

딸기 β -Galactosidase의 정제 및 생화학적 특성

이광희 · 윤경영* · 김광수* · 김남우** · 신승렬***
대구과학대학 식품영양과, *영남대학교 식품영양학과,
경산대학교 자연과학부, *경산대학교 생명자원공학부

Purification and Characteristics of β -Galactosidase from Strawberry

Kwang-Hee Lee, Kyung-Young Yoon*, Kwang-Soo Kim*, Nam-Woo Kim** and Seung-Ryeul Shin***

Department of Food and Nutrition, Taegu Science College
*Department of Food and Nutrition, Yeungnam University
**Faculty of Natural Science, Kyongsan University
***Faculty of Life Resources Engineering, Kyongsan University

Abstract

β -Galactosidase was extracted and purified from strawberry. The purified β -galactosidase from strawberry was investigated their physicochemical characteristics. β -Galactosidase was purified 25.74 fold from strawberry. The purification procedure include ammonium sulfate fraction, acetone powder treatment and gel and ion exchange chromatography. Yield of the enzyme purification was 18.11%. The purified enzyme has native molecular weight of 116,000 dalton. Vmax value and Km value of β -galactosidase were 0.077 mM ONPG/ml/15min and 1.75×10^{-2} mM, respectively. The optimum temperature and pH of β -galactosidase were 43°C and pH 4.0, respectively. The β -galactosidase activity was stable below 50°C and at pH 4.0 to pH 6.0. Among the metal ions Ca and Mg were did not affect, whereas K, Cu and Zn show a little effect on the enzyme activity. The β -galactosidase activities were inhibited by treatment with EDTA and SDS.

Key words : β -galactosidase, strawberry, ripening, galactose

서 론

과실의 성숙과 저장중에 나타나는 연화현상은 세포벽성분의 변화 및 분해와 더불어 발생하며 과실의 상품으로서의 품질에 많은 영향을 미치게 된다. 연화와 관련한 세포벽분해효소에는 polygalacturonase(PG), β -galactosidase, pectinmethylsterase(PME), cellulase, glycosidase 등이 있으며 과실의 종류나 품종에 따라 연화중 관련

효소의 활성변화에 차이가 있다(1). α -, β -Galactosidase, mannanase, xylanase, β -1,3-gluconase 등은 glycosidase에 속하며 그 중 β -galactosidase는 pectin이나 hemicellulose의 측쇄결합인 β -1,4 galactan이나 arabinogalactan을 분해하여 세포벽의 galactose를 유리시켜 연화를 촉진하는 효소로서, 성숙과 연화중에 그 활성이 증가한다(2~5). Wallner와 Bloom(6)은 토마토의 성숙중에 세포벽의 분해는 glycosidase에 의해 일어나며, 이들 효소는 성숙에 활성이 증가한다고 하였고, Bartley(7)는 β -galactosidase는 과실의 pectin의 측쇄결합인 galactan을 분해하여 galactose를 유리시키며, *in vitro* 실험에서도 사과와 조식을 연화시킨다고 보고하였다. 한편 Gross와 Wallner(8)는 토마토 성숙중에 β -galactosidase의 활성은 증가하지만 *in vitro*

Corresponding author : Kwang-Soo Kim, Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyongsan, Kyungpook, 712-749, Korea
E-mail : Kwang@yu.ac.kr

실험에서 세포벽의 용해현상이 일어나지 않으며 β -galactosidase는 pectin질의 축쇄결합인 galactan을 분해한다고 보고하였다. 연화중 사과나 딸기, 토마토 등의 세포벽에서 많은 양의 galactose가 손실됨은 β -galactosidase의 작용일 것이라는 보고도 있다(9,10). Pessey(11)는 완숙 토마토에서 3종의 β -galactosidase isoenzyme을 분리하였고, Kang 등(12)은 감으로부터 분자량 34,000, 44,000 dalton인 β -galactosidase을 분리하였다. β -Galactosidase는 pectin에서 galactose를 유리시킴으로써 과일의 연화를 촉진하는 것으로 알려져 galactose 대사와 관련하여 많은 연구가 진행중이다(13~15).

이에 본 실험에서는 비호흡상승형 과실중에 하나인 딸기의 저장, 가공시 품질향상에 도움이 되는 기초자료가 되리라 사료되어 딸기연화와 많은 관련이 있는 β -galactosidase를 분리·정제하여 효소의 생화학적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서는 경북 고령군 일대에서 재배한 '보교'종(*Fragaria grandiflora* Ehrh.) 딸기를 실험재료로 사용하였다.

β -Galactosidase의 추출

효소추출은 Bartley(4)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 딸기 500 g에 아세톤과 0.2 M Tris-HCl 완충용액 (pH 8.9)을 9:1로 혼합한 용액 1000 ml를 가하여 균질화 한 다음 Whatman No. 541 여과지로 여과하여 잔사를 5 mM 인산나트륨 완충용액 (pH 7.2)에 현탁하고, 톨루엔 3방울을 가하여 3일간 둔 다음 원심분리하여 상정액을 취하였다. 이를 다시 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 85% 포화, 염석하고 10,000 xg로 10분간 원심분리 한 다음 증류수에 용해하여 10 mM 초산나트륨 완충용액에 48시간 투석하였다. 이 투석액을 20,000 xg로 15분간 원심분리한 상정액을 Diaflo PM10 Ultrafiltration Membrane (Mw. cutoff; 10,000)을 부착한 Amicon Diaflo system을 사용하여 질소기류하에서 가압, 농축한 후 효소액으로 사용하였다.

β -Galactosidase의 분리 및 정제

효소의 분리 및 정제를 위하여 효소액 10 ml를 CM-cellulose column (2.0×35 cm)에 주입한 다음 0~1.0

M NaCl linear gradient, 유속 0.25 ml/min하여 20분 간격으로 분획하여 β -galactosidase를 분리하였다. 분리된 효소액은 Diaflo PM10 Ultrafiltration Membrane (Mw. cutoff; 10,000)을 부착한 Amicon Diaflo System을 사용하여 질소기류하에서 가압, 농축하였다. 농축한 효소액을 10 mM 초산나트륨 완충용액 (pH 4.5)으로 평형시킨 Sephacryl S-200 column (2.0×35 cm)에 10 ml를 주입하여 유속 0.25 ml/min, 20분 간격으로 분획하였으며, 정제된 효소액은 전기영동으로 분자량을 확인하였다.

Gel여과에 의한 효소의 분자량 측정

효소의 분자량은 Whitaker(16)의 방법에 따라 Sephacryl S-200 겔 여과 크로마토그래피로 측정하였다. 먼저 Sephacryl S-200 column (2.0×35 cm)을 10 mM 초산나트륨 완충용액으로 평형시켜 void volume (V_0)을 구하고, column을 완전히 세척한 후 표준단백질을 column에 주입하여 각각의 elution volume (V_e)을 구한 다음 표준단백질의 분자량에 대한 V_e/V_0 을 도성한 검량선에 의해서 각 효소의 분자량을 측정하였다. 이때 표준단백질은 cytochrome c (Mw. 12,400), carbonic anhydrase (Mw. 29,000), albumin (Mw. 66,000), phosphorylase b (mw. 94,000), alcohol dehydrogenase (Mw. 150,000)와 β -amylase (Mw. 200,000)를 사용하였다.

β -Galactosidase의 생화학적 특성

β -Galactosidase의 K_m 값과 V_{max} 값은 p -nitrophenyl- β -galactopyranoside의 농도에 따라 측정하여 Lineweaver-Burk plots으로 구하였다. 최적온도와 최적 pH는 반응온도와 pH에 변화를 주어 효소활성을 측정하여 조사하였고, 온도에 대한 열 안정성은 효소를 여러 온도에서 10분간 열처리후 냉각시켜 잔존하는 효소의 활성을 측정하였다. pH에 대한 안정성은 효소액을 4℃에서 10 시간동안 pH 2.0~10.0사이의 완충용액으로 각각 투석한 후 pH 4.0에 잔존하는 효소의 활성을 측정하였다. 효소활성에 미치는 금속이온, sodium dodecylsulfate (SDS), ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)의 영향은 최종농도가 효소반응액의 1 mM되게 제조하여 각 금속 이온과 SDS, EDTA에 의한 효소활성의 변화를 측정하였다.

결과 및 고찰

효소의 분리와 정제

딸기의 연화와 관련이 깊은 것으로 사료되는 β

-galactosidase를 gel과 ion exchange column chromatography를 이용하여 분리·정제하였다. 딸기에서 추출한 효소액을 CM-cellulose column으로 분리한 결과는 Fig. 1과 같았다. Fraction No. 27~38에서 한 개의 활성 peak가 확인되었다. 이 분획한 효소액을 모아 Diaflo PM10 ultrafiltration membrane을 사용하여 N_2 가압하에서 Amicon Diaflo system으로 농축한 다음 Sephacryl S-200 column으로 분리한 결과는 Fig. 2와 같았다. Fraction No. 19~25에서 한 개의 peak가 확인되었다.

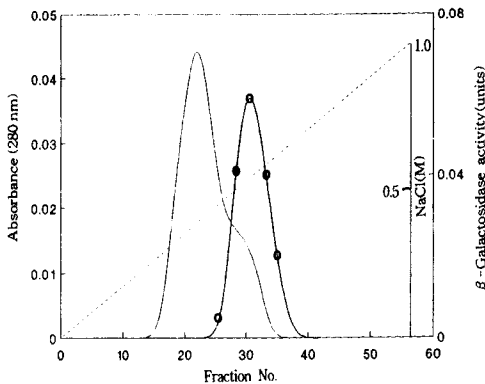


Fig. 1. Elution profile of β -galactosidase extracted from strawberries on CM-cellulose column. Column size: 2.0×35 cm, flow rate: 0.25ml/min, buffer gradient: ----, Absorbance at 280nm: —, β -galactosidase: —○—.

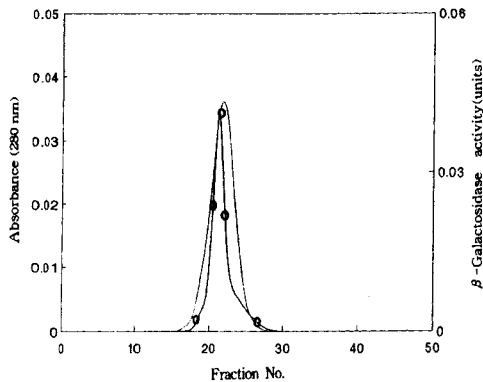


Fig. 2. Elution profile of β -galactosidase fraction from CM-cellulose on Sephacryl S-200 column. Column size: 2.0×35 cm, flow rate: 0.25ml/min, Absorbance at 280nm: —, β -galactosidase: —○—.

조효소액을 CM-cellulose와 Sephacryl S-200 column으로 정제한 결과는 Table 1과 같았다. 조효소액을 acetone powder 처리시 효소액은 약 1.14배가 정제되었고 $(NH_4)_2SO_4$ 로 처리시 2.09배가 정제되었다. CM-cellulose

column으로 정제한 β -galactosidase는 비활성도가 26.38 units/mg-prot.이었으며 정제율은 29.20%, 5.90배이었다. Sephacryl S-200 column으로 정제한 후 효소액은 비활성도가 115.08 units/mg-prot.이었고 정제율은 각각 18.11%, 25.74배이었다.

Table 1. Summary of the purification of β -galactosidase extracted from strawberries

Purification steps	Total activity (units)	Protein content (mg)	Specific activity (units/mg protein)	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude extract	38.11	8.52	4.47	100.00	1.00
Acetone powder	24.16	4.76	5.13	63.39	1.14
$(NH_4)_2SO_4$ treatment	22.71	2.42	9.37	59.58	2.09
CM-cellulose	11.13	0.42	26.38	29.20	5.90
Sephacryl S-200	6.90	0.06	115.08	18.11	25.74

효소의 분자량 측정

β -Galactosidase의 분자량을 측정하기 위해 표준단백질과 효소를 Sephacryl S-200 column에 주입하여 분획한 결과는 Fig. 3과 같았다. β -Galactosidase의 분자량은 116,000 dalton이었다. 신 등(17)은 감에서 정제한 β -galactosidase의 분자량은 115,000 dalton이라고 하였다.

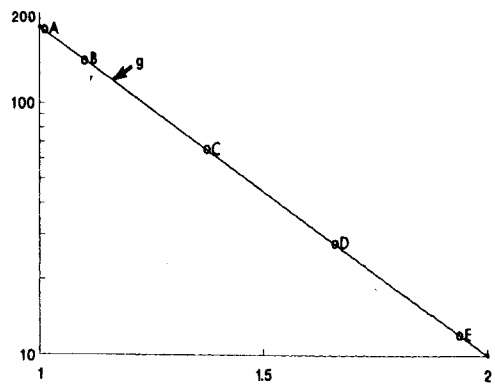


Fig. 3. Determination of molecular weight of β -galactosidase extracted from strawberries by Sephacryl S-200 gel filtration.

V_0 : void volume, V_e : elution volume of each protein. A: β -amylase(Mw. 200,000), B: alcohol dehydrogenase(Mw. 150,000), C: albumin(Mw. 66,000), D: carbonic anhydrase(Mw. 29,000), E: cytochrome c(Mw. 12,400), G: β -galactosidase.

β -Galactosidase의 생화학적 특성

기질(p-nitrophenyl- β -galactoside)농도에 따른 β -galactosidase의 활성변화를 Fig. 4에 Lineweaver-Burk

plots으로 나타내었다. 효소의 Km치는 $1.75 \times 10^{-2} \text{mM}$ 이었고 Vmax는 0.077 mM ONPG/ ml/ 15min이었다.

Fig. 5는 β -galactosidase의 반응시간에 따른 활성변화를 측정한 결과이다. β -galactosidase의 활성은 60분 이후 급격히 상승하여 120분에 최대속도에 도달았음을 알 수 있었다.

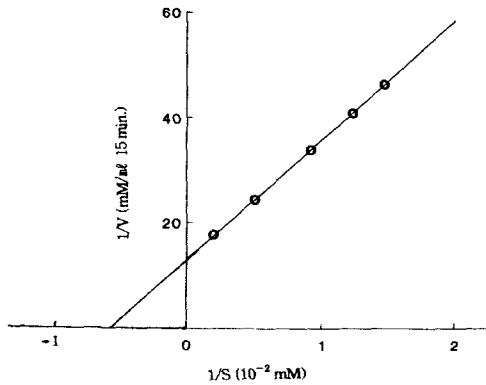


Fig. 4. Lineweaver-Burk plots of β -galactosidase extracted from strawberries.

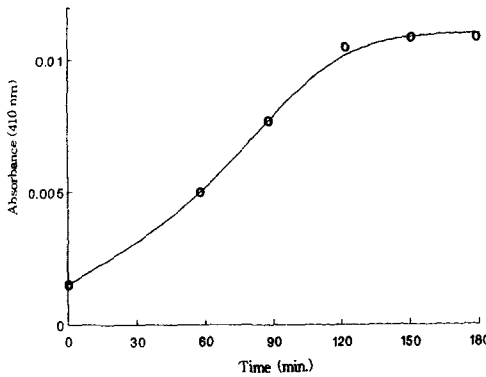


Fig. 5. Time course on the activities of β -galactosidase.

Fig. 6은 pH에 따른 β -galactosidase 활성변화를 나타내었다. 딸기의 최적 pH는 4.3이었고 pH 7.0 이상에서는 거의 활성을 나타내지 않았다. 신(18)은 감의 β -galactosidase 최적 pH는 4.2라고 하였고, Pressey(11)는 토마토의 β -galactosidase의 최적 pH는 isoenzyme의 종류에 따라 차이는 있지만 pH 4.0~5.5이라고 보고하였다. 지금까지 발표되고 있는 β -galactosidase의 최적 pH는 과실의 종류에 따라 약간의 차이는 있으나 pH 4.0~5.0사이이며 딸기의 β -galactosidase의 최적 pH와도 유사했다.

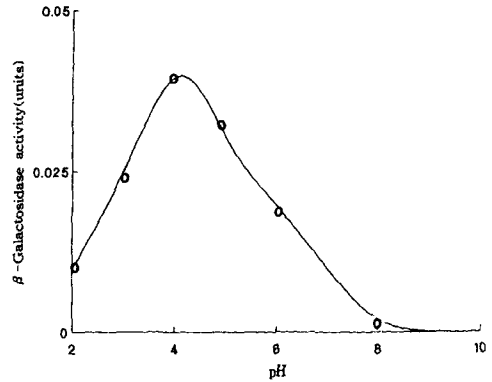


Fig. 6. Effects of pH on the activities of β -galactosidase.

Fig. 7은 β -galactosidase 활성에 미치는 온도의 영향을 나타내었다. β -galactosidase의 최적온도는 40°C이었다. 이는 감(18)의 45°C보다는 낮은 온도였으며 Ranwala 등(19)의 Muskmelon의 최적온도 60°C보다는 낮은 온도였다.

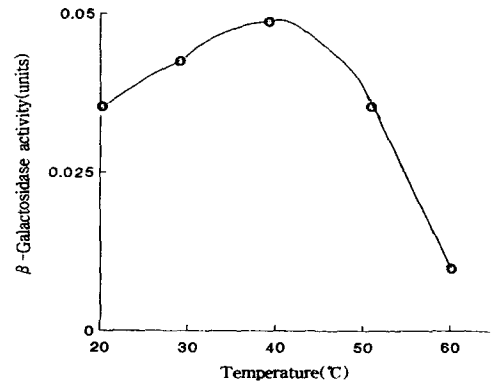


Fig. 7. Effects of temperature on the stability of β -galactosidase.

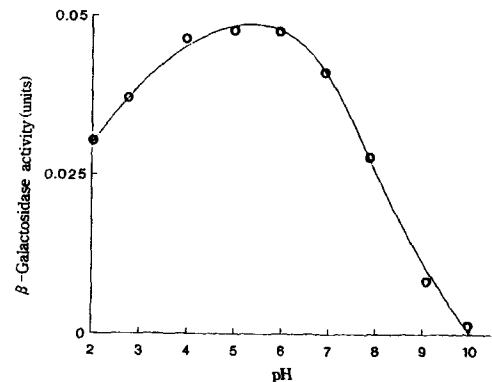


Fig. 8. Effects of pH on the stability of β -galactosidase.

β -Galactosidase의 pH에 대한 안정성을 조사한 결과는 Fig. 8과 같았다. β -Galactosidase는 pH 4.0~6.0에서 안정하였다. 이후는 활성이 떨어져 pH 9.0에서는 활성이 거의 나타나지 않았다. 신(18)은 감에서 분리한 β -galactosidase는 pH 3.0~6.0에서 안정하다고 보고했는데 이러한 결과는 딸기의 β -galactosidase의 pH에 대한 안정성과는 차이를 나타내고 있다.

Fig. 9는 β -galactosidase의 열처리에 따른 안정성을 나타내었다. 열처리에 따른 안정성은 40 °C까지는 안정하였고 50 °C에서는 1/2정도의 활성을 나타냈으며 60 °C에서는 활성을 측정할 수 없었다. Ranwala(19) 등의 Muskmelon보다는 낮은 온도에서 안정성을 나타내었으며 감(18)이나 사과(7)종의 β -galactosidase 활성 적온과는 비슷한 결과를 보였다.

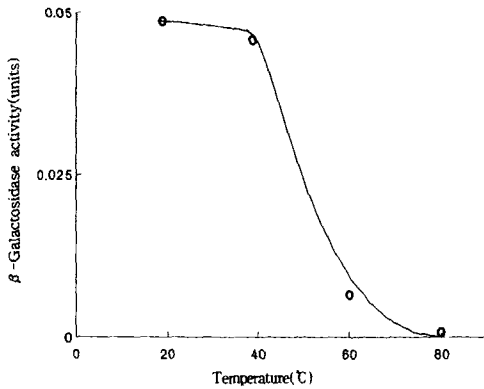


Fig. 9. Effects of heat treatment on the stability of β -galactosidase.

Table 2는 금속이온과 SDS, EDTA가 β -galactosidase의 활성이 미치는 영향을 조사한 결과이다. β -Galactosidase의 활성은 K^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} 의 금속이온에 의해 저해 받았으며, SDS는 40%, EDTA는 20~30%의 저해작용을 나타내었고 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 은 저해작용이 없었다.

Table 2. Effects of various additives on the activities of β -galactosidase

Additives	Relative activity (%)
None	100.0
K^+	85.2
Cu^{2+}	93.0
Ca^{2+}	100.0
Zn^{2+}	92.4
Mg^{2+}	105.2
SDS	59.0
EDTA	73.0

K^+ : K_2SO_4 , Cu^{2+} : $CuSO_4$, Ca^{2+} : $CaCl_2$, Zn^{2+} : $ZnCl_2$, Mg^{2+} : $MgCl_2$.

요 약

딸기의 β -galactosidase 정제는 ammonium sulfate 처리, acetone powder 처리와 CM-cellulose column과 sephacryl S-200 column을 사용했으며, 정제물은 18.11%였고, β -galactosidase의 분자량은 116,000이었다. β -Galactosidase를 기질농도에 따라 활성변화를 측정할 결과 K_m 치는 1.75×10^2 mM이었고 V_{max} 는 0.77 mM ONPG/ ml/ 15min이었다. 효소활성의 최적온도는 43 °C이고 최적pH는 4.0이었으며 50 °C이하에서는 효소활성의 안정성을 보였다. pH에 대한 안정성 조사결과 pH 4.0~6.0에서 안정했다. 또한 β -galactosidase는 금속이온 중 K^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} 에 의해 활성 저해를 보였으며 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 는 저해작용을 나타내지 않았다. SDS는 40%, EDTA는 20~30%의 활성저해를 나타내었다.

참고문헌

- Biale, J.B. and Young, R.E. (1981) Respiration and ripening in fruits- retrospect and prospect, Recent Advances in the Biochemistry of Fruit and Vegetables. John F. and Rhodes, M.J.C. Academic Press, London, 2-12
- Wallner, S.J. and Walker, J.E. (1979) Glycosidase in cell wall-degrading extracts of ripening tomato fruits, *Plant & Cell Physiol.*, **20**(2) 311-321
- Hobson, G.E. (1981) Enzymes and texture changes during ripening, Recent Advances in the Biochemistry of Fruit and Vegetables. John F. and Rhodes, M.J.C. Academic press, London, p.123-132
- Bartley, I.M. (1974) β -Galactosidase activity in ripening apple. *Phytochemistry*, **13**, 2107-2111
- Bartley, I.M. (1977) A further study of β -galactosidase activity in apple ripening in storage. *J. Exper. Bot.*, **28**, 943-948
- Wallner S.J. and Bloom, H.L. (1977) Characteristics of tomato cell wall degradation *in vitro*. Implication for the study of fruit softening enzymes. *Plant Physiol.*, **60**, 207-210
- Bartley, I.M. (1977) A further study of β -galactosidase activity in apple ripening in storage. *J. Exper. Bot.*, **28**, 943-948
- Groos, K.C. and Wallner, S.J. (1979) Degradation of cell wall polysaccharides during tomato fruit ripening.

- Plant Physiol.*, **63**, 117-120
9. 김광수, 신승렬, 송준희, 정용진 (1995) 세포벽분해 효소의 처리에 따른 감과실의 세포벽 구성비섬유성 중성당의 변화. *한국식품영양과학회지*, **24**(2), 247-253
 10. Knee, M., Sargent, J.A. and Osborne, D. J. (1977) Cell wall metabolism in developing strawberry fruits. *J. Experimental Botany*, **28**(103), 377-396
 11. Pressey, R. (1983) β -Galactosidase in ripening tomatoes. *Plant Physiol.*, **71**, 132-135
 12. Kang, I.K., Suh, S. G. , Gross, K.C. and Byun, J.K. (1994) N-terminal amino acid sequence of persimmon fruit β -galactosidase. *Plant Physiol.*, **105**, 975-979
 13. Proctor, A. and Peng, L.C. (1989) Pectin transitions in blue berry fruit development and ripening. *J. Food Sci.*, **54**, 385-387
 14. Kim, J.K., Gross, K.C. and Solmos, T. (1991) Galactose metabolism and ethylene production during development and ripening of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, **1**, 67-72
 15. Yamamoto, R., Inouhe, M. and Masuda, Y. (1988) Galactose inhibition of auxin induced growth of mono and dicotyledonous plants. *Plant Physiol.*, **86**, 1223-1227
 16. Whitaker, J.R. (1963) Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on sephadex. *Anal. Chem.*, **35**, 1950-1954
 17. 신승렬, 하유덕, 김진구, 김순동, 김광수 (1990) 감과실의 성숙과 추숙중의 β -Galactosidase활성 변화 및 특성. *한국식품영양과학회지*, **19**(6), 605-611
 18. 신승렬 (1988) 감과실의 연화시 세포벽 구성성분, 효소활성, 단백질 및 조직변화에 관한 연구. 영남대학교 대학원 박사학위논문
 19. Ranwala, A.P., Chiyuki, S. and Hiroshi, M. (1992) The role of β - galactosidase in the modification of cell wall components during muskmelon fruit ripening. *Plant Physiol.*, **100**, 1318-1325
-
- (접수 2000년 3월 29일)