

パッションフルーツ(*Passiflora edulis* Sims.)果汁中のプロテアーゼ

誌名	園藝學會雑誌
ISSN	00137626
著者	橋永, 文男 澤, 大作 伊藤, 三郎
巻/号	47巻2号
掲載ページ	p. 282-288
発行年月	1978年9月

パッションフルーツ (*Passiflora edulis* Sims)

果汁中のプロテアーゼ

橋永文男・澤 大作・伊藤三郎

(鹿児島大学農学部)

Protease in the Juice of Passion Fruit (*Passiflora edulis* Sims)

Fumio HASHINAGA, Daisaku SAWA and Saburo ITOO

Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Kagoshima

Summary

The detection of proteolytic enzyme in the juice of purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) was carried out and the properties of the crude enzyme preparations were studied.

1. It has been found that the optimum pH of two types of proteases in the juice of passion fruit was 2.3 and 5.7, using casein as a substrate. The former was designated as PFP-I (Passion fruit protease-I) and the latter, as PFP-II.

2. The maximum activity of PFP-I against temperature was 40°C and that of PFP-II was 50°C. The thermal stability of the enzymes in the solution of pH 6 was shown to be completely inactivated at 70°C and 60°C for PFP-I and PFP-II, respectively. The activity of the enzymes was comparatively stable over a pH range of 2 to 4. Although in the sodium citrate solution at pH 6 PFP-II was inactivated after freezing for 3 days, it was suitable for both of the proteases to be stored at 5°C.

3. The activity of PFP-I was inhibited by incubation with Fe^{++} , Co^{++} , Pb^{++} , Ag^+ , Zn^{++} and Hg^{++} , but activated by Mn^{++} , Sn^{++} and Cd^{++} . On the other hand, that of PFP-II was reduced by Co^{++} , Pb^{++} , Ag^+ , Ca^{++} and Cd^{++} , but slightly enhanced by Fe^{++} , Cu^{++} , Mn^{++} and Zn^{++} .

4. The maximum activity of PFP-I was in the acid pH region and was unaffected by various inhibitors such as PCMB, PMSF and EDTA. Therefore, PFP-I was estimated to be an acid protease. PFP-II was considered to be a SH-protease since its activity decreased markedly by some SH-reagents alone, being increased by cysteine.

5. As fruits matured, the amount of juice per fruit increased, while free organic acid in the juice decreased. The specific activity and the total activity of the proteases were increased remarkably.

緒 言

亜熱帯性パッションフルーツ (果物時計草) の主要栽培品種は、主としてハワイ、フィジーなどで栽培されている黄色系品種 (*P. edulis* f. *flavicarpa* Degener) と、オーストラリア、南アフリカを主産地とする紫色系品種 (*P. edulis* Sims または *P. edulis* f. *edulis*) があり(16, 19, 27), 後者が普通品種として鹿児島県南部でも栽培されている。果汁は酸味が強く、特色ある芳香成分(7, 9)を有するとともに、種々のビタミンに富み(19)、加工用あるいは生食用として有望視されている。主な用

途は果汁であるが、果肉中にアミロペクチンを主体とするデンプンが含まれているので(6)、加熱時に粘度が増加すること(13)、および芳香が消失し易い欠点(19)もある。

加工には、まず果実を半割し、果肉部を取り出したのち、果汁を搾汁する方法が用いられているが、その際、指宿地区の果汁工場で作業員の手が荒れることがあった。他方、熱帯性果実からパパイン(11)やプロメライン(15)などのタンパク分解酵素が大量に生産されていること、およびイチジク(12)やメロン(10)などについてタンパク分解酵素が報告されている。

1977年11月1日受理

本実験ではまず亜熱帯性果実であるパッションフルーツのプロテアーゼ活性の有無を検索した結果、酸性領域に最適 pH を有する 2 種のプロテアーゼを認めたので、引き続きこれら酵素の諸性質を明らかにしたものであり、これまでに得られた結果をとりまとめて報告する。

材料および方法

1. 供試材料および粗酵素の調製

鹿児島県指宿市の栽培園（樹令 5~6 年生）から紫色系パッションフルーツ (*Passiflora edulis* Sims) の完熟果を 1974~1975 年にかけて 8 月上旬頃採取し、1 kg ずつに分けて、直ちに処理するかまたは -20°C に凍結貯蔵したのち、アセトン粉末として粗酵素を調製した。まず果実を半切し、内部をさじで取り出し、綿布に入れ、ハンドジュースで搾汁した。搾汁液を遠心分離 (3,000 rpm×10 分) し、デンプンを除去したのち、2 倍容の冷却アセトン (-20°C) に入れ、酵素を沈でんさせた。冷却遠心分離機を用いて (10,000 rpm×10 分) 沈でんを集め、常法にしたがってアセトン粉末を調製し、 5°C に保存した。アセトン粉末に 100~350 倍の 20 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6) を加えて室温で 30 分間抽出後、遠心分離 (3,000 rpm×10 分) によって得られた上清液を粗酵素液として用いた。

2. 酵素活性の測定

特に記載のないものは次の方法によった。すなわち、基質として 1.2% 熱変性カゼイン (メルク製, ハンマーシュテン・カゼインをさらに精製 (1), 20 mM クエン酸緩衝液中に溶解) 5 ml に上記の粗酵素液 1 ml を添加し、 37°C に 1 時間反応させた。5 ml の 0.4 M トリクロロ酢酸 (TCA) を加えて反応を停止させ、30 分後ろ過し、ろ液中の分解カゼインを 280 nm の吸光度で測定した。TCA を添加する直前に酵素液を入れたものをテストと同様に処理してブランク値を求めた。また牛血清アルブミンを標準タンパク質として 280 nm の吸光度からタンパク量を測定した。

3. 遊離酸と糖度

遊離酸は搾汁液を遠心分離 (3,000 rpm×10 分) し、フェノールフタレインを指示薬として 0.1 N 水酸化ナトリウムで滴定し、クエン酸含量として表わした。また手持屈折糖度計によって糖度を測定した。

結 果

1. 果実の形状と組成

紫色系パッションフルーツの未熟果 (6 月中旬採取) と成熟果 (8 月上旬採取) の組成を比較し、第 1 表に示した。成熟果の方が未熟果より、果肉割合、果実当りの果汁量、ブリックス、pH が高かった。一方、遊離酸は

Table 1. General composition of purple passion fruit*.

Characteristics	Stages of maturity	
	Immature	Mature
Peel color	Green	Purple
Fruit weight (g)	35.7	35.0
Flesh per fruit (%)	45.0	54.3
Juice per fruit (%)	30.0	37.0
Brix ($^{\circ}$)	15.4	16.3
pH	2.7	3.2
Free acid (as citric acid, %)	4.17	1.52

* Products at Ibusuki

反対に減少し、1.52% であった。

2. 酵素の最適反応条件

(1) 最適 pH pH 6 のクエン酸ナトリウム緩衝液で抽出した酵素液と基質とを混合し、種々の pH に調整後、反応させた (第 1 図)。カゼインを基質に用いた場合、pH 2.3 と pH 5.7 に活性ピークが見られた。したがって、パッションフルーツには少なくとも 2 種のタンパク分解酵素が含まれていることが推測され、最適 pH 2.3 の酵素を PFP-I (Passion fruit protease-I), pH 5.7 の酵素を PFP-II と略称した。

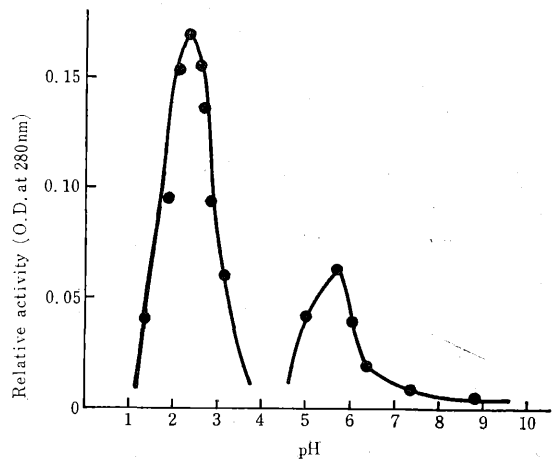


Fig. 1. Effect of pH on the proteolytic activity of passion fruit with casein as a substrate.

(2) 最適温度 2 種のプロテアーゼを含む酵素液をそれぞれの最適 pH (2.3 と 5.7) に保ち、 20°C ~ 80°C の温度で 1 時間反応させた。第 2 図に示されているように、PFP-I の最適反応温度は 40°C であり、PEP-II のそれは 50°C であった。両酵素とも最適反応領域が狭く、 20°C 以下または 65°C 以上では最高活性の約 10% 以下に減少した。

(3) 酵素活性と反応時間の関係 pH 2.3 と pH 5.7

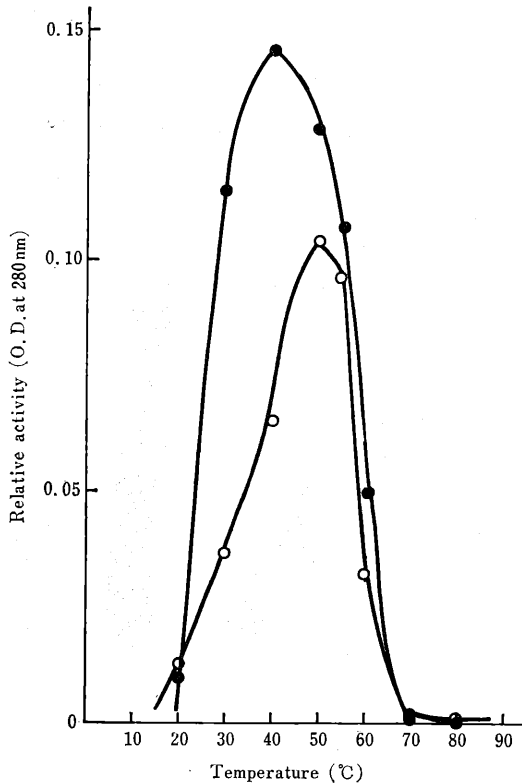


Fig. 2. Effect of temperature on the proteolytic activity of passion fruit.
PFP-I: ●—●, PFP-II: ○—○

の基質に、酵素液(約 5 mg/ml)を添加して反応させ、経時的に一定量ずつ取り出して TCA を加えて反応をとめ、反応分解物を測定した。両酵素とも反応初期は直線性を示したが、PFP-II は次第に傾いた。また別の実験で酵素活性の少ない場合は PFP-I と同じく直線になった。

3. 酵素の安定性

(1) pH 安定性 酵素液の pH を約 1~10 に調整し、20°C で 2.5 時間放置後、基質 (pH 2 と pH 6) と混合し、pH を 2.3 と 5.7 に再調整したのち、上述の方法で残存活性を測定した。その結果を第 4 図に示した。両酵素とも pH 2~4 で比較的活性が保持されたが、pH が上がるにつれて失活度が増加した。また pH 2 以下では急に失活した。

(2) 温度安定性 抽出した酵素をあらかじめ各温度で 10 分間処理した後、pH 2.3 と pH 5.7 でそれぞれ基質と反応させた結果が第 5 図である。PFP-I は 70°C 以上、PFP-II は 60°C 以上でほとんど失活した。

(3) 経時変化 20 mM クエン酸緩衝液中 (pH 6)

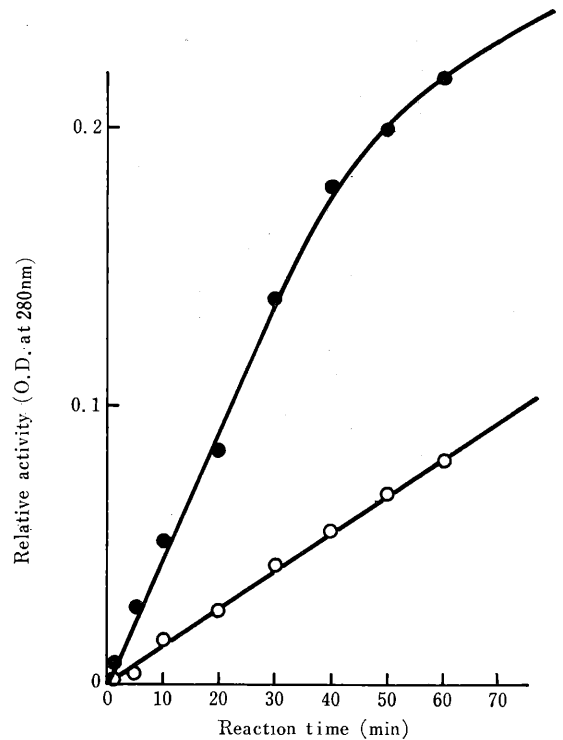


Fig. 3. Hydrolysis rates of casein by the crude proteases of passion fruit.
PFP-I: ●—●, PFP-II: ○—○

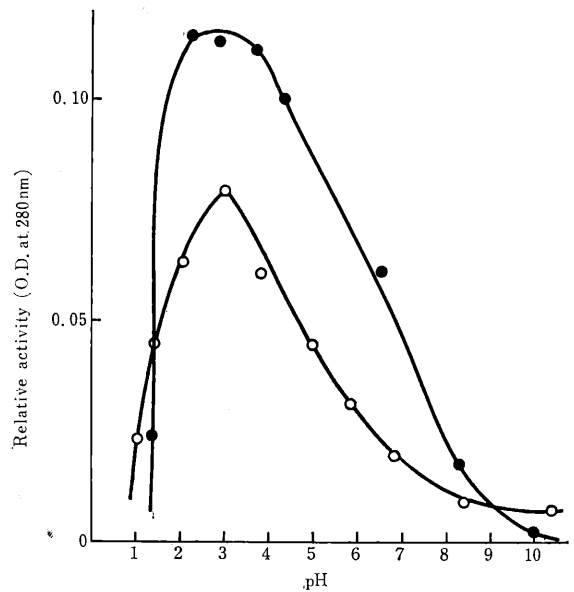


Fig. 4. Effect of pH on stability of the protease activity of passion fruit.
PFP-I: ●—●, PFP-II: ○—○
Preincubation at 20°C for 2.5 hr.

Table 2. Effect of storage temperature on protease activity of enzyme preparation of passion fruit.

Storage temperature (°C)	Enzymes	Storage time				
		Zero	2 hours	24 hours	3 days	13 days
-20	PFP-I	0.173	0.161	0.180	0.181	0.187
	PFP-II	0.085	0.110	0.070	0.008	0
5	PFP-I	0.173	0.182	0.169	0.167	0.177
	PFP-II	0.085	0.088	0.142	0.105	0.075
28	PFP-I	0.173	0.162	0.183	0	0
	PFP-II	0.085	0.105	0.141	0	0

Relative activity (Absorbance at 280 nm)

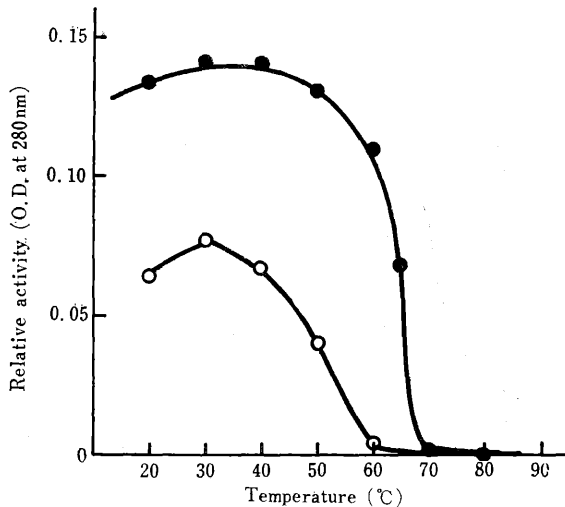


Fig. 5. Thermal stability of the protease activity of passion fruit.

PFP-I: ●—●, PFP-II: ○—○

で -20°C, 5°C, 28°C に保ち、経時的に酵素活性の変化を測定した。第2表に示したように PFP-I は凍結および 5°C で比較的安定であるが、PFP-II は凍結により活性が低下した。したがって 5°C 保存が最適であった。

4. 試薬類の酵素に対する影響

(1) 金属塩の影響 各金属塩を終濃度 1 mM になるように粗酵素液に添加したのち、pH を 2.3 と 5.7 に合せて反応させた。金属塩を加えない場合の活性を 100 とし第3表にその結果をまとめた。上述のような粗酵素液の反応においては PFP-I は Fe⁺⁺, Co⁺⁺, Pb⁺⁺, Ag⁺, Zn⁺⁺, Hg⁺⁺ により阻害を受け、Mn⁺⁺, Sn⁺⁺, Cd⁺⁺ で多少活性化された。PFP-II は Co⁺⁺, Pb⁺⁺, Ag⁺, Ca⁺⁺, Cd⁺⁺ で阻害され、Fe⁺⁺, Cu⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺ 等で活性化された。

(2) 阻害剤およびアミノ酸の影響 SH 試薬、トリブシンおよびキモトリブシン阻害剤、還元剤、金属キレート剤、タンパク変性剤およびアミノ酸等を終濃度 1 mM

Table 3. Effects of heavy metal salts on the protease activity of passion fruit.

Metals (1 mM)	Relative activity (%)	
	PFP-I	PFP-II
None	100	100
FeSO ₄	72	120
MgSO ₄	92	105
CuSO ₄	98	112
Ni(NO ₃) ₂	96	109
Co(NO ₃) ₂	39	0
Pb(NO ₃) ₂	57	72
Mn(NO ₃) ₂	115	128
AgNO ₃	68	69
SnCl ₂	127	107
ZnCl ₂	71	119
CaCl ₂	96	81
HgCl ₂	74	100
CdCl ₂	124	80

になるように反応液に加えて(例外として、PCMB と TPCK は 0.01 mM, トリブシンインヒビターは 0.01%) 反応させた。第4表に示したように、PFP-I は SH 試薬、セリン活性基阻害剤、EDTA などの金属酵素阻害剤であり影響を受けず、強酸性領域で最適活性を有することから、酸性プロテアーゼと推察される。一方 PFP-II は SH 試薬により活性が低下し、システインなどで活性が増大することから、PFP-II は SH 酵素と推定される。両酵素とも SDS によって活性が阻害されるが、各試薬に対する感受性が異なることから、異種のタンパク分解酵素と考えられる。

(3) システインの影響 PFP-II に対し強い活性化を示したシステインを種々の濃度で酵素に作用させた結果が第6図である。両酵素とも低濃度では活性化されるが、濃度が高くなると、特に PFP-I は無添加の場合より活性が減少した。

5. 成熟に伴うプロテアーゼ活性の変化

未熟果(緑色)および適熟果(全面紫色)を採取し、適熟果を室(温約 28°C)に8日間放置して、全面紫色~褐

Table 4. Effects of various compounds on the protease activity of passion fruit.

Compounds	Final concentration (mM)	Relative activity (%)	
		PFP-I	PFP-II
None	—	100	100
Iodoleacetic acid	1.0	109	71
PCMB	0.01	101	78
TPCK	〃	107	99
TLCK	1.0	100	111
PMSF	〃	110	131
Trypsin inhibitor	0.01(%)	96	86
N-Bromosuccinimide	1.0	81	99
Thioglycolic acid, Na salt	〃	93	110
2-Mercaptoethanol	〃	104	85
Potassium cyanide	〃	74	96
Ascorbic acid	〃	89	111
EDTA	〃	110	114
Guanidine, Hydrochloride	〃	99	80
Sodium dodecyl sulfate	〃	79	49
L-Aspartic acid	〃	98	106
L-Glutamic acid	〃	109	106
L-Cysteine	〃	108	153
L-Proline	〃	97	87
Hydroxy-L-Proline	〃	106	114
L-Tyrosine	〃	81	123
DL-Histidine	〃	89	115
L-Arginine	〃	98	101

PCMB: *p*-Chloromercuribenzoic acid, TPCK: *N*-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone, TLCK: *N*-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone, PMSF: Phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, Na salt.

色を呈し、しわを生じたものを過熟果として使用した。果実を 1 kg ずつ処理してアセトン粉末を調製し、その一定量をとって酵素活性を測定した。同じ操作を 2 回繰り返して、その平均値で算出した。同様に成熟果の果皮を搾汁し、アセトン粉末にしたものも同時に測定した。

第 5 表に示されているように、成熟するにつれて、両タンパク分解酵素の比活性および果実 1 kg 当りの全活性とも顕著に増大することが明らかになった。また果皮

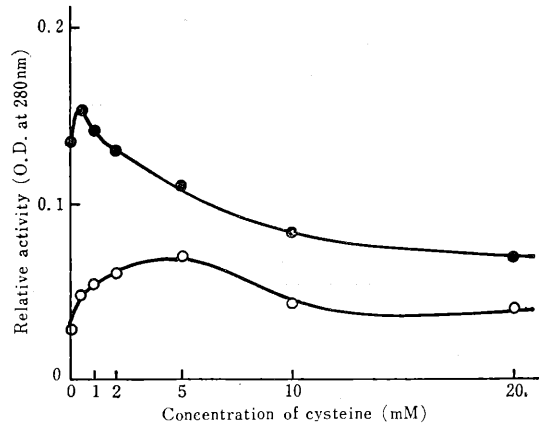


Fig. 6. Effect of the addition of cysteine of the protease activity of passion fruit.

PFP-I: ●—●, PFP-II: ○—○

は果汁よりきわめて酵素活性が少なかったが、同様に 2 種の酵素活性を有していた。

考 察

成熟果実は果汁歩止り 37% で、酸味が強く、pH 3.2 であった。有機酸組成については黄色系ではクエン酸 95%、リンゴ酸 5% であるが、紫色系ではクエン酸 41%、乳酸 23.4%、マロン酸 15.5%、コハク酸 7.56% という結果が報告(5) されているので、本実験の全酸は最も多いクエン酸として算出した。

パッションフルーツのプロテアーゼは第 1 図より、カゼイン基質で pH 2.3 と 5.7 に最適 pH を有する 2 種類の酵素が存在することが明らかになったが、同時に行った 6 M 尿素変性ヘモグロビン基質で活性を測定した結果、最適 pH 3.8 と 5.5 を示した。最適 pH が 5.7 のプロテアーゼはこれまでに報告された植物起源タンパク分解酵素と同じく(8, 14, 25), SH 酵素と考えられる。

一方、前者の最適 pH 2.3 の酵素は酸性プロテアーゼと推定されるが、強酸性のプロテアーゼとしては、ペプシン以外にヒイロタケで最適 pH 2.5(26), *Aspergillus saitoi* で pH 2.5~3.0 (28), ハスの種子で pH 2.4 (23,

Table 5. Changes in the protease activity of passion fruit associated with ripening.

Characteristics	Juice			Peel
	Immature	Mature	Overripe	Mature
Acetone powder (g/kg fruit)	1.5	1.5	1.0	0.4
Specific activity*, PFP-I	0.072	0.125	0.400	0.016
PFP-II	0.084	0.084	0.294	0.016
Total activity**, PFP-I	10.9	27.2	46.5	3.1
PFP-II	12.8	18.3	34.2	3.1

* Specific activity: Absorbance at 280 nm/hour/mg protein.

** Total activity: Protease activity/kg fresh fruit.

24) 等が報告されている。さらに植物では種子 (2, 22) および発芽種子 (3) に酸性プロテアーゼ (pH 2~3) が広く分布しているといわれている。しかし果実や他の植物組織において PFP-I のように低い pH で作用するプロテアーゼはあまり知られておらず、中性付近で作用する酵素 (4, 17, 18, 21) の報告もあるが果実中の酸性プロテアーゼは興味ある酵素と考えられる。

2種の酵素活性は第2図から明らかなように、最適反応温度が狭く、第5図におけるように、30~40°C であらかじめ処理した方が活性が増加するという結果が得られたこと、また酵素液を pH 6 に保つと一時的に活性が増加する場合のあることなどから、温度処理による酵素の活性化、またはプロテアーゼインヒビターなど (20) の阻害剤の消失等が考えられる。また pH 3 より酵素抽出率のよい pH 6 の酵素液を用いて経時変化を測定 (第2表) したが、第4図から明らかなように pH 3 の方が、より安定であることが推察される。

第5表に示されているように、タンパク分解酵素は成熟に伴って比活性および全活性とも急増していることから、果実の成熟老化に対して重要な役割をしていると考えられる。本実験に用いたプロテアーゼは粗酵素のまま活性を測定したため、さらに精製して単離した酵素について、その諸性質および他の酸性プロテアーゼとの相異等を現在研究中である。

摘 要

紫色系パッションフルーツ (果物時計草) 果汁中のタンパク分解酵素の存在を明らかにし、それら酵素の諸性質について研究した。

1. パッションフルーツ果汁中にカゼイン基質として最適 pH 2.3 と 5.7 の2種のタンパク分解酵素が存在していることを見出し、それぞれ PFP-I (passion fruit protease-I), PFP-II とした。

2. PFP-I の最適温度は 40°C, PFP-II のそれは 50°C であった。温度安定性に関しては PFP-I が 70°C で完全に失活したのに対して、PFP-II は 60°C でほとんど失活し、PFP-I よりも熱に不安定であった。また pH 安定性は両酵素とも pH 2~4 で比較的安定であった。pH 6 のクエン酸ナトリウム中では PFP-II が凍結3日目失活したが、両酵素とも 5°C の保存が適当であった。

3. 両酵素に対する種々の試薬の影響を検討した結果、重金属類では PFP-I が Fe⁺⁺, Co⁺⁺, Pb⁺⁺, Ag⁺, Zn⁺⁺, Hg⁺⁺ により、また PFP-II は Co⁺⁺, Pb⁺⁺, Ag⁺, Ca⁺⁺, Cd⁺⁺ で阻害された。反対に PFP-I は Mn⁺⁺, Sn⁺⁺, Cd⁺⁺ により、PFP-II は Fe⁺⁺, Cu⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺ により多少活性化された。

4. PFP-I は酸性領域で最適 pH を有し、PCMB, PMSF, EDTA などの各種の阻害剤によって影響を受けなかったが、PFP-II は SH 試薬のみで阻害され、システインで活性化されたので、PFP-I は酸性プロテアーゼ、PFP-II は SH プロテアーゼと推定される。

5. 果実の成熟に伴って果汁量が増加し、遊離酸が減少するとともに PFP-I と PFP-II の酵素の比活性と全活性がともに顕著に増加した。

引用文献

1. 赤堀四郎編. 1956. 酵素研究法第2巻. p. 240. 朝倉書店.
2. AKUNE, S., and S. TAKAGI. 1962. Studies on the metabolism of azuki seed protein. Part V. purification of azuki protease. *Agr. Biol. Chem.* 26: 63—71.
3. ANGELO, A. J. St., R. L. ORY, and H. J. HANSEN. 1970. Properties of a purified proteinase from hempseed. *Phytochemistry* 9: 1933—1938.
4. BURGER, W. C., N. PRENTICE, M. MOELLER, and G. S. ROBBINS. 1970. Stabilization, partial purification and characterization of peptidyl peptide hydrolases from germinated barley. *Phytochemistry* 9: 49—58.
5. CHAN, H. T. Jr. T. S. K. CHANG, and E. CHENCHIN. 1972. Nonvolatile acids of passion fruit juice. *J. Agr. Food Chem.* 20(1): 110—112.
6. CILLIE, G. G., and F. J. JOUBERT. 1950. Occurrence of an amylopectin in the fruit of the granadilla (*Passiflora edulis*). *J. Sci. Food Agr.* 1: 355.
7. HIU, D. N., and P. J. SCHEUER. 1961. The volatile constituents of passion fruit juice. *J. Food Sci.* 26: 557—563.
8. 市川芳江・佐々初世・道喜美代. 1973. しょうがたん白分解酵素の分離精製. *栄養と食糧*. 26(6): 377—383.
9. 門田利作・中村武彦. 1972. 果物時計草 (*Passiflora edulis* SIMS) に関する食品化学的研究 (第1報) 果汁中の一般成分および揮発性物質について. *食品工誌*. 19(12): 567—572.
10. KANEDA, M., and N. TOMINAGA. 1977. Isolation and characterization of a proteinase from the sarcocarp of melon fruit. *J. Biochem.* 78: 1287—1296.
11. KIMMEL, J. R., and E. L. SMITH. Crystalline papain I. Preparation, specification, and activation. *J. Biol. Chem.* 207: 515—531.
12. KRAMER, D. E., and WHITAKER, J. R. 1964. Ficus enzymes II properties of the proteolytic enzymes from the latex of *Ficus carica* variety Kadota. *J. Biol. Chem.* 239: 2178—2183.

13. KWOK, S. C. M., H. T. CHAN, Jr., T. O. M. NAKAYAMA, and J. E. BREKKE. 1974. Passion fruit starch and effect on juice viscosity. *J. Food Sci.* 39 : 431—433.
14. 村地 孝. 1966. 植物起源のプロテアーゼ. 蛋白質 核酸 酵素. 11(5) : 335—341.
15. MURACHI, T., and H. NEURATH. 1960. Fractionation and specificity studies on stem bromelain. *J. Biol. Chem.* 235 : 99—107.
16. 農林省熱帯農業研究センター. 1974. 東南アジアの果樹. pp. 365—370. (財) 農林統計協会.
17. PENNER, D., and F. M. ASHTON. Hormonal control of proteinase activity in squash cotyledons. *Plant Physiol.* 42 : 791—796.
18. PIKE, C. S., and W. R. BRIGGS. 1972. Partial purification and characterization of a phytochrome—degrading neutral protease from etiolated oat shoots. *Plant Physiol.* 49 : 521—530.
19. PRUTHI, J. S. 1963. Physiology, chemistry, and technology of passion fruit. *Advance in Food Research* 12 : 203—282.
20. RYAN, C. A. 1973. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24 : 173—196.
21. SHAIN, Y., and A. M. MAYER. 1968. Activation of enzymes during germination—trypsin-like enzyme in lettuce. *Phytochemistry* 7 : 1491—1498.
22. 信濃 栄・福島和男. 1967. 種子プロテアーゼの分布について. 千葉大園芸学部学術報告. 15 : 33—37.
23. SHINANO, S., and K. FUKUSHIMA. 1969. Studies on lotus seed protease Part II. Purification and some properties. *Agr. Biol. Chem.* 33(9) : 1236—1243.
24. 信濃 栄・島田洋子・田村五郎. 1966. ハス種子蛋白分解酵素に関する研究. (第1報) プロテアーゼ活性の検出と酵素の部分精製. *農化.* 40(4) : 185—189.
25. THOMPSON, E. H., I. D. WOLF, and C. E. ALLEN. Ginger rhizome: A new source of proteolytic enzyme. *J. Food Sci.* 38 : 652—655.
26. TOMODA, K., and H. SHIMAZONO. 1964. Acid protease produced by *Trametes sanguinea*, a wood-destroying Fungus. Part II. Physical and enzymological properties of the enzyme. *Agr. Biol. Chem.* 28(11) : 774—778.
27. WIHTTAKER, D. E. 1973. Passion fruit: Agronomy, processing and marketing. *Tropical Science* 14(1) : 59—77.
28. YOSHIDA, F., and M. NAGASAWA. 1956. Studies on the proteolytic enzymes of Black *Aspergilli*. Part II. Several properties of the crystalline proteolytic enzyme obtained from *Aspergillus saitoi*. *Bull. Agr. Chem. Soc.* 20 : 257—261.