

가지 열매 lectin의 생화학적 성질

노 광 수*

계명대학교 생물학과

Received January 22, 2008 / Accepted March 30, 2008

Biochemical Properties of Eggplant Fruit Lectin. Kwang Soo Roh*. *Department of Biology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea* - Biochemical characterization including hemagglutination of erythrocytes, molecular weight, optimum temperature, thermal stability, optimum pH, carbohydrate specificity, and inhibitory effect of metal ion were studied in lectin of eggplant (*Solanum melongena* L.) fruit prepared by ammonium sulfate fractionation and affinity chromatography. This lectin was agglutinated by trypsin-treated rat blood erythrocyte. The molecular weight of this lectin by SDS-PAGE was estimated to be approximately 19.3 kDa of a single band. This lectin has no activity by 7 carbohydrates containing D-glucose. The optimum range of temperature and pH were 10-20°C and pH 6.2-7.2, respectively. This lectin was relatively stable at 20-70°C. And the activity of this lectin was not inhibited by Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , and Mn^{2+} .

Key words : Eggplant, hemagglutination activity, lectin

서 론

가지(*Solanum melongena* L.)는 감자, 고추, 담배, 토마토와 함께 가지과의 1년생 초본 식물로서, 원산지는 인도지역이며 [7], 아시아에서 1,500년 이상 재배되고 있다[11]. 한국에서는 일반적으로 긴 모양의 짙은 보라색의 열매를 맺는 품종을 주로 재배하지만, 외래종 열매는 공이나 달걀 모양을 하고 있으며, 흰색, 노란색 등 다양한 색깔을 지닌다. 가지의 건조 중량은 7-11%이며, 3-4%의 glucose, fructose, sucrose, starch의 탄수화물이고, 1.5%의 식이섬유와 미량의 지방과 단백질을 함유하고 있다. 또한 다량의 비타민 C와 미네랄을 함유하고 있으며[13], 쓴맛을 내는 솔라닌 M 및 항암 효과가 있는 폴리페놀, 안토시아닌 계통의 색소와 같은 특이 물질도 함유하고 있다[6]. 가지는 식용으로 뿐만 아니라 약용으로도 사용되어, 혈중 콜레스테롤 수치를 낮추주고 천식, 기관지염, 콜레라 치료에 사용되며[15], 그 외에도 고혈압, 독버섯 중독의 치료, 타박상, 종창, 치질, 치통, 화상, 동상, 장 내 출혈 등 여러 가지 질병의 치료에 사용이 된다[2].

Lectin은 당과 결합할 뿐만 아니라 적혈구 세포를 응집시키고 당 화합물을 침전시킨다[8]. Active chain과 binding chain으로 구성되어 있으며, 이 두 chain사이엔 이황화 결합으로 연결되어 있다. Lectin의 binding chain이 세포 수용체와 결합을 하고 active chain이 세포 내부로 유입하여 ribosome의 단백질 합성을 저해시킨다고 한다[20]. 또한 binding chain에 존재하는 특정 당과의 결합은 항원과 항체간의 친화력과 비슷하거나 더 강하다고 알려져 있다. 이러한 특이적

성질로 인해 lectin은 암세포에 특이적으로 작용하여 암세포를 죽이는데 이용되고 있으며, 다당류나 당단백질의 분리에 이용되기도 하고, 세포막의 연구, 혈액형 검사 및 면역학적 연구 등 생명과학분야의 연구에 이용될 만큼 높은 가치를 지니고 있다[24,36]. Lectin은 여러 생물에서 발견이 되는 자연계에 널리 분포하는 물질이며, 특히 식물에서는 종자나 열매에 많이 존재한다[31,33]. 이에 본 연구에서는 식용식물로서의 가치뿐만 아니라 약용으로서의 높은 가치를 지닌 가지 열매 lectin의 생화학적 특성을 연구하기 위해, 가지 열매로부터 최종적으로 Sephadex G-100을 사용한 affinity chromatography에 의해 lectin을 분리하고, 이의 적혈구 응집반응, lectin의 활성, 분자량, 탄수화물 특이성, 최적 반응온도, 열 안정성, pH 안정성 및 금속이온 특이성을 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료

대형 마트에서 구입한 가지 열매를 본 실험의 재료로 사용하였다.

Lectin의 분리

Kilpatrick [16]의 방법을 일부 변형하여 lectin을 분리하였다. 껍질을 제거한 가지열매를 분쇄기에 넣고 분쇄한 후, 0.15 M NaCl/0.1 M sodium phosphate buffer를 넣어 밤새 교반하였다. 8겹의 거즈를 사용하여 여과한 용액을 1,000×g에서 원심분리를 하여 상등액을 얻었다. 이에 50%의 $(NH_4)_2SO_4$ 를 서서히 넣어 완전히 용해시켜 밤새 교반한 다음, 40,000×g에서 1시간 원심분리 하고, 침전물을 소량의 neutral saline에 완전히 용해시켰다. 이 용액을 neutral sal-

*Corresponding author

Tel : +82-53-580-5207, Fax : +82-53-580-5164

E-mail : rks@kmu.ac.kr

ine으로 24시간 마다 교환하면서 48시간 투석하였다.

Neutral saline으로 평형화시킨 Sephadex G-100이 들어있는 column (1.5×20 cm)에 투석된 용액을 주입한 후, neutral saline을 사용하여 0.3 ml/min의 유속으로 유출시켜 3 ml씩 분획하였다. 280 nm의 파장에서 측정된 흡광도가 0.03 이하로 될 때까지 분취하였다. 각 분획의 활성은 trypsin을 처리한 쥐의 혈액을 사용하여 적혈구 응집반응을 측정하였다. 활성이 가장 높은 분획을 생화학적 특성 연구에 사용하였다. 모든 과정은 단백질의 변성을 막기 위하여 4°C에서 수행하였다.

단백질 함량의 측정은 BSA를 표준물질로 하여 Bradford [1]방법에 따라, microplate reader (Bio-Rad)를 사용하여 595 nm의 단일파장에서 측정하여 계산하였다.

적혈구 응집반응의 측정 및 lectin의 활성 측정

적혈구 응집반응의 측정은 Takatsy [34]의 방법을 변형하여 사용하였다. Microtiter plate의 각각의 well에 neutral saline과 분리한 lectin 용액을 넣어 2배 연속 희석법으로 희석하였다. Trypsin을 처리한 쥐의 혈액을 가하여 30°C에서 10분간 반응시킨 후, 응집 여부를 확인하였다. 쥐의 혈액은 neutral saline에 0.25% trypsin을 가하여 활성화 시킨 2% 적혈구 부유액을 사용하였다.

적혈구 응집반응은 육안으로 선행 확인한 다음, 현미경을 사용하여 최종적으로 확인하였다. Lectin의 활성은 혈구 최종 응집을 나타내는 희석 배수를 역수로 계산하여 나타내었다.

혈액의 특이성 측정

Trypsin 미처리구와 trypsin을 처리한 사람의 ABO 혈액, 쥐 및 토끼의 혈액을 neutral saline으로 세척한 후, 2% 적혈구 부유액을 만든 다음, 이들을 분리한 lectin 용액과 반응시켜 적혈구 응집 여부를 확인함으로써 어떤 혈액에 특이적으로 반응하는지와 혈액 응집반응에 따른 응집 여부를 조사하였다.

SDS-PAGE 및 분자량 측정

Laemmli [19]의 방법에 따라 12% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 30 mA에서 1시간 동안 실시하였다. 전기영동 후 gel을 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색을 하였고, acetic acid로 탈색시켰다.

Weber와 Osborn [38]의 방법에 따라 분자량은 전기영동한 lectin과 표준 단백질에 대한 상대이동도(Rf)와 단백질 분자량에 대한 대수값을 통해 계산하였다. 이때 사용한 표준 단백질은 rabbit muscle phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), chicken egg white ovalbumin (45 kDa), bovine erythrocyte carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa), α -lactalbumin (14.4 kDa)

이다.

탄수화물의 특이성

분리한 lectin 용액에 200 mM의 D-glucose, D-galactose, D-maltose, D-mannose, D-fructose, N-acetyl-D-glucosamine 및 D-sucrose 용액을 각각 가한 후, 이를 6.25 mM 농도까지 2배 연속 희석법으로 연속 희석하여 30분간 반응시켰다. 여기에 활성화 시킨 쥐의 2% 적혈구 부유액을 가하여 20°C에서 15분간 반응시켜 적혈구 응집 여부를 확인하였다.

최적 반응온도 측정

분리한 lectin의 최적 반응온도를 알아보기 위하여 온도 변화에 따른 활성을 측정 하였다. 이때 분리한 lectin을 2배 연속 희석법으로 연속 희석한 후, 활성화 시킨 쥐의 2% 적혈구 부유액을 넣어 주었다. 항온수조에서 10-90°C 사이의 온도를 각각 처리한 후, 혈구 응집 반응을 측정 하였으며, 최대 희석 배수의 residual activity를 100%로 하여 잔존하는 lectin의 상대적인 활성을 계산하였다.

열 안정성 측정

분리한 lectin의 열 안정성을 알아보기 위하여 lectin을 20-100°C 사이의 온도에서 각 10분간 열처리한 후, 급냉시켰다. 적혈구 응집반응을 통해 잔존하는 상대적 lectin의 활성을 측정하였다.

pH 안정성 측정

분리한 lectin의 pH 안정성을 알아보기 위하여, pH 2.0-10.0 사이 buffer를 사용하여 4°C에서 4시간 투석 후, 적혈구 응집반응을 통해 잔존하는 상대적 lectin의 활성을 측정 하였다. 이때 buffer는 0.025 M glycine-HCl buffer (pH 2.0), 0.2 M acetate buffer (pH 3.2, 4.2), 0.01 M phosphate buffer (pH 6.2, 7.2), 0.2 M Tris buffer (pH 8.0, 9.1), 0.2 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 10.0)를 사용하였다.

금속이온의 영향

분리한 lectin 용액에 20 mM의 CaCl₂, CoCl₂, CuSO₄, FeSO₄, MgSO₄, 및 MnSO₄ 용액을 각각 가한 후, 2배 연속 희석법으로 1.25 mM의 농도가 될 때까지 연속 희석한 다음, 이들을 30분간 반응시켰다. 여기에 활성화 시킨 쥐의 2% 적혈구 부유액을 가하여 20°C에서 15분간 반응시켜 적혈구 응집 여부를 확인하였다.

결 과

Lectin의 분리

50% 농도의 (NH₄)₂SO₄를 첨가하여 얻은 침전물을 neutral

saline으로 용해하여 투석한 다음, Sephadex G-100 상에서 용출 용액으로 neutral saline을 사용하여 lectin을 분리하였다. 6-19번째 분획에서 높은 단백질 함량을 나타냈으나 이중 6번째 분획의 활성이 가장 높게 나타났다(Fig. 1). 따라서 이 분획을 사용하여 lectin의 혈액 특이성과 활성, 분자량, 탄수화물의 특이성, 최적 반응온도, 열 안정성, pH 안정성 및 금속이온의 영향을 조사하였다.

혈액의 특이성과 활성화

분리된 lectin에 trypsin으로 처리된 사람의 ABO형 혈액, 쥐 및 토끼의 혈액을 가하여 각각의 혈구 응집반응을 측정한다. 결과, 사람의 A, B, O, AB형, 토끼의 혈액에서 응집반응이 일어나지 않았으며, 쥐의 혈액에서만 응집이 일어났다. 이는 lectin이 혈액에 대한 특이성이 있음을 의미한다.

Trypsin을 처리하지 않은 혈액을 분리한 lectin과 반응시킨 결과, 6종의 혈액형 모두에서 응집반응이 전혀 일어나지 않았다(Fig. 2). 이 결과로서 활성화된 혈액만이 응집반응에 관여함을 알 수 있었다. 따라서 lectin의 생화학적 특성 연구에 trypsin으로 활성화시킨 쥐의 혈액을 사용하였다.

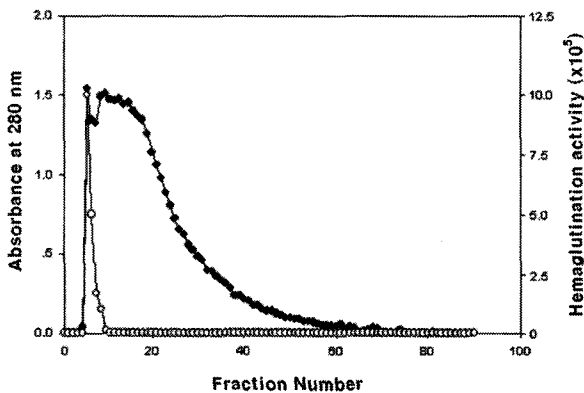


Fig. 1. Elution profile for protein (●) and hemagglutination activity of lectin (○) isolated from eggplant fruit by affinity chromatography on Sephadex G-100. The bound lectin was eluted with neutral saline. Hemagglutination activity was determined using the rat blood.

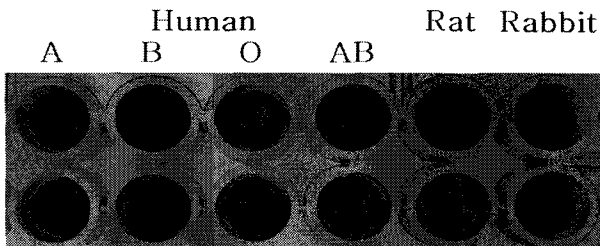


Fig. 2. Hemagglutination effect of eggplant fruit lectin on human ABO, rat, and rabbit blood. Upper: no treated with trypsin. Lower: treated with trypsin.

SDS-PAGE와 lectin의 분자량

SDS-PAGE에 의해 분리한 lectin은 단일 band로 존재함을 확인할 수 있었으며(Fig. 3), 이 band의 분자량을 표준 단백질에 대한 상대이동도와 비교하여 측정된 결과 19.3 kDa임을 알 수 있었다(Fig. 4).

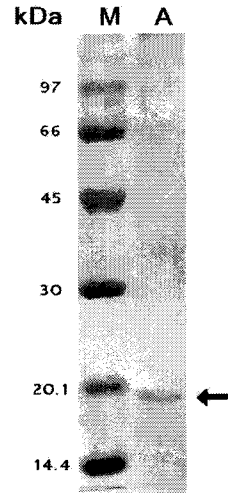


Fig. 3. 12% SDS-PAGE of lectin isolated from eggplant fruit. The gels were run at 30 mA for 1 hr and stained with Coomassie brilliant blue R-250. Arrow indicate lectin isolated by affinity chromatography on Sephadex G-100. Lanes: M, molecular weight marker; A, purified lectin. The molecular weight markers were rabbit muscle phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), chicken egg white ovalbumin (45 kDa), bovine erythrocyte carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa), α -lactalbumin (14.4 kDa).

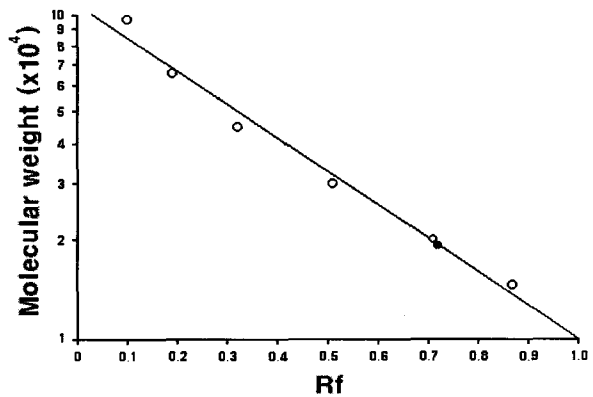


Fig. 4. Determination of molecular weight of eggplant fruit lectin on SDS-PAGE. Closed black circle (●) indicates lectin isolated by affinity chromatography on Sephadex G-100. The molecular weight markers were rabbit muscle phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), chicken egg white ovalbumin (45 kDa), bovine erythrocyte carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa), α -lactalbumin (14.4 kDa).

탄수화물의 특이성

D-glucose, D-galactose, D-maltose, D-mannose, D-fructose, N-acetyl-D-glucosamine 및 D-sucrose를 200 mM 농도에서 6.25 mM 농도까지 희석하고, lectin을 가하여 반응시켰다. 탄수화물로 인한 lectin과 적혈구의 최소 저해농도를 측정하기 위하여, 그 활성을 측정한 결과, 100 mM 이하의 농도에서는 모든 탄수화물에서 적혈구 응집반응이 일어났다. 따라서 lectin의 활성에는 본 연구에서 사용한 탄수화물은 100 mM 이하의 농도에서는 lectin과 적혈구의 응집을 저해시키지 않았으므로, 탄수화물에 대한 특이성이 나타나지 않았다 (Table 1).

최적 반응온도

10-90°C의 범위에서 lectin의 최적 반응온도를 하였다. 그 결과 분리된 lectin의 가장 안정적인 반응온도는 10-20°C로 활성이 100%로 가장 높았고, 30°C부터는 활성이 20%로 급격히 감소하여 40°C에서 60°C에서는 매우 낮은 활성을 보였으며, 70°C이상에서는 활성이 상실되었다(Fig. 5).

열 안정성

20-100°C 범위에서 lectin의 열 안정성을 측정하였다. 그

Table 1. Inhibition of hemagglutination activity by various carbohydrates

Carbohydrates	Minimum concentration of carbohydrates (mM)
D-glucose	>100
D-galactose	>100
D-maltose	>100
D-mannose	>100
D-fructose	>100
N-acetyl-D-glucosamine	>100
D-sucrose	>100

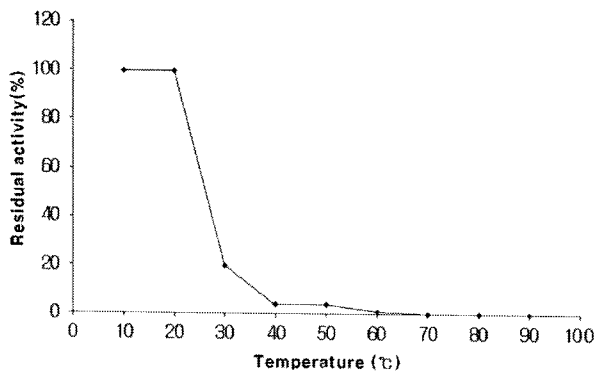


Fig. 5. Effect of temperature on hemagglutination activity of lectin isolated from eggplant fruit. The lectin activity was tested by incubation at 10-90°C, respectively.

결과 분리된 lectin은 20°C에서 70°C까지 안정적이었으며, 80°C부터는 급격히 감소하여 20%의 활성을 나타내었고, 90-100°C에서는 4%의 활성이 나타났다(Fig. 6).

pH 안정성

2.0-10.0까지의 pH 범위에서 lectin의 pH 안정성을 측정하였다. 그 결과 분리된 lectin은 phosphate buffer를 사용한 pH 6.2-7.2까지의 약산성과 중성에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 그러나 pH 4.2와 pH 8.0에서는 활성이 급격히 감소하여 pH 3.2 이하와 pH 9.1 이상에서는 활성이 완전히 상실되었다(Fig. 7).

금속이온의 영향

금속이온 Ca²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺ 및 Mn²⁺를 20 mM 농도에서 1.25 mM 농도까지 희석하고, lectin을 가하여 반응시켰다. 금속이온으로 인한 lectin과 적혈구의 최소 저해농도를 측정한 결과, 20 mM 이하의 농도에서는 모든 금속이온에서 적혈구 응집반응이 일어났다. 이와 같이 lectin의 활성에는 본 연구에서 사용한 금속이온은 20 mM 이하의 농도에서

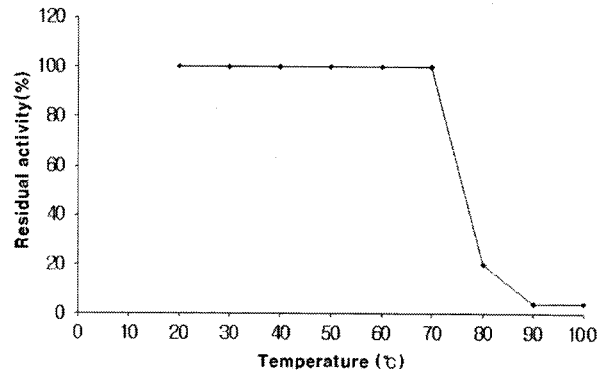


Fig. 6. Thermal stability of lectin isolated from eggplant fruit. The lectin was preheated for 10 min at 20-100°C, respectively.

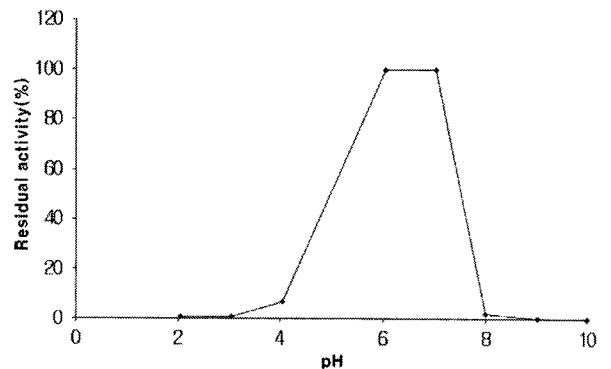


Fig. 7. Effect of pH on hemagglutination activity of lectin isolated from eggplant fruit. The lectin was incubated in different pH for 4 hr at 4°C.

Table 2. Inhibition of hemagglutination activity by various metal ions

Ions	Inhibitory effect
Ca ²⁺	None
Co ²⁺	None
Cu ²⁺	None
Fe ²⁺	None
Mg ²⁺	None
Mn ²⁺	None

는 lectin과 적혈구의 응집을 저해시키지 않았으므로, 금속이온에 대한 특이성이 나타나지 않았다(Table 2).

고찰

가지 열매에서 0.15 M NaCl/0.1 M sodium phosphate buffer를 이용하여 단백질을 추출하고, (NH₄)₂SO₄를 이용하여 추출물을 침전시킨 후 Sephadex-G100을 이용한 affinity chromatography를 통해 lectin을 분리하였다. 식물성 lectin은 mannose [12]나 glucose [30]와 같은 당당류를 이용하여 분리하기도 하며, N-acetyl-D-glucosamine에 특이적으로 결합하는 성질을 이용하여 분리하기도 한다[23].

Lectin은 당단백질과 특이적으로 결합하는 물질로써, 혈액과 특이적으로 반응하는 성질을 가지고 있어[32], lectin의 활성 측정을 위해 사용된다[3]. 본 연구에서도 혈액의 종류에 따른 응집력으로 활성을 측정하였는데, trypsin을 처리하지 않은 사람의 ABO형 혈액, 쥐 및 토끼의 혈액의 적혈구와 trypsin으로 활성화 시킨 적혈구를 사용하였다. 그 결과 trypsin을 처리한 쥐의 혈액에서만 응집반응이 일어났으며, trypsin을 처리하지 않은 모든 혈액과 trypsin을 처리한 사람과 토끼의 혈액에서는 응집이 일어나지 않았다. 따라서 가지 열매로부터 분리한 lectin은 trypsin을 처리한 쥐 혈액의 적혈구에서만 특이성을 가지는 것으로 조사 되었다.

본 연구와는 달리, 작두콩 종자 lectin [30]에서는 토끼 혈액의 적혈구에만 혈액 특이성을 가지며, 가지과(科) 식물인 방울토마토[26]는 사람 혈액의 적혈구에 모두 혈구 응집반응을 일으킨다. 또한 *Pinellia ternata* 뿌리 lectin[25]에서는 trypsin을 처리하지 않은 토끼, 생쥐, 쥐의 적혈구와 응집반응이 일어났으며, 특히 trypsin을 처리한 토끼 혈액의 경우 trypsin을 처리하지 않은 혈액보다 응집이 더욱 잘 일어났다.

표고버섯 lectin [22]에서는 본 연구 결과와 같이 trypsin 처리 유무와 상관없이 사람의 ABO 혈액형 모두에서 응집이 일어나지 않았다. 그러나 본 연구 결과와는 달리 trypsin을 처리하지 않은 쥐에서도 응집반응이 일어났으며, 토끼와 생쥐는 trypsin을 처리하지 않았을 때, 개는 trypsin을 처리했을 때 응집반응이 일어났다.

이와 같이 lectin은 적혈구의 종류에 따라 혈구 응집반응

이 다르게 일어나는 적혈구에 대한 종 특이성과, trypsin 처리의 유무에 따라 적혈구 응집반응이 다르게 나타나는 혈액 활성에 따른 특이성이 있음을 알 수 있었다.

분리된 lectin을 SDS-PAGE한 결과, 단일 band로 나타났으며, 이 band의 분자량은 19.3 kDa로 측정되었다. 겨우살이 lectin [4]은 124 kDa, 작두콩 lectin [29]은 102 kDa, 강낭콩 유식물 lectin [28]은 180 kDa로서 분자량이 매우 크나, 10.7 kDa의 방울토마토 lectin [26]은 매우 분자량이 작다. 따라서 가지과(科) 식물들은 분자량이 매우 작음을 알 수 있다.

벼 lectin [39]은 단일 band의 15 kDa이며, *Paratelphusa jacquemontii* lectin은 34 kDa의 단일 구조를 가진다[21]. 방울토마토의 lectin이 두 개의 subunit으로 이루어진 반면, 가지의 lectin은 벼와 *Paratelphusa jacquemontii*의 lectin과 유사한 저분자의 단일 구조인 것으로 조사 되었다.

Lectin의 탄수화물 특이성은 혈구 응집을 억제하는 능력에 의해 이루어지며, 이는 여러 가지 다른 탄수화물을 이용하여 lectin에 의한 당당류 또는 다당류가 혈구 응집을 저해하는 능력을 측정함으로써 알 수 있다. 이러한 당 특이성을 통해 lectin을 분류할 수 있는데, 한 가지 당 특이성을 가지는 isolectin도 존재하며, 여러 가지 당에 대해 특이성을 갖는 lectin을 구별할 수도 있다[37].

탄수화물 특이성은 D-glucose, D-galactose, D-maltose, D-mannose, D-fructose, N-acetyl-D-glucosamine 및 D-sucrose에 대한 활성을 측정한 결과, 이들 탄수화물들에서도 적혈구 응집반응이 일어났다. 이와 같이 탄수화물에 의한 적혈구 응집반응의 저해가 일어나지 않았다는 것은 탄수화물에 대한 특이성이 없음을 의미한다. 그러나 한국산 겨우살이 lectin [4]의 경우, 15종의 탄수화물 중 D-galactose, D-lactose, D-mannose 및 D-raffinose의 4종류 탄수화물에서 특이성이 나타났다. 따라서 본 연구에서의 D-glucose와 D-fructose에 대한 결과와 동일하였으나, D-galactose와 D-mannose에 대해서는 다른 결과를 나타내었다. 유럽산 겨우살이에서는 D-galactose 만 본 연구와 다른 결과를 보였고, 나머지는 같은 결과를 보였다[40]. 산수유 lectin에서는 30종의 탄수화물 중 D-galactose와 D-mannose에 대한 결과가 본 연구 결과와 동일하게 나타났다[5].

가지 lectin의 최적 반응온도는 10-20°C에서 100%의 활성이 나타났으며, 30°C이상의 온도에서는 그 활성이 급격하게 감소하기 시작하여 70°C 이상의 온도에서는 활성이 떨어져 응집반응이 나타나지 않았다. 반면 40°C를 최적온도로 가지며, 20~30°C에서 다소 낮은 활성을 가지는 같은 가지과 식물인 방울토마토의 lectin [26]을 통해 가지의 lectin이 상대적으로 낮은 온도의 최적 반응온도를 가짐을 알 수 있었다. 본 연구 결과와는 달리 강낭콩 유식물 lectin의 안정적인 반응온도는 20-60°C로서 30°C에서 가장 높은 활성을 나타냈으며 60°C 이상에서는 활성능이 현저히 떨어져 70°C에서는 혈구 응집

반응을 보이지 않았다[28]. *Zizyphus mauritiana* 종자 lectin은 80-100°C에서 혈구 응집반응을 보이지 않았다[9].

가지 lectin의 열 안정성은 20-70°C에서 가장 안정적이었으며, 80°C에서는 20%의 활성을 나타내었고, 90-100°C에서도 약하지만 약간의 활성을 띄었다. 높은 온도에서 쉽게 변성이 일어나는 단백질임에도 불구하고 100°C에서도 활성을 가지는 것으로 보아 고온에서도 lectin이 다소의 열 안정성을 가지고 있다고 생각된다.

70°C까지 안정한 winged bean lectin [10]의 결과는 본 연구에서의 안정성 온도 범위와 동일하다. 알로에 lectin [27]은 0-60°C까지 100% 활성이 나타났으며, 70°C부터 활성이 감소하기 시작하여 80°C에서 약 20%의 활성이 나타났고, 90°C에서는 활성이 완전하게 나타나지 않았다. 겨우살이 lectin [4]의 경우에는 10-50°C까지 100% 활성이 나타났으며, 60°C부터 활성이 감소하였다. 60°C에서도 25%의 활성이 나타났으며, 70-100°C에서도 약간의 활성이 나타났다. 따라서 가지 lectin이 겨우살이 lectin뿐만 아니라 열에 강한 식물로 알려진 알로에의 lectin보다도 열에 더 안정적임을 알 수 있었다.

가지 lectin은 pH 6.2-7.2까지의 약산성과 중성에서 가장 안정적이었다. pH 4.2와 pH 8.0에서는 그 활성이 급격히 감소하여 pH 3.2 이하와 pH 9.1 이상에서는 활성이 완전히 상실되었다. 땅콩 뿌리 lectin [14], *Parkia javanica* lectin [35], 방울토마토 lectin [26]의 경우에는 pH 7.0-7.5에서 안정적이여 본 연구 결과와 유사하였다. *Kalanchoe crenata*의 lectin[18]은 pH 2.0-7.5에서 안정적이거나, pH 7.5-12.0에서는 활성이 급격히 감소하였다. 산수유 lectin[5]은 pH 4.0-7.4에서는 안정적이었으나, 산성인 pH 2.0-3.2에서는 활성이 약하였으며, 염기성인 pH 8.8-10.8에서는 활성이 없었다. 이와 같이 lectin에 따라 pH에 대한 안정성 정도가 다를 수 있다.

가지 lectin에 대한 Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} 및 Mn^{2+} 에 의한 활성을 측정 한 결과, 이들 2가 금속이온들에서는 특이성을 발견할 수 없었다. 본 연구 결과와 동일하게 팽이버섯 lectin의 경우 Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} 및 Mn^{2+} 에서 특이성이 발견되지 않았다[17]. 따라서 금속이온에 영향을 받지 않는 lectin임을 알 수 있었다.

요 약

가지 열매로부터 neutral saline에 의한 추출, $(NH_4)_2SO_4$ 침전 및 Sephadex-G100을 이용한 affinity chromatography에 의해 분리한 lectin의 생화학적 특성을 연구하였다. Trypsin을 처리하지 않은 사람, 쥐와 토끼의 적혈구에서는 혈구 응집반응이 일어나지 않았으며, Trypsin을 처리한 사람, 쥐와 토끼의 적혈구 중에서는 쥐의 적혈구에서만 혈구 응집반응이 일어났다. SDS-PAGE에 의해 가지 lectin의 분자량을 확인한 결과, 19.3 kDa의 단일 band 임이 확인되었다.

D-glucose를 포함하는 7개의 탄수화물은 100 mM 이하의 농도에서 lectin과 적혈구의 응집을 저해시키지 않았으므로, 탄수화물에 대한 특이성이 나타나지 않았다. 최적 반응온도 범위는 10-20°C로서, 20-70°C에서 열에 대해 안정하였으며, 안정된 pH 범위는 pH 6.2-7.2로 확인되었다. Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} 및 Mn^{2+} 20 mM 이하의 농도에서는 lectin과 적혈구의 응집을 저해시키지 않았으므로, 금속이온에 대한 특이성이 나타나지 않았다

References

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Buczkowska, H. 2000. Eggplant cultivation under cover. Climatic requirements. *Owoce*. **39**, 12-19.
- Burger, M. M. 1967. Assays for agglutination with lectins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **57**, 359-367.
- Chang, C. S., M. J. Oh and K. S. Roh. 1999. Purification and biochemical characterization of lectin from *Viscum album*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 578-584.
- Chung, S. R., K. H. Jeune, S. Y. Park and S. J. Jang. 1993. Toxicity and lectins constituents from the seed of *Corus officinalis*. *Kor. J. Pharmacogn.* **24**, 177-182.
- Esteban, R. M., E. M. Molla, L. M. Robredo, F. J. Lopez-Andreu. 1992. Changes in chemical composition of eggplant fruits during development and ripening. *J. Agr. Food Chem.* **40**, 998-1000.
- Gleddie, S., W. Keller, G. Setterfield. 1986. Eggplant, pp. 500-511, In Evans, D. A. and W. R. Sharp (eds.), *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 3, Techniques for Propagation and Breeding. MacMillan, New York.
- Golestein, I. J., R. C. Hughes. M. Monsigny. T. Osawa, and N. Sharon. 1980. What should be called a lectin? *Nature* **285**, 66-70.
- Gupta, N. and P. S. Srivastava. 1998. Purification and characterization of a lectin from seeds and cotyledonary callus of *Zizyphus mauritiana*. *Plant Cell Reports* **17**, 552-556.
- Higuchi, M. and K. Iwai. 1985. Purification and some properties of the basic lectin from winged bean seeds. *Agr. Biol. Chem.* **49**, 391-398.
- Hinata, H. 1986. Eggplant (*Solanum melongena* L.), pp. 363-370, In Bajaj, Y. P. S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 2, Springer, Berlin.
- Hirano, K., T. Teraoka, H. Yamanaka, A. Harashima, A. Kunisaki, H. Tahahashi and D. Hosokawa. 2000. Novel mannose-binding rice lectin composed of some isolectins and its relation to a stress-inducible *salT* gene. *Plant Cell Physiol.* **41**, 258-267.
- Kaloo, G. 1993. Eggplant (*Solanum melongena*), pp. 587-604, In Kaloo, G. (ed.), *Genetic Improvement of Vegetable Crops*. Pergamon Press, Oxford.
- Kalsi, G., H. R. Das, C. R. Babu and R. H. Das. 1992.

- Isolation and characterization of a lectin from peanut roots. *Biochem. Biophys. Acta.* **1117**, 114-119.
15. Khan, R. 1979. *Solanum melongena* and its ancestral forms. pp. 629-636, In Hawkes, J., R. N. Lester and A. D. Skelding (eds.), *The Biology and Taxonomy of Solanaceae*. Academic Press, London.
 16. Kilpatrick, D. C. 1980. Purification and some properties of a lectin from the fruit juice of the tomato. *Biochem. J.* **185**, 269-272.
 17. Kim, H. S., S. Y. Son, S. Y. Hwang and B. S. Hong. 1999. Purification and characterization of the lectins from mushroom *Flammulina velutipes*. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **42**, 304-309.
 18. Kuku, A. and O. B. Eretan. 2004. Purification and partial characterization of a lectin from the fresh leaves of *Kalanchoe crenata* (Andr.) Haw. *J. Biochem. Mol. Biology.* **37**, 229-233.
 19. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
 20. Lis, H. and N. Sharon. 1986. Lectins as molecules and as tools. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 35-67.
 21. Maghil, E. P., D. P. Mercy, B. N. Renuka and S. S. Jeya. 2003. Purification and characterization of a sialic acid specific lectin from the hemolymph of the freshwater crab *Paratelphusa jacquemontii*. *Eur. J. Biochem.* **270**, 4348-4355.
 22. Moon, I. J., S. R. Chung and K. H. Jeune. 1995. Mitotic stimulation and cancer cell agglutination of the lectin from *Lentinus edodes*. *Yakhak Hoeji.* **39**, 260-267.
 23. Nachbar, M. S., J. D. Oppenheim and J. O. Thomas. 1980. Isolation and characterization of a lectin from the tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Biol. Chem.* **255**, 2056-2061.
 24. Olsnes, S., F. Stirpe, K. Sandvig and A. Phil. 1982. Isolation and characterization of viscum, a toxic lectin from *Viscum album* L. (Mistletoe). *J. Biol. Chem.* **257**, 13263-13270.
 25. Park, K. B., K. S. Lee, J. R. Kim and Y. J. Kim. 1981. Purification and characterization of a lectin obtained from banha (*Pinellia ternata*) roots. *Kor. Biochem.* **14**, 137-147.
 26. Park, N. Y., S. P. Lee and K. S. Roh. 2007. Biochemical characterization of lectin isolated from cherry tomato fruit. *J. Life Science.* **17**, 254-259.
 27. Park, W. B and J. Y. Park. 1999. Isolation and characterization of lectin from *Aloe vera*. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **31**, 899-905.
 28. Roh, K. S. 2007. Biochemical characterization of lectin purified from kidney bean seedling. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **22**, 53-57.
 29. Roh, K. S. and D. J. Lee. 2002. Purification and some properties of lectin from *Canavalia ensiformis* L. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 484-489.
 30. Roh, K. S. and N. Y. Park. 2005. Characterization of the lectin purified from *Canavalia ensiformis* shoots. *Biotechnol. Bioproc. Engineer.* **10**, 334-340.
 31. Sharon, N. and H. Lis. 1972. Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* **177**, 949-959.
 32. Sharon, N. 1977. Lectins. *Sci. American* **236**, 108-119.
 33. Sharon, N. and H. Lis. 1987. Century of lectin research (1888-1988). *Trends Biochem. Sci.* **12**, 488-491.
 34. Takatsy, G. 1967. The use of a microtiter in serological procedures. In *International Symposium on Immunological Method of Biological Study.* **4**, 275-280.
 35. Utarabhand, P. and P. Akkayanont. 1995. Purification of a lectin from *Parkia javanica* beans. *Phytochem.* **38**, 281-285.
 36. Wagner, H., E. Jordan, and B. Feil. 1986. Studies on the atandardization of mistletoe preparations. *Oncology* **43**, 16-22.
 37. Walkins, A. H. 1972. Carbohydrates in cell recognition. *Sci. American* **22**, 74-81.
 38. Weber, K. and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.
 39. Zhang, W., W. J. Peumans, A. Barre, C. H. Astoul, P. Rovira, P. Rouge, P. Proost, P. Truffa-Bachi, A. A. H. Jalali and E. J. M. Van Damme. 2000. Isolation and characterization of a jacalin-related mannose-binding lectin from salt-stressed rice (*Oriza sativa*) plants. *Planta* **210**, 970-978.
 40. Ziska, P., H. Franz and K. Kindt. 1978. The lectin from *Viscum album* L. purification by biospecific affinity chromatography. *Experientia* **34**, 123-124.