

## 감과실의 성숙과 추숙중의 $\beta$ -Galactosidase활성 변화 및 특성

신승렬 · 하유덕 · 김진구\* · 김순동\*\* · 김광수

영남대학교 식품영양학과, \*상주농업전문대학 식품가공학과, \*\*효성여자대학교 식품가공학과

### Characteristics and Activity Changes of $\beta$ -Galactosidase during Maturation and Postharvest of Persimmon Fruits

Seung-Ryeul Shin, Yoo-Duk Ha, Jin-Gu Kim\*, Soon-Dong Kim\*\* and Kwang-Soo Kim

Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyongsan, 713-749, Korea

\*Dept. of Food Science and Technology, National Sangju Agriculture Junior College, Sangju, 742-170, Korea

\*\*Dept. of Food Science and Technology, Hyosung Women's University, Kyongsan, 713-702, Korea

#### Abstract

$\beta$ -Galactosidase activity was not detected at green mature stage but were 21.79 and 380.23 units/100g -fr. wt. in mature and soft persimmon, respectively. The molecular weight of  $\beta$ -galactosidase was estimated to be 115,000 daltons by the method of gel filtration.  $V_{max}$  and  $K_m$  value were 0.095mmole *p*-nitrophenyl-galactoside and  $1.8 \times 10^{-2}$ mM, respectively. The optimum temperature and pH of  $\beta$ -galactosidase were 45°C and 4.2, respectively.  $\beta$ -Galactosidase was inhibited by SDS.

#### 서 론

과실의 연화는 성숙과 저장중에 일어나는 생리적 변화로서 세포벽 분해효소에 의해 세포벽 구성성분의 변화를 초래하여 일어나며, 과실의 품질평가에 많은 영향을 준다<sup>1,2)</sup>. 세포벽 분해효소중에 연화와 가장 밀접한 관계가 있는 polygalacturonase<sup>3)</sup>는 middle lamella의 구성 성분인 pectin질을 분해하여 가용성 polyuronide를 유리시키는 반면에,  $\beta$ -galactosidase<sup>3,4)</sup>는 pectin의 side chain인 galactan이나 arabinogalactan에 작용하여 galactose를 유리시키므로써 연화를 촉진시킨다. Hobson<sup>1)</sup>과 Bartley<sup>5)</sup>는  $\beta$ -galactosidase가 성숙중에 생합성되어 활성이 증가하고 galactose를 유리시켜 연화를 촉진한다고 하였으며, 그리고 과실의 연화중에 세포벽구성 arabinose와 galactose가 감소한다는 보고<sup>6,7)</sup>가 있다. Gross와 Wallner<sup>8)</sup>

1)는 토마토 성숙중에 세포벽중의 galactose는 감소하고 유리 galactose는 현저히 증가하였는데 이는  $\beta$ -galactosidase와 밀접한 관계가 있다고 하였다. 전보<sup>9,10)</sup>에서 감과실의 성숙과 추숙에 세포벽 비섬유성 당인 galactose와 arabinose가 감소하였으며 연사에서 보다 현저하였고, pectin질에서도 동일한 경향이였다. 이는  $\beta$ -galactosidase와 밀접한 관계가 있을 것으로 생각되어 본 연구에서는  $\beta$ -galactosidase의 활성변화를 조사함과 더불어 생화학적 특성을 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 재 료

본 실험에 사용한 재료는 전보<sup>14)</sup>와 동일한 것을 사용하였다.

### 효소추출

효소추출은 Pressey<sup>12)</sup>가 행한 방법에 따라 시료 200g에 증류수 400ml를 가하여 10분간 균질화하고 30분간 천천히 저어준 후 균질액에 1M이 되게 NaCl을 가하고 0.5N NaOH로 pH 6.0으로 맞춘 후 magnetic stirrer로 3시간 저어준 다음 miracloth로 여과하였다. 위의 조작을 반복하여 추출한 여과액을 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 85% 포화, 염석하고, 5,000g로 10분간 원심분리한 다음 침전물을 증류수 20ml에 용해하여 0.15N NaCl용액에서 48시간 투석하였으며, 다시 20,000g로 15분간 원심분리한 상정액을 조효소액으로 하였다. 모든 효소의 추출 조작은 4°C에서 행하였다.

### β-Galactosidase의 활성측정

β-Galactosidase의 활성도 측정<sup>13)</sup>은 *p*-nitrophenyl-β-galactoside를 가수분해하는 정도를 측정하여 효소의 활성도로 나타내었다. *p*-nitrophenyl-β-galactoside를 2mg/ml으로 녹인 10mM sodium acetate buffer(pH 4.0) 50μl에 0.2% BSA(bovine serum albumin) 300μl와 10mM sodium acetate buffer(pH 4.0) 100μl를 잘 혼합한 후 효소액 100μl를 가하여 15분간 반응시킨 다음 200mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2ml를 가하여 반응을 정지시키고 410nm에서 흡광도를 측정하였다. β-Galactosidase의 활성도는 30°C에서 15분 동안에 1mmole *p*-nitrophenyl-β-galactoside를 분해하는 효소량을 1unit로 하였다.

### β-Galactosidase의 분리 정제 및 분자량 측정

β-Galactosidase의 분리, 정제 및 분자량 측정은 전보<sup>11)</sup>의 polygalacturonase와 동일하게 행하였다.

### β-Galactosidase의 생화학적 특성

β-Galactosidase의 기질 *p*-nitrophenyl-β-galactoside의 농도에 따른 활성의 변화를 각각 측정하여 Km값과 Vmax값을 구하였다. 최적온도와 pH는 각 온도와 pH에서 효소의 활성을 측정하여 조사하였다. 온도에 대한 안정성은 효소를 여러 온도에서 10분간 열처리한 후 즉시 냉각시켜 잔존

하는 효소의 활성을 측정하여 조사하였다. pH에 대한 안정성은 효소액을 4°C에서 pH 2~10사이의 buffer로 투석한 후 pH 4.0에서 잔존하는 효소의 활성을 측정, 조사하였다. 효소활성에 미치는 금속이온, SDS, EDTA의 영향을 조사하기 위하여 최종농도가 효소반응액의 1mM이 되게 제조해서 각 금속이온과 EDTA, SDS에 대한 효소활성의 변화를 측정하였다.

### 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry<sup>14)</sup>의 방법에 따라 행하였다.

## 결과 및 고찰

β-Galactosidase는 세포벽 분해 효소로서 과실이 성숙과 저장중에 활성이 증가하고 galactan과 arabinogalactan을 분해하여 galactose를 유리하는 효소로서 연화와 밀접한 관계가 있다<sup>1,2)</sup>. β-Galactosidase의 활성은 polygalacturonase와 같이 변색기까지는 나타나지 않았으나 완숙감에서는 21.79 unit/100g-fr. wt이었고 연시에서는 380.23unit/100 g-fr. wt.로 급격히 증가하였다. Bartley<sup>16)</sup>와 Knee<sup>17)</sup>는 사과와 성숙중에 β-galactosidase 활성이 증가하고 pectin질의 side chain인 arabinogalactan과 galactan을 분해하여 galactose와 arabinose를 유리함으로 연화를 촉진시킨다고 하였다. 이러한

Table 1. Changes in the activity of β-galactosidase extracted from persimmon fruits during ripening and softening (Unit/100g-fr. wt)

	Stage			
	GP	TP	MP	SP
β-Galactosidase activity	nd	nd	21.79	380.23

a) GP : mature green persimmon, TP : turning stage persimmon

MP : mature persimmon, SP : softened persimmon

nd : not detected.

One unit of activity is expressed as 1 mmole of *p*-nitrophenyl-β-galactoside degraded/15min. at 30°C.

점을 고려할 때  $\beta$ -galactosidase는 polygalacturonase와 더불어 감이 연화함에 따라 활성이 증가하고, pectic galactan을 분해하여 감의 연화를 촉진하는 것으로 생각된다.

Sephacryl S-200 column으로 분리, 정제한 결과는 Fig. 1와 같으며,  $\beta$ -galactosidase의 활성 peak는 fraction No. 31~40에 존재하였다. Sephacryl S-200 column으로 분획한  $\beta$ -galactosidase를 CM-cellulose column으로 분획한 결과 Fig. 2에서와 같이 fraction No. 18~29에서 한개의 활성 peak를 얻었다. Pressey<sup>12)</sup>는 익은 토마토에서 3종의 isoenzyme을, Gatt와 Baker<sup>18)</sup>, Ohtani와 Misaki<sup>19)</sup>는 papaya 열매와 상추잎에서 각각 1종의  $\beta$ -galactosidase를 분리하였는데, 감에서는 1종의  $\beta$ -galactosidase만이 분리되었다.

조효소액을 sephacryl S-200과 CM-cellulose column으로  $\beta$ -galactosidase를 정제한 결과는 Table

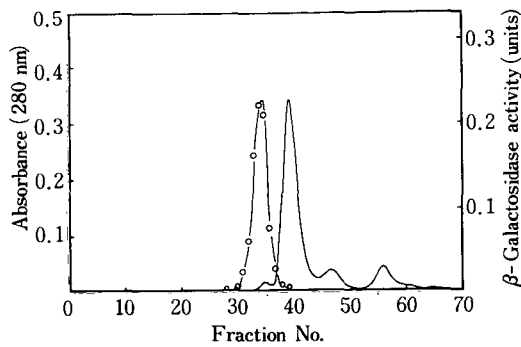


Fig. 1. Elution profile of  $\beta$ -galactosidase extracted from soft persimmon fruits on Sephacryl S-200 column. Column size ; 2.65 $\times$ 65cm, Flow rate ; 0.25ml/min., Absorbance at 280nm ; —,  $\beta$ -Galactosidase activity ; ○

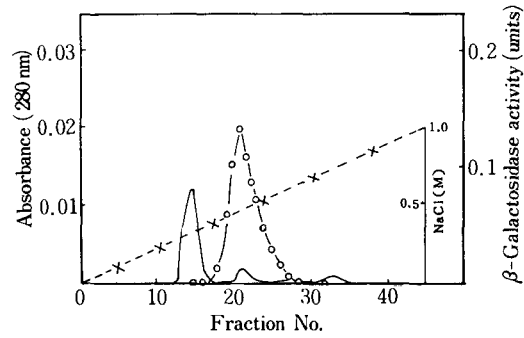


Fig. 2. Elution profile of  $\beta$ -galactosidase fraction from Sephacryl S-200 on CM-cellulose column. Column size ; 2.5 $\times$ 35cm, Flow rate ; 0.25ml/min., Absorbance at 280nm ; —, Buffer gradient ;  $\times$ --- $\times$ ,  $\beta$ -Galactosidase activity ; ○

2와 같다. 조효소액을  $(NH_4)_2SO_4$ 로 처리하였을 때 정제율은 1.15배 이었고, sephacryl S-200으로 gel여과한 비활성도는 32.86unit/mg-protein이었다. 이때 정제율과 회수율은 각각 10.33배, 57.80%이었다. 다시 CM-cellulose column으로 정제하였을 때 비활성도가 114.50unit/mg-protein로서 36.00배 정제되었으며, 이때 회수율은 41.95%이었다.

Gel 여과에 의해 분자량을 측정한 결과(Fig. 3),  $\beta$ -galactosidase의 분자량은 115,000 dalton이었다. Pressey<sup>12)</sup>는 토마토에서 분자량이 각각 144,000, 62,000, 71,000 daltons인 3종의  $\beta$ -galactosidase isoenzyme을 분리하였고, Ohtani와 Misaki<sup>19)</sup>는 papaya 열매의  $\beta$ -galactosidase 분자량은 156,000 dalton이며 2개의 subunit로 구성되어 있다고 하였다. 그리고 Takonishi 등<sup>20)</sup>은 *Penicillium multicolor*에서 126,000 dalton인  $\beta$ -galactosidase를 분리

Table 2. Summary of the purification of  $\beta$ -galactosidase extracted from soft persimmon fruits

Purification step	Total activity (units)	Protein content (mg)	Specific activity (units/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude extract	13.65	4.29	3.18	100.00	1.00
$(NH_4)_2SO_4$ treatment	12.65	3.46	3.66	92.72	1.15
Sephacryl S-200	7.89	0.24	32.86	57.80	10.33
CM-cellulose	5.73	0.05	114.50	41.95	36.00

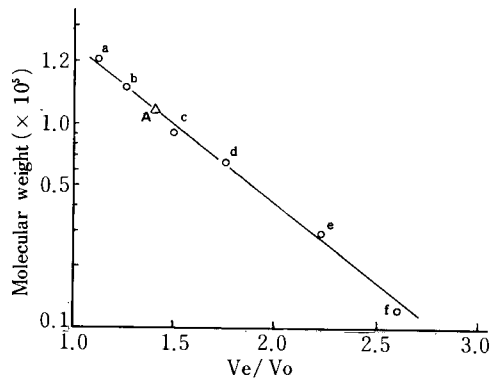


Fig. 3. Determination of molecular weight of  $\beta$ -galactosidase extracted from soft persimmon fruits by Sephacryl S-200 gel filtration.  $V_0$ : void volume,  $V_e$ : elution volume of each protein.  
 a:  $\beta$ -amylase(200,000), b: alcohol dehydrogenase(160,000)  
 c: phosphorylase b(94,000), d: albumin(66,000), e: carbonic anhydrase(29,000), f: cytochrome c(12,400).  
 A:  $\beta$ -galactosidase.

하였다.

#### 생화학적 특성

분리, 정제한  $\beta$ -galactosidase의 생화학적 특성을 조사하기 위하여 기질의 농도 pH 온도 반응 시간 등에 따른 활성의 변화와 열과 pH에 대한 안정성을 조사하였다.

$\beta$ -Galactosidase의 기질에 대한 특성을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다.  $\beta$ -Galactosidase는 *p*-nitro-

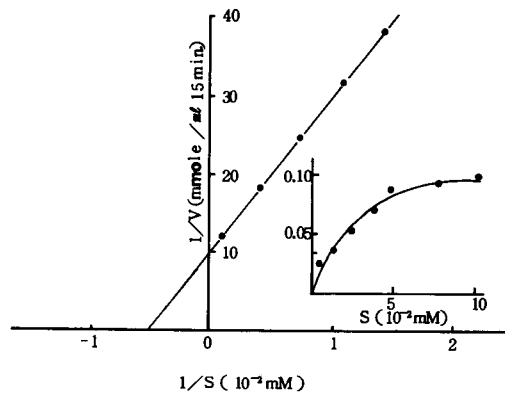


Fig. 4. Lineweaver-Burk plots of  $\beta$ -galactosidase extracted from soft persimmon fruits.

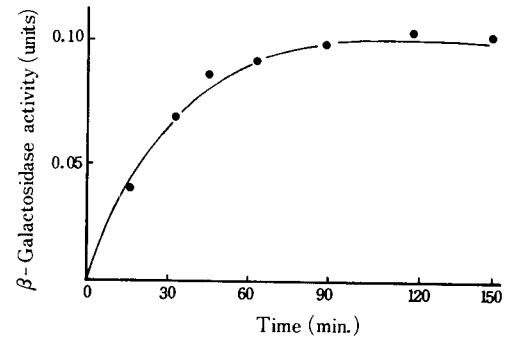


Fig. 5. Time course on the activities of  $\beta$ -galactosidase extracted from soft persimmon fruits.

phenyl- $\beta$ -galactoside를 기질로 하였을 때 반응속도는 기질의 농도가  $5 \times 10^{-5}M$ 까지 급격히 최대 활성을 나타내었다. 이때  $K_m$ 값은  $1.84 \times 10^{-2} mM$ 이었고  $V_{max}$ 는  $0.095 mmole p$ -nitrophenyl- $\beta$ -galactoside degraded/ml/15min.이었다.

$\beta$ -Galactosidase의 반응시간에 따른 활성변화를 측정된 결과는 Fig. 5와 같다.  $\beta$ -Galactosidase의 활성은 60분까지 급격히 증가한 후 90분에 최대 속도에 도달하였다.

Fig. 6은  $\beta$ -galactosidase의 pH에 따른 활성변화를 나타낸 것이다. 감의  $\beta$ -galactosidase의 최적 pH는 4.2이었고, pH 6.0이상에서는 거의 활성이 없었다. Gatt와 Baker<sup>18)</sup>는 상추잎에 존재하는  $\beta$ -galactosidase의 최적 pH는 4.2라고 하였으며, Pressey<sup>12)</sup>는 토마토의  $\beta$ -galactosidase의 최적 pH는 isoenzyme간에 다소의 차이가 있지만 pH 4.0~5.5이라고 보고하였으며 Papaya열매의 경우

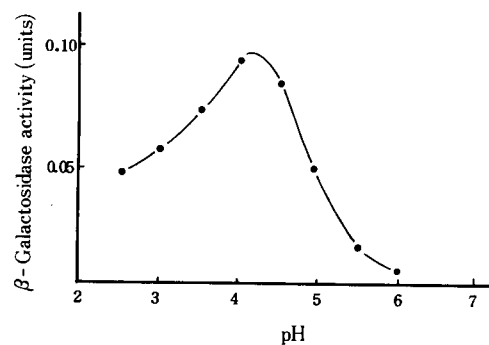


Fig. 6. Effects of pH on the activities of  $\beta$ -galactosidase extracted from soft persimmon fruits.

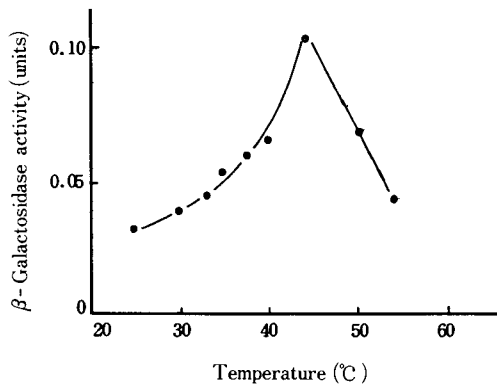


Fig. 7. Effects of temperature on the activities of  $\beta$ -galactosidase extracted from soft persimmon fruits.

pH 3.5~4.5<sup>19)</sup>, 미생물 *Penicillium multicolor*의 경우는 pH 4.0<sup>20)</sup>이라고 보고가 있다. 지금까지 보고되고 있는  $\beta$ -galactosidase 최적 pH는 시료에 따라 다소의 차이는 있지만 대개 pH 4~5 사이에 존재하며 감의  $\beta$ -galactosidase의 최적 pH도 유사함을 알 수 있다.  $\beta$ -galactosidase의 활성에 미치는 온도의 영향은 Fig. 7과 같으며  $\beta$ -galactosidase의 최적온도는 45°C이었다.

$\beta$ -Galactosidase의 pH에 대한 안정성을 조사한 결과는 Fig. 8과 같다.  $\beta$ -Galactosidase는 pH 3.0~6.0에서 안정하였으나 이후 서서히 활성이 떨어져서 pH 10.0에서 완전히 소실되었다.  $\beta$ -Galactosidase의 pH에 따른 안정성에 대한 연구보고를 보면 Ohtani와 Misaki<sup>19)</sup>는 papaya 열매의  $\beta$ -galac-

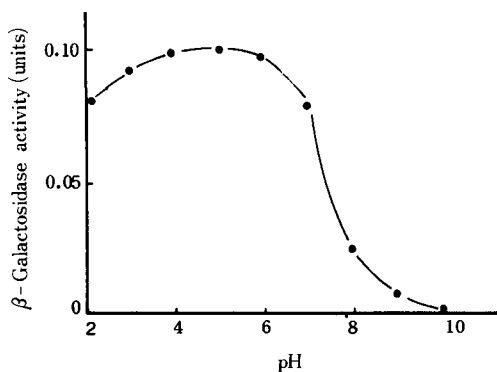


Fig. 8. Effects of pH on the stability of  $\beta$ -galactosidase extracted from soft persimmon fruits.

tosidase는 pH 4.0~9.0에서, Takenishi 등<sup>20)</sup>은 *Penicillium multicolor*의  $\beta$ -galactosidase는 pH 3.0~7.5에서 안정하다고 하였는데 이러한 결과는 감의  $\beta$ -galactosidase의 pH에 대한 안정성과는 다소의 차이가 있는 것으로 사료된다.

$\beta$ -Galactosidase의 열처리에 따른 안정성은 Fig. 9와 같다. 열처리에 대한  $\beta$ -galactosidase의 안정성은 40°C까지는 안정하였고 50°C에서는 활성이 50% 정도 소실되었다. Ohtani와 Misaki<sup>19)</sup>는 papaya 열매의  $\beta$ -galactosidase는 50°C까지는 안정하나 60°C에서 80%정도 70°C에서 완전히 소실된다고 보고하였는데 이는 본 연구의 결과와도 유사한

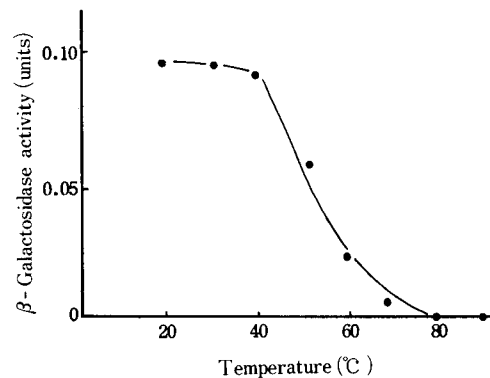


Fig. 9. Effect of heat treatment on the stability of  $\beta$ -Galactosidase extracted from soft persimmon fruits.

Table 3. Effects of various additives on the activities of  $\beta$ -galactosidase extracted from soft persimmon fruits

Additives	Final concentration (mM)	Relative activity(%)
		$\beta$ -Galactosidase
None	—	100.0
K <sup>-</sup>	1	84.6
Cu <sup>++</sup>	〃	90.4
Ca <sup>++</sup>	〃	100.0
Zn <sup>++</sup>	〃	80.7
Mg <sup>++</sup>	〃	103.0
SDS	〃	57.7
EDTA	〃	84.2

\*K<sup>+</sup> : K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Cu<sup>++</sup> : CuSO<sub>4</sub>, Ca : CaCl<sub>2</sub>, Zn<sup>++</sup> : ZnCl<sub>2</sub>, Mg<sup>++</sup> : MgCl<sub>2</sub>

경향이다. Pressey<sup>12)</sup>는 토마토의  $\beta$ -galactosidase는 50°C에서 5분간 열처리하였을 때 활성이 50% 소실된다고 하였으며 Gatt와 Baker<sup>19)</sup>는 상추잎의  $\beta$ -galactosidase는 30°C까지는 안정하나 55°C에서 활성이 80% 정도 소실된다고 하였다.  $\beta$ -Galactosidase의 열처리에 대한 안정성은 시료의 종류에 따라 다양하고 50°C이하에서는 비교적 안정한 것으로 사료된다.

Table 3은 금속이온과 EDTA, SDS가  $\beta$ -galactosidase의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과이다.  $\beta$ -Galactosidase는  $K^+$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Zn^{++}$ , EDTA에 10~20%, SDS에 42% 정도 저해 받았으나, Ca과 Mg은 저해작용이 없었다. Ohtani와 Misaki<sup>19)</sup>, Takenishi 등<sup>20)</sup>은  $Cu^{++}$ 과 SDS는  $\beta$ -galactosidase의 활성을 저해하는 반면  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $K^+$ ,  $Mn^{++}$ , EDTA와 염화금속이온은  $\beta$ -galactosidase의 활성에 영향을 주지 않는다고 보고하였다.

### 요 약

$\beta$ -Galactosidase는 미숙감에서는 활성이 없었으나, 완숙감과 연시에서 각각 21.79, 380.23 unit/100g-fr. wt.이었으며 연시에서 현저히 증가하였다.  $\beta$ -Galactosidase는 isoenzyme이 존재하지 않았고, 분자량은 115,000dalton이었다.  $\beta$ -Galactosidase의 Km값은  $1.84 \times 10^{-2}$ mM, Vmax는 0.095 mmole *p*-nitrophenyl- $\beta$ -galactoside degraded/ml/15min.이었고 최적 pH는 4.2, 최적온도는 45°C이었으며, 60°C에서 10분간 열처리하였을 때 활성이 50%소실되었다.  $\beta$ -Galactosidase의 활성에 SDS는 저해하였으나  $Mg^{++}$ 과  $Ca^{++}$ 은 영향을 주지않았다.

### 사 사

본 연구는 한국과학재단 1988년도 학술연구조성비지원(891-1508-062-2)에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며, 연구비를 지원하여 준 한국과학재단에 깊은 사의를 표하는 바이다.

### 문 헌

- Hobson, G. E. : Enzymes and texture changes during ripening. In : Friend, J. and Rhodes, M. J. C.(eds), Recent advances in the biochemistry of fruit and vegetables. Academic Press, London, p. 123(1981)
- Knee, M. and Bartley, I. M. : Composition and metabolism cell wall polysaccharides in ripening fruits. In : Friend, J. and Rhodes, M. J. C.(eds), Recent advances in the biochemistry of fruit and vegetable. Academic Press, London, p. 133(1980)
- Huber, D. J. : The role of cell wall hydrolases in fruit softening. *Horticultural Reviews* 5, 169 (1983)
- Pressey, R. : Enzymes involved in fruit softening. In : R. L. Ory and Angelo, A. St.(eds), Enzymes in food and beverage processing. ACS Symposium Series 47, p. 172(1977)
- Bartly, I. M. :  $\beta$ -Galactosidase activity in ripening apple. *Phytochemistry*, 13, 2107(1974)
- Gross, K. C. and Sams, C. E. : Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening : A species survey. *Phytochemistry*, 23(11), 22457(1984)
- Wallner, S. J. and Bloom, J. H. : Characteristics of tomato cell wall degradation in vitro. Implicaton for the study of fruit softening enzymes. *Plant Physiol.*, 60, 207(1977)
- Gross, K. C. and Wallner, S. J. : Degradation of cell wall polysaccharides during tomato fruit ripening. *Plant Physiol.*, 63, 117(1979)
- 신승렬, 김주남, 김순동, 김광수 : 감과실의 성숙과 추숙중의 세포벽 구성성분의 변화. *한국식품과학회지*, 22(6)(1990)
- 신승렬, 송준희, 김순동, 김광수 : 감과실의 성숙과 추숙중의 세포벽 다당류의 비섬유성 단당류의 변화 *한국식품과학회지*, 22(6)(1990)
- 신승렬, 김진구, 김순동, 김광수 : 감과실의 성숙과 추숙중의 polygalacturonase의 활성변화 및 특성. *한국영양식량학회지*, 9(6), 550 (1990)
- Pressey, R. :  $\beta$ -Galactosidase in ripening tomatoes *Plant Physiol.*, 71, 132(1983)
- Neveins, D. J. : elation of glycosidases to bean hypocotyl growth., *Plant Physiol.*, 46, 458 (1970)

14. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
16. Bartley, I. M. : A further study of  $\beta$ -galactosidase activity in apple ripening in storage. *J. Exper. Bot.*, **28**, 943(1977)
17. Knee, M., Sargent, J. A. and Osborne, D. J. : Cell wall metabolism in developing strawberry fruits. *J. Exper. Bot.*, **28**(103), 377-396 (1977)
18. Gatt, H. and Baker, E. A. : Purification and separation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidase from spinach leaves. *Biochem. Biophysiol. Act.*, **206**, 125(1970)
19. Ohtani, K. and Misaki, A. : Purification and characterization of  $\beta$ -D-galactosidase and  $\alpha$ -D-mannosidase from papaya(*Carica papaya*) seeds. *Agric. Biol. Chem.*, **47**(1), 2441(1983)
20. Takenishi, S., Watanabe, Y., Miwa, T. and Kobayashi, R. : Purification and some properties of  $\beta$ -galactosidase from *Penicillium multicolor*. *Agric. Biol. Chem.*, **47**(11), 2553(1983)

(1990년 9월 2일 접수)