetic acid  
 \*<sup>2</sup> *p*-Chloromercuribenzoic acid  
 \*<sup>3</sup> *N*-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone  
 \*<sup>4</sup> *N*<sup>2</sup>-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone  
 \*<sup>5</sup> Phenylmethylsulfonyl fluoride

Table 3. Characteristics of kiwifruit at various ripening stages

Stage of ripening	Average weight of fruit (g)	Flesh hardness (kg/cm <sup>2</sup> )	Refractometer value (°Brix)	Titratable acidity (%)*			Protein (%)		
				Core	Tissue around the seeds	Flesh	Core	Tissue around the seeds	Flesh
Unripe	71.3	2.99	10.3	1.76	2.83	2.89	0.83	1.15	1.15
Ripe I	65.7	1.45	13.3	0.75	1.51	1.60	2.07	2.16	2.17
Ripe II	63.4	1.11	13.9	0.75	1.60	1.54	2.03	2.13	2.38
Overripe	69.9	0.61	13.2	0.74	1.46	1.41	1.73	1.78	2.11

\* Expressed as citric acid percent

KFP-I は追熟が進むにつれ種子周辺部で減少するものの果肉部では顕著に増加した。

考 察

Arcus<sup>1)</sup> はキウイフルーツ果実中にプロテアーゼが存在することを報告し、これをアクチニジンと呼んだ。この酵素はゼラチンを基質に用いた実験で最適 pH が 4.0-4.3 であった。これは本実験においてカゼインを基質としたとき最適 pH が 3.9 を示した KFP-I に相当するものであろう。また McDowall<sup>7,8)</sup> によって報告されたアクチニジン A<sub>2</sub> も KFP-I と同じ酵素であらう。

いっぽう KFP-II に対応するであろうと考えられるものは McDowall<sup>8)</sup> のアクチニジン A<sub>1</sub> かもしれないが、これに関する詳細な報告は見当たらない。また福井ら<sup>2)</sup> はキウイフルーツ中に最適 pH6.0 のプロテアーゼの存在を報告しているが、これは本実験での

KFP-II に相当するものかもしれない。

これら 2 種のキウイフルーツ・プロテアーゼの性質をカゼインを基質として調べた結果、阻害実験により両者ともチオールプロテアーゼであることが確認されたが、これらの酵素は上述のように異なった性質を示していた。しかしキウイフルーツプロテアーゼはパッションフルーツ・プロテアーゼに比べて<sup>3)</sup> 果実当たりの酵素活性は明らかに強かった。

プロテアーゼの果実内分布を調べるために用いた果実は平均果実重より小さかった。それを追熟し、硬度の低下から熟度を判定した。果心部は常に他の部位に比べてプロテアーゼ活性が低く、追熟による変化も少なかった。果実当たりでは KFP-II に対する KFP-I の割合は追熟が進むにつれて大きくなった。

要 約

キウイフルーツ果実 (*Actinidia chinensis* Planch.)

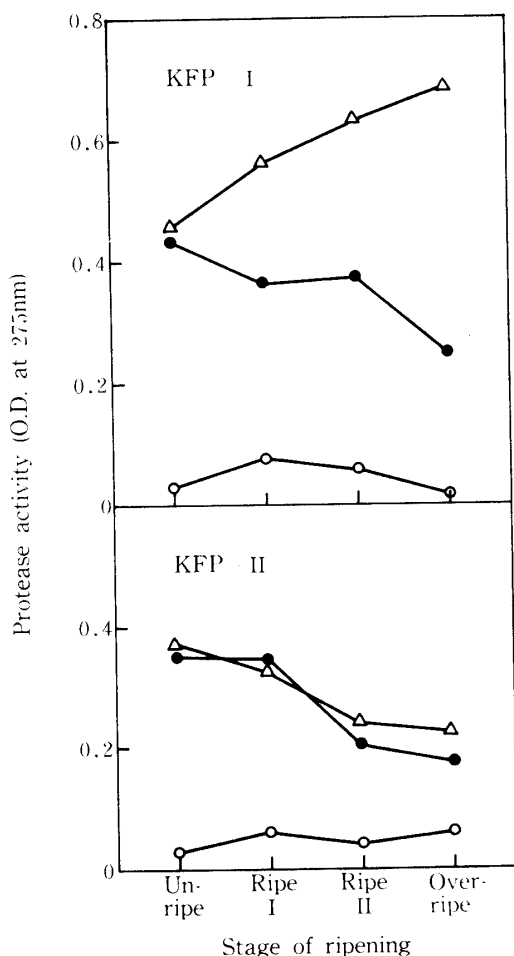


Fig. 5. Protease activities at the different parts of kiwifruit during ripening.

○—○: Core, ●—●: Tissue around the seeds, △—△: Flesh

のプロテアーゼの性質を調べるとともに、追熟中のそれら酵素の果実内分布を測定した。

キウイフルーツのプロテアーゼは2種類あり、最適pHは3.9と6.5であった。これらをそれぞれKFP-I (Kiwifruit protease-I), KFP-IIと略称した。その最適温度はそれぞれ45°Cと40°Cであった。また両酵素ともpH6-7で最も安定であり、pH2以下では完全に失活した。またKFP-Iは60°C, KFP-IIは40°Cまで安定であった。金属イオンに対する影響

をみると両酵素とも $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Hg}^{++}$ によって著しく活性が阻害された。そのうえKFP-IIは $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Cd}^{++}$ によっても阻害された。また両酵素ともセリンプロテアーゼ阻害剤でほとんど影響されなかったが、SH試薬によって阻害され、KFP-Iはシステインにより、またKFP-IIはメルカプトエタノールによって活性化された。追熟中のプロテアーゼ活性をみると果心部では活性が低く、しかもあまり活性の変化が認められなかった。未熟のときは果肉の酵素活性が種子周辺部の酵素活性よりわずかに高かった。熟度が進むにつれて種子周辺部の酵素活性はKFP-I, KFP-IIとも減少し、果肉ではKFP-IIは減少したがKFP-Iは顕著に増加した。

謝辞 試料のキウイフルーツを提供いただいた福岡県立花町役場経済課および立花町内農業協同組合に謝意を表す。

#### 文 献

- 1) Arcus, A. C.: Proteolytic enzyme of *Actinidia chinensis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **33**, 242-244 (1958)
- 2) 福井正夫・野田啓良・山田正純: チャイニーズ・ゲーズベリー果実の一般成分およびタンパク質分解酵素の性質について。香川県農業試験場報告, No. 28, 67-72 (1976)
- 3) 橋永文男・澤 大作・伊藤三郎: パッションフルーツ (*Passiflora edulis* Sims.) 果汁中のプロテアーゼ。園学雑, **47** (2), 282-288 (1978)
- 4) Hashinaga, F., Yamato, F. and Ito, S.: Partial purification and characterization of protease from passion fruit juice. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **19**, 73-79 (1983)
- 5) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 6) Lynn, K. R.: Definition of the site of reactivity of the ancestral protease of the papain type. *Phytochemistry*, **22** (11), 2485-2487 (1983)
- 7) McDowall, M. A.: Anionic proteinase from *Actinidia chinensis* preparation and properties of the crystalline enzyme. *Eur. J. Biochem.*, **14**, 214-221 (1970)
- 8) McDowall, M. A.: The action of proteinase A<sub>2</sub> of *Actinidia chinensis* on the B-chain of oxidized insulin. *Biochim. Biophys. Acta*, **293**, 226-231 (1973)

### Summary

During the fruit-ripening, studies were made on protease-properties and its distribution in kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planch.).

In the kiwifruit protease the pH optima were fixed to be 3.9 and 6.5 respectively: with the designations of the former as KFP-I (Kiwifruit protease-I), of the latter as KFP-II. The temperature optima of these enzymes were ascertained to be 40°C and 45°C, respectively. In the pH range 6 to 7 most stable were both enzymes, below pH 2 inactivated, completely. Up to 60°C was stable KFP-I; up to 40°C, KFP-II; at 80°C inactivated completely in both. The inhibitors of the activity of KFP-I were  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{++}$  and  $\text{Hg}^{++}$ , those of the activity of KFP-II being  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Hg}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$  and  $\text{Cd}^{++}$ . Common serine protease inhibitors hardly affected both enzymes, though sulfhydryl reagents affected both of them. KFP-I activity was enhanced by cysteine, while KFP-II activity by 2-mercaptoethanol.

It was in the core which was relatively constant during ripening that the low levels in the activities of proteases were detected. In the unripe fruits, the activities of both proteases in the flesh were noted to be slightly higher than those in the tissues around the seeds. In the activity of KFP-I, a marked increase was observed in the flesh during ripening, whereas a decreasing was noted in the flesh around the seeds.