



## Kobe Shoin Women's University Repository

Title	ショウガ根茎の蛋白分解酵素の性質について —ショウガ組織の部位特異性ならびに成熟に伴う活性発現— Nature of Proteolytic Activity in Ginger Root -Changes in Proteolytic Activity in different root segments and in Varying stages of root maturation
Author(s)	市川 芳江 (Yoshie Ichikawa)
Citation	生活科学論叢 (Review of Living Science), No.20 : 69-78
Issue Date	1988
Resource Type	Bulletin Paper / 紀要論文
Resource Version	
URL	
Right	
Additional Information	

# ショウガ根茎の蛋白分解酵素の 性質について

— ショウガ組織の部位特異性ならびに成熟に伴う活性発現 —

## Nature of Proteolytic Activity in Ginger Root — Changes in Proteolytic Activity in different root Segments and in Varying stages of root maturation —

市川 芳江

Extract of ginger root (*Zingiber officinale*) has high proteolytic activity, which tenderizes meat. However its activity depends on several factors.

1) When ginger root was cut into cross sections, the center had high proteolytic activity, however the circumference did not. 2) During storage of fresh ginger root at room temperature, its proteolytic activity decreased time-dependently. But refrigerating the root in a closed vinyl bag prevented its decrease. 3) Matured ginger showed high proteolytic activity. But ginger root harvested prior maturation (in September and October) had no proteolytic activity; rather it had a low molecular weight, and heat stable protease inhibitor.

### 1. 緒 言

ショウガ根茎は特有な芳香、辛味成分を有し調理に独得の風味を与えるものであるが、単に香料としての役目だけでなく、蛋白分解酵素<sup>1)</sup>、アミラーゼ<sup>2)</sup>、なども含まれており調理に影響を与えている。

大沢等はショウガによる肉の軟化作用は、ショウガ根茎のたん白質分解酵素作用により肉の筋繊維の膨化と筋鞘の溶解がおこることによることを明らかにした<sup>3)</sup>。次いで著者等は、市販ショウガ根茎からカゼインを基質とするたん白質分解酵素を抽出し精製をおこない isoenzyme である 2 種類の酵素を SDS 電気泳動上単一たん白質として結晶化に成功した<sup>4)</sup>。ところで著者はこの研究過程において、ショウガ汁の蛋白分解酵素活性を測定する場合、あるいは肉軟化効果を期待して調理にショウガを用いる場合、必ずしも、単位重量当りあるいは単位たん白質あたりいつも同じ効果が得られるとは限らず季節による変動があることを経験した。現在市場に出荷されている

ショウガ根茎は、春にショウガ根茎を植え、生育後11月中旬に掘りだし再び土壤中に戻し葉柄部分を腐朽させながらしばらくの間根茎を成熟させ、12月中旬に収穫し、土室中に貯蔵したもので、需要に応じて貯蔵したものを市場に供給している。そこでこれらの成熟過程・貯蔵過程においてショウガ根茎に含有されている成分が変動したり、たん白質分解酵素についても差異があることが考えられる。またショウガ蛋白分解酵素が活性発現に関係する SH 基を有する酵素であることから、市場に出た後の保存状態、保存期間によって空気酸化などによりたん白質分解酵素活性に変化が起ることも考えられるので、成熟・貯蔵の異なる時期でのショウガたん白質分解酵素活性の差異について今回検討した。その結果、生育直後のショウガ根茎(いわゆる新ショウガ根茎)にはほとんどたん白質分解酵素活性がないことを見出しその原因は、蛋白分解酵素を阻害物質が新ショウガにはあるためではないかということについてあわせて検討した。

## 2. 実験方法

### 1) 実験材料

徳島県香美郡園芸農業組合連合会 香美郡土物共選所(横田芳章氏)より同一地域で同時期に採取保存された大ショウガ根茎を1987年10月より12月までは2週間に1回、1988年1月から10月までは1月に1回、1回約4kgの提供を受け試料として用いた。

### 2) 試料の抽出、精製法

特に断わらない限り皮つきショウガ40gを秤量し、外部より約0.5cmの皮部分を除去した後中心部20gを試料として用いた。試料は市販のプラスチック製おろし器ですばやくすりおろし、すりおろされたものすべてを4 $\mu$ M システインを含む40mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0) 20mlを用いて Waring blender に移し冷却下で3分間攪はんする。得られたホモジネートはガーゼで濾過し濾液を粗酵素溶液とする。

酵素の部分精製：酵素の精製は著者がすでに報告した方法を一部以下のように改変しておこなった。ショウガ根茎の粗酵素溶液に硫酸アンモニウムを加え20%~60% (W/V) に沈澱する酵素活性画分を原報の<sup>4)</sup> DEAE セルロースカラムにより分画の代わりにファルマシア社製 FPLC システムの Mono Q カラムを用い、またセファデックス G-100カラムによる分画の代わりに YMC 社製(山村化学、京都)の HPLC 用 Diol S-200カラムを用いて各々の常法により酵素を部分精製した。

### 3) ショウガ根茎たん白質分解酵素活性の測定

たん白質分解酵素活性はカゼインを基質として Anson の方法<sup>5)</sup>を一部改良した以下の方法で行った。20 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)に溶解した1%カゼイン溶液1mlを予め37°Cに保ったのち、酵素溶液0.5mlを加え、37°C、20分間インキュベーションを行った後、ただちに氷冷した20%トリ

クロル酢酸 (TCA) 0.5mlを加え反応を停止する。TCA 液を10分間氷冷後2000 rpm、20分間の冷却遠心を行い沈澱を除去する。上澄液中の一定量の TCA 可溶性たん白質を Folin-Ciocalteu の変法に従い定量する。上澄液 1 mlに0.55 M 炭酸ナトリウム溶液2.5mlを加えた後1/3に希釈したフェノール試薬0.5mlを加え30℃、30分間静置後650nm の吸収度を測定する。酵素活性は試料湿重量 1 g 当りの OD 650nm の値で表した。

#### 4) たん白質量の測定

たん白質量の測定は、Lowry の方法に従い、牛血清アルブミンを標準たん白として求める。酵素活性を比活性 (S. A.) で表示する場合には、たん白質 1 mg 当りの酵素活性を OD650nm の値で示した。

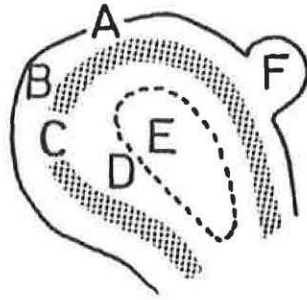


Fig. 1 A single ginger root segment, showing location A-F

	Wet Weight (g) (g/216.5g)	Protein (mg/gwt)	Activity (OD/gwt)	S. A. (OD/mg)
	(%)			
A	20.0 ( 9.2)	6.93	0	0
B	54.0 (25.2)	11.7	0	0
C	59.0 (27.2)	13.0	16.5	1.27
D	43.0 (19.9)	11.9	17.7	1.49
E	40.0 (18.5)	11.1	15.5	1.40
F	20.0	18.9	18.9	1.18

Table 1. Distribution of proteolytic activity in various root tissues.

(A), outer segment circumference including skin: (B), inner segment circumference approaching cambium: (C), cambium zone: (D), center excluding nucleus: (E), nucleus: (F), bud.

### 3. 実験結果および考察

#### 1) ショウガ根茎中のたん白質分解酵素の組織部位による差異と季節による変動

##### i) ショウガの組織部位による差異

ショウガ根茎を切断すると Fig.1. に示すように、外見から外皮部分 (A)、形成層と外皮部分との間 (B)、形成層 (C)、内部 (D、E)、芽 (F) に大別される。約200g 重量のショウガ根茎を用い、A B Cの各部分を分離し、内部 (D、E) に関しては適当に中心部側を (E)、外側部分を (D) に分けて試料とした。各組織部位20g をホモゲナイズし可溶性 (絞り汁) 成分についてたん白質およびたん白質分解酵素活性を測定した結果を Tab. 1. に示す。その結果、形成層より外側の組織 A と B にはたん白質分解酵素活性が検出されなかった。形成層より内側の C、D、E においては同じくらいのたん白質、分解酵素活性が存在していることが判明した。湿重量当りのたん白質量は外皮部分 (A) の低値を除いてほぼ同じ位の量が存在している。このことはショウガを用いる場合外皮をむいて除去することはたん白質分解酵素利用の面からはさしつかえないことを意味している。また形成層にいたるまでの外皮周辺組織にたん白質分解酵素活性がないことは、この部位の酵素が保存中不安定になり失活したためか、この部位にたん白質分解酵素を阻害する成分が含まれているためかなどの原因が考えられる。ショウガ汁をそのまま空気中で保存するとたん白質分解酵素活性が急減すること、また酵素活性はSH 酵化剤によって容易に失活しSH 還元剤によってその失活が保護されるSH 酵素であることを考えると長期保存中に空気酸化を受けて外周部の酵素活性が失活したものと考えられる。

##### ii) ショウガ根茎の部位による酵素活性の差異

試料の大ショウは Fig.2. に示すように平均約7~10個の塊である。この大ショウは通常八百屋で適当な大きさに切断された後、あるいはスーパー用に産地であらかじめ2~3個の塊茎に切断しラップ包装された後市販されている。各塊茎間におけるタンパク質分解酵素活性に差異があるのかどうかを知る目的で12月期に神戸市の八百屋の店先にあった7~10個の塊茎をもつ大ショウガをいくつか購入して個々の塊茎の蛋白分解酵素活性を測定した。方法は根茎から皮を含む40

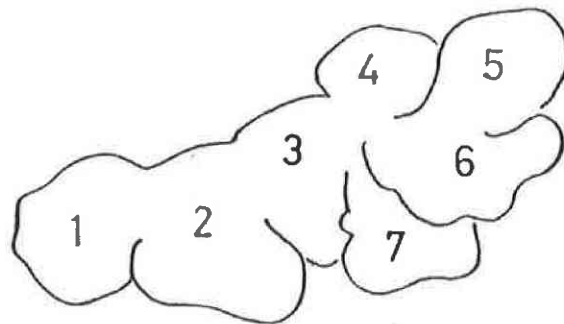


Fig. 2 A single ginger root, showing segment 1~9.

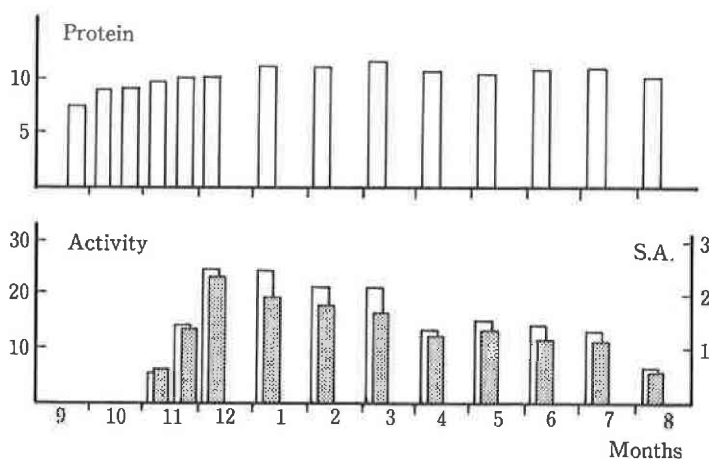
No.	Wet. Weight (g)	Protein (mg/gwt)	Activity (OD/gwt)	S. A. (OD/mg)
1	53.1	11.2	22.0	1.96
2	69.4	8.99	15.8	1.76
3	59.1	9.58	16.1	1.69
4	59.4	11.76	22.3	1.89
5	42.9	10.1	20.7	2.06
6	34.0	10.4	20.2	1.95
7	35.1	10.8	22.3	2.06

**Table 2.** Distribution of proteolytic activity in various ginger root segments, Numbers indicate ginger root segments.

g を切り取り、その外周部20g を取り除いた内部部分20g を試料にしてそこに含まれるたん白質分解酵素活性の総量を測定した。その一例について Table.2. に示す。平均湿質重量g 当り約20 (OD 650 nm) の活性があり塊茎間にはあまり大きな含有量の差がないことがわかった。

iii) ショウガの熟成・貯蔵による酵素活性の変動

前記の徳島県香美郡園芸農業組合連合会 香美郡土産物共選所では11月末に畑からショウガを一度掘り出した後土壌中に戻しさらに成熟させ茎を腐らせた後土室中に移して貯蔵し需要に応じて出荷している。そこでこれらのショウガ生育・成熟・貯蔵過程において根茎中の蛋白分解



**Fig. 3** Seasonal changes in the content of proteolytic activity of ginger root.

Upper figure: Protein (mg/g tissue wt) Lower figure: Proteolytic Activity □ (OD 650nm/wt), Specific Activity ▨ (OD 650nm/Prot. wt)

酵素活性量に変動があるかどうかを測定した。まだ生育中のショウガである9月から11月末までの試料は2週間ごとに、それ以降は土室に貯蔵中のショウガを1カ月ごとに掘り出してもらい翌日にたん白質量と酵素活性を測定した。その結果を Fig.3 に示す。9月～10月末までの生育中にショウガは湿重量当りのたん白質量はショウガが生育するとともに経時的に増加するが、たん白質分解酵素活性は検出されなかった。11月初旬期に急速に酵素活性が検出され、土壌中での成熟を行うに伴い(12月～1月期) 高値を保つ。この酵素活性が高い時期のショウガ湿重量当りのたん白質量はほぼ一定の値を保っていることから、ショウガ塊茎の乾燥などによる見かけの増大によるものではないことが分かった。

iv) ショウガの保存方法と保存期間による酵素活性の変動

市販ショウガの塊茎を家庭で保存する場合保存方法や期間でどのように根茎中のたん白質分解酵素活性が変化するかを調べた。八百屋に依頼し出荷元より入荷された直後の大ショウガを6月期に入手し実験に供した。保存方法は；①室温保存(紙袋にいれ室温20～25℃の実験室内に放置) ②冷蔵庫保存(ビニール袋に入れ口を閉じ約5℃の冷蔵庫に保存)の2種類とし、期間は0日、8日、13日後とし、測定内容は根茎の重量、たん白質量、蛋白質分解酵素活性量とした。尚重量変化測定は重量測定用の同じ塊の重量の変動を測定した。蛋白質量、蛋白質分解酵素活性量

		Storage (days)	1	8	13
Refrigerator	Weight (%)		100	88.0	84.2
	Protein (mg/gwt)	outside	7.17	6.16	7.28
		inside	6.58	8.27	6.45
	Activity (OD/gwt)	outside	5.59(100%)	1.19(21.7%)	0
		inside	10.8 (100%)	7.80(72.2%)	0.43(4.0%)
	S.A. (OD/mg)	outside	0.78	0.17	—
inside		1.63	0.94	0.07	
Room temp.	Weight (%)		100	98.1	97.3
	Protein (mg/gwt)	outside	7.61	8.20	8.15
		inside	8.34	9.15	8.30
	Activity (OD/gwt)	outside	3.55(100%)	2.83(79.7%)	0.99(27.9%)
		inside	13.8 (100%)	11.9(86.2%)	9.92(71.9%)
	S.A. (OD/mg)	outside	0.47	0.34	0.12
inside		1.65	0.30	1.20	

**Table 3.** Changes in the content of proteolytic activity of ginger root during storage., in a paper bag refrigerator storage; 5°C, in a closed vinyl bag, room temperature storage; 20～25°C

を測定するときには試料40gを切り取り、皮付きのまま外側からすり20gを外周部とし、残りを内部として各々を測定試料とした。得られた結果を Tab. 3. 示す。ショウガ室温保存すると乾燥に伴いまず外周部のたん白質分解酵素活性が急減し 8 日目、もとの活性の約20%になり13日目には活性は全く検出されなくなった。一方外部組織に比べて内部組織中の酵素活性の減少は遅く 8 日目でも約72%保持されているが13日後になると約 4 %に減少した。ビニール袋に入れて冷蔵庫に保存した場合には湿重量の変化はほとんどなく外周部組織中の酵素活性も13日後に約28%残存し内部組織では72%も残存している結果が得られた。この結果からショウガ塊茎を購入後、空気遮断を目的としてビニール袋に封入し冷蔵庫保存することによりたん白質分解酵素活性の減少が妨げられることがわかった。

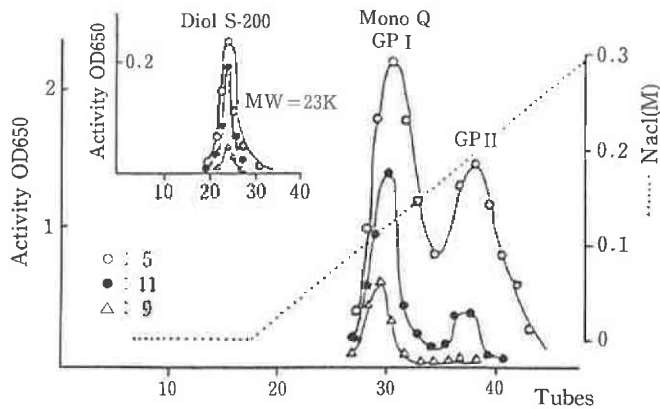
## 2) たん白質分解酵素活性のショウガ根茎中での発現について

Fig. 3. に示したように10月末までの生育中の新ショウガにはたん白質分解酵素が検出されず、11月以降の成熟したショウガになるとたん白質分解酵素活性が急速に発現してくるのはなぜかという問題は興味のある問題である。この問題について、1) 新ショウガにはたん白質分解酵素がなく成熟する過程のある時期に急激にたん白質分解酵素が出来る可能性と、2) 新ショウガにもたん白質分解酵素は存在するが阻害する因子が新ショウガに存在し成熟する間に阻害因子の活性が消失することにより活性が発現するという可能性とが考えられる。次にこれらの可能性について検討した

### i) アイソザイム酵素の変化

著者等はすでにショウガ抽出液中のカゼインを基質とするたん白質分解酵素を精製し、DEAEセルローズイオン交換クロマトグラフィーで2種のアイソザイム酵素を分離し GP I、GP II と名づけ報告した<sup>4)</sup>。Fig. 4. は成熟度の異なるショウガから得られた粗酵素標品中のたん白分解酵素活性のアイソザイムの変化を Mono Q と Diol S-200カラムを用いて調べたものである。試料の Mono Q カラムへの添加量はたん白質量 OD 280 mu 値が2となるように調整した後、一定量10 mlを20mM のリン酸緩衝液 PH6.0の条件下で吸着させ NaCl の濃度勾配 (0-0.3M) で溶出した。たん白質分解酵素活性は OD650nm で表した。○は5月に入手した市販用ショウガで、土室中に保存されており土室から出した直後入手し、その後-80℃で測定時まで約3ヶ月凍結したものを試料とした。●は11月期の成熟直後のショウガで測定まで-80℃で保存していた。ホモジネート中には GP I 型と両方のタイプの活性が存在し、GP I 型が GP II 型に比べて多量に存在していた。△は9月期に収穫前のものを畑から掘りだし測定まで-80℃で保存されていたもので Fig. 4.にあるように GP I 活性のみが少量存在し、GP II 活性は検出されない。Diol S-200カラムでゲル濾過した結果は Fig. 4. 左上挿入図に示したように9月期、11月初期、後期いずれの試





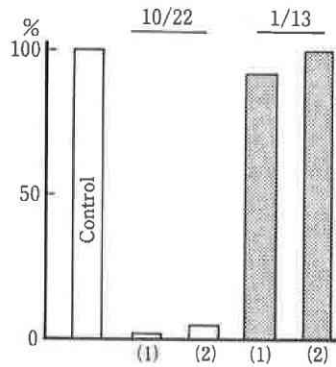
**Fig. 4** Separation of ginger protease on Mono Q and Diol S-200 columns.  
Mono Q column; FPLC system, Diol S-200 column; HPLC system.

- (△); immature ginger root harvested in Sept.
- (●); matured ginger root harvested in Nov.
- (○); mature ginger root stored until May.

料も分子量約23000のたん白質分解酵素一種のみしかなくことがわかった。以上の結果9月採取試料になかったG P II活性は根茎成熟過程で現れてくるものと思われる。しかし、Fig. 3.において9月期試料に酵素活性が検出されなかったのは量的に僅少であったためと思われるが、ホモジネート中に低分代性の酵素活性阻害因子の存在を否定できない。そこで次の検討を行った。

ii) 新ショウガ中のたん白質分解酵素阻害因子について

たん白質分解酵素活性の高いショウガ抽出液を標準として用い、蛋白質分解酵素活性が検出されなかった10月22日の新ショウガ抽出液中にたん白質分解酵素活性阻害因子がないかどうかについて調べた。標準のショウガ抽出液を0.2 mM システイン含有0.2 mM PH 7.0リン酸緩衝液20 lで15時間透析性物質を除去し酵素溶液とした。その一定量に標準の酵素溶液を透析した外液または酵素活性のない新ショウガを透析した外液、および各々のショウガの抽出液を透析した外液を加えて活性を測定した。各々のショウガのホモジネートを1 N HClで酸処理しさらに100℃加熱して酵素活性を失活させた後1 N NaOHで中和した後遠心分離した澄液を加えて活性を測定した。Fig. 5.に示されるように新ショウガの外液および酸・熱処理したショウガ抽出液の上澄液を酵素に加えると酵素活性が完全に失活した。しかし活性を有するショウガ抽出液を同じように処理した場合の上澄液には酵素活性を阻害する効果がない。このことから新ショウガの抽出液中にはたん白質分解酵素を阻害する因子が含まれており、その因子は低分子の透析性で、熱、酸処理に対して安定性があることが分かった。



**Fig. 5** Effect of dialyzable fraction from immature and mature ginger root extract on the proteolytic activity. □ immature ginger root; harvested on Oct. 22. ▨ mature ginger root; harvested on Jan. 13. 100% indicates the original proteolytic activity (1), control + dialyzable fraction of ginger extract (2), control + acid and heat treated ginger extract.

#### 4. 要 約

ショウガに含まれる蛋白質分解酵素について  
含有酵素活性に差があり

1) ショウガ根茎組織の部位により外皮に近い程空気酸化や乾燥により酵素活性が失活されやすいことがわかった。

2) ショウガ根茎中の蛋白質分解酵素活性を失活しないように保存するためには、ビニール袋に入れて空気を遮断し冷蔵庫に保存するとよいことがわかった。

3) ショウガ根茎の生育から成熟の過程において組織に含有される酵素活性に変動が見られる。生育中（9月～10月）のいわゆる新ショウガには蛋白質分解酵素活性が全く含まれていない。

収穫期近くから酵素活性が発現し、土壤中で成熟したショウガ根茎には酵素活性量が充分含まれている。この酵素活性の発現は酵素量の増大に加えて、新ショウガ中に含まれている低分子性・熱安定性の蛋白質分解酵素阻害因子が成熟過程で消失するためにおこると考えられる。以上著者がショウガ根茎中より単離しその酵素化学的諸性質を明かにした蛋白質分解酵素について、根茎中の分布・安定性・阻害因子との関連等を今回明かにした。

終わりに本実験に試料を提供して下さった徳島県香美郡園芸農業組合連合会 香美郡土物協選所 横田芳章氏に深く感謝の意を表する。

## 5 引用文献

- 1) 道喜美代、大沢はま子、中浜信子、櫻井幸子：家政誌、19、167、(1968)
- 2) 市川芳江、高谷とし子：家政学雑誌、36、670、(1985)
- 3) 大沢はま子、館岡孝、小林好美子：調理科学、7、193、(1974)
- 4) 市川芳江、佐々初世、道喜美代：栄養と食料、26、377、(1973)
- 5) Anson, M. L.: J. Gen. Physiol., 22, 79, (1938)
- 6) Folin, O. and Ciocalteu, V.: J. Biol. Chem., 73, 627, (1929)
- 7) Lowry, O. H., Rousenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: J. Biol. Chem., 193, 265, (1951)