

パパイヤ成熟果に残存するプロテアーゼ活性の評価

西山 一郎, 高橋 淑子, 下橋 淳子, 松森 慎悟, 大田 忠親

(駒沢女子短期大学)

原稿受付平成 19 年 8 月 24 日; 原稿受理平成 20 年 2 月 2 日

Evaluation of Protease Activity Remaining in Papaya Fruit at Eating-Ripe Stage

Ichiro NISHIYAMA, Toshiko TAKAHASHI, Atsuko SHIMOHASHI,
Shingo MATSUMORI and Tadachika OOTA

Komazawa Women's Junior College, Inagi, Tokyo 206-8511

Protease activity in papaya fruit at eating-ripe stage was evaluated using a synthetic peptide and food proteins as substrates. The protease activity against L-pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine *p*-nitroanilide in papaya fruit was less than 5% of that in kiwifruit or pineapple fruit juice. Protease concentration in papaya juice was estimated at 3.8 μ g papain equivalent/ml using an authentic papain as a standard. While pork myofibrillar proteins were remarkably degraded by kiwifruit, pineapple, or ginger juice, papaya juice caused only a slight degradation of the proteins. Treatment of pork tissue with papaya juice caused no apparent change on muscular morphology at light microscopic level. The addition of pureed papaya flesh at 50% to the gelatin jelly did not prevent gelatin gelation, although it caused about 20% decrease in the gel strength. These results suggest that the protease remaining in eating-ripe papaya fruit have only slight proteolytic effects on food proteins because its amount is considerably low.

(Received August 24, 2007; Accepted in revised form February 2, 2008)

Keywords: papaya パパイヤ, papain パパイン, gelatin ゼラチン, jelly ゼリー, meat 食肉, proteolysis タンパク質分解.

1. 緒 言

パパインは、パパイヤ未熟果の果皮を傷つけたときに流出する乳汁(ラテックス)から抽出・精製される酵素である¹⁾。パパインは、システインプロテアーゼの一種であるが、その基質特異性は比較的ゆるやかで、また化学的安定性にも優れるため、広い pH および温度範囲において、種々のタンパク質に対して加水分解作用を発揮する。そのため、ビールの清澄剤や食肉軟化剤などとして食品工業分野で用いられる¹⁾。他、一般家庭向けにも、パパイン配合の食肉軟化剤やから揚げ粉、洗顔剤、入浴剤などの製品が市販されている。

パパインが種々の食品タンパク質を加水分解することから、一般向けの料理の本やインターネット上には、「パパイヤはパパインを豊富に含み、消化を助けるため、肉料理後のデザートに適する」、「生のパパイヤは

ゼラチンゼリーのゲル化を妨げる」あるいは、「パパイヤの果実や果汁で処理すると、硬い肉が軟らかくなる」といった記載がしばしば認められる。一方、調理学・食品学領域の学術書でも、果実の項目において、「パパイヤ果実にはパパインが含まれる」、「パパイヤはパパインを多く含み、胃腸の働きを助ける」あるいは「パパイヤにはタンパク質分解酵素が含まれており、肉の軟化に使うことがある」と記述されている場合が多い。一方では、「パパイヤ完熟果では、パパインは認められない」と記載された学術書も散見される。

一般には、パパイヤ未熟果に豊富に含まれるパパインは、果実の成熟と共にその含量が減少し、果物として市販される成熟果においては、パパインはほとんど、あるいは全く含まれていないとされている²⁾³⁾。しかし、パパイヤ成熟果に残存するパパインについての、

調理学的・食品学的見地からの評価は、ほとんどなされていない。そこで本研究では、果物として市販されているパパイヤ成熟果には、実際にどの程度のプロテアーゼ活性が残存しており、またそのプロテアーゼは、食肉タンパク質成分やゼラチンゼリー形成にどの程度の影響を及ぼすかを調査した。

2. 実験方法

(1) 実験材料

パパイヤの成熟果としては、最も一般的に市販されているソロ種果実（ハワイ産およびフィリピン産）を、東京都内の複数の青果店やスーパーマーケットで、様々な時期に購入して用いた。果実の硬度は、果実硬度計（藤原製作所）の円錐型針頭を用いて、果実赤道部3箇所につき果皮上から測定し、その平均値とした。硬度1.5~2.0 kgを示す果実を適熟期果実と判定し供試した。このときの果皮の色調は、全体の2/3程度が緑色を呈するものから、全体が黄色のものまでが含まれた。

プロテアーゼ活性の比較のため、市販のキウイフルーツ果実（ニュージーランド産、ヘイワード種）、パインアップル果実（フィリピン産、スムーズカイエン種）およびショウガ根茎（国産、近江種）を上記と同様に購入し、実験に供した。

豚もも肉は非凍結品を精肉店より購入し、直ちに使用した。

(2) 搾汁の調製

パパイヤ果実を縦四つ切りにして、その一切れの皮と種を除去し、フードプロセッサー（クイジナートLPP2JW）でホモジナイズした後、四重のガーゼで搾汁した。得られた搾汁に対して10,000×g、4℃で10分間の遠心分離を行い、その上清をパパイヤ搾汁として実験に用いた。なお、残りの3/4の果肉は、後述するゼラチンゼリー作製の材料とした。

パインアップル、キウイフルーツおよびショウガは、剥皮した後、上記と同様の方法にて搾汁を調製した。

(3) プロテアーゼ活性の測定

搾汁のプロテアーゼ活性は、合成基質である L-pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine *p*-nitroanilide (Sigma) を用いて、既報⁴⁾に従い pH 6.0 の条件にて測定した。プロテアーゼ活性は、*p*-ニトロアニリンのモル吸光係数を $\epsilon_{405}=9,920 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ として、1分間に遊離される *p*-ニトロアニリンの物質質量によって表した。パパイヤ適熟期果実 20 果を用い、それぞれ独立

した実験を行った。また比較のため、キウイフルーツ、パインアップルおよびショウガの搾汁についても、同様にプロテアーゼ活性を測定した。

なお、パパイヤ搾汁に代えて 2.5-50 $\mu\text{g/ml}$ のパイン水溶液 (Sigma) を用い、同様の測定を行うことによって、プロテアーゼ活性の標準曲線を作成した。

(4) 筋原線維の調製

筋原線維は、豚もも肉を材料として、Claeys *et al.*⁵⁾ の方法に従って調製した。得られた筋原線維画分は、10 mg/ml の濃度となるよう、0.6 mol/l の NaCl 水溶液に溶解し、使用時まで -85℃ にて保存した。なお、筋原線維画分のタンパク質濃度は、牛血清アルブミン (Sigma, Fraction V) を標準として、Lowry *et al.*⁶⁾ の方法により定量した。

(5) 筋原線維タンパク質への搾汁処理の影響

筋原線維タンパク質溶液 (10 mg/ml, 50 μl) を 25℃ にて 5 分間プレインキュベートした後、この基質溶液に、同様に 25℃ に保温したパパイヤ搾汁 (25 μl) を加え、さらに 25℃ にて 30 分間のインキュベートを行った。酵素反応を停止するために、200 mmol/l モノヨード酢酸 (和光) 水溶液を 1 μl 加え (最終濃度約 2 mmol/l)、1 分後に 2 倍濃度電気泳動用試料緩衝液 (0.1 mol/l トリス-塩酸緩衝液, 4% ドデシル硫酸ナトリウム, 4% 2-メルカプトエタノール, 40% グリセロール, 0.002% ブロモフェノールブルー, pH 6.8) を 100 μl 加えた。直ちに 100℃, 3 分間の湯煎を施し、放冷した後、SDS-PAGE 分析に供した。この実験にはパパイヤ適熟果実 10 果を用い、それぞれ別々に筋原線維タンパク質加水分解作用を評価した。また比較のため、キウイフルーツ、パインアップルおよびショウガの搾汁についても、同様の実験を行った。

なお一部の実験では、パパイヤ搾汁に代えて市販のパパイン (Sigma) を 50 mmol/l クエン酸リン酸緩衝液 (pH 5.5) に 10-500 $\mu\text{g/ml}$ の濃度となるよう溶解し、同様の実験を行った。

タンパク質成分の SDS-PAGE 分析は、ミニスラブ電気泳動装置を用い、Laemmli⁷⁾ の方法に従って行った。上記の方法により作製した電気泳動用試料 5 μl について、7.5% のポリアクリルアミドゲルを用い、定電流 (20 mA) 80 分間の泳動を行った。泳動後のゲルは、常法によりクマジーブリリアントブルー R-250 染色ならびに脱色を施した。

(6) 食肉組織への搾汁処理の影響

豚もも肉小片 (10 mm×10 mm×20 mm) を作製し、

Table 1. Comparison of protease activity in the juice

	Protease activity* ¹ (nmole <i>p</i> -nitroaniline released/min)
Papaya	0.39±0.23 (<i>n</i> =20)
Kiwifruit	8.32±1.82 (<i>n</i> =12)
Pineapple	9.33±1.02 (<i>n</i> =8)
Ginger	3.33±0.69 (<i>n</i> =8)

* Each value represents the mean±SD.

10 ml のパパイヤ搾汁に浸漬した。室温 (25℃) で 2 時間処理した後、もも肉小片に付着した搾汁をキムワイプで除き、OCT コンパウンド (Miles) 中に包埋し、ドライアイス-アセトン中で急速凍結した後、組織観察用試料とした。対照実験としては、パパイヤ搾汁の代わりに 50 mmol/l クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.5) による同様の処理を行った。また比較のため、キウイフルーツ搾汁でも、同様の実験を行った。

各食肉試料につき、クリオスタットにて 5 μm 厚の横断面切片を作製し、4% パラホルムアルデヒドを含む 0.1 mol/l リン酸緩衝液 (pH 7.4) により室温 15 分間の固定を行った。常法によりヘマトキシリン-エオジン染色を施した後、オリンパス VANOX 顕微鏡により観察した。

(7) ゼラチンゼリーの作製とゲル強度測定

皮と種を除去したパパイヤ果肉を、フードプロセッサ (Cuisinart DLC-8) にかけて、ステンレス製裏ごし器により裏ごししてピューレーとした。このピューレーを 99 g ずつ計り取り、一方にはパパイン阻害剤として 200 mmol/l モノヨード酢酸 1 ml を、他方には純水 1 ml を加えそれぞれ混合し、2 分後に下記のゼラチン溶液と混合した。

パパイヤピューレー作製と並行して、60℃のお湯 74 g に上白糖 20 g と粉ゼラチン (ゼラチン 21, 新田ゼラチン) 6 g を加え溶解した。溶液の温度が 40℃ まで低下するのを待って、上記のパパイヤピューレーと混合した。このゼラチン・果肉ピューレー混合液を、ゼリー型 (70 ml) に入れ、氷水にて 30 分間冷却した。

硬さ測定用のゼリーとしては、同様に作製したゼラチン・果肉ピューレー混合液を、ステンレス製流し缶 (7 cm×14 cm) に深さ 2 cm となるように流し入れ、氷水中にて 30 分間冷却することによりゲル化させた。その後、乾燥を防ぐため食品包装用ラップフィルムをかけ、4℃の冷蔵庫に 24 時間保持した後、ゲル強度を

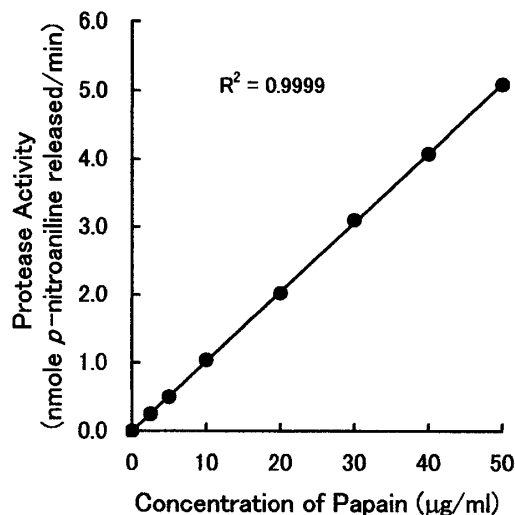


Fig. 1. Correlation between papain concentration and protease activity

Protease activity of papain was measured at pH 6.0 using a synthetic substrate, L-pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine *p*-nitroanilide.

既報⁸⁾に従って測定した。

3. 実験結果と考察

(1) 搾汁のプロテアーゼ活性

合成基質を用いて、それぞれの搾汁のプロテアーゼ活性を測定した結果、パパイヤ搾汁のプロテアーゼ活性は、キウイフルーツやパインアップル搾汁の 5% 以下であった (Table 1)。また、この値はショウガ搾汁のプロテアーゼ活性と比較しても、顕著に低かった (Table 1)。この結果より、パパイヤ搾汁のプロテアーゼ活性は、明らかに検出されるレベルではあるものの、プロテアーゼを豊富に含むことが知られている果物やショウガなどの搾汁と比較すると、著しく弱いことが示された。

パパイン標品を用いて、その濃度と活性との相関を調べたところ、本実験系においては、少なくともパパイン濃度 50 μg/ml までは明瞭な直線性が認められた (Fig. 1)。この標準直線を用いて、パパイヤ搾汁のプロテアーゼ活性 (Table 1) を濃度に変換すると、3.8 μg パパイン等量/ml と算出された。この値は、キウイフルーツ搾汁中のタンパク質分解酵素であるアクチニジンの濃度が約 2.9 mg/ml である⁴⁾ ことと比較すると、その 0.13% 程度に相当する極めて微量であることが確認された。

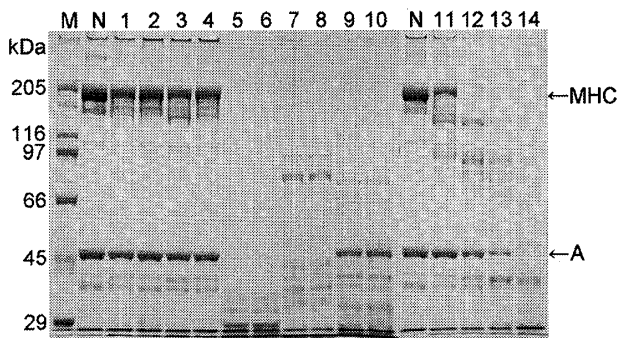


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of pork myofibrillar proteins treated with fruit juice or papain

Pork myofibrillar proteins were treated with papaya (1-4), kiwifruit (5, 6), pineapple (7, 8), ginger (9, 10) juice, or papain (11-14) at 25°C for 30 min. Papain concentrations were 10 (11), 50 (12), 100 (13), or 500 (14) $\mu\text{g/ml}$. M: molecular weight marker proteins, N: no enzyme control, MHC: myosin heavy chain, A: actin.

(2) 筋原線維タンパク質に対する搾汁の影響

各種搾汁およびパパイン処理を施した豚肉由来筋原線維タンパク質の電気泳動像を、Fig. 2に示す。搾汁や酵素を含まない緩衝液で処理したものは、ミオシン重鎖 (MHC) およびアクチン (A) が、主要なバンドとして認められた (Fig. 2, レーン N)。パパイヤ搾汁で30分間処理した場合には、ミオシン重鎖のバンドがやや薄くなったものの、全体の泳動像に大きな変化は認められなかった (Fig. 2, レーン 1-4)。このことから、パパイヤ搾汁による筋原線維タンパク質の加水分解は、軽微であることが示された。この実験は、パパイヤ成熟果20果を用いて行ったが、いずれも同様の結果が得られた。

これに対して、キウイフルーツ (Fig. 2, レーン 5, 6)、パインアップル (Fig. 2, レーン 7, 8) あるいはショウガ (Fig. 2, レーン 9, 10) の搾汁で処理した場合には、筋原線維タンパク質の電気泳動像に大きな変化が認められた。いずれの場合にもミオシン重鎖のバンドが消失し、またアクチンのバンドにも明瞭な減少、あるいは完全な消失が認められた。この結果より、これらの搾汁処理によって、筋原線維タンパク質が顕著に加水分解されたことが示された。

以上の結果より、パパイヤ搾汁の筋原線維タンパク質加水分解作用は、キウイフルーツやパインアップル、ショウガなどの搾汁と比較して、軽微であることが判明した。筋原線維タンパク質を基質とした場合、パパインは pH 5-8 において顕著な加水分解活性を示すこ

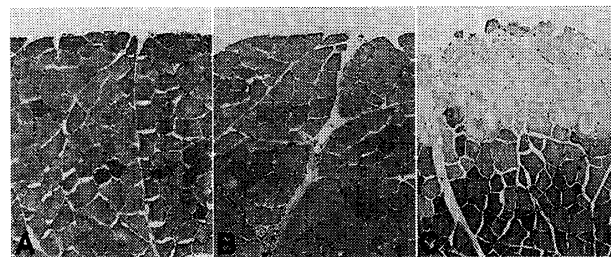


Fig. 3. Effects of papaya and kiwifruit juice on pork tissue

Pork samples were soaked in papaya (B) or kiwifruit juice (C) at 25°C for 2 h. Transverse sections of the specimens were stained with hematoxylin-eosin, and observed under a light microscope. A: no enzyme control. $\times 25$.

とが報告されている⁹⁾。本実験では、筋原線維タンパク質の搾汁処理を、搾汁の pH (5.5) で行った。パパイヤ搾汁は、パパインの最適 pH 付近においても、わずかな筋原線維タンパク質分解作用を示すのみであった。この結果から推測して、胃内の強い酸性条件下におけるパパイヤ搾汁の筋原線維タンパク質分解作用は、ほとんど無視しうる程度であることが推測された。

一方、筋原線維タンパク質に対しパパイン処理を行った場合には、その濃度に依存したタンパク質分解が認められた (Fig. 2, レーン 11-14)。パパイン濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ では、ミオシン重鎖が部分的に分解されるに止まったが、50~100 $\mu\text{g/ml}$ では、ミオシン重鎖がほぼ完全に分解され、またこれに伴って、アクチンの分解も顕著になった。パパイン濃度 500 $\mu\text{g/ml}$ では、ミオシン重鎖およびアクチンのバンドが完全に消失した。

パパイヤ搾汁で処理した場合 (Fig. 2 レーン 1-4) と 10 $\mu\text{g/ml}$ のパパインで処理した場合 (Fig. 2 レーン 11) とを比較することにより、パパイヤ搾汁中のパパイン濃度は 10 $\mu\text{g/ml}$ 以下であると推察された。この結果は、パパイヤ搾汁中のプロテアーゼ濃度を 3.8 μg パパイン等量/ml と見積もった上記の結果と矛盾しない。

(3) 食肉組織に対する搾汁の影響

パパイヤ搾汁の食肉組織に対する影響を調べた結果を、Fig. 3に示す。食肉片をパパイヤ搾汁に浸漬し、室温で2時間処理したときの食肉組織像 (Fig. 3 B) は、酵素を含まない緩衝液に浸しただけの対照区 (Fig. 3 A) と、特に差異が認められなかった。パパインは、食肉組織への浸透性に乏しいことが報告されている¹⁰⁾が、搾汁が直接接していた食肉表層部においてさえも、光学顕微鏡レベルでの組織変化は認められな

パパイア成熟果に残存するプロテアーゼ活性の評価

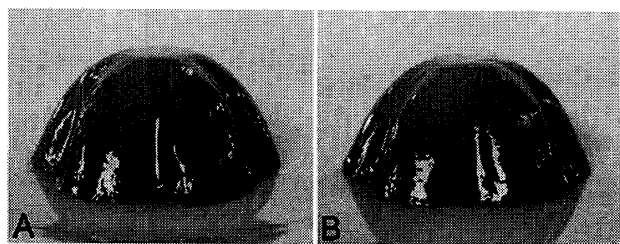


Fig. 4. Gelatin jelly samples containing papaya puree

Gelatin jelly containing 50% papaya puree was prepared with (A) or without (B) 1 mmol/l iodoacetic acid, an inhibitor of papain.

かった。これに対し、キウイフルーツ搾汁を用いて同様の実験を行った場合には、食肉表面から約 0.5 mm までの表層部において筋細胞が分解され、著しい組織変化が観察された (Fig. 3 C)。この結果から、パパイア搾汁に含まれるプロテアーゼは、食肉組織に対して顕著な影響は与えないことが示唆された。

(4) ゼラチンゼリーのゲル化に対する影響

パパイアピューレーを 50% 加えてゼラチンゼリーを作製したところ、モノヨド酢酸でパパイン活性を阻害した場合と遜色なくゼラチンゼリーを作製できることが確認された (Fig. 4)。同様の実験をキウイフルーツ果肉を用いて行った場合には、ゲル化が完全に阻害される⁸⁾ ことと比較すると、ゼラチンのゲル化に対するパパイン果肉中のプロテアーゼの影響ははるかに小さいことが確認された。

ゼラチンゼリーのゼリー強度に対するパパイアピューレーの影響を調べた結果を、Table 2 に示す。パパイアピューレーを 50% 添加したとき、阻害剤無添加のパパイアゼリーの硬さは、阻害剤添加時と比較して 20% 程度減少することが示された。この結果は、少ないながらパパイアにもプロテアーゼが含まれているため、ゼラチンの一部が加水分解され、ゼリー強度が低下していることを示唆した。ただし、20% 程度のゲル強度の減少は、ゼラチン濃度を若干高めるだけで、十分補うことができるものと考えられる。この結果よりパパイア果実は、条件を選べば生の果肉とゼラチンとを混合するような調理・加工への応用が十分可能であると推測された。

以上の結果を総合すると、パパイア成熟果にはパパインに起因すると考えられるプロテアーゼ活性が認められるものの、その活性はわずかであり、パパイア搾汁やピューレーが食肉タンパク質やゼラチンに及ぼす

Table 2. Gel strength of gelatin jelly containing 50% papaya puree

	Gel strength ($\times 10^4$ N/m ²)
+Iodoacetic acid	2.70 $\pm$ 0.20
-Iodoacetic acid	2.14 $\pm$ 0.53

Each value represents the mean $\pm$ SD of five independent experiments.

影響も軽微であることが示された。この結果より、一部の文献に見られる「パパイアはパパインを多く含む」あるいは「パパイアは肉の消化を助ける」という表現は、そのプロテアーゼ活性を過大評価している可能性があり、誤解を招く危険性があるものと考えられた。

4. 要 約

果物として市販されているパパイア成熟果に含まれるプロテアーゼの活性を、合成基質を用いて測定したところ、そのプロテアーゼ活性は、キウイフルーツやパインアップル搾汁の 5% 以下であった。豚肉筋原線維タンパク質をパパイア成熟果搾汁で処理した場合には、ミオシン重鎖が若干分解されたものの、その加水分解作用は、キウイフルーツ、パインアップルおよびショウガ搾汁に比較して軽微であった。食肉組織をパパイア成熟果搾汁によって 2 時間処理した場合には、光学顕微鏡レベルでの組織変化は認められなかった。パパイア成熟果ピューレーを 50% 添加した場合でも、ゼラチンはゲル化してゼリーを作製できることを確認した。以上の結果より、パパイア成熟果にはわずかなプロテアーゼ活性が認められるものの、その搾汁やピューレーが食肉タンパク質やゼラチンゼリーに及ぼす影響は軽微であることが示された。

引 用 文 献

- 1) (社) 農山漁村文化協会：『果樹園芸大百科 17 熱帯特産果樹』、農山漁村文化協会、東京、142-143 (2000)
- 2) 伊藤三郎：『シリーズ食品の科学 果実の科学』、朝倉書店、東京、160 (1991)
- 3) (社) 日本果協協会：『最新果汁果実飲料事典』、朝倉書店、東京、183-186 (1997)
- 4) 西山一朗、大田忠親：キウイフルーツ果汁のアクチニン濃度およびプロテアーゼ活性の品種間差、食科工誌、**49**, 401-408 (2002)
- 5) Claeys, E., Uytterhaegen, L., Buts, B., and Demeyer, D.:

- Quantification of Beef Myofibrillar Proteins by SDS-PAGE, *Meat Sci.*, **39**, 177-193 (1995)
- 6) 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)
 - 7) Laemmli, U. K.: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685 (1970)
 - 8) 西山一朗：キウイフルーツ「香粹」のプロテアーゼ活性とゼラチンのゲル化に対する影響，家政誌，**53**，1001-1007 (2002)
 - 9) 西山一朗：精製アクチニジンによる筋原線維タンパク質分解作用の pH 依存性，家政誌，**52**，1082-1089 (2001)
 - 10) 西山一朗，大田忠親：食肉内へのパパインの浸透性に関する免疫組織化学的検討，駒沢女子短期大学「研究紀要」，**36**，19-25 (2003)