

식용달팽이 β -Galactosidase의 정제와 생화학적 특성

윤경영[†] · 김광수

영남대학교 식품영양학과

Purification and Characterization of the β -Galactosidase from Edible Snail

Kyung-Young Yoon[†] and Kwang-Soo Kim

Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

Abstract

The β -galactosidase was purified from the internal organs of edible snail by fractionation with ammonium sulfate, ion exchange chromatography on DEAE-Sephadex, Mono Q HR 5/5 and gel filtration on Sephacryl S-200, Superose 12 HR 10/30 chromatography. The specific activity of the purified β -galactosidase was 18.8 units/mg protein with 31.3 purification fold from crude extract. The β -galactosidase had native molecular weight of 144,000 dalton and was composed of two subunits of 72,000 dalton. The isoelectric point of the enzyme was determined 4.1. This enzyme was the most active at pH 3.0 and 60°C, and was stable in the pH range 2.0~8.0 and below 50°C. The enzyme was inhibited by metal ions and sugars such as fructose, glucose, galactose, maltose and xylose.

Key words: β -galactosidase, edible snail, purification

서 론

달팽이는 육각류에 속하는 연체동물로서 나선형의 껍질로 몸을 둘러싸고 있으며, 기능성이 우수하여 식용 및 약용으로 이용되어 왔다(1). 달팽이는 주로 요리로서 즐겨 먹는데 프랑스, 이탈리아, 스페인, 중국, 일본 등지에서 인기가 대단히 높으며, 최근 국내에서도 호텔, 전문음식점, 백화점 등에서 달팽이의 수요가 점차 늘고 있는 추세이고(2,3) 양식기술의 발달 및 보급과 함께 인공양식이 급증하고 있다. 또한 달팽이의 소화액은 한 종류의 효소만이 함유된 미생물과는 달리 여러 종류의 우수한 carbohydrase가 포함되어 있으며, 특히 cellulase, β -galactosidase 및 chitinase와 같은 효소가 많이 함유되어(4,5) 학문적으로 뿐만 아니라 수용성식이섬유소 및 복합 올리고당 생산과 같은 산업적 이용 가치를 기대할 수 있다. 이중 β -galactosidase(β -D-galactosidase galactohydrolase, EC. 3.2.1.23)는 D-galactose와 alcohol 사이의 β -D-galactoside 결합을 가수분해하는 효소이며, 또한 D-galactose와 (1-4)나 (1-6) β -D-galactoside 결합을 가지고 있는 oligosaccharide를 가수분해한다(6). β -Galactosidase는 가수분해뿐만 아니라 전이를 동시에 일으킬 수 있는 활성을 가지고 있는 효소이다(7). 유당이 β -galactosidase에 의해 가수분해 될 때 생성된 galactose가 단당류, 다당류 또는 alcohol과 같은 활성 수용체 분자에 결합하여 새로운 glycosidic 결합

이 형성되어 여러 종류의 oligosaccharide를 생성한다(8). β -Galactosidase는 자연계에 널리 분포되어 있으며, 동물(5,9-12), 식물(13-15)을 비롯하여 세균(16-20), 효모(21-25), 곰팡이(26-28)와 같은 미생물 등에서 많이 발견되고 있지만 공학적으로 식품산업에 이용되고 있는 대부분의 β -galactosidase는 미생물로부터 분리·정제되어 이용되고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 많이 양식되고 있는 왕달팽이(*Achatina fulica*) 내장으로부터 β -galactosidase를 분리·정제하여 이들 효소의 생화학적 특성을 밝힘으로써 식용달팽이 효소 연구의 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 식용달팽이(*Achatina fulica*)는 경북 칠곡군 동명면에 소재한 농가 양식장에서 살아있는 채로 구입하여 실험실에 운반 후 세척, 탈각하여 오물과 물기를 제거한 다음 견육을 분리하고 내장만을 -35°C에 동결, 저장하여 두고 시료로 사용하였다.

효소의 추출, 분리 및 정제

효소추출은 시료 100 g에 10 mM phosphate buffer(pH 6.5) 500 mL를 가하여 균질화한 다음, 4°C에서 3시간 방치한

[†]Corresponding author. E-mail: yoonky2441@hanmail.net
Phone: 82-53-810-2874. Fax: 82-53-815-2874

후 8,000 rpm에서 60분간 원심분리(Supra 21K, Hanil, Korea)하여 얻은 상정액을 조효소액으로 사용하였다. 효소의 분리정제를 위하여 얻은 조효소액을 ammonium sulfate(20~80%)로 염석하고 8,000 rpm에서 1시간 원심분리한 다음, 침전물을 10 mM phosphate buffer(pH 6.5)에 용해 후 동일한 buffer로 24시간 투석하였다.

효소의 정제는 투석 후 농축하여 얻은 효소액을 20 mM phosphate buffer(pH 6.5)로 미리 평형시켜 놓은 DEAE Sephadex A-50 column(3.0×25 cm)에 5 mL를 흡착시키고, 이온교환수지에 결합되지 않은 단백질을 동일 완충용액 320 mL로 용출시킨 다음, 0~1.0 M NaCl 농도구배법을 적용하여 0.4 mL/min 유속으로 8 mL씩 분획하였다. 이온교환 크로마토그래피 과정에서 얻어 농축한 효소액 5 mL를 Sephacryl S-200 column(3.0×50 cm)에 주입한 다음, 동일한 완충용액을 사용하여 0.2 mL/min 유속으로 4 mL씩 분획하였다. Sephacryl S-200 겔 여과에서 얻은 β -galactosidase 활성 분획을 제농축한 후 20 mM phosphate buffer(pH 6.5)로 미리 평형시켜 놓은 Mono Q HR 5/5 column(0.5×10 cm)에 주입하였다. 이온교환수지에 결합되지 않은 단백질을 동일 완충용액으로 용출시킨 다음, 0~0.5 M NaCl 농도구배법을 적용하여 1 mL/min 유속으로 1 mL씩 분획하였다. Mono Q HR 5/5 이온교환 크로마토그래피에서 얻은 분획물 농축한 후 Superose 12 HR 10/30 column(1.0×30 cm)에 주입하여 정제하였으며, 이 때의 유속은 0.5 mL/min였고, 0.5 mL씩 분획하였다. 각 분획에 대해서 280 nm에서의 흡광도와 β -galactosidase 활성을 측정하였으며, 각 단계에서 분리된 효소액은 Diaflo PM10 Ultrafiltration Membrane(MW cut-off:10,000)이 부착된 Amicon Diaflo System(Amicon Co., USA)을 사용하여 N₂ gas로 가압, 농축하였다.

효소의 활성 측정

β -Galactosidase의 활성도 측정은 *p*-nitrophenyl- β -galactopyranoside를 가수분해하는 정도를 측정하여 효소의 활성도로 나타내었다. 즉, 기질인 *p*-nitrophenyl- β -galactopyranoside를 mL당 2 mg으로 녹인 10 mM sodium acetate buffer(pH 4.0) 500 μ L에 0.2% BSA(bovine serum albumin) 300 μ L와 10 mM sodium acetate buffer(pH 4.0) 100 μ L를 잘 혼합한 후 효소액 100 μ L를 가하여 30분간 반응시킨 다음, 200 mM Na₂CO₃ 2 mL를 가하여 반응을 정지시키고 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. β -Galactosidase의 활성 단위는 30°C에서 30분 동안에 1 μ mole *p*-nitrophenyl- β -galactopyranoside를 분해하는 효소량을 1 unit로 하였다.

단백질 정량

단백질의 함량은 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 Lowry 등(29)의 방법으로 정량하였으며, 크로마토그래피를 이용한 정제과정에서는 280 nm에서 흡광도로 단백질의 농도를 표시하였다.

분자량 측정

효소의 분자량은 Whitaker(30)의 방법에 따라 Sephacryl S-200 겔 여과 크로마토그래피로 측정하였다. 먼저 Sephacryl S-200 column(3.0×50 cm)을 20 mM sodium phosphate 완충용액으로 평형시켜 blue dextran으로 void volume(V₀)을 구하였다. 표준단백질을 column에 주입하여 각각의 elution volume(V_e)을 구한 다음, 표준단백질의 분자량에 대한 V_e/V₀을 작성한 후 검량선에 의해서 각 효소의 분자량을 측정하였다.

전기영동은 Laemmli(31)의 방법에 따라 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)의 방법을 사용하였다. 농축용 겔과 분리용 겔은 각각 5%, 10% polyacrylamide gel로 하였고, 시료는 sodium dodecylsulfate(SDS)와 2-mercaptoethanol을 각각 2%와 5%되게 가하여 100°C에서 5분간 열처리하였다. 전기영동(Hoefer, Pharmacia, Sweden)은 20 mA로 90분간 실시하였고, 염색은 0.25% Coomassie brilliant blue R-250으로, 탈색은 메탄올 : 아세트산 : 증류수(4.5 : 1 : 4.5) 혼합용액으로 행하였다.

등전점 측정

효소의 등전점은 Pharmacia Calibration Kits(Pharmacia Co., Sweden)를 사용하여 측정하였으며, pH 3-10용 5% polyacrylamide gel 상에 정제된 효소와 pI 표준단백질(IEF-Mix 3.6-9.3, Sigma, USA)을 loading하여 전기영동한 후 Coomassie brilliant blue로 염색하여 등전점을 확인하였다.

pH의 영향

효소 활성에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위하여 pH 2.0에서 pH 11.0까지에서의 효소 활성도를 측정하였다. 사용한 완충용액으로는 KCl-HCl buffer(pH 2.0), sodium citrate buffer(pH 3.0~5.0), sodium phosphate buffer(pH 5.0~8.0), carbonate buffer(pH 9.0~11.0)를 사용하였다. 효소의 pH에 대한 안정성은 일정량의 효소용액과 각 100 mM 완충용액을 혼합하여 4°C에서 24시간 방치한 후 효소의 잔존 활성을 측정하였다.

온도의 영향

효소의 반응 최적 온도를 조사하기 위해 정제된 효소 용액을 20~80°C에서 반응시켜 효소의 활성을 측정하였으며, 효소의 온도에 대한 안정성을 검토하기 위해 정제된 효소 용액을 30~80°C에서 30분간 방치한 후 효소의 잔존 활성을 측정하였다.

금속이온의 영향

금속이온이 효소의 활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 각종 금속이온(KCl, NaCl, LiSO₄, CaCl₂, FeCl₂, HgCl₂, MgCl₂, MnO₄, ZnCl₂, AgNO₃, Pb(CH₃COO)₂, CuSO₄, BaCl₂)을 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가한 다음 30분간 방치한 후 효소의 잔존 활성을 측정하였다.

당류의 영향

당류가 β -galactosidase의 활성에 미치는 영향을 검토하기 위해 여러 종류의 당(glucose, fructose, galactose, maltose, xylose, sucrose)을 각각 10 mM과 1 mM이 되도록 준비하고 효소용액 0.5 mL와 당용액 0.5 mL를 혼합하고, 40°C에서 10분간 반응시킨 후 *p*-nitrophenyl- β -galactopyranoside로 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

β -Galactosidase의 정제

식용달팽이 내장에서 추출한 조효소액을 DEAE Sephadex A-50 column에 주입하여 0~1.0 M의 NaCl 농도구배에 의하여 용출시킨 결과(Fig. 1), 0.1~0.4 M NaCl의 넓은 범위에서 β -galactosidase의 활성 peak가 나타났다. 이 중 대부분의 β -galactosidase 활성이 있는 fraction No. 42~56의 분획을 농축한 후에 Sephacryl S-200 column에 주입하여 분획하였다. 그 결과, Fig. 2와 같이 fraction No. 29~36에서 β -gal-

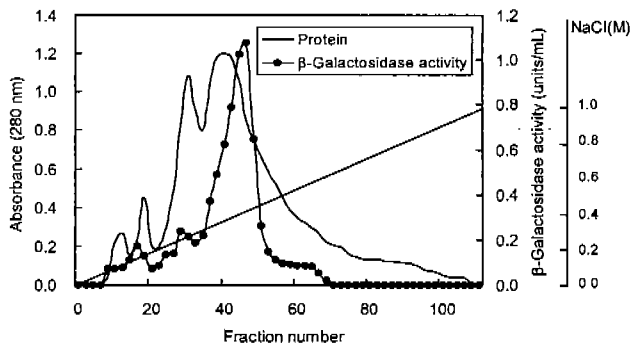


Fig. 1. Chromatograms of β -galactosidase from edible snail on DEAE Sephadex A-50.

Column size: 3.0×25 cm, Flow rate: 0.4 mL/min.

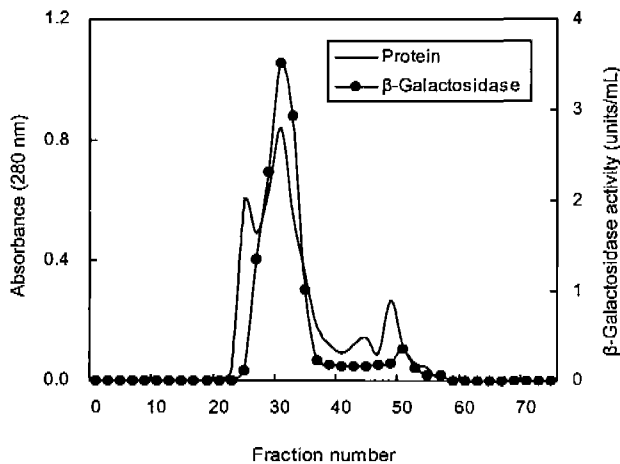


Fig. 2. Chromatograms of β -galactosidase from DEAE Sephadex A-50 on Sephacryl S-200.

Column size: 3.0×50 cm, Flow rate: 0.2 mL/min.

actosidase의 활성을 나타내었다. Sephacryl S-200 겔 여과 크로마토그래피에서 얻은 분획을 Mono Q HR 5/5 column에 주입하여 용출한 결과는 Fig. 3과 같았다. 0.05 M에서 0.2 M NaCl사이에서 단백질과 β -galactosidase 활성 peak를 얻었으며, 이 중 0.1 M에서 0.2 M NaCl농도에서 높은 β -galactosidase 활성이 확인되었다. Mono Q HR 5/5 이온교환 크로마토그래피에서 얻어진 β -galactosidase 활성 분획을 농축한 후 Superose 12 HR 10/30 column에 주입하여 용출한 결과는 Fig. 4와 같았다. Fig. 4에서 보는 것과 같이 세 개의 단백질 peak로 분리되었으며, fraction No. 26~36에서 β -galactosidase 활성 peak가 확인되었다. 이 분획을 모아 전기영동을 실시한 결과, 단일밴드를 나타내었으며, 따라서 달팽이 내장으로부터 추출한 β -galactosidase는 정제가 되었음을 확인하였다.

Table 1은 달팽이로부터 얻은 조효소액을 각 정제단계별로 단백질 함량 및 활성의 변화를 조사한 결과이다. 정제과정이 진행될수록 단백질 함량은 크게 감소하였으며, 비활성도는 증가하였다. 조효소액, 황산암모늄 염석, DEAE Sephadex A-50, Sephacryl S-200 겔 여과, Mono Q HR 5/5 column

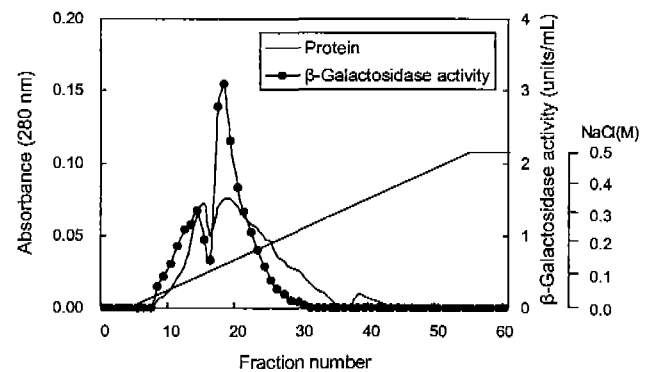


Fig. 3. Chromatograms of β -galactosidase from Sephacryl S-200 on Mono Q HR 5/5.

Column size: 0.5×10 cm, Flow rate: 1.0 mL/min.

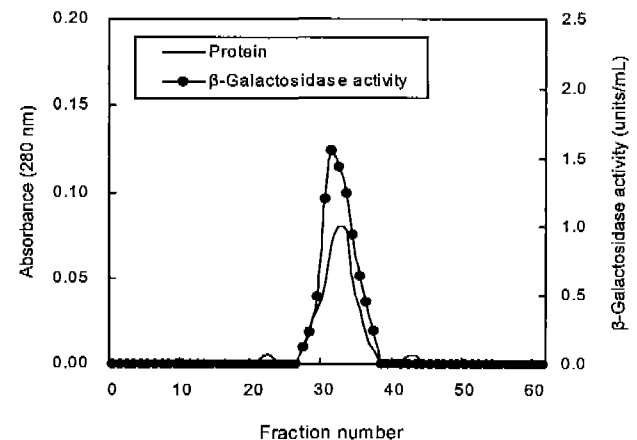


Fig. 4. Chromatograms of β -galactosidase from Mono Q HR 5/5 on Superose 12 HR 10/30.

Column size: 1×30 cm, Flow rate: 0.5 mL/min.

Table 1. Purification steps and purity of β -galactosidase from edible snail

Purification steps	Total activity (units)	Protein content (mg)	Specific activity (units/mg protein)	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude extract	2,368.7	4,277.4	0.6	100.0	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,095.6	1,988.1	1.1	88.5	1.9
DEAE Sephadex A-50	1,340.3	303.4	4.4	56.6	8.0
Sephacryl S-200	1,181.5	174.4	6.8	49.9	12.3
Mono Q HR 5/5	615.9	49.3	12.5	26.0	20.8
Superose 12 HR 10/30	492.7	26.2	18.8	20.8	31.3

및 Superose 12 HR 10/30 column 후의 비활성도는 각각 0.6, 1.1, 4.4, 6.8, 12.5 및 18.8 units/mg protein으로, Mono Q HR 5/5 column으로 분리한 경우 비활성도가 크게 증가하였음을 알 수 있었다. Mono Q HR 5/5 column과 Superose 12 HR 10/30 column 정제과정 후 조효소액에 비해 각각 20.8배, 31.3 배 정제되었다.

분자량

β -Galactosidase의 분자량을 측정하기 위해 표준단백질과 효소를 Sephacryl S-200 column에 주입하여 분획한 각 단백질의 V_e/V_o 와 분자량과의 관계를 도식한 결과는 Fig. 5와 같았으며, 달팽이의 β -galactosidase의 분자량은 약 144,000 dalton으로 확인되었다. 10%의 gel 농도에서 SDS-PAGE를 실시하여 표준단백질의 분자량과 상대적인 이동거리를 도식한 결과는 Fig. 6과 같았으며, 72,000 dalton 부근에서 단일 밴드가 나타났다. 따라서 달팽이 내장의 β -galactosidase는 72,000 dalton의 분자량을 가진 두개의 subunit로 구성된 dimer임을 확인하였다. Choi 등(32)은 *Bacillus* sp. TA-11로부터 62,000 dalton의 분자량을 가진 두 개의 subunit와 40,000 및 34,000 dalton의 분자량을 가진 subunit로 구성된 205,000 dalton의 β -galactosidase를 분리하였다. Lee 등(33)과 Shin

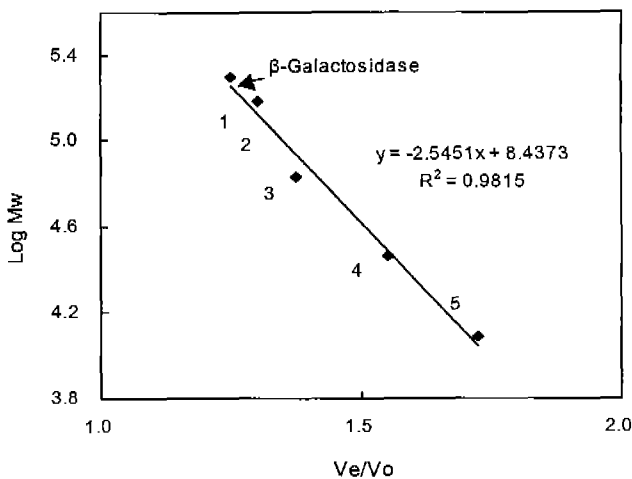


Fig. 5. Determination of molecular weight of β -galactosidase by Sephacryl S-200 gel filtration.

V_o : void volume, V_e : elution volume of each protein, 1: β -amylase (MW. 200,000), 2: alcohol dehydrogenase, (MW. 150,000), 3: albumin (MW. 66,000), 4: carbonic anhydrase (MW. 29,000), 5: cytochrome c (MW. 12,400).

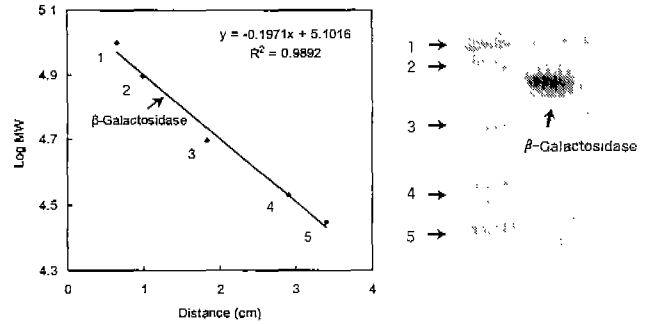


Fig. 6. Determination of molecular weight of β -galactosidase by SDS-PAGE electrophoresis.

1. phosphorylase b (Mw. 101,000), 2. bovine serum albumin (Mw. 79,000), 3. ovalbumin (Mw. 50,000), 4. carbonic anhydrase (Mw. 34,700), 5. soybean trypsin inhibitor (Mw. 28,400).

등(34)은 딸기와 감에서 분자량이 각각 116,000와 115,000 dalton인 β -galactosidase를 분리하여 본 실험에서 얻은 β -galactosidase의 분자량과 유사하였다.

등전점

표준 단백질의 상대적인 이동거리를 측정하여 산출한 식용달팽이 β -galactosidase의 등전점은 Fig. 7과 같이 4.1임을 확인하였다. *Penicillium multicolor*(28)와 *Kluyveromyces*

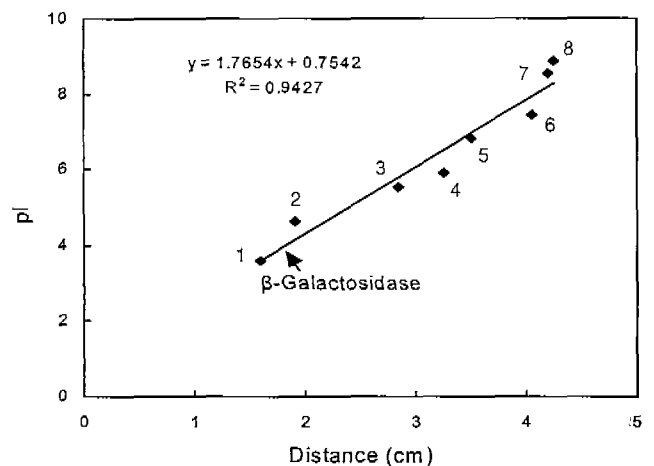


Fig. 7. Determination of pI of β -galactosidase by isoelectric focusing.

1: amyloglucosidase (pI 3.6), 2: soybean trypsin inhibitor (pI 4.6), 3: β -lactoglobulin A (pI 5.1), 4: carbonic anhydrase II (pI 5.9), 5: carbonic anhydrase I (pI 6.6), 6: myoglobin (pI 7.2), 7: *Lens culinaris* lectin (pI 8.8), 8: trypsinogen (pI 9.3).

fragilis(21)에서 분리된 β -galactosidase의 등전점은 각각 pH 5.9, pH 5.1이라고 보고되었으며, 파파야 씨(15)에서 분리된 β -galactosidase의 등전점은 pH 8.4이라고 보고되어 본 연구에서 분리된 달팽이의 β -galactosidase와 큰 차이를 보였으나, *Bacillus circulans*(18)와 *Aspergillus niger*(26)의 경우 등전점이 각각 pH 4.5과 pH 4.9이라고 보고되어 본 연구의 결과와 유사하였다.

최적 pH와 pH 안정성

pH에 따른 효소활성 변화를 조사한 결과는 Fig. 8(A)와 같이 pH 3.0에서 최대 활성을 보였고, pH 5.0이상에서는 50% 활성의 감소를 나타내어 산성 효소임을 알 수 있었다. 쥐의 장과 간장의 lysosome에서 정제된 β -galactosidase 경우에는 *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside에 대한 가수분해율이 각각 pH 2.6과 pH 3.0에서 최대활성을, pH 6.0이상에서는 활성이 급격히 감소하며, 사람의 장 lysosomal β -galactosidase의 최적 pH는 3.6인 것으로 알려져 있다(12). 또한 Park 등(27)은 *Penicillium multicolor*에서 추출한 β -galactosidase의 최적 pH는 4.0, Ohtani와 Misaki(15)는 파파야 씨에서 분리한 β -galactosidase의 최적 pH는 3.5~4.5이라고 보고하였는데, 이는 본 연구의 달팽이 β -galactosidase의 경우와 유사한 경향을 보였다.

Fig. 8(B)는 β -galactosidase의 pH에 대한 안정성을 조사한 결과이다. 달팽이의 β -galactosidase의 pH에 따른 활성 변화는 pH 2.0~8.0에서는 80%이상의 활성이 유지되어 비교적 넓은 범위에서 안정하였고, pH 9.0이상 알칼리 영역에서는 활성이 많이 감소하였다. Takenishi 등(28)은 *Penicillium multicolor*로부터 정제한 β -galactosidase를 pH 2.0에서 pH 8.0까지의 완충용액과 함께 40°C에서 3시간 방치한 후 활성을 측정하였을 때, pH 3.5~7.0에서 활성의 변화가 없었으며, pH 2.5에서도 80%이상의 효소활성을 가졌으나 pH 8.0에서는 활성이 급격히 감소한다고 보고하였다. *Aspergillus oryzae*에서 분리된 β -galactosidase는 pH 4.0~6.0에서 70%이상의 활성이 유지되었고, pH 3.6~8.0의 비교적 넓은 범위에서 활성에 변화가 없다고 보고(27)해 달팽이의 경우와 유사한 경향

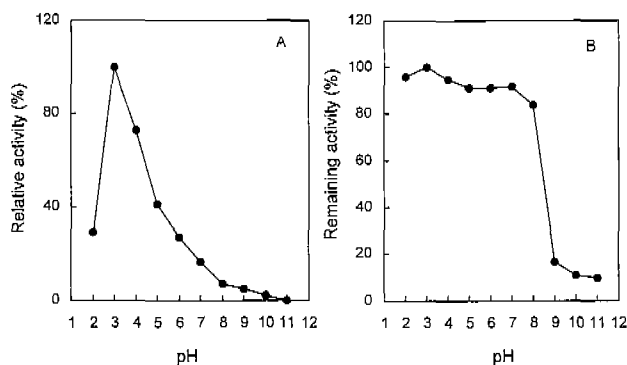


Fig. 8. Effects of pH on the activity (A) and stability (B) of β -galactosidase from the edible snail.

을 나타내었다. 반면, 파파야에서 분리된 β -galactosidase는 pH 5.0에서 pH 9.0까지 활성이 높아 약산성에서 약알칼리성 범위에서 안정하고(15), *Streptococcus thermophilus*의 β -galactosidase는 단지 pH 6.8~7.0의 좁은 범위에서 안정하였다(17).

최적 온도와 온도 안정성

β -Galactosidase의 활성에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과는 Fig. 9(A)와 같았다. 달팽이의 β -galactosidase의 최적 온도는 60°C이었고, 50°C에서는 80%이상의 활성이 유지되었으나 40°C이하, 70°C이상에서는 40%이하로 효소활성이 크게 감소하였다. *Penicillium multicolor*에서 분리된 β -galactosidase는 60°C에서 최대의 효소활성을 가졌으며 50°C에서는 90%이상의 활성을 유지하였고, 40°C이하, 70°C이상에서 활성이 크게 감소하였다는 보고(28)는 달팽이 β -galactosidase의 경우와 유사한 경향이였다. 또한 파파야(15), *Bacillus circulans*(18) 및 *Escherichia coli*(16)에서 분리된 β -galactosidase의 최적 온도가 60°C였다는 보고도 본 연구의 결과와 유사하였다. 감(34)의 β -galactosidase의 최적 온도는 45°C, *Bifidobacterium* sp. INT-57(35)과 *Bacillus* sp. TA-11(32)에서 분리된 β -galactosidase의 최적 온도는 40°C, *Aspergillus oryzae*(27)의 β -galactosidase의 최적 온도는 55°C, *Thermophilic Bacterium*(36)에서 정제된 β -galactosidase의 최적온도는 65°C이었다는 보고는 본 연구의 결과와 다소 차이가 있었다. 따라서 β -galactosidase는 급원에 따라 최적 온도에 차이가 있는 것으로 생각된다.

Fig. 9(B)는 β -galactosidase의 열 안정성을 조사하기 위하여 각 온도에서 30분간 정지한 후 잔존하는 효소의 활성 변화를 조사한 결과이다. Fig. 9(B)에서 나타난 바와 같이 30~50°C에서 잔존활성이 96~100%로 효소가 안정하였으나, 60°C이상의 온도에서는 잔존활성이 20%이하로 급격히 감소하였다. 달팽이 β -galactosidase는 50°C이하에서는 안정하나 60°C이상에서는 불안정하여 달팽이의 β -galactosidase는 열에 대하여 비교적 불안정한 것으로 생각된다. Choi 등(32)은 *Bacillus* sp. TA-11에서 분리한 β -galactosidase의 온도 안

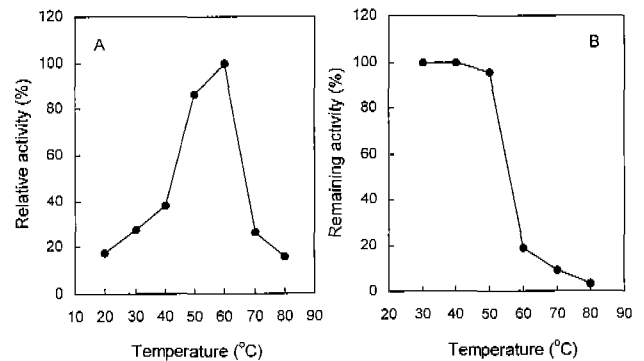


Fig. 9. Effects of temperature on the activity (A) and stability (B) of β -galactosidase from the edible snail.

정성을 조사한 결과는 40°C에서 가장 안정하였고, 50°C에서는 80%의 잔존활성을, 60°C에서는 60%의 잔존활성을 유지하였다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사하였다.

금속이온의 영향

Table 2는 금속이온이 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각종 금속이온을 최종농도가 1 mM이 되도록 효소액에 첨가한 다음 30분간 정치한 후 효소의 잔존활성을 측정된 결과이다. 본 연구에서 사용된 모든 금속이온이 β -galactosidase 효소 활성을 저해하는 것으로 나타났으며, 특히 $HgCl_2$ 를 첨가한 경우 상대활성이 21%로 나타나 Hg^{2+} 이온이 효소 활성을 가장 강하게 저해하는 것을 확인하였다. Dickson 등(23)은 Na^+ 와 Mn^{2+} 이 *Kluyveromyces lactis*에서 분리된 β -galactosidase의 활성을 촉진시켰으나 Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} 은 효소 활성의 저해제로 작용하며, Co^{2+} , Fe^{2+} 는 활성에 영향을 주지 않는다고 보고하였다. *Penicillium multicolor*의 β -galactosidase는 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} 에 의해서 영향을 받지 않으나 Cu^{2+} 와 Hg^{2+} 에 의해 저해를 받는다는 보고(28)도 있다. 감에서 분리된 β -galactosidase는 Ca^{2+} 에 영향을 받지 않았으며, Mg^{2+} 에 의해 활성이 촉진되고 K^+ , Cu^{2+} 및 Zn^{2+} 에 의해 다소 저해를 받았다(34). 파파야에서 분리된 β -galactosidase의 경우 Mg^{2+} , Mn^{2+} 및 Zn^{2+} 는 효소활성에 영향을 주지 않았으며, Ca^{2+} 는 효소활성의 촉진제로, Cu^{2+} , Ag^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , $NaAsO_2$ 는 효소활성의 저해제로 작용하였다(15). 토마토에서 분리된 β -galactosidase의 경우에는 1 mM의 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} 는 효소활성에 영향을 미치지 않았으나 0.1 μM 의 Hg^{2+} 은 효소활성을 저해하였다(37). 이상에서와 같이 금속이온이 효소활성에 미치는 영향은 Hg^{2+} 에 의한 효소활성 저해를 제외하고 효소의 급원에 따라 많은 차이를 가지는 것을 알 수 있었다.

당류의 영향

Table 3은 당류가 β -galactosidase 활성에 미치는 영향을 조사한 결과이다. Sucrose와 lactose는 상대 효소활성이 1 mM

Table 2. Effects of metal ions on the activity of β -galactosidase from edible snail

Metal ions	Relative activity (%)
None	100
KCl	47
NaCl	51
Li_2SO_4	54
$CaCl_2$	49
$FeCl_2$	57
$HgCl_2$	21
$MgCl_2$	49
$MnSO_4$	55
$ZnCl_2$	51
$AgNO_3$	45
$Pb(CH_3COO)_2$	51
$CuSO_4$	61
$BaCl_2$	51

Table 3. Effects of sugars on the activity of β -galactosidase from the edible snail

Sugars	Relative activity (%)	
	1 mM	10 mM
Control	100	100
Fructose	94	85
Glucose	96	88
Galactose	89	64
Maltose	96	88
Xylose	98	90
Sucrose	101	102
Lactose	105	107

에서 각각 101%, 105%이었고, 10 mM에서는 102%와 107%로 증가되어 효소활성에 큰 영향을 주지 않았다. Fructose, glucose, galactose, maltose 및 xylose에 경우에는 두 농도 모두에서 효소작용을 저해하였으며, 10 mM 농도가 1 mM 농도에 비해 상대활성이 낮은 것으로 보아 이들의 농도가 높을수록 효소활성을 더 강하게 저해하는 것을 알 수 있었다.

Bacillus sp. TA-11의 β -galactosidase에 10 mM농도로 여러 가지 당류와 혼합하여 *o*-nitrophenyl- β -D-galactoside 효에 대한 효소활성을 측정하였는데, lactose와 sucrose는 소활성에 영향을 주지 않고, glucose, galactose, maltose, soluble starch(0.2%), xylose는 활성을 저해한다는 보고(32)는 본 연구의 결과와 유사한 경향을 보였다. 따라서 β -galactosidase는 sucrose와 lactose에 의해 저해를 받지 않으나 glucose, maltose, xylose 등에 의해서는 저해를 받는 것으로 생각된다.

요 약

달팽이 내장을 마쇄, 추출, 염석 및 투석 후 얻은 조효소액을 두 번의 이온교환 크로마토그래피 및 두 번의 겔여과 크로마토그래피를 거쳐 최종적으로 얻은 β -galactosidase의 비활성도는 18.8 units/mg protein이었고, 정제도는 31.3배, 수율은 20.8%이었다. β -Galactosidase의 분자량을 측정하기 위해 겔 여과와 전기영동을 실시한 결과, native molecular weight가 약 144,000으로, SDS-PAGE 결과, 약 72,000으로 나타나 이 효소는 동일한 polypeptide로 구성된 dimer로 추측되었으며, 등전점은 pI 4.1이었다. β -Galactosidase의 최적 pH와 온도는 각각 pH 3.0과 60°C로 측정되었으며, pH 2.0~8.0에서 80%이상의 효소 활성을 나타내었고, 온도 30~50°C에서 안정하였다. 모든 금속이온과 fructose, glucose, galactose, maltose 및 xylose는 β -galactosidase의 저해제로 작용하였다.

문 헌

- Ryu, B.H. and Lee, B.C. : Effect of *Achatina fucica* extract on lipid composition of serum in diabetic rats induced by streptozotocin. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **23**, 731-735 (1994)
- 논문호 : 왕우렁이 양식. 오성출판사, 서울, p.25 (1988)

3. 옥치섭 : 식용달걀이 양식과 이용. 오성출판사, 서울, p.77 (1991)
4. Strasdine, G.A. and Whitaker, D.R. : On the origin of the cellulase and chitinase of *Helix Pomatia*. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **41**, 1621-1626 (1963)
5. Got, R., Marnay, A., Jarrige, P. and Font, J. : Beta-galactosidase of *Helix pomatia*. *Nature*, **204**, 686-687 (1964)
6. Nijpels, H.H. : Lactase. In *Developments in food carbohydrate-3: Disaccharidases*, Lee, C.K. and Lindley, M.G. (eds.), Applied Science Publishers Ltd., London, p.23 (1982)
7. Kulp, K. : Carbohydrase. In *Enzymes in Food Processing*, Reed, G. (ed.), 2nd ed., Academic Press, New York, p.92 (1975)
8. Huber, R.E., Kurz, G. and Wallenfels, K. : A quantitation of the transgalactosylase activities of β -galactosidase (*E. coli*) on lactase. *Biochemistry*, **15**, 1994-2001 (1976)
9. Shukla, T.D. : β -Galactosidase technology: A solution to the lactose problem. *CRC Crit. Reviews Food Technol.*, **5**, 325 (1975)
10. Gray, G.M. and Santiago, N.A. : Intestinal β -galactosidases. I. Separation and characterization of three enzymes in normal human intestine. *J. Clin. Invest.*, **48**, 716-728 (1969)
11. Rosensweig, N.S. : Adult human milk intolerance and intestinal lactase deficiency (A review). *J. Dairy Sci.*, **52**, 585-587 (1969)
12. Alpers, D.H. : Separation and isolation of rat and human intestinal β -galactosidases. *J. Biol. Chem.*, **244**, 1238-1246 (1960)
13. Redgwell, R.J., Melton, L.D., Brasch, D.J. and Coddington, J.M. : Structure of the pectic polysaccharides from the cell walls of the kiwi fruit. *Carbohydrate Research*, **226**, 287-302 (1992)
14. Bartley, I.M. : β -Galactosidase activity in ripening apples. *Phytochemistry*, **13**, 2107-2111 (1974)
15. Ohtani, K., and Misaki, A. : Purification and characterization of β -galactosidase and α -D-mannosidase from papaya (*Carica papaya*) seeds. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2441-2451 (1983)
16. Morisi, J., Pastore, M. and Viglia, A. : Reduction of lactose content of milk by entrapped β -galactosidase. I. Characteristics of β -galactosidase from yeast and *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.*, **56**, 1123-1127 (1972)
17. Ramana Rao, M.V. and Dutta, S.M. : Purification and properties of beta-galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sci.*, **46**, 1419-1423 (1981)
18. Mozaffar, Z., Nakanishi, K., Matsuno, R. and Kamikubo, T. : Purification and properties of β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 3053-3061 (1984)
19. Kim, Y.M., Lee, J.C., Chung, P.K., Choi, Y.J. and Yang, H.C. : Studies on the production of β -galactosidase by *Lactobacillus sporogenes*; Production of extracellular β -galactosidase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**, 59-66 (1983)
20. Choi, S.Y., Kim, Y.K. and Yoon, S. : Growth factors and α - and β -galactosidase activities of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 in milk and soymilk. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**, 987-993 (1996)
21. Mahoney, R.R. and Whitaker, J.R. : Purification and physicochemical properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Food Sci.*, **43**, 584-591 (1978)
22. Dickson, R.C. and Markin, J.S. : Physiology studies of β -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.*, **142**, 777-785 (1980)
23. Dickson, R.C., Dickson, L.R. and Markin, J.S. : Purification and properties of an inducible β -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.*, **137**, 51-61 (1979)
24. Van Huynh, N. and Declaire, M. : In situ activation of β -galactosidase of *Kluyveromyces bulgaricus* resting cells by sodium and potassium phosphates and chlorides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 390-393 (1985)
25. Castillo, F.J. and Moreno, B. : Properties of lactase produced by *Candida pseudotropicalis*. *J. Dairy Sci.*, **66**, 1616-1621 (1983)
26. Greenberg, N.A. and Mahoney, R.R. : Rapid purification of β -galactosidase (*Aspergillus niger*) from a commercial preparation. *J. Food Sci.*, **46**, 684-687 (1981)
27. Park, Y.K., De Santi, M.S.S. and Pastore, G.M. : Production and characterization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *J. Food Sci.*, **44**, 100-103 (1979)
28. Takenishi, S., Watanabe, Y., Miva, T. and Kobayashi, R. : Purification and some properties of β -galactosidase from *Penicillium multicolor*. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2533-2540 (1983)
29. Lowry, O.H., Roserough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
30. Whitaker, J.R. : Determination of molecular weight of proteins by gel filtration on sephadex. *Anal. Chem.*, **35**, 1950-1953 (1963)
31. Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, **227**, 680-685 (1970)
32. Choi, Y.J., Kim, I.H., Lee, B.H. and Lee, J.S. : Purification and characterization of β -galactosidase from alkalophilic and thermophilic *Bacillus* sp. TA-11. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **22**, 191-201 (1995)
33. Lee, K.H., Yoon, K.Y., Kim, K.S., Kim, N.W. and Shin, S.R. : Purification and characteristics of β -galactosidase from strawberry. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.*, **7**, 201-206 (2000)
34. Shin, S.R., Ha, Y.D., Kim, J.G., Kim, S.D. and Kim, K.S. : Characteristics and activity changes of β -galactosidase during maturation and postharvest of persimmon fruits. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **19**, 605-611 (1990)
35. Yeo, N.I., Lee, S.K. and Ji, G.E. : Characterization of α -galactosidase from *Bifidobacterium* sp Int-57. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **25**, 689-693 (1993)
36. Oh, M.J., Lee, J.S., Kim, H.J. and Kim, C.J. : Studies on the β -galactosidase from *Thermophillic bacterium*; On the production, purification of enzyme and the properties of the purified enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**, 15-21 (1983)
37. Pressey, R. : β -Galactosidases in ripening tomatoes. *Plant Physiol.*, **71**, 132-135 (1983)

(2001년 12월 10일 접수; 2002년 1월 25일 채택)