

## 성게로부터 분리한 $\beta$ -galactosidase의 정제 및 특성

김규형 · 김용태\* · 김세권  
 부경대학교 화학과, \*日本 靑山學園大學 化學科

### Purification and Characterization of $\beta$ -Galactosidase from Sea Urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*

Gyu-Hyung KIM, Yong-Tae KIM\* and Se-Kwon KIM

Department of Chemistry, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

\*Department of Chemistry, College of Science & Engineering, Aoyama Gakuin University, Setagaya-ku, Tokyo 157, Japan

$\beta$ -Galactosidase was extracted from the internal organ of sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. The enzyme was purified 384.6-fold over the crude extract by the sequential chromatographic methods including DEAE-Sephadex A-25, CM-Cellulose, and Con A-Sepharose 4B affinity chromatography with a recovery 1.26%. The molecular weight of the purified enzyme was estimated approximately 94 kDa as monomeric form by SDS-PAGE and Sephadex G-150 gel chromatography. The maximum enzymatic activity was observed at pH 3.0 and 50°C, but the enzyme was stable over the pH range of 3.0~5.0 and below 37°C. The  $K_m$  and  $V_{max}$  values against PNPG (p-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside) were 15.0 mM and 214  $\mu$ mole/min per mg protein, respectively. The enzymatic activity was activated by  $Ba^{2+}$ , but significantly inhibited by DFP,  $Hg^{2+}$ ,  $Sn^{3+}$  and galactose.

Key words:  $\beta$ -galactosidase, sea urchin, purification, characterization, internal organ

#### 서 론

$\beta$ -Galactosidase는 이당류인 유당을 2단계 반응에 의하여 단당류인 glucose와 galactose로 가수분해하는 효소로 (Richard et al., 1995), 소장내에서 이 효소가 부족하면 유당을 분해하지 못하여 유당 소화장애증 (lactose intolerance)을 일으키게 된다. 뿐만 아니라 이 효소는 유제품에서 유당의 결정화 현상을 감소시켜 유제품의 품질을 향상시키는데도 이용된다 (Lisker et al., 1995; Young et al., 1980; Hourigan, 1984). 또한 이 효소는 과일의 숙성에 관여하기도 하고 (Kitagawa, 1995), 유전적으로 결핍되면 Krabbe disease 등의 유전병을 일으키기도 하면서 (Shigematsu, 1990) 생물의 성장과 분화에 크게 관여하고 있다.

이처럼  $\beta$ -galactosidase는 자연계에 널리 존재하는 효소로써 지금까지는 대부분 효모, 세균 등과 같은 미생물 유래의 것이 보고되어 왔으며 (Miyazaki, 1988; Gonzalez and Monsan, 1991; Nakao et al., 1994; Ohtsuka et al., 1990), 그 이외에 백합의 꽃가루, 양파 등과 같은 식물 (Singh and Knox; 1985, Kim et al., 1993)이나 소, 고양이 등과 같은 육상동물 (Hiraiwa et al., 1986; Homes and O'Brien, 1979) 유래의 효소도 일부 보고된 바 있다. 그러나 해양자원으로서 부터의 연구는 극히 미약하여 아직 보고된 것이 거의 없으며, Shigeta et al. (1991)이 보고한 우렁쟁이 (sea squirt, *Styela plicata*)로부터 정제한  $\beta$ -galactosidase 정도가 알려져 있을 뿐이다.

따라서 본 연구는 우리 나라 근해에 널리 분포하고 있는 말뚝성게 (sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*)의 내장으로부터  $\beta$ -galactosidase를 분리하여 그 생화학적 특성을 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 재 료

본 실험에 사용된 말뚝성게 (sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*)는 부산광역시 소재 자갈치시장에서 1997년 12월에 구입하여 드라이아이스 통에 담아 운반하여 즉시 내장을 분리하여 초저온 냉동고 (-70°C)에 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

효소 정제를 위하여 사용된 PNPG (p-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside), 분자량 측정용의 표준 단백질 (SDS electrophoresis 분자량 표준단백질, 겔여과용 분자량 표준단백질), DEAE-Sephadex A-25, CM-Cellulose, Con (Concanavalin) A-Sepharose 4B, methyl- $\alpha$ -glucoside 그리고 Sephadex G-150 등은 Sigma chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)의 제품을 이용하였다. 이 외의 분석에 사용된 시약은 시약용 특급품을 사용하였다.

##### 효소의 정제

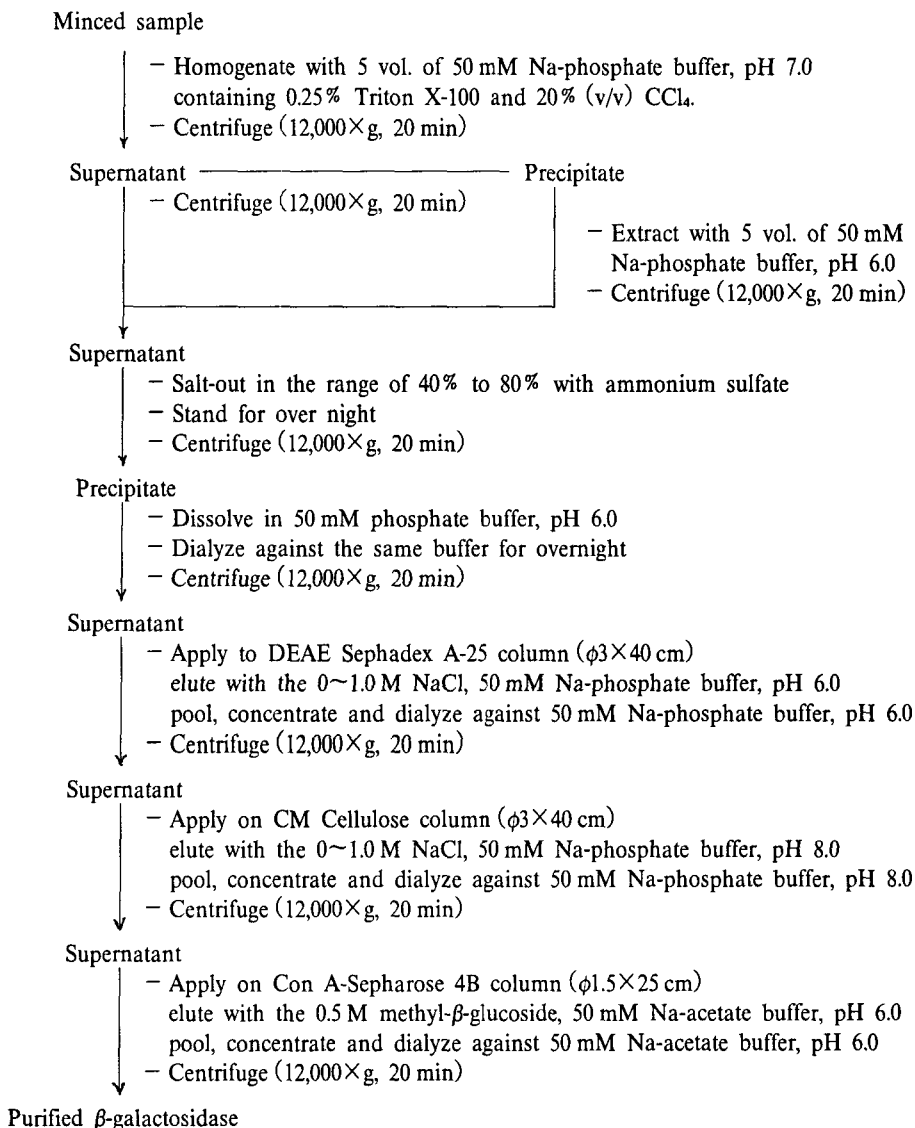
성게내장 중의  $\beta$ -galactosidase는 Kim et al. (1993)의

방법에 준하여 Scheme 1과 같은 방법으로 추출하였다.

즉, 동결된 상태의 성게내장을 저온실에서 완전히 해동시켜 0.25% Triton X-100이 함유된 50 mM sodium phosphate 완충용액 (pH 7.0)을 3배량 (w/v) 가하여 균질기 (NOHONSEIKI KAISHA LTD.)로 균질화 (10,000 × rpm, 2 min)한 후, 원심분리 (12,000 × g, 20 min)하였다. 상층액을 모은 다음 잔사를 다시 50 mM sodium phosphate 완충용액 (pH 6.0, 이하 A 완충용액이라 명명함)을 첨가하여 동일한 방법으로 상층액을 얻었다. 위의 두 상층액을 혼합한 후 지방을 제거하기 위해 20% (v/v)

의 CCl<sub>4</sub>를 첨가하고 균질화 (12,000 × g, 20 min)시킨 후, 이를 A 완충용액으로 24시간 투석하고 원심분리 (12,000 × g, 20 min)하여 냉동보관하여 정제를 위한 시료로 사용하였다.

이 조효소액으로 포화황산암모늄 염석을 실시하여 포화도 40~80%의 획분을 모아 최소량의 A 완충용액에 녹인 다음, 동일 완충 용액으로 24시간 투석하고, 불용성의 물질은 원심분리 (12,000 × g, 20 min)하여 제거하였다. 조효소의 염석 획분은 미리 A 완충용액 (pH 6.0)으로 평형화시킨 DEAE-Sephadex A-25 column (φ3 × 40 cm)



Scheme 1. Schematic flow chart for purification of β-galactosidase from sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*

에 주입시켜 흡착시키고 동일 완충용액을 충분히 흘려 비흡착 부분을 제거한 후, A 완충용액에 NaCl을 가해 농도가 0~1.0M이 되도록 선형상농도구배법으로 분별용출(유속: 0.5 ml/min, 수집량: 7 ml) 시켰고, 얻어진 획분을 질소압력농축기(Ultra-membrane filterator, SATO-RIUS Co., MW 10 kDa)로 농축하여 A 완충용액으로 24시간 투석한 후에 원심분리(12,000×g, 20 min)하였다.

여기에서 활성을 보이는 획분은 다음 단계로 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 8.0, 이하 B 완충용액이라 명명함)으로 평형화시킨 CM-Cellulose column( $\phi$ 3×40 cm)에 재차 주입하여 앞서와 동일한 과정으로 진행시키고, 용출은 B 완충용액에 NaCl을 가하여 농도가 0~1.0M이 되도록 선형상농도구배법으로 분별용출(유속: 0.5 ml/min, 수집량: 5 ml)시킨 후, 얻어진 획분을 농축하여 24시간 투석하고 원심분리(12,000×g, 20 min)하였다. 여기서 활성이 나타난 획분을 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>와 0.5 mM NaN<sub>3</sub>를 포함하고 있는 50 mM sodium acetate 완충용액(pH 6.0)으로 평형화시킨 Con A-Sepharose 4B affinity column( $\phi$ 1.5×25 cm)에 주입시켜 흡착되지 않은 부분을 용출(유속: 0.5 ml/min, 수집량: 3 ml)시킨 후, 0.5 M methyl- $\beta$ -glucoside 용액으로 용출시켜  $\beta$ -galactosidase의 활성이 높은 획분을 확인하였으며, 이 획분을 농축하고 24시간 투석한 후, 원심분리(12,000×g, 20 min)하였다.

이상의 과정으로 정제한 효소를 -40°C 이하에 보관하면서 정제 효소의 특성실험에 사용하였다.

#### 효소활성의 측정

$\beta$ -Galactosidase의 활성은 Tulsiani et al. (1995)의 방법을 수정하여 PNPG를 기질로 하여 측정하였다. 즉 0.1 M citrate-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 완충용액(pH 4.0)에 PNPG를 5 mM이 되도록 용해한 기질용액 2 ml를 적절히 희석한 효소액 0.5 ml를 가하고, 37°C에서 20분간 반응시킨 후 급냉시키면서 냉각된 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 2.5 ml를 가하여 반응을 정지시킨 다음, 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성의 단위는 위의 조건에서 1분 동안에 1  $\mu$ mol의 PNPG를 유리시키는데 필요한 효소량을 1 unit으로 정의하였다.

#### 단백질의 정량

단백질의 정량은 Lowry et al. (1951)의 방법에 의해 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 정량하였다. Chromatography의 실험시 용출되는 단백질은 280 nm에서의 흡광도를 이용하여 측정하였다.

#### 분자량의 측정

정제된 효소의 분자량은 Laemmli (1970)와 Bollag and Edelsrein (1991)의 방법을 응용하여 9.5% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 사용하여 측정하였다. 표준 단백질로는  $\beta$ -galactosidase(116 kDa), fructose-6-phosphate kinase(84 kDa), pyruvate kinase(58 kDa), ovalbumin(45 kDa), lactic dehydrogenase(36.5 kDa)와 triosephosphate isomerase(26.6 kDa) 등을 사용하였다.

겔여과를 이용한 분자량의 측정은 50mM sodium phosphate 완충용액(pH 6.0)으로 평형화시킨 Sephadex G-150 column( $\phi$ 1.5×80 cm)에서 행하였으며, 표준 단백질로는 amylase(200 kDa), alcohol dehydrogenase(150 kDa), bovine serum albumin(66 kDa)과 carbonic anhydrase(29 kDa)를 이용하였다.

#### pH와 온도의 영향

표준 조건에서 pH 변화에 따른 정제효소의 영향을 알아보기 위해 0.1 M glycine/HCl 완충용액(pH 2~3), 0.1 M sodium citrate 완충용액(pH 3~6), 0.1 M sodium phosphate 완충용액(pH 6~8), 0.1 M Tris/HCl 완충용액(pH 8~9)과 같이 다양한 범위의 pH를 사용하여(Dawson et al., 1986), 효소액을 37°C에서 20분간 반응시켜  $\beta$ -galactosidase의 활성을 조사하였다. 또한 pH의 안정성을 알아보기 위하여 다양한 pH에 용해된 효소용액을 1시간 정지시킨 후 잔존활성을 측정하였다.

온도 변화에 따른 정제효소의 영향은 효소를 30~60°C 사이의 온도에서 0.1 M citrate-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH 4.0) 완충용액으로 20분간 반응시킨 후, 남아 있는 활성을 측정하여 조사하였다.

#### 금속이온과 저해제의 영향

무기금속 이온과 저해제가 정제효소의 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 무기금속 이온은 각각의 최종농도가 5 mM이 되도록 첨가하여 50°C에서 0.1 M citrate-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH 4.0) 완충용액을 사용하여 활성을 측정하였다. 저해제는 최종농도가 각각 1 mM이 되도록 첨가하여 동일조건에서 활성을 측정하였다.

#### K<sub>m</sub>과 V<sub>max</sub>

정제효소에 대한 속도상수(K<sub>m</sub>, V<sub>max</sub>)를 결정하기 위하여 PNPG를 기질로 사용하여 조사하였다. 즉, 50°C, 0.1 M citrate-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH 4.0) 완충용액을 사용하여 기질농도 0.01~20 mM의 범위에서 반응속도를 측정하여 Lineweaver-Burk plot으로 K<sub>m</sub>과 V<sub>max</sub>를 측정하였다.

결과 및 고찰

$\beta$ -Galactosidase의 정제

성게의 내장에서 추출한 조효소액을 포화도 40~80%로 포화황산암모늄 염석을 실시하여 획분을 모아 투석하였고, 그 투석액을 50 mM sodium phosphate 완충용액 (pH 6.0)으로 평형화시킨 DEAE-Sephadex A-25 column ( $\phi 3 \times 40$  cm)에 주입하여 0~1.0 M NaCl을 함유하는 완충액으로 선형상농도구배법으로 용리 (유속: 0.5 ml/min, 수집량: 7 ml)시킨 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 이 단계에서  $\beta$ -galactosidase의 활성을 나타내는 획분 (13~31)을 분리하였으며, 이 획분을 다시 농축, 투석하여 50 mM sodium phosphate 완충용액 (pH 8.0)으로 평형화시킨 CM-Cellulose column ( $\phi 3 \times 40$  cm) 0~1.0 M NaCl을 사용하여 농도구배법으로 용리시킨 결과 (Fig. 2), 높은 활성을 갖는 획분 (64~88)을 분리할 수 있었다.

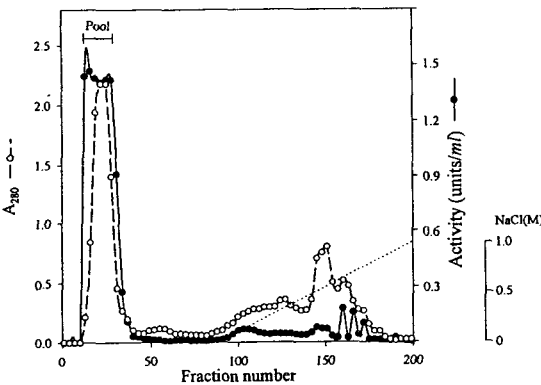


Fig. 1. The elution profile of DEAE Sephadex A-25 chromatography.

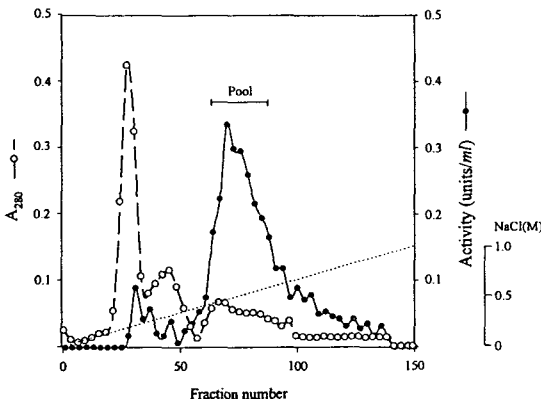


Fig. 2. The elution profile of CM-Cellulose chromatography.

이 획분만을 모아서 다시 농축, 투석하여 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>와 0.5 mM NaN<sub>3</sub>를 포함하고 있는 50 mM sodium acetate 완충용액 (pH 6.0)으로 평형화시킨 Con A-Sepharose 4B affinity column 크로마토그래피하여 0.5 M methyl- $\alpha$ -glucoside로 용리시킨 결과 (Fig. 3), 높은 활성을 나타내는 획분 (22~28)을 얻었고, 전기이동 결과 하나의 단일한 단백질로 정제되었음을 알 수 있었다.

이상의 정제과정을 요약한 결과를 Table 1에 나타내었다. 정제된  $\beta$ -galactosidase는 조효소에 비해 약 384.6배 정제되었고, 회수율은 1.26%로 매우 낮은 회수율을 보였다. 이와는 대조적으로 같은 해양 생물인 우렁쉥이 (Shigeta et al., 1991)의 회수율과 정제도는 18%와 952배로 나타나 성게 내장의 효소 보다 상대적으로 높은 회수율과 정제도로 정제되었음을 알 수 있었다. 그러나 일반적으로 동식물 유래의  $\beta$ -galactosidase들은 조직내에 많은 효소들을 포함하고 있어, 효소생산을 인위적으로 유도시킨 미생물에 비해 정제가 어려우며 회수율도 10% 이하로 낮은 것으로 알려져 있다 (Kuo and Wells, 1978; Kim et al., 1993; Tulsiani et al., 1995).

효소의 분자량

정제된  $\beta$ -galactosidase를 9.5% SDS-PAGE를 이용하여 분자량을 측정된 결과, 97 kDa의 분자량을 갖는 하나의 polypeptide로 밝혀졌다 (Fig. 4). 또한 Sephadex G-150 겔여과를 사용한 분자량의 측정에서도 정제효소의 분자량이 97 kDa로 나타나, 두 실험의 결과가 일치함을 보여주었다. 성게 내장 유래  $\beta$ -galactosidase의 분자량은 해양생물인 우렁쉥이 (Shigeta et al., 1991)의 것과 비교했을 때 약 20 kDa 더 큰 것으로 나타났으며, Tulsiani

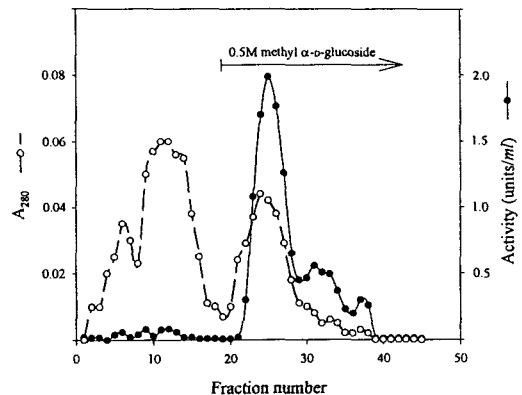


Fig. 3. The elution profile of Con-A Sepharose 4B affinity chromatography.

Table 1. Summary of purification of  $\beta$ -galactosidase from sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*

step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	6,086	546,644	89.8	1.0	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ppt. (40~80%)	1,173	369,378	314.9	3.5	67.57
DEAE-Sephadex A-25	33.8	160,713	4,755	53.0	29.40
CM-Cellulose	0.7	38,262	29,432	327.8	7.00
Con A-Sepharose 4B	0.2	6,907	34,535	384.6	1.26

있었으며 (Shigeta et al., 1991), 또한 green onion (Kim et al., 1993), sweet cherry (Andrews and Shulin, 1994), Japanese pear 등의 식물 유래  $\beta$ -galactosidase와 rat의 epididymal luminal fluid (Tulsiani et al., 1995)와 같은 동물 유래의  $\beta$ -galactosidase가 이와 유사하게 1개의 단위체를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 미생물 유래의  $\beta$ -galactosidase는 2~4개의 단위체를 갖는 것들이 많이 알려져 있으며 (Miyazaki, 1988; Ohtsuka et al., 1990; Kang, 1991), 육상동물에서 추출한  $\beta$ -galactosidase는 여러 개의 단위체를 가진 isoenzyme의 형태로 된 것이 보고되어 있다 (Kuo and Wells, 1978; Homes and O'Brien, 1979; Hiraiwa et al., 1986). 이 외에도 galactosyl transferase의 활성을 함께 가지고 있는  $\beta$ -galactosidase도 있다 (Kuo and Wells, 1978; Ohtsuka et al., 1990).

pH와 온도의 영향

정제된  $\beta$ -galactosidase에 대해 다양한 pH에서 그 영향을 조사한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 정제효소는 Gonzalez and Monsan (1991)에 의해 보고된 *Aspergillus fonsecaeus*의  $\beta$ -galactosidase에서 처럼 pH 3.0에서 최대의 효소활성을 나타내었다.

또한 반응시간 동안 각 pH에서의 효소활성에 대한 안정성을 조사하기 위하여 pH 2~8 사이의 완충용액에 사용된 효소액을 37°C에서 1시간동안 정치시킨 후 남아 있는 효소활성을 측정해 본 결과, 성체 내장 유래의 효소는 37°C, pH 3~4 사이에서 1시간의 반응시간에도 불구하고 95% 이상의 활성을 유지하였고, pH 5에서도 약 80%의 활성을 나타내었다. 그러나 pH 2 이하 및 pH 6 이상에서는 활성이 급속히 감소함을 나타내었다. 정제효소의 활성이 산성 pH에서 높다는 것은 이미 보고된 Kuo and Wells (1978)의 rat 유선 (mammary gland) 유래  $\beta$ -galactosidase와 거의 일치하였으며, 성체 내장 효소의 이러한 최적 pH와 pH 안정성은 같은 해양생물인 우렁쟁이에서 추출한  $\beta$ -galactosidase의 최적 pH인 4.0와 매우 유사하였는데 (Shigeta et al., 1991), 이는 해양생물 유래의  $\beta$ -galactosidase가 산성 pH에서 최적의 활성을 나타냄을

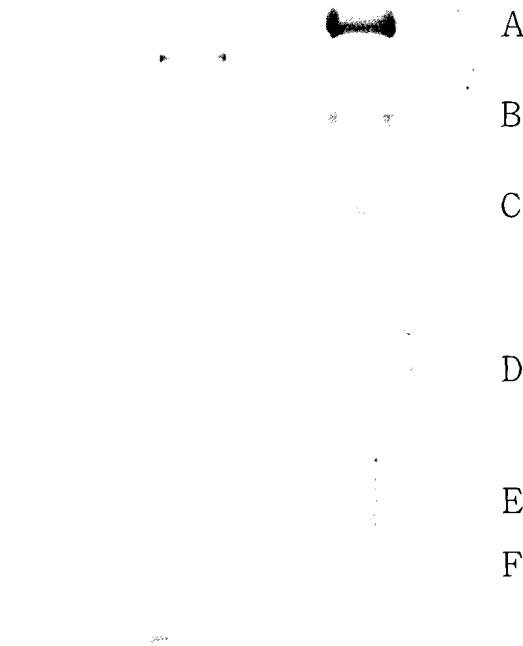


Fig. 4. Estimation of molecular weight of the  $\beta$ -galactosidase from the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus* by SDS-PAGE electrophoresis on 9.5% gels.

A;  $\beta$ -galactosidase (116kDa), B; fructose-6-phosphate kinase (84kDa), C; pyruvate kinase (58kDa), D; ovalbumin (45kDa), E; lactic dehydrogenase (36.5 kDa), F; triose-phosphate isomerase (26.4kDa).

et al. (1995)에 의해 보고된 쥐의 부고환 (epididymis) 유래의  $\beta$ -galactosidase와는 거의 유사한 분자량을 알 수 있었다.

또한 성체 유래의  $\beta$ -galactosidase는 해양 생물인 우렁쟁이 유래의 효소처럼 1개의 단위체 (subunit)를 가지고

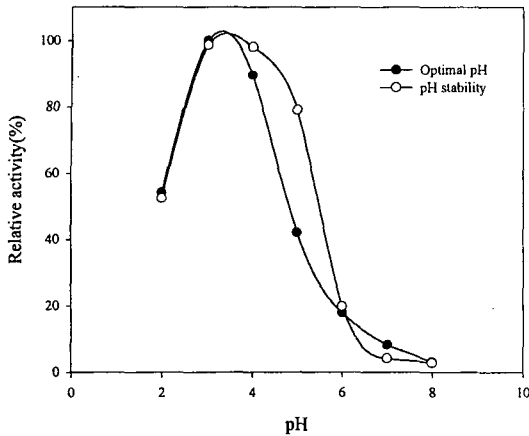


Fig. 5. Dependencies on pH and pH stability of the purified  $\beta$ -galactosidase from sea urchin, *Hemacentrotus pulcherrimus*. The enzyme was incubated in the designated buffers for 1 hour and the residual activity was determined.

보여주는 것이었다. 또한 Kim et al. (1993) 및 Andrews and Shulin (1994)이 보고한 green onion과 sweet cherry 등의 식물이나, Hiraiwa et al. (1986), Homes and O'Brien (1979)과 Tulsiani et al. (1995)이 보고한 소의 간, feline의 간, rat의 epididymal luminal fluid 등의 동물에서 정제한 것들도 대부분 높은 산성 pH에서 최적 활성을 나타내며, pH 3~5 범위에서 안정성을 갖는 산성  $\beta$ -galactosidase임을 알 수 있었다. 그러나 Choi et al. (1995)은 *Bacillus* sp. TA-11 유래의  $\beta$ -galactosidase는 pH 7~11의 알칼리 조건에서도 80% 이상의 활성을 유지한 것도 있으며, Ohtsuka et al. (1990)이 *Cryptococcus laurentii* OKN-4에서 추출한 정제효소는 최적 pH가 2.8~9.3으로 산성에서 알칼리성의 전범위에 걸쳐 pH에 대해 안전성이 있음을 나타내었다.

정제효소의 온도에 대한 영향을 조사하기 위하여 0.1 M citrate- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 4.0)에 용해한 효소를 30~60°C 사이의 다양한 온도에서 20분간 반응시켜 활성을 측정 한 결과 (Fig. 6), 효소의 활성은 온도가 상승함에 따라 급격하게 증가하여 50°C에서 최대값을 나타내었으나 그 이상의 온도에서는 급격하게 감소하는 것으로 나타났다. 이는 green onion (Kim et al., 1993), *Cryptococcus laurentii* OKN-4 (Ohtsuka et al., 1990), *Bacillus* sp. TA-11 유래의  $\beta$ -galactosidase와 유사한 결과를 나타내었다.

#### 금속이온과 저해제의 영향

여러 가지 금속이온들과 킬레이트제 및 기타성분들이 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 성분의

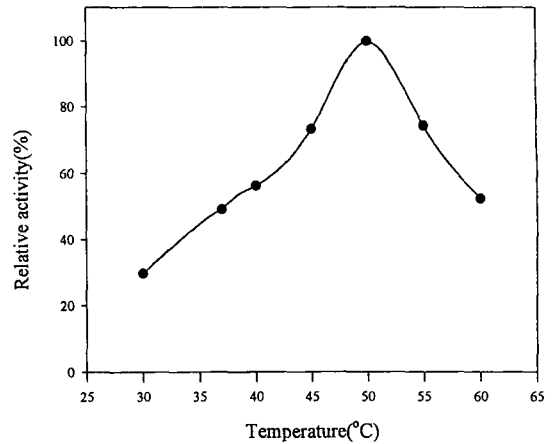


Fig. 6. Dependencies on various temperature of the purified  $\beta$ -galactosidase from sea urchin, *Hemacentrotus pulcherrimus*.

농도는 5 mM로, 저해제의 농도는 1 mM로 하여 그 영향을 조사하여 그 결과를 Table 2에 나타내었다.

금속이온들 중  $\text{Ba}^{2+}$ 는 효소의 활성을 2배 정도 증가시킨 것으로 나타났는데 이는 쥐의 유선에서 분리한  $\beta$ -galactosidase와 유사한 결과였다 (Kuo and Wells, 1978). EDTA와 같은 킬레이트제나  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  등의 금속이온들은 효소활성에 크게 영향을 나타내지 않은 반면,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ 과 같은 금속이온들과 DFP (diisopropyl fluorophosphate)는 효소활성을 크게 감소시키는 것으로 나타났다. 특히 Hg와 DFP의 경우에는 거의 활성이 나타나지 않는 것으로 보아 효소의 활성중심에 serine 잔기가 관여하고 있는 것을 알 수 있었다 (Shigeta et al., 1991).

또한 다양한 탄수화물 기질이 정제효소에 미치는 영향을 조사해 본 결과 정제효소는 Singh et al. (1985) 및 Choi et al. (1995)이 liliun pollen과 *Bacillus* sp. TA-11에서 보인 것과 같이 galactose에 대해 경쟁적인 저해의 양상을 나타내었다. 그러나 glucose 및 다른 단당류에 대해서는 별다른 효과를 나타내지 않았다. 또 Lactose, sucrose 등과 같은 이당류에 대해 동일한 실험을 실시한 결과 lactose 만이 저해효과를 나타내었다. Galactose가 lactose 보다 큰 저해활성을 갖는 것은 활성부위에 결합하는 친화력이 galactose가 크기 때문이다 (Choi et al., 1995).

#### $K_m$ 과 $V_{max}$

기질농도에 따른 반응속도를 Lineweaver-Bulk plot을 이용하여 Michaelis-Menten 상수 ( $K_m$ )와 최대반응속도

**Table 2.** Effect of the activators and inhibitors on  $\beta$ -galactosidase activity purified from sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*<sup>1</sup>

Materials	Concentration (mM)	Relative activity (%)	Materials	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Control	5	100.0	EDTA	1	98.4
Na <sup>+</sup>	5	99.6	DFP <sup>2</sup>	1	1.4
Mg <sup>2+</sup>	5	90.4	Galactose	5	54.8
Ca <sup>2+</sup>	5	57.4	Glucose	5	89.3
Cu <sup>2+</sup>	5	96.6	Fructose	5	95.9
Ba <sup>2+</sup>	5	171.2	Sucrose	5	108.7
Sn <sup>2+</sup>	5	28.0	Lactose	5	77.9
Hg <sup>2+</sup>	5	0.0	Glucosamine	5	101.1

<sup>1</sup>All of the cations were added as chlorides, except Cu<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup>, which were added as sulfates. The enzyme solutions containing cations and inhibitors were preincubated at 40°C for 30 min and the residual activity was measured.

<sup>2</sup>DFP : diisopropyl fluorophosphate

(V<sub>max</sub>)를 측정하여 Fig. 7에 나타내었다. 정제효소의 경우 기질로 PNPg를 사용한 경우 K<sub>m</sub>은 15.0 mM, V<sub>max</sub>는 214 μmol/min · mg · protein으로 나타났다. 이는 Choi et al. (1995)이 보고한 *Bacillus* sp. TA-11과는 유사한 값을 나타내었지만, 우렁쟁이와 소의 간에서 유래한  $\beta$ -galactosidase의 K<sub>m</sub> 값인 1.85 및 0.2 mM 보다는 높게 나타나 기질에 대한 친화력이 다소 낮은 것을 알 수 있었다. 그렇지만, V<sub>max</sub>의 값은 추출된 다른 효소들과 유사한 값을 나타내었다 (Miyazaki, 1988; Nakao et al., 1994; Singh and Knox, 1985; Shigeta et al., 1991).

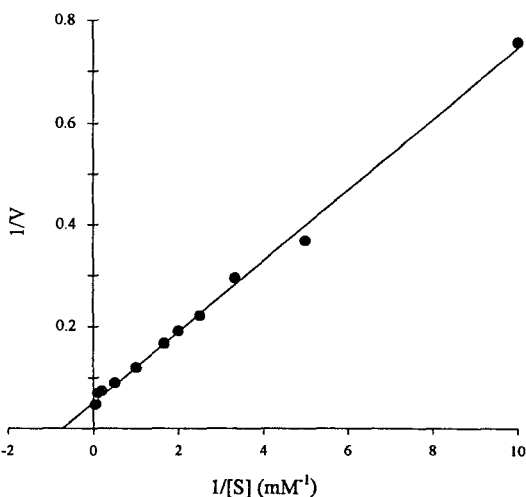
요 약

우리 나라 근해에 많이 분포하고 있는 말뚝성게 (sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*)의 내장으로부터 Triton X-100을 이용하여  $\beta$ -galactosidase를 추출하고, 40~80% (w/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, DEAE-Sephadex A-25 및 CM-Cellulose 이온교환 크로마토그래피, Con A-Sepharose 4B 친화성 크로마토그래피를 사용하여 분리, 정제하여 그 생화학적 특성을 조사한 결과는 다음과 같다.

정제된  $\beta$ -galactosidase는 단일의 단백질로 이루어진 효소로 판명되었고, 효소의 정제도는 조효소에 비해 384.6배 증가하였고, 수율은 1.26%이었다. 정제효소의 최적 pH와 온도는 각각 3.0 및 50°C 이었다. 효소의 활성은 Ba<sup>2+</sup>와 같은 금속이온에 의해 촉진되었고, Hg<sup>2+</sup>, Sn<sup>2+</sup> 및 DFP에 의해 현저하게 저하되었으며, 당인 galactose와 lactose에 의해 저하되어 기질 저해 효과가 나타남을 알 수 있었다. 효소의 분자량은 SDS-PAG 전기이동과 Sephadex G-150 겔여과를 실시한 결과 97 kDa로 나타났다. 합성기질인 PNPg를 사용하여 효소의 속도론적 상수를 측정된 결과 K<sub>m</sub>은 15.0 mM, V<sub>max</sub>는 214 μmol/min · mg · protein으로 나타났다.

참 고 문 헌

Andrews, P.K. and L. Shulin. 1994. Partial purification and characterization of  $\beta$ -D-galactosidase from sweet cherry, a nonclimacteric fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2177~2182.  
 Bollag, D.M. and S.J. Edelsrein. 1991. *Protein methods*, Wiley-Liss, 46~49.



**Fig. 7.** Lineweaver-Burk plot for the determination of the Michaelis-Menten constant on the purified enzyme using p-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside as substrate.

- Choi, Y.J., I.H. Kim, B.H. Lee, and J.S. Lee. 1995. Purification and characterization of  $\beta$ -galactosidase from alkalophilic and thermophilic *Bacillus* sp. TA-11. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 22, 191~201.
- Dawson, R.M.C., D.C. Elliott, H.W. Elliott, and K.M. Jones. 1986. Data for biochemical research. 3rd. ed., Oxford university press, 426~439.
- Gonzalez, R.R. and P. Monsan. 1991. Purification and some characteristics of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus fonsecaeus*. *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 349~352.
- Hiraiwa, M., T. Shiraishi, and Y. Uda. 1986. Multiplicity of bovine liver GM1 ganglioside  $\beta$ -galactosidase. *J. Biochem.*, 100, 255~258.
- Homes, E.W. and J.S. O'Brien. 1979. Purification and properties of acid  $\beta$ -galactosidase from feline liver. *J. Am. Chem. Soc.*, 18 (6), 952~958.
- Hourigan, J.A. 1984. Nutritional Implications of lactose. *Austral. J. Dairy Technol.*, 39, 114~120.
- Kang, K.H., H.K. Min, H.K. Yi, and Y.H. Jang. 1991. Production, purification and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Bifidobacterium longum* KCTC 3215. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19 (5), 456~463 (in Korean).
- Kim, S.K., H.G. Byun, K.D. Choi, H.S. Roh, W.H. Lee, E.H. Lee. 1993. Removal of skin from filefish using enzymes. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 26 (2), 159~172 (in Korean).
- Kim, Y.S., K.S. Park, and J.S. Kim. 1993. Purification and characterization of  $\beta$ -galactosidase from green onion. *Korean Biochem. J.*, 26 (7), 602~608.
- Kitagawa, Y., Y. Kanayama, and S. Yamaki. 1995. Isolation of  $\beta$ -galactosidase fractions from Japanese pear: Activity against native cell wall polysaccharides. *Physiol. Plan.*, 93, 545~550.
- Kuo, C-H. and W.W. Wells. 1978.  $\beta$ -Galactosidase from rat mammary gland. *J. Biol. Chem.* 253 (10), 3550~3556.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680~685.
- Lisker, R., L. Auguilar, I. Lares, and J. Caravioto. 1980. Double blind study of milk lactose intolerance in a group of rural and urban children. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33, 1049~1053.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265~275.
- Miyazaki, Y. 1988. Purification, characterization, and properties of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus macerans*. *Agric. Biol. Chem.*, 52 (3), 625~631.
- Nakao, M., M. Harada, Y. Kodama, T. Nakayama, Y. Shibano, and T. Amachi. 1994. Purification and characterization of thermostable  $\beta$ -galactosidase with high trans-galactosylation activity from *Saccharopolyspora rectivirgula*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 657~663.
- Ohtsuka, K., A. Tanoh, T. Kanematsu, T. Uchida, and T. Shinke. 1990. Purification and properties of a  $\beta$ -galactosidase with high galactosyltransfer activity from *Cryptococcus laurentii* OKN-4. *J. of Ferment. and Bioeng.*, 70 (5), 301~307.
- Richard, J.P., J.G. Westerfeld, and S. Lin. 1995. Structure-reactivity relationships for  $\beta$ -galactosidase (*Escherichia coli*, lac Z). 1. Brønsted parameters for cleavage of alkyl  $\beta$ -D-galactopyranosides. *Biochem.*, 34, 11703~11712.
- Shigematsu, H., S. Morimoto, Y. Kishimoto, S. Wiler, J. Tomichi, J. Baranger, M. Shinohara, A.M. Yeanger, and J.S. O'Brien. 1990. Saposins (spingolipid activator proteins) in the twitcher mutant mouse. *J. Neurochem.* 55 (5), 1659~1662.
- Shigeta, S., K. Ono, and S. Oka. 1991. Purification and characterization of a Sea Squirt  $\beta$ -galactosidase. *J. Biochem.*, 110, 134~140.
- Singh, M.B. and R.B. Knox. 1985.  $\beta$ -Galactosidases of lily pollen. *Phytochem.*, Kuo and Wells, 1978 (8), 1639~1643.
- Tulsiani, D.R.P., M.D. Skudlarek, Y. Araki, and M-C. Orgebin-Crist. 1995. Purification and characterization of two forms of  $\beta$ -galactosidase from epididymal luminal fluid: evidence for their role in the modification of sperm plasma membrane glycoprotein (s). *Biochem. J.*, 305, 41~50.
- Young, C.K., J.W. Stull, R.R. Taylor, R.C. Angus, and T.C. Daniel. 1980. Acceptability of frozen desserts made with neutralized, hydrolyzed, fluid cottage cheese whey. *J. Food Sci.*, 45, 805~808.

---

1998년 5월 13일 접수

1998년 8월 28일 수리