

パイナップルに含まれるタンパク質分解酵素ブロメラインの 研究動向：生化学および抽出・精製

Research trends of Bromelain, a protease from pineapple :
biochemistry, extraction and purification

澤野頼子
Yoriko Sawano

要旨 ブロメラインはパイナップルに含まれる主要なタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）である。本酵素は、そのタンパク質分解活性やそれに基づく薬理学的作用により、食品、化粧品、医薬品、医療分野で様々な利用されている。本総説では、ブロメラインの生化学的性質を述べるとともに、産業利用および構造機能相関解析に利用するための抽出・精製法に関する研究動向について紹介する。

Abstract Bromelain is a major protease extracted from pineapple. It has been variously utilized in food, cosmetics, pharmaceuticals and clinical fields due its proteolytic activity and pharmacological effects. This review presents biochemical properties of this enzyme and research trends on its extraction and purification methods for industrial use and structure-function analysis.

1. はじめに

パイナップル (*Ananas comosus*) は、南米、東南アジア、中国、ハワイなどの熱帯あるいは亜熱帯地域で栽培されている、果実を食用とする植物である^{1,2,3)}。独特な芳香と甘味を呈し、糖質、タンパク質、ビタミン類、マグネシウム、マンガンなどの栄養素を含み、世界的に人気のある果物である。食物繊維が豊富なことからダイエットサプリメントとしても利用されている⁴⁾。パイナップルは、古くから東南アジア、ケニア、インド、中国において民間医療に用いられ、薬用植物として利用されてきた^{3,5)} が、その薬効には「ブロメライン (bromelain)」が大きく寄与している^{1,6)}。

ブロメラインは、パイナップルの主要なタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）である。本酵素は、活性中心にシステインのチオール基 (-SH) をもつシステインエンドプロテアーゼ (EC 番号3.4.22) に分類され、パパイヤに含まれるパパインに代表されるパパインファミリー (CA クラン、C1ファミリー、C1Aサブファミリー) に属する⁷⁾。キウイに含まれるアクチニジン、イチジクに含まれるフィシンなどもこのファミリーに属する。植物のプロテアーゼは、一般的にストレス応答や種子発芽における貯蔵タンパク質の動態、防御反応の誘導、老化、細胞死などに重要な役割を果たしている。また、プロテアーゼ活性化受容体 (protease-activated protease : PAR) を活性化し、薬理学的な作用に関与する⁸⁾。

ブロメラインは、そのタンパク質分解活性やそれに基づく薬理学的作用により、食品、化粧品、繊維などの産業分野に加え、医薬品や医療分野においても様々な利用されている^{1,5,6,9)}。食品産業では、肉軟化、製菓・製パン工程、タンパク質加水分解物の製造、ビールの清浄化、酵

素褐変防止などに利用され¹⁰⁾、化粧品産業においては、皮膚のピーリングの有効成分として使われている⁵⁾。医薬品や医療分野においては、タンパク質分解活性に加え、抗菌活性や抗炎症活性、抗ガン活性、抗浮腫活性、抗血小板活性、抗凝固活性、繊維素溶解活性、抗血栓活性などを示すことから、胃腸炎における消化促進をはじめ、創傷・火傷の治癒、外科手術後の回復、変形性関節症、副鼻腔炎、抗生剤の吸収促進などに有効とされている^{3,11,12)}。

ブロメラインが最初に見出されたのは19世紀後半であるが、1957年にHeinickeが果実よりも茎に、より高濃度に存在していることを発見して以降、茎を原料として商業的な生産が開始された^{3,13)}。茎は食用できない廃棄部分であるため、ブロメラインの抽出に適した安価な材料であり、茎から抽出したブロメライン（ステムブロメライン）が産業分野では主に利用されてきた^{3,5,12)}。その後、芯、葉、果皮などのその他の廃棄部分にもブロメラインが含まれていることが分かり、近年、これらの廃棄物を利用したブロメラインの抽出・精製が環境負荷低減の観点からも注目されている^{14,15,16)}。

本総説では、ブロメラインの生化学的性質を述べ、産業利用や構造機能相関解析に利用するための抽出・精製方法に関する研究動向について紹介する。

2. 生化学的性質

植物のプロテアーゼは、一般的に果実の成長の初期段階に生産され、果実が成熟するとほぼ消失する。しかし、ブロメラインは、一般的な植物プロテアーゼとは異なり、果実の成長の初期段階にはほとんど検出されず、果実の成熟に伴って発現量が増加する^{5,13)}。パイナップル植物体では、成長や果実の成熟過程において植物病原菌等から防御する役割を担っている¹⁷⁾。

ブロメラインは、パイナップル植物体の葉、茎、果実、果皮などの様々な部位に存在するが、特に茎と果実に豊富に存在している⁵⁾。茎に存在するブロメラインはステムブロメラン（EC 3.4.22.32）と呼ばれ、果実に存在するブロメラインはフルーツブロメライン（EC 3.4.22.33）と呼ばれる。茎に存在する主要なプロテアーゼはステムブロメラインであるが、その他にアナナイン（EC 3.4.22.31）とコモサインと呼ばれるシステインプロテアーゼも少量共存している³⁾。これら4種のシステインプロテアーゼは、表1に示したように生化学的あるいは物理化学的性質が異なる点がある。特に、ステムブロメランが等電点9.5以上の塩基性タンパク質であるのに対し、フルーツブロメラインは等電点4.6の酸性タンパク質であるのは大きく異なる点である。これに関して、両者のアミノ酸配列の相同性は80%程度であるが、ステムブロメラインはフルーツブロメラインに比べ、塩基性アミノ酸残基数が多いのに対し、酸性アミノ酸残基数が少ないことが反映されている⁷⁾。このことは、最適pHにも反映され、どちらのブロメラインも最もプロテアーゼ活性が高いpHは6.0付近であるが、フルーツブロメラインの方がやや酸性側領域において、ステムブロメラインの方がやや塩基性側領域において活性を示す⁸⁾。また、両者ともアミノ酸残基数や分子量に幅があるのは、アミノ酸配列の多型、糖鎖の結合の有無、あるいは、抽出・精製条件の違いによるものと考えられる^{3,18)}。アミノ酸配列の多型は、パパインやフィシンにも見られる遺伝子多型によるものと考えられ^{19,20,8)}、相同性の高い複数の配列が報告されている⁷⁾。

フルーツブロメラインとステムブロメラインのホモロジーモデリングによる立体構造予測およびステムブロメラインの結晶構造解析によると、両者ともに全体的な立体構造は類似しており、 α ヘリックスドメインと逆平行 β シートドメインからなる^{7,18)}。その2つのドメインの間に、

表1. パイナップル由来システインプロテアーゼの生化学的および物理化学的性質^{3, 8)}

名称	ステムブロメライン (Stem bromelain)	フルーツブロメライン (Fruit bromelain)	アナナイン (Ananain)	コモサイ (Comosain)
EC番号	EC 3.4.22.32	EC 3.4.22.33	EC 3.4.22.31	
起源	パイナップル茎	パイナップル果実	パイナップル茎	パイナップル茎
分子質量 (kDa)	23.8-37.0	23.0-32.5	23.4-25.0	24.4-24.5
等電点	> 9.5	4.6	>10	>10
アミノ酸残基数	212, 291, 285	326, 351	216	186
最適温度 (°C)	40-60	37-70	—	—
最適pH	5.5-8	4-7	—	—
糖鎖の有無	有	有/無	無	有

2つのポケット、すなわち、触媒残基であるCysとHisを含む第1ポケットと基質特異性に関わるS2サブサイトである第2ポケット、をもつ活性部位がある¹⁸⁾。

プロテアーゼとしての基質特異性については、ステムブロメライン、フルーツブロメラインともに、タンパク質あるいはペプチド内部のAla、Leu、Lys、あるいはArgのC末端側のペプチド結合を切断しやすい。一方で、ステムブロメラインがBz-Phe-Val-Arg-pNAよりもZ-Arg-Arg-pNAを著しく切断しやすいのに対し、フルーツブロメラインはこれらの基質に対してステムブロメラインほど強い活性を示さず、両基質に対する特異性が逆である、などの差異がある^{1, 7, 8, 21)}。また、この2つの基質に対するアナナインの特異性は、フルーツブロメラインと同様に、ステムブロメラインとは逆である。ステムブロメラインあるいはアナナインと基質ペプチドの複合体モデリング解析によると、基質特異性に関わるS2サブサイトの深いポケットが、アナナインでは6個の疎水性残基（2個のTrp、1個のIle、2個のAla、および1個のLeu）で構成されているのに対し、ステムブロメラインではIleがGluに置換されていること、その他にAsp209が基質のArgのリガンドとして働き、基質特異性の差に関与すると考えられる¹⁸⁾。

ブロメラインのプロテアーゼ活性は、Cys、硫酸水素塩、NaCN、H₂S、Na₂S、安息香酸塩によって活性化される^{1, 22)}。一方、有機水銀、Hg²⁺、Zn²⁺、テトラチオン酸塩によって可逆的に阻害され、*N*-エチルマレイミド、*N*-(4-ジメチル-3,5-ジニトロフェニル)マレイミド、モノヨード酢酸、ヨードアセトアミドなど、触媒残基CysのSH基をアルキル化する薬剤によって不可逆的に阻害される^{8, 9)}。また、パパイナファミリーの他の多くのシステインプロテアーゼと同様に、セリンプロテアーゼであるトリプシンの阻害剤であるTLCK (*Na*-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride)、および、キモトリプシンの阻害剤であるTPCK (*Na*-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone)によって阻害される。パパイナとTPCKとの複合体のX線結晶構造解析やパパイナファミリーに属すクロストリパインとTLCKとの解析によって、触媒残基Cysが不可逆的にアルキル化されていることが示されており、ブロメラインでも同様なことが生じていると考えられる^{23, 24, 8)}。しかし、ブロメラインは、パパイナファミリーの他の多くのシステインプロテアーゼとは異なり、卵白シスタチンによってほとんど阻害されず、E64 (*trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane)によってゆっくりと阻害される^{25, 18)}。後者については、ステムブロメラインとE64との複合体のX線結晶構造解析によって、E64のLeu残基がブロメラインの活性部位の第2ポケット (S2サブサイト) の底に位置するGlu68の側鎖 (パ

インファミリーの他のシステインプロテアーゼでは、これに相当する位置はIleである)の立体障害の影響で、活性部位に深く入り込めないことが原因であることが示された¹⁸⁾。

また、プロメラインは比較的高い熱安定性を示し、60℃、30分間の処理後は元の半分程度のプロテアーゼ活性を保持し、70℃、15分間の処理後は元の活性の9～22%程度まで低下し、100℃、10分間の処理で完全に活性を失う²⁶⁾。70℃以上では、不可逆的な熱変性が起こることが円偏光二色性(Circular Dichroism: CD)測定や示差走査熱量測定(Differential Scanning Calorimetry: DSC)により明らかにされた²⁷⁾。また、低濃度のプロメライン溶液は室温で急速に活性が低下するが、濃度50 mg/mL以上の溶液は室温で1週間程度、安定である³⁾。

3. 抽出・精製方法

パイナップル茎の破碎液から遠心やろ過の操作により繊維質や不溶物を除去することによって、粗プロメライン抽出液が得られる。粗プロメライン抽出液には、ステムプロメライン(抽出液全体の80%を占める)、フルーツプロメライン(同10%)、アナニン(同5%)を含めた様々なシステインプロテアーゼに加え、フォスファターゼ、グルコシダーゼ、ペルオキシダーゼ、セルラーゼ、リボヌクレアーゼ、糖タンパク質、糖質、プロテアーゼインヒビター、有機的に結合したカルシウムなどが含まれている^{1, 2, 4, 9)}。“ステムプロメライン”と称して市販されている製品の多くは、遠心後に、限外ろ過、凍結乾燥を行う「従来法」によって製造される、黄色の粉末状のものである。これも様々なシステインプロテアーゼとそれ以外の成分を含んでいる^{5, 12, 18)}。酵素の酵素学的解析および立体構造解析に基づく構造機能相関解析には高純度であることが不可欠である一方で、産業利用する際には、純度よりも収率やコストが重視される場合も多いため、プロメラインを使用する目的に応じて様々な抽出・精製法が用いられる¹²⁾。ここでは、従来法以外の抽出・精製方法について紹介する。

(A) 水性二相系(Aqueous Two-Phase System: ATPS)による抽出

水性二相系(ATPS)は、2つの水相による相分離系である。親水性の2種の高分子(例えば、ポリエチレングリコール(PEG)とデキストラン)、または、高分子と無機塩類(例えば、PEGとリン酸塩)を高濃度で水に加えると、2つの水相に相分離することを利用して、目的物質を分離することができる^{28, 29)}。有機溶媒を使用せず、穏和な条件で使用でき、操作が迅速・容易で、スケールアップしやすい点、さらに、相分離に使用した試薬を再利用できることから低コストで環境低負荷である点から、タンパク質など生体物質の抽出・精製に利用されている。相分離に使用する試薬成分や濃度を調整することにより、標的タンパク質を変性させずに、他のタンパク質や色素、多糖などから分離することができる^{28, 30)}。

プロメラインの抽出・精製においても、PEG/K₂SO₄、PEG/MgSO₄、PEG/ポリアクリルアミドなどのATPSを適用した報告がある³⁾。例えば、8% PEG4000および15% 硫酸アンモニウムを用いたATPSによって、4.0 units/mgの活性を示すステムプロメラインおよび3.6 units/mgの活性を示すフルーツプロメラインが精製された³¹⁾。Ketnawaらは、パイナップル果皮からのプロメラインの精製において、様々な分子量のPEGと様々な種類および濃度の塩とを組み合わせた二相系を用いて検討し、18% PEG6000および17% MgSO₄による二相系を用いた場合に、最も高い精製倍率(3.44倍)と活性収率(206%)で得た^{32, 29)}。また、Novaesらは、PEG/ポリアクリルアミドの二相系を用いて、パイナップル廃棄部分から精製倍率25.78倍、活性収率335%でブ

ロメラインを精製した²⁶⁾。これらの実験においては、ブロメラインはPEG液相に分離された。PEGは細胞膜に作用するが、タンパク質（酵素）の活性には影響を与えず、むしろ酵素の活性部位を保護することにより、高収率で活性型酵素を得ることが可能になると考えられる^{5,28)}。

(B) 逆ミセル抽出 (Reversed micellar extraction : RMS)

逆ミセルは、ある種の界面活性剤を非極性溶媒中に溶解した際に、その親水基を内側に向けて自発的に形成される会合体であり、その内部に水相を保持し、親水性物質を可溶化することができる。逆ミセル抽出法 (RMS) は、タンパク質などの親水性分子を含む水相と逆ミセルを含む有機相を接触させることによって、目的物質を逆ミセル内に取り込む抽出分離法である。目的物質は、界面活性剤によって周囲の有機相から保護され、変性の少ない状態で分離できる³³⁾。また、低コストで、特別な動力を必要としないため省エネルギーであり、スケールアップがしやすい点も優れている³⁰⁾。

ブロメラインの抽出・精製においてもRMSの適用例が報告されている。Hebbarらは、陽イオン界面活性剤であるcetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (濃度150 mM) および0.1 M NaCl (pH8.0) によるRMS (10 mLの系) を用いて、パイナップル芯の抽出液から精製倍率5.2倍、活性収率106%でブロメラインを精製した³⁴⁾。この系をスケールアップし (5 Lの系)、4.5 kgのパイナップル芯から精製倍率2.43倍、活性収率81.3%でブロメラインが精製された³⁵⁾。さらに、RMSと限外ろ過を組み合わせることで、抽出・精製効率が向上し、パイナップル芯の抽出液から精製倍率5.9倍、活性収率95.8%でブロメラインが精製された³⁶⁾。Kumarらは、親和性に基づく逆ミセル抽出分離を適用し、ブロメラインのリガンドとなるconcanavalin A (ブロメラインの糖鎖に結合するレクチン) や界面活性剤の濃度、溶液のpH等を最適化し、パイナップル抽出液から精製倍率12.32倍、活性収率185.6%でブロメラインを精製した³⁷⁾。

(C) クロマトグラフィー

クロマトグラフィーはパイナップルからブロメラインを精製する際に広く用いられ、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどが用いられる¹²⁾。イオン交換クロマトグラフィーは、特異性が高く、スケールアップしやすいことが利点である³⁰⁾。ブロメラインの精製においては、陽イオン交換クロマトグラフィーとアフィニティークロマトグラフィー (Sephacryl-SB 4B) を組み合わせることで、共存する、類似性の高いアナニンと分離できた³⁸⁾。さらに、これらの2つのクロマトグラフィーにアセトンによる沈殿操作を加えることで精製度が向上した²⁵⁾。Costaらは、陽イオン交換クロマトグラフィ (CMセファロース) とゲルろ過クロマトグラフィー (Sephadex G-50) を組み合わせることで、16.9倍の精製倍率で、390.75 units/mgのブロメラインを精製した³⁹⁾。パイナップル茎の粗抽出液を陽イオン交換クロマトグラフィーに供し、続いて、その非吸着画分を陰イオン交換クロマトグラフィーに供することで、2種の酸性ブロメライン (フルーツブロメライン) が分離された⁴⁰⁾。また、高速向流クロマトグラフィー (High-speed Countercurrent Chromatography : HSCCC) とCTAB/イソオクタン-ヘキシルアルコールによる逆ミセル抽出を組み合わせることで、5.0 gの果実粗抽出物 (3.3 kg分の果実に相当) から3.0 gのフルーツブロメラインが精製された⁴¹⁾。市販品の“ステムブロメライン”には、ステムブロメラインの他、フルーツブロメライン、アナニン、およびコマサインの各々の多型 (アイソフォーム) が含まれている上に、システインプロテアーゼの触媒残基CysのSH基が

空気中の酸素などにより不可逆的な酸化を受けやすく、活性型プロテアーゼと不活性型プロテアーゼが混在している。Matagneらは、メトキシポリエチレングリコール-*o*-ピリジンジスルフィド (mPEG-OPSS) を用いて、SH基を特異的にPEG誘導体化した上で、陽イオン交換クロマトグラフィーと陰イオン交換クロマトグラフィーを組み合わせて、パイナップル茎に含まれる様々な多型および活性型・不活性型のシステインプロテアーゼを分離し、8種の活性型アイソフォーム、すなわち、3種の塩基性プロメライン (ステムプロメライン)、2種の酸性プロメライン (フルーツプロメライン)、2種のアナニン、および1種のコモサイン、を精製した⁸⁾。精製された各プロテアーゼは、詳細な酵素学的解析やX線結晶構造解析に供するのに十分な高純度なものであった^{8,18)}。

(D) 組換えタンパク質の生産

組換えDNA技術を用いて標的タンパク質をコードする遺伝子をベクター等に組み込み、これを導入した宿主で組換えタンパク質を発現させる方法も行われている。現在、組換えDNA技術により生産される酵素は、市場全体の約90%を占めている³⁰⁾。プロメラインについても、大腸菌BL21-AI^{42, 43)}、BL21-CodonPlus(DE3)⁴⁴⁾、BL21(DE3)pLysS⁴⁵⁾、および酵母*Pichia pastoris*¹⁷⁾による発現系が報告されている。大腸菌においてHis-tagを付加して発現された組換え型ステムプロメラインは、1段階の金属アフィニティークロマトグラフィーによって精製され、天然のプロメラインと同等のプロテアーゼ活性や抗菌活性を示した^{42, 45)}。また、酵母*Pichia pastoris*においてHis-tagを付加して発現された組換え型フルーツプロメラインは、1段階の金属アフィニティークロマトグラフィーによって精製され、天然のプロメラインに匹敵するプロテアーゼ活性を示した¹⁷⁾。

4. おわりに

最近では、プロメラインは、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の感染阻害活性を示すことが報告される^{4, 46, 47)} など、新たな利用可能性もある。不可食部の食品廃棄物からの酵素の抽出・精製は、環境負荷低減の観点およびコスト面で優れているが、高純度で得ようとする場合は、特殊な化学修飾を必要としたり、複数の精製手法を組み合わせるなど条件検討が必要である。一方、組換えタンパク質として得る方法は、単一の酵素を迅速に得るには適した方法であり、今後、ますます発展していくと考えられるが、産業利用する場合には大量生産に適した発現系の検討や大規模な培養装置など設備投資等が必要となる。本総説で紹介した抽出・精製法によって、産業用途に見合った純度、収率、コストで得られたプロメラインが、ますます活用されることを期待したい。合わせて、高純度のプロメラインを得ることによって、詳細な酵素学的解析や阻害剤等との立体構造解析がさらに行われ、構造機能相関解析が進展することを期待したい。また、これらの抽出・精製法がその他の酵素にも適用され、産業利用や構造機能相関解析に活用されることも期待される。

文献

- 1) Mamo, J., Assefa, F. (2019) Antibacterial and anticancer property of bromelain: A plant protease enzyme from pineapples (*Ananas comosus*). *Curr. Trends Biomed. Eng. Biosci.* 19, 60–68.
- 2) Tochi, B.N., Wang, Z., Xu, S.-Y., Zhang, W. (2008) Therapeutic application of pineapple protease (bromelain): A review. *Pak. J. Nutr.* 7, 513–520.
- 3) Jančić, U., Gorgieva, S. (2021) Bromelain and nisin: The natural antimicrobials with high potential in biomedicine. *Pharmaceutics* 14, 76.
- 4) Hikisz, P., Bernasinska-Slomczewska, J. (2021) Beneficial properties of bromelain. *Nutrients* 13, 4313.
- 5) Ramli, A.N.M., Aznan, T.N.T., Illias, R.M. (2017) Bromelain: From production to commercialisation. *J. Sci. Food Agric.* 97, 1386–1395.
- 6) Pavan, R., Jain, S., Shraddha, K.A. (2012) Properties and therapeutic application of bromelain: A review. *Biotechnol. Res. Int.* 2012, 976203.
- 7) Ramli, A.N.M., Manas, N.H.A., Hamid, A.A.A., Hamid, H.A., Illias, R.M. (2018) Comparative structural analysis of fruit and stem bromelain from *Ananas comosus*. *Food Chem.* 266, 183–191.
- 8) Matagne, A., Bolle, L., El Mahyaoui, R., Baeyens-Volant, D., Azarkan, M. (2017) The proteolytic system of pineapple stems revisited: Purification and characterization of multiple catalytically active forms. *Phytochemistry* 138, 29–51.
- 9) De Lencastre Novaes, L.C., Jozala, A.F., Lopes, A.M., de Carvalho Santos-Ebinuma, V., Mazzola, P.G., Pessoa Junior, A. (2016) Stability, purification, and applications of bromelain: A review. *Biotechnol. Prog.* 32, 5–13.
- 10) Arshad, Z.I.M., Amid, A., Yusof, F., Jaswir, I., Ahmad, K., Loke, S.P. (2014) Bromelain: An overview of industrial application and purification strategies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 7283–7297.
- 11) Manzoor, Z., Nawaz, A., Mukhtar, H., Haq, I. (2016) Bromelain: Methods of Extraction, Purification and Therapeutic Applications. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 59, 1–16.
- 12) Bala, M., Ismail, N.A., Mel, M., Jami, M.S., Mohd Salleh, H., Amid, A. (2012) Bromelain Production: Current Trends and Perspective. *Arch. Des Sci.* 65, 369–399.
- 13) Heinicke, R.M., Gortner, W.A. (1957) Stem bromelain—A new protease preparation from pineapple plants. *Econ. Bot.* 11, 225–234.
- 14) Upadhyay, A., Lama, J.P., Tawata, S. (2010) Utilization of pineapple waste: A review. *J. Food Sci. Technol. Nepal* 6, 10–18.
- 15) Awasthi, M.K., Azelee, N.I.W., Ramli, A.N.M., Rashid, S.A., Manas, N.H.A., Dailin, D.J., Illias, R.M., Rajagopal, R., Chang, S.W., Zhang, Z., Ravindran, B. (2022) Microbial biotechnology approaches for conversion of pineapple waste in to emerging source of healthy food for sustainable environment. *Int. J. Food Microbiol.* 373, 109714.
- 16) Zhou, W., Ye, C., Geng, L., Chen, G., Wang, X., Chen, W., Sa, R., Zhang, J., Zhang, X. (2021) Purification and characterization of bromelain from pineapple (*Ananas comosus* L.) peel waste. *J. Food Sci.* 86, 385–393.
- 17) Wang, W., Zhang, L., Guo, N., Zhang, X., Zhang, C., Sun, G., Xie, J. (2014) Functional Properties of a Cysteine Proteinase from Pineapple Fruit with Improved Resistance to Fungal Pathogens in

Arabidopsis thaliana. *Molecules* 19, 2374–2389.

- 18) Azarkan, M., Maquoi, E., Delbrassine, F., Herman, R., M'Rabet, N., Esposito, R.C., Charlier, P., Kerff, F. (2020) Structures of the free and inhibitors-bound forms of bromelain and ananain from *Ananas comosus* stem and in vitro study of their cytotoxicity. *Sci. Rep.* 10, 19570.
- 19) Liu, J., Sharma, A., Niewiara, M.J., Singh, R., Ming, R., Yu, Q. (2018) Papain-like cysteine proteases in *Carica papaya*: lineage-specific gene duplication and expansion. *BMC Genomics* 19, 26.
- 20) Zhai, Y., Cui, Y., Song, M., Vainstein, A., Chen, S., Ma, H. (2021) Papain-Like Cysteine Protease Gene Family in Fig (*Ficus carica* L.): Genome-Wide Analysis and Expression Patterns. *Front Plant Sci.* 12, 681801.
- 21) Napper, A.D., Bennett, S.P., Borowski, M., Holdridge, M.B., Leonard, M.J., Rogers, E.E., Duan, Y., Laursen, R.A., Reinhold, B., Shames, S.L. (1994) Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain. *Biochem. J.* 301, 727–735.
- 22) Gautam, S.S., Mishra, S.K., Dash, V., Goyal, A.K., Rath, G. (2010) Comparative study of extraction, purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant. *Thai J. Pharm. Sci.* 34, 67–76.
- 23) Drenth, J., Kalk, K.H., Swen, H.M. (1976) Binding of chloromethyl ketone substrate analogues to crystalline papain. *Biochemistry* 15, 3731–3738.
- 24) Gilles, A. M., De Wolf, A., Keil, B. (1983) Amino-acid sequences of the active-site sulfhydryl peptide and other thiol peptides from the cysteine proteinase alpha-clostripain. *Eur. J. Biochem.* 130, 473-479.
- 25) Rowan, A.D., Buttle, D.J., Barrett, A.J. (1990) The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochem. J.* 266, 869-875.
- 26) Novaes, L.C., Ebinuma, V., Mazzola, P.G., Pessoa, A. Jr (2013) Polymer-based alternative method to extract bromelain from pineapple peel waste. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 60, 527–535.
- 27) Khan, R.H., Rasheedi, S., Haq, S.K. (2003) Effect of pH, temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. *J. Biosci.* 28, 709–714.
- 28) Chakraborty, A. J., Mitra, S., Tallei, T. E., Tareq, A. M., Nainu, F., Cicia, D., Dhama, K., Emran, T. B., Simal-Gandara, J., Capasso, R. (2021) Bromelain a Potential Bioactive Compound: A Comprehensive Overview from a Pharmacological Perspective. *Life* 11, 317.
- 29) Ketnawa, S., Chaiwut, P., Rawdkuen, S. (2011) Aqueous two-phase extraction of bromelain from pineapple peels ('Phu Lae' cultiv.) and its biochemical properties. *Food Sci. Biotechnol.* 20, 1219–1226.
- 30) Colletti, A., Li, S., Marengo, M., Adinolfi, S., Cravotto, G. (2021) Recent Advances and Insights into Bromelain Processing, Pharmacokinetics and Therapeutic Uses. *Appl. Sci.* 11, 8428.
- 31) Sankaran, K., Vadasundari, V., Hemavathy, R.V. (2011) A comparative study on determining the efficacy of salt precipitation and biphasic system in the extraction of bromelain from *Ananas comosus*. *Asian J. Sci. Technol.* 2, 16–22.
- 32) Ketnawa, S., Sai-Ut, S., Theppakorn, T., Chaiwut, P., Rawdkuen, S. (2009) Partitioning of bromelain from pineapple peel (*Nang Lae* cultiv.) by aqueous two phase system. *Asian J. Food Agro-Ind.* 2, 457–468.

- 33) 西機 忠昭 (2000) 逆ミセルにおける物質移動現象. 膜 25, 11-16.
- 34) Hebbar, H.U., Sumana, B., Raghavarao, K.S.M.S. (2008) Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. *Bioresource Technol.* 9, 4896–4902.
- 35) Hebbar, H.U., Hemavathi, A.B., Sumana, B., Raghavarao, K.S.M.S. (2011) Reverse micellar extraction of bromelain from pineapple (*Ananas comosus* L. merry) waste: scale-up, reverse micelles characterization and mass transfer studies. *Sep. Sci. & Tech.* 46, 1656-1664.
- 36) Hebbar, U.H., Sumana, B., Hemavathi, A.B., Raghavarao K.S.M.S. (2012) Separation and Purification of Bromelain by Reverse Micellar Extraction Coupled Ultrafiltration and Comparative Studies with Other Methods. *Food Bioprocess Technol.* 5, 1010–1018.
- 37) Kumar, S., Hemavathi, A.B., Hebbar, H.U. (2011) Affinity based reverse micellar extraction and purification of bromelain from pineapple (*Ananas comosus* L. Merry) waste. *Process Biochem.* 46, 1216–1220.
- 38) Rowan, A.D., Buttle, D.J., Barrett, A. (1988) Ananain: A novel cysteine proteinase found in pineapple stem. *Arch. Biochem. Biophys.* 267, 262–270.
- 39) Costa, H.B., Fernandes, P.M., Romao, W., Ventura, J.A. (2014) A new procedure based on column chromatography to purify bromelain by ion exchange plus gel filtration chromatographies. *Ind. Crop. Prod.* 59, 163–168.
- 40) Harrach, T., Eckert, K., Maurer, H. R., Machleidt, I., Machleidt, W., Nuck, R. (1998) Isolation and characterization of two forms of an acidic bromelain stem proteinase. *J. Protein Chem.* 17, 351–361.
- 41) Yin, L., Sun, C.K. Han, X., Xu, L., Xu, Y., Qi, Y., Peng, J. (2011) Preparative purification of bromelain (EC 3.4.22.33) from pineapple fruit by high-speed counter-current chromatography using a reverse-micelle solvent system. *Food Chem.* 129, 925–932.
- 42) Amid, A., Ismail, N.A., Yusof, F., Mohd-Salleh, H. (2011) Expression, purification, and characterization of a recombinant stem bromelain from *Ananas comosus*. *Process Biochem.* 46, 2232–2239.
- 43) Arshad, Z.I.M., Amid, A., Othman, M.E.F. (2015) Comparison of different cell disruption methods and cell extractant buffers for recombinant bromelain expressed in *E. coli* BL21-AI. *J. Teknol.* 77, 83–87.
- 44) Razali, R., Budiman, C., Kamaruzaman, K.A., Subbiah, V.K. (2021) Soluble Expression and Catalytic Properties of Codon-Optimized Recombinant Bromelain from MD2 Pineapple in *Escherichia coli*. *Protein J.* 40, 406–418.
- 45) George, S., Bhasker, S., Madhav, H., Nair, A., Chinnamma, M. (2014) Functional characterization of recombinant bromelain of *Ananas comosus* expressed in a prokaryotic system. *Mol. Biotechnol.* 56, 166-174.
- 46) Sagar, S., Rathinavel, A.K., Lutz, W.E., Struble, L.R., Khurana, S., Schnaubelt, A.T., Mishra, N.K., Guda, C., Palermo, N.Y., Broadhurst, M.J., Hoffmann, T., Bayles, K.W., Reid, S., Borgstahl, G., Radhakrishnan, P. (2021) Bromelain inhibits SARS-CoV-2 infection via targeting ACE-2, TMPRSS2, and spike protein. *Clin. Transl. Med.* 11, e281.
- 47) Tallei, T.E., Fatimawali, A.Y., Idroes, R., Kusumawaty, D., Emran, T.B., Yesiloglu, T.Z., Sippl, W.,

Mahmud, S., Alqahtani, T., Alqahtani, A.M., Asiri, S., Rahmatullah, M., Jahan, R., Khan, M. A., Celik, I. (2021) An Analysis Based on Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation Study of Bromelain as Anti-SARS-CoV-2 Variants. *Front. Pharmacol.* 12, 717757.