

β - galactosidase의 構造와 物理化學的 性質

韓國放送通信大學 安 鍾 健

서울대학교 農科大學 金 顯 旭*
乳加工學·酪農微生物學 研究室

I. 緒 論

β - galactosidase(β -D-galactoside galactohydrolyase)(EC. 3. 2. 1. 23)은 乳糖의 β -1, 4 glycosidic linkage를 분해하여 單糖類인 glucose와 galactose를 生産하는 酵素이다.

乳糖은 牛乳의 主炭水化合物이나 小腸에 이것을 分解할 수 있는 β -galactosidase가 부족할 때에는 섭취된 乳糖은 모두 單糖類로 分解되지 못하며 분해되지 못한 乳糖은 大腸으로 이행되어 腹部鼓脹, 腹鳴, 痙攣, 泄瀉等を 일으키며, 냉동유제품과 농축유제품에서는 직경 $10\mu\text{m}$ 이상의 結晶을 형성하며 나쁜조직의 원인이 된다. 이러한 문제점을 각각 乳糖消化障礙, 乳糖結晶에 의한 Sandiness라 하며 乳糖을 乳糖分解酵素인 β -galactosidase로 분해 함으로서 해결할 수 있다. 乳糖이 乳製品에서 가지는 이러한 問題點들을 해결하기 위하여 β -galactosidase에 관한 研究가 많이 수행되었으며 實用性있는 酵素生産源과 실제적 응용에 관한 β -galactosidase의 여러가지 特性이 종합, 보고된 바 있다⁷⁶.

β -galactosidase가 乳糖을 分解하는데 關여하는 生化學的 性質은 酵素生産源에 따라 相異할 뿐만 아니라 반응에 주어진 條件에 따라서 다를 수 있다. 이는 乳糖을 分解하여 glucose와 galactose를 生成하는 공통점을 가지고 있기는 하나 酵素의 구조가 다르기 때문이다. β -galactosidase를 근본적으로 이해하기 위해서는 이러한 구조적 특성과 그에 따른 反應原理를 규명해야 한다.

本 總說에서 여러가지 生産源으로 부터의 β -galactosidase의 구조적 특성, 반응양상, 물리화학적 성질 등에 관한 研究를 綜合 하고자 한다.

II. β - galactosidase의 構造

精製된 β -galactosidase의 構造의 特性이 modification(16, 17, 18, 19), 超遠心分離(2, 5, 10, 28, 51, 68), 전자현미경(8) 등의 方法으로 연구되었다. 이러한 特性은 β -galactosidase의 生産源에 따라 차이가 있으며 *Escherichia coli*의 β -galactosidase에 對하여는 1972년 Wallenfels와 Weil(68)에 의하여 綜合보고 되었다.

*Escherichia coli*의 β -galactosidase는 요소(53, 57, 73), mercaptoethanol, ethanolamine(53, 54) 등에 의해 同一한 4개의 subunit로 分離될 수 있는 tetramer이다. steer等(56)도 *Escherichia coli* K-12가 生産한 β -galactosidase의 cysteine을 carbonyl化 하고 pH12와 pH7.5의 70% formic acid에서 분리하여 이 酵素가 2개 이상의 polypeptide로 구성되어 있음을 증명하였다. 이러한 사실은 전자현미경에 의하여 確認된 바 있으며 4개의 subunit가 4군데의 corner에 배열되어 있고 크기는 $120\text{Å} \times 70\text{Å}$ 이었다¹⁴. *Kluyveromyces fragilis*의 β -galactosidase도 초원심분리에 의하여 4개의 subunit로 분리되었다³⁸. 그러나 *Aspergillus oryzae*⁴⁷와 *Streptococcus lactis*⁴⁶의 β -galactosidase는 dimer이고 *Aspergillus oryzae*⁴⁷의 β -galactosidase는 glucosamine과 中性炭水化合物을 함유한다고 보고 되었다⁴⁷.

*Escherichia coli*의 β -galactosidase는 tetramer 상태에서만 活性이 있었으나^{52, 72} trypsin에 의해서 몇개의 分節로 분해 되었을 때에는 원래의 活性을 그대로 보존 하였다¹¹. *Kluyveromyces fragilis*의 β -galactosidase도 tetramer일때에만 活性이 있었고 MgCl_2 存在下에서는 subunit도 活性을 나

타내었다³⁶⁾. 사람의 肝에서 發見된 β -galactosidase는 dimer일때에는 活性이 있으나 monomer는 活性을 잃었다^{25, 27)}. 그러나 *Streptococcus lactis* 7962의 β -galactosidase는 monomer와 dimer 모두 活性을 가지고 있었고 phosphate buffer에서 시간이 경과하면서 dimer가 monomer로 분해될때 酵素가 불안정하게 되어 活性이 감소하였으며 ammonium sulfate로서 monomer로 분리되는 것을 防止 하였을때 酵素의 活性이 유지 되었다⁴⁶⁾.

Wickson과 Huber⁷²⁾는 *Escherichia coli*가 生産한 β -galactosidase가 요소용액에서 subunit로 分離하는 것과 活性이 喪失되는 것은 비례하지 않는 것을 發見 하였고 이는 active tetramer, inactive tetramer, inactive subunit의 세단계의 과정을 거쳐 subunit로 分離되기 때문이라고 보고 하였다. 또한 *Escherichia coli* K-12의 β -galactosidase는 다른 subunit와 결합하여 더 큰 분자의 형태로 될수 있는데 이는 tetramer보다 熱에 대한 安全性이 낮았다^{45, 53)} *Escherichia coli* β -galactosidase의 두개의 dimeric subunit는 divalent ion bridge에 의하여 結合되어 活性이 있는 tetramer로 存在하며⁵⁴⁾ 結合部分은 subunit의 3번째에서 92번째 아미노산이라고 보고 되었고^{8, 9)}, Jörnvalld 등³³⁾은 76, 396, 600번째에 있는 cysteine이 結合部分에 포함 된다고 하였다. Disulfide bond^{12, 53)}와 Mg 이온⁶²⁾은 관여하지 않는다고 보고 되었다.

最近 chymotrypsin digestion¹⁶⁾, trypsin digestion¹⁸⁾, cyanogen bromide digestion^{17, 19, 22, 23, 35)}에 의하여 *Escherichia coli*가 生産한 β -galactosidase의 아미노산 結合순서를 밝혀 내기 위한 研究가 이루어 졌다. Fowler와 Zabin²⁰⁾은 완전한 아미노산 배열 순서를 밝혀냈는데 monomer는 하나의 polypeptide이며 1021개의 아미노산으로 이루어졌음을 解明하였고^{20, 24)} 이러한 事實은 Craven 등¹²⁾이 發表한 1070개의 아미노산으로 이루어졌다는 결과와 비슷하다.

Subunit는 polypeptide가 겹쳐져 있으며 아미노산중 378~418, 442~500, 541~601, 654~743, 762~862, 990~1021번째의 것들은 표면에 노출되어 있는 것이 免疫學的方法에 의하여 밝혀졌으며 Jörnvalld 등³³⁾도 1019번째 아미노산이 표면에 位置한

다고 보고 하였다. 이러한 事實들은 polypeptide의 中央部分과 carboxyl基가 있는 끝부분이 露出되어 있고 amino基의 部分은 内部에 있음을 나타한다⁸⁾.

Escherichia coli K-12를 0.01M selenate에서 培養 했을때 150번째의 methionine이 selenomethionine으로 바뀌었고 요소와 熱에 처한 安定性이 감소 하였다³⁰⁾. 또한 phenylalanine이 β -2-thienylalanine으로 바뀌었을 때에도 熱, 요소, toluene, trypsin에 대한 安定性이 줄어 들었다³²⁾.

β -galactosidase의 active site에 대한 확실한 實驗結果는 아직 없다. *Kluyveromyces fragilis* N RRL Y-1109의 β -galactosidase는 P-chloro-mercuribenzoate와 같은 sulfhydryl agent에 의해 活性이 감소되어 sulfhydryl基가 反應에 관여 한다고 報告되었으나⁶⁴⁾, Craven 등¹²⁾과 Loontjens 등⁴³⁾은 *Escherichia coli*가 生産한 β -galactosidase에 있어서는 sulfhydryl基는 反應에 間接적으로 영향을 미칠 뿐이라고 報告 하였다.

Escherichia coli β -galactosidase의 polypeptide의 500번째 methionine²¹⁾과 498번째의 cysteine³³⁾이 active site에 포함 되어 있거나 아주 가까이 位置할 것이라고 報告 되었으며 *Macrophomina phaseoli*의 β -galactosidase는 24개의 tryptophan residue중에서 한개가 N-bromosuccinimide와 結合할 때에 活性이 없어졌다⁵⁹⁾.

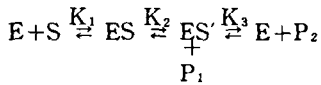
Deschavanne 등¹³⁾은 *Escherichia coli* Eo1의 β -galactosidase에는 galactose subsite와 glucose subsite가 있으며 trehalose, stachyose, raffinose와 같은 多糖類들이 活性에 영향을 미치지 않는 것으로 보아 binding site의 크기가 매우 작은 것이라고 하였으며, 扁桃에 있는 β -galactosidase의 active site는 β -D-fucosidase와 β -D-glucosidase의 것과 同一한 곳에 있다고 報告 되었다⁶⁶⁾.

III. β -galactosidase의 反應

Wallensfels⁶⁷⁾는 sulfhydryl基와 imidazole基가 반응에 직접 관여 한다는 假定下에 SN²(親核的 二分子 置換反應)와 類似한 反應原理를 提起 하였다. Galactosidic oxygen에 sulfhydryl基가 양자를 공급하여 -S(-)으로 되는 酸으로서 역할하고 imidazole基는 전자를 공급하는 親核的 反應을 하여

glucose가分離되고 galactose의 C₁과 imidazole基 질소가 결합된 복합물이 형성된다. sulfhydryl基로부터生成된 -S⁻은 H₂O로부터 양자를 얻어 sulfhydryl基로 환원되고 H₂O로부터 형성된 OH⁻은 galactose와 imidazole 복합물의 galactose C₁에 결합하여 galactose를 imidazole基로부터 분리함으로써乳糖의分解가 완료된다. 그러나 Loontjens等⁴³⁾은 sulfhydryl基는 반응에直接的으로 관여하지는 않는다고報告하였다.

反應進行 過程에 酵素와 基質이 결합한 Michaelis 복합체(ES)와, aglycon 부분(P₁)이 떨어져 나간 중간복합체(Intermediary complex, ES')가 假定 되었다⁶⁵⁾. 中間複合體(ES')는 다시 分解되어 酵



素와 galactose(P₂)로 한다. 이 過程中의 反應의 速度에 제일 영향을 미치는 단계(Rate limiting step)는 *Escherichia coli* K-12와 *Escherichia coli* 2 Eol로부터의 β-galactosidase의 경우 Michaelis 복합체(ES)가 中間複合體(ES')로 이행되는 과정이었으며¹⁵⁾ pH가 5.5 이상일 때에는 Michaelis 복합체와 中間複合體 모두가 반응속도에 영향을 미쳤다⁶¹⁾. pH 6.9에서 phenylgalactoside가 分解될 때에는 中間複合體의 形成이 rate limiting step이었다⁶⁵⁾. 그러나 反應過程, 1 중간물질로서 中間複合體만을 假定하고 이때의 rate limiting step은 最終生産物의 生成段階라고 주장한 報告도 있다^{4, 5)}.

IV. β-galactosidase의 物理化学的 性質

*Escherichia coli*가 生産한 β-galactosidase의 subunit³⁶⁾와 tetramer¹²⁾의 分子量은 各各 135,000과 540,000이었으며 subunit의 鋳강상수는 16S^{51, 53, 60)}이었고 *Aeromonas formicans*로부터의 鋳강상수 16S의 β-galactosidase가 生産되었다⁵¹⁾. *Kluyveromyces fragilis*의 β-galactosidase의 分子量을 gel filtration에 의해서는 500,000이상이었으나 sedimentation equilibrium 方法에 의하여 203,000⁶⁴⁾, 201,000⁴⁴⁾의 것으로 분석되었고 沈降常數는 10S⁶⁴⁾이었다. *Sporobolomyces singularis*가 생산한 β-galactosidase의 분자량과 沈降常數는 140,000, 7.6S이고⁵⁾, *Macrophomina phaseoli*로부터의 β-galactosidase는 분자량 112,000, 鋳강상수는 6.3S로 보고 되었다⁵⁸⁾ *Aspergillus oryzae*^{47, 60)}와

*Bacillus megaterium*⁵²⁾의 β-galactosidase의 分子量은 各各 105,000~112,000, 150,000이었고 사람의 肝에서는 分子量 150,000의 dimer와 分子量 660,000의 multimer가 發見 되었다. 이러한 事實들로 미루어 보아 β-galactosidase의 분자량은 100,000~700,000으로서 몇개의 subunit로 구성된 dimer 혹은 multimer의 상태로 存하는 것으로 생각된다.

*Kluyveromyces fragilis*⁶⁴⁾, *Aspergillus oryzae*⁶⁸⁾, *Aspergillus niger*⁷⁴⁾의 β-galactosidase의 等電點은 各各 4.4, 4.4~4.6, 4.6으로 유사하였다.

Escherichia coli ML308이 生産한 β-galactosidase의 280nm에서의 吸光度의 비율은 1.52이었으며²⁹⁾ *Sporobolomyces singularis*의 β-galactosidase는 2.61이었다⁵⁾. *Escherichia coli* ML308의 β-galactosidase의 280nm에서의 molecular extinction coefficient가 조사된 바 있으며 138,000이었다²⁹⁾.

일반적으로 動物에서는 한가지 試料에서 2가지 혹은 3가지의 β-galactosidase가 發見된다. 쥐의 腦에 있는 神經組織으로부터 DEAE-Cellulose에 吸着与否로 두가지의 β-galactosidase가 分離되었는데 吸着되는 것의 分子量은 81,000이었고 吸着되지 않는 것은 103,000이었다³⁰⁾. 쥐의 小腸에는 酸性에서 活性이 나타나는 것과 中性에서 活性이 있는 것이 發見 되었으며 分子量은 各各 83,000~105,000, 360,000~510,000이었다³⁷⁾. 또한 쥐의 乳腺에 있는 β-galactosidase는 gelfiltration에 의해 分子量을 측정 했을때 溶出緩衝溶液의 pH가 7.0일 때에는 110,000 pH가 5일 때에는 200,000이었다³⁹⁾. 백의 일종인 *Helix pomatia*에서도 두가지 β-galactosidase가 發見되었는데 이들은 15~16%의 炭水化合物을 포함하였으며 等電點은 pH 4.5와 pH 4.6으로 비슷하였으나 電氣泳動에서의 이동거리가 달랐으며 沈降常數도 6.4S와 10.4S로 相異했다²⁶⁾. 사람의 肝에서는 세종류(A₁, A₂, A₃)의 β-galactosidase가 發見되었으며 A₂와 A₃는 A₁의 dimer, multimer이었다²⁵⁾. 動物外에도 *Sclerotium tuliparum*⁵⁹⁾과 *Aspergillus niger*⁷⁴⁾는 各各 두가지로 세가지의 β-galactosidase를 生産하였으며 *Sclerotium tuliparum*이 生産한 두개의 β-galactosidase의 沈降常數는 6.92S, 6.32S, partial specific volume은 0.762cm³/g, 0.748cm³/g,

분자량은 125,000, 117,000이었으며⁵⁸⁾ *Aspergillus niger*가 생산한 세개의 β -galactosidase의 분자량은 124,000, 150,000, 173,000이었다⁷⁴⁾.

酵素의 反應基는 反應을 촉진할 수 있기 위하여는 적절한 ion 상태로 되어야 한다. 일반적으로 β -galactosidase의 適正 pH는 細菌과 酵母의 경우는 中性이며 곰팡이, protozoa, 식물, 동물의 경우는 酸性이다⁷⁶⁾. 適正 pH는 β -galactosidase가 生産된 미생물이 자란 培地の 조성⁴⁹⁾과 反應이 실시된 완충용액의 種類³⁹⁾에 따라 다를 수 있어 sucrose에서 자란 *Neurospora crassa*로 부터의 β -galactosidase는 pH7에서 活性이 제일 높았으나 cellobiose에서 자란 것으로 부터의 β -galactosidase의 適正 pH는 6.0이었고⁴⁹⁾, 쥐의 乳腺에 있는 β -galactosidase의 경우 sodium citrate buffer에서는 pH3.4가 適正 pH 이었고 glycine-HCl buffer에서는 pH2.7~3.0이 適正 pH 이었다³⁹⁾. 또한 β -galactosidase의 適正 pH와 安定한 pH는 동일하지 않을 수 있으며 *Aspergillus niger*가 生産한 β -galactosidase의 適正 pH와 安定한 pH는 각각 3.4~4.0, 4.0~8.0이었고⁶⁾, *Phaseolus vulgaris*로 부터의 β -galactosidase는 pH3.8~4.0이 適正 pH 이었으며 pH4.6~8.0에서 安定하였다¹⁾.

熱은 酵素와 基質의 親和性, 反應基의 이온化, 酵素의 安定性에 影響이 많다. 일반적으로 곰팡이가 生成한 β -galactosidase는 耐熱性, 好熱性이나 細菌과 酵母가 生産한 β -galactosidase는 中溫에서 反應力이 強하고 熱에 弱하다⁷⁶⁾. 그러나 溫泉에서 분리한 *Thermus aquaticus*와 유사한 細菌으로 부터 反應適正溫度가 80°C인 β -galactosidase가 發見된 바 있다⁶³⁾. Phosphate buffer가 *Bacillus megaterium*⁴⁰⁾과 *Aeromonas formicans*⁵¹⁾의 β -galactosidase의 熱에 對한 安定性을, cysteine은 *Thermus aquaticus*와 유사한 細菌으로 부터의 β -galactosidase⁶³⁾의 熱安定性을 增進하였다.

또한 反應은 氷하의 온도에서는 이루어질 수 있으며 *Kluyveromyces lactis*의 β -galactosidase는 -13°C에서는 活性을 보였으나 -19°C 이하에서는 活性이 없었으며³⁾, *Escherichia coli* K-12의 β -galactosidase는 -25°C에서 活性을 나타내었다¹⁵⁾.

β -galactosidase의 反應은 여러가지 微量元素에 의해 影響을 받으며 生産源에 따라 다르다. 微量元素에 의한 影響은 反應조건에 따라서도 다를 수 있으며 *Escherichia coli*의 β -galactosidase

는 基質이 O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside일때에는 Na⁺에 의해 反應이 제일 많이 촉진되었으나 基質이 乳糖일때에는 K⁺가 反應을 제일 많이 촉진하였고⁵⁰⁾, Na⁺은 *Escherichia coli* ML309가 生産한 β -galactosidase의 反應을 pH가 낮고 基質의 濃度가 낮고 溫度가 높을수록 더욱 촉진하였으며 물에서 보다는 D₂O에서 촉진능력이 떨어졌다⁷⁰⁾. 또한 微量元素는 β -galactosidase의 安定性增進에 기여한다. 마그네슘이온은 *Kluyveromyces lactis*가 生成한 β -galactosidase의 安定性을 增進하였고⁷⁾ 망간이온은 *Kluyveromyces fragilis*^{64, 71, 72)}와 *Kluyveromyces lactis*⁷⁾의 β -galactosidase의 安定性을 유지하는데 기여하였다. 일반적으로 수은^{31, 42, 60, 64)}, 구리^{41, 60, 64)} 은^{39, 60, 64)}과 같은 重金屬은 β -galactosidase의 反應을 방해 하는데 이는 酵素의 sulfhydryl基, imidazole基, carboxyl基와 결합하기 때문이다.

V. 結 論

각종 酵素源에서 生成된 β -galactosidase의 構造와 物理化學的 性質은 각기 다르다. β -galactosidase는 生産源에 따라 subunit 몇개가 결합된 dimer 혹은 multimer로 존재하며 條件의 변화에 의해 monomer로 分離될 수 있다. 分離된 monomer는 活性을 잃을 수 있고, 活性은 나타나지만 安定性이 저하되어 活性이 급격히 감소하는 경우도 있으며, pH와 溫度, 혹은 微量元素는 酵素의 構造에 影響을 줄 수 있기 때문에 酵素本래의 構造維持에 유의해야 한다. 또한 하나의 β -galactosidase 生産源으로 부터 두가지 이상의 β -galactosidase가 生成될 수 있으며 이들은 그 構造 및 物理化學的 特性과 실제이용에 관계되는 性質이 다르므로 β -galactosidase를 精確하게 分別하여 特征성을 조사하여야 한다. β -galactosidase의 反應에 참여하는 反應基와 反應原理는 확실히 밝혀지지 않았다.

이러한 諸般 物理化學的 特性과 反應樣相을 闡明하므로써 β -galactosidase를 根本적으로 이해하며 더욱 効果적으로 應用할 수 있을 것으로 생각된다.

VI. 引用文獻

1. Agrawal, K.M.L., and O.P. Bahl. 1968. Glycosidases of *Phaseolus vulgaris*. II. Isolation and gener-

- al properties. *J. Biol. Chem.* 243 : 103–111.
2. Appel, S.N., D.N. Alpers, and G. M. Tomkins. 1965. Multiple molecular forms of β -galactosidase. *J. Molecular Biol.* 11 : 12–22.
 3. Baer, R.J., and Loewenstein. 1979. Activity of β -D-galactosidase from *Saccharomyces lactis* at temperatures below 0°C. *J. Dairy Sci.* 62 : 1041–1044.
 4. Becker, V. E., and N. J. Evans. 1969. The influence of monovalent cations and hydrostatic pressure on β -galactosidase activity. *Biochem. Biophys. Acta.* 191 : 95–104.
 5. Blakely, J. A., and S. L. Mackenzie. 1969. Purification and properties of a β -hexosidase from *Sporobolomyces singularis*. *Canadian J. Biochem.* 47 : 1021–1025.
 6. Borglum, G. B., and M. Z. Sternberg. 1972. Properties of a fungal lactase. *J. Food Sci.* 37 : 619–623.
 7. Bouvy, F. A. M. 1975. Applications for lactase treated whey. *Food product Development.* 9(2) : 10–14.
 8. Celada, F., A. V. Fowler, and I. Zabin. 1978. probes of β -galactosidase structure with antibodies. Reaction of anti-peptides antibodies. against native enzyme. *Biochem.* 17(24) : 5156–5160.
 9. Celada, F. and I. Zabin. 1979. A dimer-dimer binding region in β -galactosidase. *Biochem.* 18(3) : 404–406.
 10. Chabaud, O., S. Bouchilloux, ET M. Ferrand. 1971. Characterization, isolation and properties of thyroid glycosidases : β -galactosidase, β -N-acetylglycosaminidase and α -mannosidase. *Biochem. Biophys. Acta.* 227 : 154–170.
 11. Chonchie, J., J. Findlay, and G. A. Levvy. 1959. Mammalian glycosidases. Distribution in the body. *Biochem.* 71 : 318–325.
 12. Craven, G. R., E. Steers, JR., and C. B. Anfinsen. 1965. Purification, composition, and molecular weight of the β -galactosidase of *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* 240 : 2468–2477.
 13. Deschavanne, P. T., O. M. Viratelle, and J. M. Yon. 1978. Conformational adaptability of the active site of β -galactosidase. Interaction of the enzyme with some substrate analogus effectors. *J. Biol. Chem.* 253(3) : 833–837.
 14. Doz, P., H. Sund, and K. Weber, 1966. The quaternary structure of proteins. *Angew, Chem. Internat. Edit.* 5(2) : 231–245.
 14. Fink, A. L., and K. J. Angelides. 1975. The β -galactosidase catalyzed hydrolysis of O-nitrophenyl- β -D-galactoside at subzero temperatures : Evidence for a galactosylenzyme intermediate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64(2) : 701–708.
 16. Fowler, A. V. 1978. Amino acid sequence of β -galactosidase. V. Isolation and sequences of chymotryptic peptides. *J. Biol. Chem.* 253(15) : 5484–5489.
 17. Fowler, A. V. 1978. Amino acid sequence of β -galactosidase. VII Isolation of the 24 cyanogen bromide peptides. *J. Biol. Chem.* 253(15) : 5499–5504.
 18. Fowler, A. V., A. J. Brake, and I. Zabin. 1978. Amino acid sequence of β -galactosidase. VI. Limited tryptic digestion of the citraconylated protein and sequence of tryptic peptides. *J. Biol. Chem.* 253(15) : 5490–5498.
 19. Fowler, A. V., A. T. Brake, and I. Zabin. 1978. Amino acid acid sequence of β -galactosidase. X. Sequence of the COOH-terminal segment, CNBr peptides 18 to 24. residues 654 to 1021. *J. Biol. Biol. Chem.* 253(15) : 5515–5520.
 20. Fowler, A. V., and I. Zabin. 1977. The amino acid sequence of β -galactosidase of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74(4) : 1507–1510.
 21. Fowler, A. V., and I. Zabin. 1978. Methionine 500, the site of covalent attachment of an active site-directed reagent of β -galactosidase. *J. Biol. Chem.* 253(15) : 5283–5285.
 22. Fowler, A. V., and I. Zabin. 1978. Amino acid sequence of β -galactosidase. VIII. Sequence of the NH₂-terminal segment, CNBr peptides 1 to 9, residue 1 to 377. *J. Biol. Chem.* 253(15) : 5505–5509.
 23. Fowler, A. V., and I. Zabin. 1978. Amino acid sequence of β -galactosidase. IX. Sequence of the central segment, CNBr peptides 10 to 17, residues 378 to 653. *J. Biol. Chem.* 253(15) : 5510–5514.
 24. Fowler, A. V., and I. Zabin. 1978. Amino acid sequence of β -galactosidase. X. Peptide ordering procedures and the complete sequence. *J. Biol. Chem.* 253(15) : 5521–5555.
 25. Frost, R. C., E. W. Holmes, A. G. W. Norden, and J. S. O'Brien. 1978. Characterization of purified human liver acid β -D-galactosidase A₂ and A₃. *Biochem.* 175 : 181–188.
 26. Got, R., and A. Marnay. 1968. Isolement, purification at quelques caractéristiques physioco-chimiques de deux β -hexosidases du sue digestif d'*Helix pomatia*. *European J. Biochem.* 4 : 240–246.

27. Hoeksema, H. L., O. P. V. Diggelen, and H. Galjard. 1979. Intergenic complementation after fusion of fibroblasts from different Patients with β -galactosidase deficiency. *Biochem. Biophys. Acta.* 566 : 72-79.
28. Holsinger, V. H. 1978. Application of lactose modified milk and whey. *Food Tech.* March. 35-40.
29. Hu, A. S. L., R. G. Wolfe, and F. J. Reithel. 1959. The preparation and purification of β -galactosidase from *Escherichia coli* ML308. *Archives of Biochem. Biophys.* 81 : 500-507.
30. Huber, R. E., and R. S. Criddle. 1967. The isolation and properties of β -galactosidase from *Escherichia coli* grown on sodium selenate. *Biochem. Biophys. Acta.* 141 : 587-599.
31. Hughes, R. C., and R. W. Jeanloz. 1964. The extracellular glycosidases of *Diplococcus Pneumoniae*. I. Purification and properties of a neuraminidase and a β -galactosidase. Action on the α_1 -acid glycoprotein of human plasma. *Biochem.* 3 : 1535-1543.
32. Hanecek, J., and H. H. Richenberg. 1964. The incorporation of β -2-thienylalanine into the β -galactosidase of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* 81 : 108-121.
33. Jörnvall, H., A. V. Fowler, and I. Zabin. 1978. Probes of β -galactosidase structure with iodoacetate. Differential reactivity of thiol groups in wild type and mutant forms of β -galactosidase. *Biochemistry.* 17(2) : 5160-5164.
34. Jungalwala, F. B., and E. Robins. 1968. Glycosidases in the nervous system. III. Separation, purification, and substrate specificities of β -galactosidases and β -glucuronidase from brain. *J. Biol. Chem.* 243 : 4258-4266.
35. Katze, J., S. Sridhara, and I. Zabin. 1966. An amino-terminal peptide of β -galactosidase. Its detection in crude extracts of wild type and nonsense mutants of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 25 : 5341-5346.
36. Korenman, S. G., G. R. Craven, and C. B. Anfinsen. 1966. Determination of the carboxyl-terminal amino acid residue of the β -galactosidase of *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys. Acta.* 124 : 160-165.
37. Kraml, J., O. Koldovsky, A. Heringova, V. Jirsova, K. Kacal, M. Ledvina, and H. Pelichova. V. J. 1969. Characteristics of β -galactosidase in the mucosa of the small intestine of infant rats. *Biochem.* 114 : 621-627.
38. Klulikova, A. K., A. S. Tikhomirova, and R. V. Feniksova. 1972. Purification and properties of *Saccharomyces fragilis* β -galactosidase. *Biokhimiya.* 37(2) : 402-419.
39. Kuo, C. H., and W. W. Wells. 1978. β -galactosidase from rat mammary gland. Its purification, properties, and role in the biosynthesis of β -o-galactopyranosyl myoinositol. *J. Biol. Chem.* 253(10) : 3350-3356.
40. Landman, O. E. 1957. Properties and induction of β -galactosidase in *Bacillus megaterium*. *Biochem. Biophys. Acta.* 23 : 558-569.
41. Lederberg, J. 1950. The β -D-galactosidase of *Escherichia coli*, strain K-12. *J. Bact.* 60 : 381-392.
42. Lester, G., and A. Byers. 1965. Properties of two β -galactosidases of *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18 : 725-734.
43. Loontjens, F. G., K. Wallenfels, and R. Weil. 1970. Studies on the interaction of the inhibitor O-mercuriphenyl β -D-galactoside chloride with β -galactosidase from *Escherichia coli* K-12. *European J. Biochem.* 14 : 138-149.
44. Mahoney, R. R., and J. R. Whitaker. 1978. Purification and physicochemical properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Food sci.* 43 : 584-591.
45. Marchesi, S. L., E. Steers, JR., and S. Shifrin. 1969. Purification and characterization of the multiple forms of β -galactosidase of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* 181:20-34.
46. McFeters, G. A., W. E. Sandine, R. R. Becker, and P. R. Elliker. 1969. Some factors affecting association-dissociation of β -galactosidase from *Streptococcus lactis* 7962. *Canadian J. Microbiol.* 15 : 105-110.
47. Mega, J., and Y. Matsuchima. 1979. Comparative studies of three exo- β -glycosidases of *Aspergillus oryzae*. *J. Biochem.* 85 : 335-341.
48. Ogushi, S., T. Yoshimoto, and D. Tsuru. 1980. Purification and comparison of two types of β -galactosidases from *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Tech.* 58(2) : 115-122.
49. Perry C. B. and G. Lester. 1973. The identification of a third β -galactosidase activity in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54(4) : 1476-1482.
50. Reithel, F. J. and J. C. Kim. 1960. Studies on the

- β -galactosidase isolated from *Escherichia coli*. ML308. I. The effect of some ions on enzymatic activity. Archives of Biochem. Biophys. 90: 271-277.
51. Rohlfsing, S. R., and I. P. Crawford. 1966. Purification and characterization of the β -galactosidase of *Aeromonas formicans*. J. Bact. 91(3) : 1085-1097
 52. Rohlfsing, S. R., I. P. Crawford. 1966. Partial purification and physical properties of *Bacillus megaterium* β -galactosidase. J. Bact. 92 (4) : 1258-1259.
 53. Shifrin, S., and E. Steers, JR., 1967. The effect of urea on subunit interactions of β -galactosidase from *Escherichia coli* K-12. Biochem. Biophys. Acta. 133 : 463-471.
 54. Shifrin, S., S. W. Luborsky, and B. J. Grochowski, 1970. Inactivation and dissociation of β -galactosidase by amines. Biochem. Biophys. Res. Commun. 38-997-1002.
 55. Sinnott, M. L., and O. M. Viratelle. 1973. The effect of methanol and dioxan on the rates of the β -galactosidase catalyzed hydrolysis of some β -D- galactopyranoside : Rate limiting degalactosylation Biochem. J. 133 : 81-87.
 56. Strees, E. S., JR., G. R. Craven, C. B. Anfinsen, and J. L. Bethune. 1965. Evidence for nonidentical chains in the β -galactosidase of *Escherichia coli* K-12. J. Biol. Chem. 240 : 2478 -2484.
 57. Steers, E., Jr, and S. Shifrin. 1967. Characterization of the β -galactosidase from a lactose negative complementing mutant of *Escherichia coli* K-12. Biochem. Biophys. Acta. 133 : 454 -462.
 58. Sugiura, M., M. Suzuki, T. Shimomura, M. Sasaki, and M. Kurobe. 1979. Physicochemical properties of β -galactosidase from *Sclerotium tuliparum* and *Macrophomina phaseoli*. Ferment. Tech. 57(2) : 86-90.
 59. Sugiura, M., M. Suzuki, and M. Kurobe. 1980. Chemical modification of β -galactosidase from *Macrophomina phaseoli* with N-bromosuccinimide. J. Ferment. Tech. 58(1) : 11-15.
 60. Tanaka, Y., A. Kagamishi, A. Kiuchi, and T. Horiuchi. 1975. Purification and properties of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. J. Biochem. 77 : 241-247
 61. Tenu, JP., O. M. Viratelle, J. Garnier, and J. Yon. 1971. pH dependance of the activity of β -galactosidase from *Escherichia coli*. European J. Biochem. 20 : 363-370.
 62. Ullmann, A., and J. Monod. 1969. On the effect of divalent cations and protein concentration upon renaturation of β -galactosidase from *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 35 : 35-42.
 63. Ulrich, J. T., G. A. Mcfeters, and K. L. Temple. 1972. Induction and characterization of β -galactosidase in an extreme thermophile. J. Bact. 110 : 691-698.
 64. Uwajima, T., H. Yagi., and O. Terada. 1972. Purification, crystallization and some properties of β -galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. Agri. Biol. Chem. 36(4) : 570-577.
 65. Viratelle, O., J. P. Tend, J. Garnier and J. Yon. 1969. Preliminary study of the nucleophilic competition in β -galactosidase catalyzed reaction. Biochem. Biophys. Res. Commun, 37(6) : 1036 -1041.
 66. Walker, D. E., and B. Axelrod. 1978. Evidence for a single catalytic site on the β -D- glucosidase and β -D- galactosidase of almond emulsion. Archives of Biochem. Biophys. 87(1) : 102 -107.
 67. Wallenfels, K. 1977. β -galactosidase (crystalline). in Methods in Enzymology. Vol 5 : 212. Academic Press Inc. New York.
 68. Wallenfels, K., and R. Weil. 1972. β -galactosidase. in Enzyme. 7 : 617-663. Academic Press Inc. New York.
 69. Wallenfels, K., K. L. Zarnitz, G. Laule, H. Bender, and M. Keser. 1959. Untersuchungen über milchzuckerspaltende Enzyme. III. Reinigung, Kristallization und Eigenschaften der β -Galactosidase von *Escherichia coli* ML309. Biochemische Zeitschrift. 331 : 459-485.
 70. Wallenfels, K., O. P. Malhotra, and D. Dabich. 1960. Untersuchungen über milchzuckerspaltende Enzyme. VIII. Der Einfluss des Kationen- Milieus auf die Aktivität der β -Galactosidase von *Escherichia coli* ML309. Biochemische Zeitschrift. 333 : 377-394.
 71. Wendorff, W. L., and C. H. Amundson. 1971.

- Characterization of β -galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. J. Milk and Food Tech. 34 (6) : 300-306.
72. Wedorff, W. L., C. H. Amundson, J. C. Graver, and N. F. Olson. 1971. Use of yeast β -galactosidase in milk and milk Products. J. Milk and Food Tech. 34 : 294-299.
73. Wickson, V. M., and R. E. Huber. 1970. The non-simultaneous dissociation and loss of activity of β -galactosidase in urea. Biochem. Biophys. Acta. 207 : 150-155.
74. Widmer, F., and J. L. Leuba. 1979. β -galactosidase from *Aspergillus niger*. Euroqean J. Biochem. 100 : 559-567.
75. Wierzbicki, L. E., and F. V. Kosikowski. 1971. Preperation and characterization of lactose(β -galactosidase) for microbial sources. J. Dairy Sci. 54 : 763.
76. 安鍾健, 金顯旭. 1981. 乳製品에 利用되는 β -galactosidase에 関한 綜說, 韓國酪農學會誌, 3(1) : 47-74.