

한국산 파인애플에서 분리한 bromelain의 정제와 특성

최 청 · 손규목* · 조영제 · 천성숙 · 임성일 · 석영란

영남대학교 식품가공학과, *창원전문대학 식품영양학과

초록 : 한국산 파인애플로부터 bromelain을 추출하여 황산암모늄염석, DEAE-cellulose ion-exchange chromatography, gel filtration을 이용하여 약 21배 정제하였고, 정제효소는 전기영동상 단일밴드를 나타내었으며, 분자량은 약 22,000이었다. 정제된 bromelain은 glycine과 serine이 가장 많이 함유되어 있었으며 최적작용 pH와 온도는 6.0, 60 °C였다. pH 5~7, 50 °C 이하에서 안정성을 보였으며 Mn^{2+} 에 의해 활성이 촉진되었고, Mg^{2+} , Fe^{2+} 등의 금속이온에 의해 급격한 활성저해가 관찰되었다. 정제효소는 p-chloromercuribenzoic acid에 의해 저해되어 SH효소로 추측되었으며, Km과 Vmax값은 각각 $5.747 \times 10^{-4} M$, 131.58 $\mu g/min$ 이었다. 돈육 조직에 효소를 처리하였을 때 효소 농도가 증가함에 따라 육단백질이 가수분해되어 유리되는 수용성 질소량과 아미노태 질소량이 증가되어 연육효과가 있음이 확인되었다(1991년 12월 23일 접수, 1992년 2월 6일 수리).

단백질 및 펩티드를 가수분해시키는 protease는 물리, 화학적인 가수분해에 비해 부가반응이 없고 촉매 활성이 크기 때문에 에너지 소모가 적고 가공후에 제거할 필요가 없어 현대산업사회가 발달함에 따라 각종 효소의 이용도가 급격히 증가하고 있다. 특히 protease는 조미료 제조, 식육의 연화, 맥주, 청주의 혼탁방지, 치즈 숙성 등¹⁻⁴⁾의 식품공업과 소화제, 소염진통제 등 제약공업, 피혁공업, 세제산업 등⁵⁻¹⁰⁾ 여러분야에 걸쳐 이용되고 있는 효소이다. 식품공업에 이용되는 식물기원 protease에 대해서는 papaya과실에 존재하는 papain,^{12,11-14)} 무화과 유액에서 추출한 ficin,¹⁵⁻²⁰⁾ 키위,²¹⁻²⁷⁾ 능이,^{28,29)} 생강³⁰⁾ 및 매론³¹⁾에서 분리한 protease 등의 효소학적 특성에 관한 많은 연구가 보고된 바 있다. 파인애플에서 분리한 bromelain은 Chittenden³²⁾이 처음 발견한 이래 Inagami와 Murachi³³⁾에 의하여 그 효소학적인 특성이 보고되었다. Lowe³⁴⁾는 bromelain의 아미노산 배열과 기능에 관하여, Kang 등^{4,11)}은 bromelain 처리에 의한 우육·근육단백질의 용해율에 대하여 보고한 바 있다. 맥주공업에서 뿐만 아니라 연육소에 사용되는 과정에서 고기에 효소를 처리한 후 요리할 때 60~70 °C의 온도에서 효소에 의한 연육과정이 이루어져야 하므로 열에 안정한 효소가 요구되고 있다. 이러한 관찰에서 볼 때 파인애플에서 분리한 bromelain의 열안정성은 매우 중요한 의미를 가지며, 이에 관한 연구들이 많이 진행되어 왔

나,³⁵⁻³⁸⁾ 한국산 파인애플로부터 분리한 단백질 분해효소에 관한 연구보고는 없는 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 한국산 파인애플로부터 단백질 분해효소인 bromelain을 분리, 정제하여 그 생화학적 특성과 이 효소에 의한 연육효과에 관하여 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시재료

제주도산 파인애플(*Ananas comosus*, L.)을 1991년 3월에 구입하여 상온에서 일주일간 후숙시킨 후 공시재료로 사용하였다.

조효소의 조제

파인애플의 껍질을 박피하고 줄기를 제거한 후 과육을 waring blender로 갈고 약 5배의 0.2 M phosphate buffer (pH 6.0)를 가하여 효소단백을 용출시킨 후 원심분리하여 상정액을 취하고 70% 포화황산암모늄을 가하여 효소단백을 응집, 침전시키고 원심분리로 수거하여 조효소로 사용하였다.

효소의 정제

Protease의 정제는 조효소를 0.2 M phosphate buffer

Key words : Bromelain, pineapple, proteolytic enzyme
Corresponding author : C. Choi

(pH 6.0)로 투석한 다음 저온실에서 DEAE-cellulose column(3×50 cm)을 사용하여 0~1 M NaCl linear gradient로 0.65 ml/min의 유속으로 7 ml/tube씩 용출하였고 활성분획은 다시 Sephadex G-150 column(2×60 cm)으로 0.5 ml/min의 유속으로 5 ml/tube씩 용출하였다(Fig. 1).

효소활성 측정

효소활성 측정은 Anson-Hakihara 변법^{39,40)}을 이용하여 측정하였으며, 이 때 효소활성단위는 효소액 1 ml가 1 분간에 생성하는 tyrosine의 μg 으로 정하였다.

단백질 정량

Lowry 등⁴¹⁾의 방법에 따라 bovine-serum albumin을 표준단백질로 사용하여 단백질량을 측정하였다.

Polyarylamide gel electrophoresis

Davis 법⁴²⁾에 의해 7.5% polyacrylamide gel로써 tube당 3 mA로 실온에서 약 4시간동안 수행하였다. 전

기영동 후 gel은 1% amido black 10-B로서 염색하였고 7% acetic acid로 탈색하였다.

분자량 측정

정제 protease의 분자량은 Weber와 Osborn의 방법⁴³⁾에 따라 sodium dodesyl sulfate(SDS)-polyarylamide gel electrophoresis로 측정하였으며, 1% SDS, 1% 2-mercaptoethanol을 함유한 0.01 M phosphate buffer로 용해하여 37℃에서 3시간 동안 영동시켰다. 영동시킨 후 Rm 값에 따라 표준곡선을 이용하여 분자량을 측정하였으며, 이 때 표준품으로 bovine serum albumin(66000), egg albumin(45000), pepsin(370000), trypsinogen(24000), β -lactoglobulin, lysozyme(14300) 등을 사용하였다.

아미노산 분석

아미노산 조성은 산 가수분해법에 따라 측정하였다. 시료에 6N-HCl 용액을 가하고 질소가스를 충전, 밀봉하여 105℃에서 20시간 가수분해한 다음 감압 농축하여 HCl을 제거하고 아미노산자동분석기로 분석하였다.

Bromelain 첨가에 의한 육질의 연화효과

효소처리육의 조제시 효소액의 농도는 돈육중량의 0.01~1.0% 까지로 하였다. 효소의 용매로서는 10% Na₂CO₃로 pH를 조절한 pH 7.0의 증류수를 사용하였으며, Pot에 정형한 육 500g을 넣고 이것에 500g의 효소액(처리구) 또는 증류수(대조구)를 추가한 후 실온에서 60분간 보존하였다. 이 사이에 육의 앞뒤 부분을 fork로 2회씩 자극하였다. 소정시간 후 처리구와 대조구의 육을 흐르는 물에서 충분히 세척하고 건조된 가제를 이용하여 물을 제거하고 2 mm plate chopper에서 2회 통하고 다시 칼로 잘 다진뒤 윤과 양 등의 방법⁴⁴⁾에 따라 질소 분석을 통하여 효소처리효과를 판정하였다.

결과 및 고찰

Bromelain의 정제

파인애플에서 얻은 조효소를 0.2 M phosphate buffer (pH 6.0)로 24시간 투석하여 농축하였다. 이 때 21.9%의 불순단백질이 제거되었고 효소의 비활성역가(효소단백 mg당 unit)는 44.48 unit/mg 이었으며, 농축된 효소단백을 DEAE-cellulose column을 이용한 ion-exchange chromatography한 결과 Fig. 2와 같이 5개의 fraction이 분획되었고 약 0.37 M NaCl에서 활성단백이 용출되었다. 이 때 효소의 비활성역가는 222.27 unit/mg 이었고 수

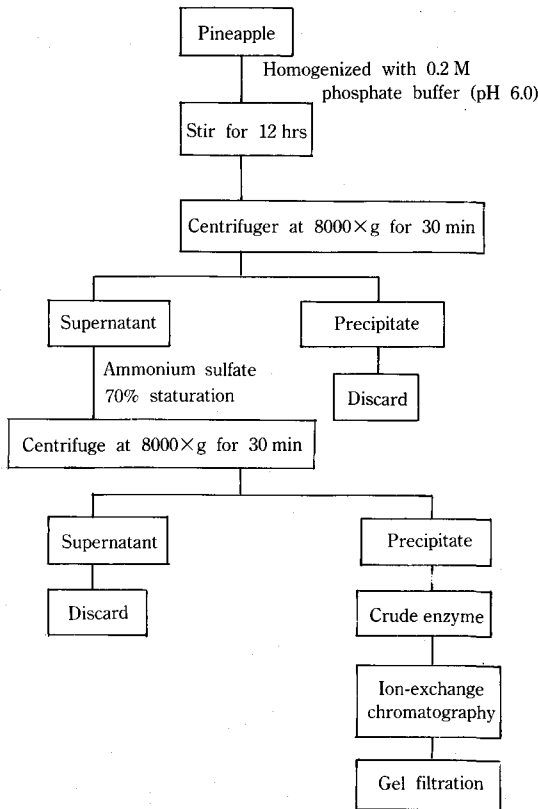


Fig. 1. Procedure of purification of bromelain from Korean pineapple.

율은 42.37% 이었다. 활성분획은 Sephadex G-150 column으로 gel filtration한 결과 Fig. 3과 같이 2개의 단백질 peak가 나타났으며 이중 18~30번 분획에서 효소 활성이 나타났고 분리된 활성분획은 모아서 농축한 뒤 동결건조하였다. 이때 수율은 37.19%였고 정제도는 21.15 배, 비활성역가는 335.23 unit/mg으로 정제되었다(Table 1). 이는 Siver stein과 Kezdy³⁸⁾가 pineapple로부터 bromelain을 14.2배 정제하였다고 보고한 것보다는 높았다.

Polyacrylamide gel electrophoresis

효소의 정제 여부를 판단하기 위해 Davis 법⁴²⁾에 따라

7.5% polyacryl amide gel로써 전기영동을 한 결과 Fig. 4 에서와 같이 단일밴드를 나타내었다.

분자량 측정

정제된 효소는 Weber와 Osborn의 방법⁴³⁾에 따라 전기영동을 실시한 결과 Fig. 5에서와 같이 분자량이 약 22,000 정도로 측정되었다. Ota 등⁴⁵⁾이 보고한 Hawaiian pineapple의 줄기나 열매로부터 분리한 bromelain의 분자량이 35,000, Murachi 등⁴⁶⁾이 보고한 33,000보다 분자량이 적었다. 이러한 결과는 품종간의 차이가 있는 것으로 생각된다.

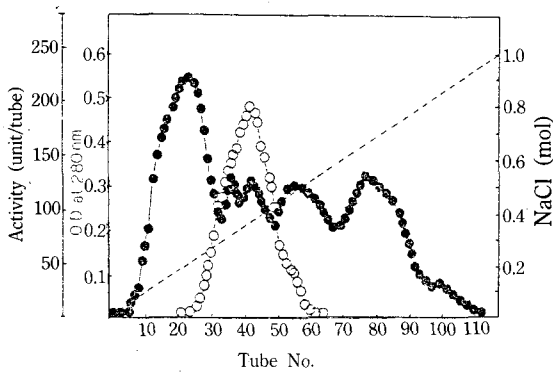


Fig. 2. DEAE-cellulose column chromatography of bromelain from Korean pineapple.

●—● : Protein, ○—○ : Activity

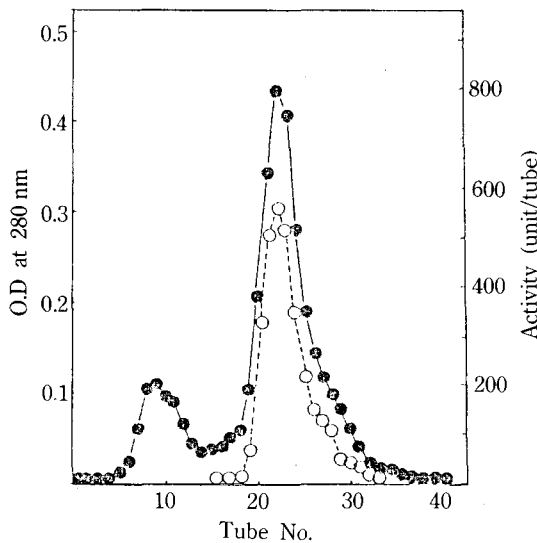


Fig. 3. Sephadex G-150g gelfiltration of bromelain from Korean pineapple.

●—● : Protein, ○—○ : Activity

Table 1. Purification procedure of bromelain from Korean pineapple

	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude enzyme solution	525.00	8320.00	15.85	100.00	1.00
Ammonium sulfate precipitate	95.26	4935.28	44.48	59.32	2.81
DEAE-cellulose	15.86	3525.20	222.27	42.37	14.02
Sephadex G-150	9.23	3094.17	335.23	37.19	21.15

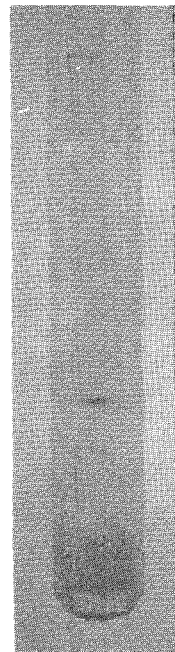


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoresis of purified bromelain from Korean pineapple.

효소학적 성질

1) pH의 영향

한국산 파인애플의 bromelain의 활성 및 안정성에 미치는 pH의 영향을 검토한 결과는 Fig. 6과 같으며 최적 pH는 6.0 이었고, 안정범위는 pH 4~7의 범위에서 안정하였다. 이는 Balls 등⁴⁷⁾이 bromelain의 최적 pH가 6 부근이고 pH 2~3의 강산성에서는 실패한다는 보고와 유사하였으나 pH의 안정범위는 6~7에 비하여 더 컸다.

2) 온도의 영향

본 효소의 활성 및 안정성에 미치는 온도의 영향을 Fig. 7과 같으며 최적작용온도는 60 °C이었고 50 °C에서는

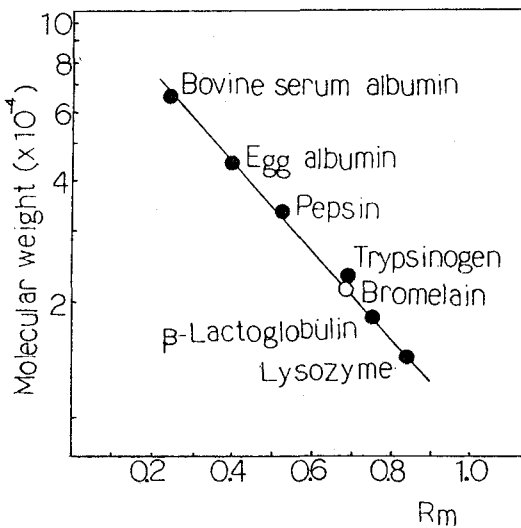


Fig. 5. The calibration curve for the determination of molecular weight of bromelain by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

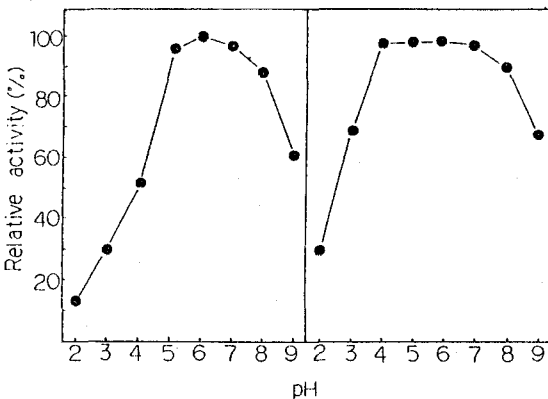


Fig. 6. Effect of pH on the activity of bromelain from Korean pineapple.

활성감소가 거의 없었으나 70 °C에서 60분간 열처리시 약 60%가량 실패되었다. 이 같은 결과는 Greenberg와 Winnick⁴⁸⁾가 보고한 결과와 유사하였다.

3) 금속이온의 영향

효소활성에 미치는 각종 금속이온의 영향을 검토한 결과는 Table 2와 같이 Mn²⁺ 이온에 의해 132.9%로 가장 많은 활성촉진이 발생하였으며 Zn²⁺, Fe²⁺에 의하여 가장 많은 저해가 관찰되었다.

4) 저해제

효소활성에 영향을 미치는 화학적 저해제 중 금속과 결합하여 chelate를 형성하는 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), 효소분자의 활성에 SH기가 존재하여 이를 저해하는 p-chloromercuribenzoic acid(PCMB), 말단아

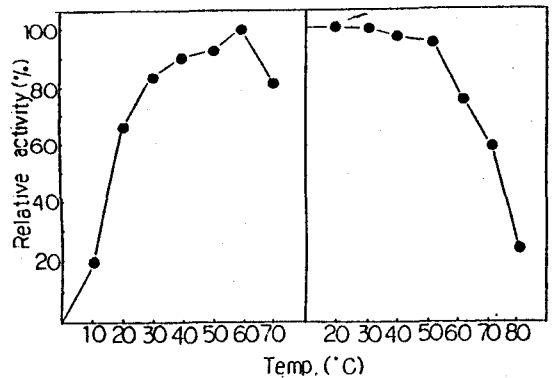


Fig. 7. Effect of temperature on the activity of bromelain from Korean pineapple.

Table 2. Effect of metal ions on the activity of bromelain from Korean pineapple

Ion	Metal	Relative activity(%)
Mn ⁺⁺	MnSO ₄ · H ₂ O	132.96
Na ⁺	Na ₂ SO ₄	104.55
Mg ⁺⁺	MgSO ₄ · 7H ₂ O	101.14
Ca ⁺⁺	CaCO ₃	96.59
Ba ⁺⁺	BaCl ₂ · 2H ₂ O	93.75
K ⁺	K ₂ SO ₄	88.07
Pb ⁺⁺	Pb(CH ₃ COO) ₂	54.55
Cu ⁺⁺	CuSO ₄ · 5H ₂ O	24.43
Hg ⁺⁺	HgCl ₂	15.91
Zn ⁺⁺	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	9.43
Fe ⁺⁺	FeSO ₄	2.27
	None	100.00

The reaction mixture, consisted of 0.5 ml enzyme solution and 0.5 ml ion solution(2×10⁻² M), was incubated at 30 °C for 1 hr and the residual activities were assayed.

미노기와 친화력이 강하여 이 말단아미노산이 활성부위인 경우 효소활성을 저해하는 2,4-dinitrophenol(DNP), protease의 경쟁적 저해제로서 작용하는 ϵ -aminocaproic acid(ACA)를 선정하여 10 mM의 농도로 작용시켜 효소활성을 측정된 결과 PCMB에 의해 강한 저해효과가 관찰되었으며 0.1 mM 정도에서 거의 90% 가량의 저해 효과가 있었다. 일반적으로 bromelain은 SH 효소로 알려져 있으며 본 실험에서도 이와 유사한 결과를 얻었다 (Table 3, 4).

5) Km값

본 효소의 기질에 대한 친화력을 살펴보기 위하여 Lineweaver-Burk plot로 Km값을 측정된 결과 Fig. 8에서와 같이 Km값은 5.747×10^{-4} M, Vmax는 131.58 $\mu\text{g}/\text{min}$ 이었다.

아미노산 분석

정제한 효소단백질의 아미노산 조성은 Table 5에서와 같이 glycine과 glutamic acid, aspartic acid가 가장 많이 함유되어 있고 histidine과 methionin이 가장 적게 함유

Table 3. Effect of various inhibitors on the activity of bromelain from Korean pineapple

Inhibitor	Relative activity(%)
Control	100.00
p-Chloromercuri benzoic acid	2.12
2,4-Dinitrophenol	92.16
Aminocaproic acid	99.18
Ethylenediamine tetraacetic acid	102.12

The reaction mixture, consisted of 0.5 ml enzyme solution and 0.5 ml inhibitor solution(2×10^{-2} M), was incubated at 30 °C for 1 hr and the residual activities were assayed.

Table 4. Effect of PCM concentration on the activity of bromelain from Korean pineapple

Concentration(mM)	Relative activity(%)
Control	100.00
0.01	73.68
0.10	9.05
1.00	7.07
10.00	1.81

The reaction mixture, consisted of 0.5 ml enzyme solution and 0.5 ml inhibitor solution(2×10^{-2} M), was incubated at 30 °C for 1 hr and the residual activities were assayed.

되어 있었다. 이같은 결과는 Ota 등⁴⁵⁾이 bromelain 단백질이 glycine과 asparic acid가 많이 함유되어 있다고 보고한 것과 유사하였다.

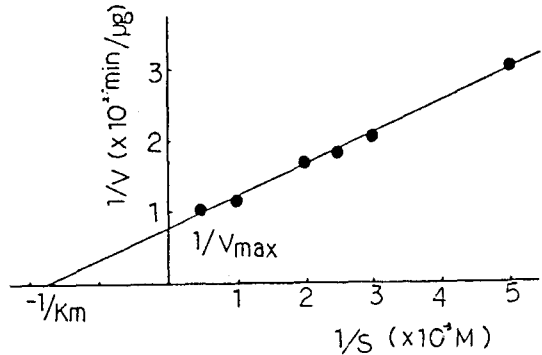


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot for the hydrolysis of Hammarsten milk casein by the purified enzyme.

Table 5. Amino acid composition of bromelain from Korean pineapple

Amino acid	Content(mg/g)
Lysine	29.29
Histidine	4.54
Arginine	31.76
Aspartic acid	108.35
Threonine	49.22
Serine	109.99
Glutamic acid	84.42
Alanine	87.17
Cystine	34.37
Valine	70.26
Methionine	18.97
Isoleucine	59.40
Leucine	35.75
Tyrosine	70.40
Phenylalanine	27.50
Proline	39.87
Glycine	117.28

Table 6. Effect if enzyme concentration on the amounts of soluble amino acid nitrogen

Enzyme concentration (%)	Soluble nitrogen (mg/meat g)	Amino acid nitrogen (mg/meat g)
Control	2.26	0.21
0.01	3.25	0.40
0.05	3.33	0.41
0.10	3.38	0.58
0.50	3.54	0.59
1.00	5.27	0.84

Bromelain의 처리가 육질에 미치는 영향

Table 6에 표시한 바와 같이 수용성 질소, amino태 질소는 bromelain의 농도가 높아짐에 따라 증가하는 경향을 보였다. 이것은 bromelain의 처리에 의하여 근육의 구성 단백질이 분해되어 용해성이 높아지는 것으로 생각되며 또한 아미노태 질소가 증가하는 것은 많은 peptide 결합이 가수분해되는 것으로 생각된다. 이러한 결과는 윤과 양⁴⁴⁾의 panain농도가 높아질수록 연육효과가 증가한다는 보고와 유사하였다.

참 고 문 헌

1. Jansen, F.F. and Balls, A.K. : J. Biol. Chem., 137 : 459(1941)
2. Cayle, T. and Lopez-Ramos, B. : Wallerstein Lab. Comm., 27 : 87(1964)
3. Monsan, P., Duteurtre, B. M. and Durand, G. : J. Food Sci., 43 : 424(1978)
4. Kang, C.K. and Rice, E.E. : J. Food Sci., 35 : 563 (1970)
5. Nikadai, T., Nasuno, S. and Iguchi, N. : Agric. Biol. Chem., 32 : 261(1977)
6. Impoolsup, A., Bhumiratana, A. and Fle, T. : Appl. Environ. Microbiol., 42 : 619(1982)
7. Tasuziro, I. : Academic Press, New York., p. 3 (1978)
8. Kageyama, K. : J. Ferment. Technol., 33 : 53(1955)
9. Nunokawa, Y., Namba, Y. and Watanabe, S. : J. Soc. Brew., 56 : 930(1961)
10. Masaaki, Y.S. and Mitsuno, M. : Agr. Biol. Chem., 48 : 1637(1984)
11. Kang, C.K. and Warner, W.D. : J. Food Sci., 39 : 812 (1974)
12. Ebata, M. and Yasunobu, K.T. : J. Food Sci., 237 : 1086(1962)
13. 박관화, 김재욱, 신재두, 노봉수 : 한국식품과학회지, 11 : 171(1979)
14. 노봉수, 박관화 : 한국식품과학회지, 12 : 219(1980)
15. Paul, T.E., King, T.P., Craig, L.C. and Walti, A. : Biochemistry, 7 : 163(1968)
16. Sugiura, M. and Sasaki, M. : 藥學雜誌, 93 : 63 (1973)
17. Sugiura, M. and Sasaki, M. : 藥學雜誌, 93 : 338 (1973)
18. Williams, D.C., Sgarbieri, V.C. and Whitaker, J.R. : Plant Physiol, 43 : 1083(1968)
19. Jones, I.K. and Glazer, A.N. : J. Biol. Chem., 245 : 2765(1970)
20. 김준평, 서재언, 김정숙 : 한국식품과학회지, 18 : 270 (1976)
21. Carne, A. and Morre, C.H. : Biochem. J., 173 : 73 (1978)
22. Harris, S. and Macdonald, B. : N. Z. J. Sci., 18 : 307 (1975)
23. Baker, E.N. : J. Mol. Biol., 115 : 263(1977)
24. Matsumoto, S., Obara, T. and Luh, B.S. : J. Food Sci., 48 : 607(1983)
25. Luh, B.S. and Wang, Z. : Advances in Food Research, 29 : 279(1984)
26. 김복자 : 한국식품과학회지, 21 : 569(1989)
27. Soda, I., Kaneko, K. Sato, T. and Nakagawa, H. : Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 34 : 36(1987)
28. 임봉래, 유관성, 김미경, 류재수, 손희숙, 이태규 : 한국영양식량학회지, 20 : 35(1991)
29. 이태규 : 한국영양식량학회지, 15 : 276(1986)
30. 최양문, 양한철 : 식품과학회지, 22 : 99(1989)
31. Kaneda, M. and Tominaga, N. : Agric. Biol. Chem., 51 : 489(1987)
32. Chittenden, R.H. : Trans. Conn. Acad. Sci., 8 : 281 (1982)
33. Inagami, T. and Murachi, T. : Biochemistry, 2 : 14 39(1963)
34. Lowe, G. : Tetrahedron, 32 : 291(1976)
35. Ota, S. Moore, C. and Stein, W.H. : Biochemistry, 3 : 180(1964)
36. Sococca, J. and Lee, Y.N. : J. Biol. Chem., 224 : 180 (1964)
37. Silverstein, R.M. : Anal. Biochem., 62 : 478(1974)
38. Silverstein, R.M. and Kezdy, F.J. : Arch. Biochem. Biophys., 167 : 678(1975)
39. Anson, M.L. : J. Physiol., 22 : 79(1938)
40. 秋原西郎 : 酵素研究法, Vol. II(朝昌書店, 東京), 1-7 : 237(1956)
41. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : J. Biol. Chem., 193 : 265(1951)
42. Davis, B.J. : Ann. New York Acad. Sci., 121 : 404 (1964)
43. Weber, K. and Osborn, M. : J. Biol. Chem., 244 : 6, 4406(1969)
44. 윤정의, 양용 : 한국식품과학회지, 6 : 163(1974)
45. Ota, S., Moore, S. and Stein, W.H. : Biochemistry, 3 : 180(1961)
46. Murachi, T., Yasui, M. and Yasuda, Y. : Biochemistry, 3 : 48(1964)
47. Balls, A.K., Thompson, R.R. and Kies, M.W. : Ind. Eng. Chem., 33 : 950(1941)
48. Greeberg, D.M. and Winnick, T. : J. Biol. Chem., 135 : 7G1(1940)

Purification and characteristics of bromelain from Korean pineapple

Cheong Choi, Gyu-Mok Son*, Young-Je Cho, Sung-Sook Chun, Sung-Il Lim and Yeoung-Ran Seok(Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Gyongsan 713-800, Korea, *Department of Food and Nutrition, Changwon Junior College, Changwon 641-210, Korea)

Abstract : Bromelain was purified from Korean pineapple, *Ananas comosus*, L. The enzyme was purified about 21 fold by DEAE-cellulose ion-exchange chromatography and gel filtration on Sephadex G-150. Purified enzyme was confirmed as active single band by polyacrylamide electrophoresis and the molecular weight was estimated to be about 22,000 by SDS-PAGE. The optimum pH and temperature were 6.0 and 60 °C, respectively. The range of its stability to the pH and temperature were respectively 5.0 to 7.0 and below 50 °C. It was found that Mn^{2+} increased the enzyme activity, whereas Mg^{2+} and Fe^{2+} decreased it abruptly. The purified enzyme was inhibited by p-chloromercuribenzoic acid, indicating that reactive SH groups are required for the enzyme activity. The reaction of the enzyme followed typical Michaelis-Menten kinetics with K_m value of 5.747×10^{-4} M and V_{max} of 131.58 $\mu g/min$ for casein. When meat was treated with the enzyme, free soluble nitrogen and amino acid nitrogen increased as enzyme concentration increased.