

동양달팽이 *Nesiohelix samarangae* 에서의 Cellulase 활성에 대한 세포화학적 및 면역세포화학적 연구

정계현 · 이용석

순천향대학교 자연과학대학 생명과학부

= Abstract =

Cytochemical and Immunocytochemical Study on the Cellulase Activity in the stomach of the Land Snail *Nesiohelix samarangae*

Kye-Heon Jeong and Yong-Seok Lee

Department of Life Sciences, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University

In order to observe the anticellulolytic localization in the stomach tissue of a Korean land snail, *Nesiohelix samarangae*, a cytochemical method and a immunogold labeling method were applied. For the cytochemical study on the cellulase activity, Benedict reaction method was applied. And for the immunocytochemical study, the rabbit serum immunoglobulins (IgG) was obtained from the rabbits injected with cellulase which was extracted from body fluid of the snail. The stomach tissues of *Nesiohelix samarangae* were fixed with 4% paraformaldehyde and embedded in Lowicryl K4M at -40°C under UV light (360 nm). The thin sections were loaded on the nickel grids and stained with the serum IgG and protein A-gold complex (particle size: 20 nm). Observations were undertaken with transmission electron microscope (Jeol, JEM-1010).

The epithelium of the stomach was consisted of three types of cells. In the cytochemical study, the reaction products were found along the periphery of the vacuoles derived from the Benedict reaction. In the immunocytochemical study, the protein-A gold particles were selectively labeled in Type 1 and Type 3 cells. The particular regions which were labeled with the protein-A gold particles were on the membranes of rER, in the surrounding cytoplasm of the rER and secretory granules, and in the apical cytoplasm of the cells. On the material being secreted from the apical cytoplasm was also labeled with the immunogold particles. The all results obtained throughout present study suggest that the stomach epithelium of the snail, *Nesiohelix samarangae* secrete cellulase as one of digestive enzymes.

Key words: Snail, Stomach, Cellulase, *Nesiohelix samarangae*, Antibody

연체동물의 소화관은 구강으로부터 시작하여 식도, 소낭, 위, 장관으로 이루어져 있다. 연체동물의 소화기관의 해부학적 및 형태학적 연구로는 Purchon(1956)이 연체동물의 위를 두 가지 type으로 분류한 이후, Morton(1953), Owen(1956), Morton(1960), Smith(1967), Rudman(1972a, b) 등에 의해 복족류 및 신복족류의 소화기관인 위, 소화선(digestive gland), 장관 등의 구조와 기능에 대한 연구가 진행되었다.

소화관에 대한 조직학적·미세구조적 연구는 Lufty와 Demian(1967)에 의해 *Marisa cornuarietis* 소화기관의 조직학적 연구와, Demian과 Michelson(1971)에 의해 *Marisa cornuarietis*의 소화관에서 분비하는 mucin에 대한 조직화학적 연구가 수행되었다. 그후 Roldan과 Garcia(1988)는 *Theba pisana* 소화관의 해부학적 조직학적 연구를 하였으며, Alba 등(1988)은 *Helix aspersa*의 소화관에서의 내분비세포에 대해 연구하였으며, 최근에는 복족류 *Lymnaea stagnalis*의 소화관에 대한 조직화학적 및 전자현미경적 연구(Boer and Kits, 1990)와 정 등(1993)이 한국산 주요 담수 복족류 2종(*Parafossarulus manchouricus*와 *Radix auricularia coreana*)의 소화관의 미세구조에 대한 연구를 수행한 바 있다.

소화관에서의 생리·생화학적 연구에서는 더욱 미흡한 편이나 *Lammelibranch*의 섭식 및 소화에 관한 연구(Yonge, 1923), *Ostrea edulis* 소화기관의 구조와 생리적 소화에 관한 연구(Yonge, 1926), *Pterocera* 위에 특유하게 존재하는 기관인 crystalline style에서 cellulase가 분비된다는 연구(Yonge, 1932), 및 *Lammelibranch*의 crystalline style에서도 cellulolytic activity가 있다는 연구(Newell, 1953) 등이 있다. 최근 Maeda(1996)는 국내에서 식용달팽이로 알려진 *Achatina fulica*에서 cellulase를 분리하여 그 특성을 알아보기도 하였다.

상기한 바와 같이 지금까지의 동물들의 여러 기관에서 분비하는 각종 효소들에 대한 연구의 대부분은 연구 대상 기관(organ)을 대량으로 확보하여 추출물을 얻어낸 다음 이를 분석해 보는 방법으로 수행되어 왔다. 하지만 소화기관의 미세구조와 연관지어 그 물질을 분비하는 위치를 확인하는 방법이 사용된 연구는 매우 드물다.

따라서 본 연구는 세포 수준에서 동양달팽이를 재료로 cellulase의 존재를 확인하고자 시도되었다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 이용된 동양달팽이(*Nesiiohelix samarangae*)는 서해안 태안반도 부근의 섬인 '가의도'에서 채집하여 본 연구실에서 계속 사육해온 종이다.

2. 실험방법

1) 세포화학적 실험

육상패류인 동양달팽이의 소화기관 중 뱃물 부위별로 적출하여 2% glutaraldehyde로 1시간 30분간 전고정하고 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)로 10분씩 3회 수세하고, 0.01 M carboxymethyl cellulose(C.M.C.) 용액에 20분간 incubate 하였다가 Benedict's reagent에 넣어 80-90℃로 10분간 가열하여 반응을 촉진시켰다. 대조군은 이 과정에서 가열을 하지 않았다. 다음에 1% OsO₄로 1시간 30분간 후고정하고 역시 수세한 후 단계적인 alcohol 탈수과정을 거쳐 Epon 또는 araldite mixture에 매몰하여 ultramicrotome으로 초박절편을 얻어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하고, 투과전자현미경(TEM)으로 관찰하며 소화관 및 부속선별로 cellulase activity가 나타나는 부위를 찾아 관찰하였다.

2) 면역세포화학적 실험

(1) 항체의 제조

폐각을 제거한 동양달팽이의 연체부와 그의 4배 부피의 1 M phosphate buffer(pH 6.0)를 test tube에 넣고 homogenizing한 후 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 효소의 단백질 변성을 막기 위해 이러한 과정은 모두 4℃에서 실시하였다.

Cellulase 활성도 측정 : 0.1 g의 carboxymethyl cellulose와 1 g의 agar를 비이커에 넣고 생리식염수를 넣어 최종부피 100 ml가 되게 하여 끓인 후, petridish에 부은 후 공기 중에서 식혀 0.1%의 carboxymethyl cellulose를 함유하는 1% agar medium에 미리 채취한 달팽이의 체액을 spotting하였다. Spotting한 배지를 36℃에서 1시간동안 처리하고, congo red로 1-2분간 염색한 후 1 M 식염수 용액으로 탈색하였다.

(2) 효소의 추출

효소를 추출하기 위해 전기영동을 실시하였다. 효소

의 단백질 변성을 막기 위해 SDS를 첨가하지 않는 non-SDS PAGE를 실시하였다.

Local Determination of Cellulase in the Acrylamide Gel : Acrylamide gel 상의 cellulase의 위치를 detection 후 원하는 부분만 절취 tracking dye 가 gel을 빠져나가기 전 전기영동을 중지하고 gel 상의 한 개의 lane만 절취하여 cellulase 활성도 측정에서와 같은 방법으로 gel 상에서 cellulase의 위치를 알아내었다.

(3) 항체의 제조

Elution 시킨 PBS 용액과 동일한 양의 Freund's complete adjuvant를 섞은 용액 8 ml 정도를 생후 3개월 된 토끼의 피하지방에 여러 군데 나누어서 주사하였다. Boosting을 위해 1차 접종 2주 후 다시 재접종을 실시하였다.

항체 생성을 확인하기 위하여 boosting 2주 후 토끼의 귀에서 혈액을 약 1 ml 정도 채취하고, 3000 rpm에서 원심분리하여 혈청만 채취하였다.

항체 형성을 확인하기 위하여 1% agar 배지를 이용한 통상적인 double diffusion 방법을 이용하였다.

IgG 분리는 cardiac puncture로 채취한 혈액으로부터 혈청을 분리한 후 DEAE sephacell column chromatography를 이용해서 IgG를 분리하였다.

각각의 분획을 280 nm(UV)에서 OD값을 측정하고 실제로 항체로 쓸 수 있는 분획을 선정한 후 동결건조하여 보관하였다.

2. TEM 관찰용 Block 및 절편 제작

동양달팽이의 패각을 제거한 후 위를 절취하였다. 4℃를 유지한 채 0.1 M phosphate buffer(pH 6.0)를 사용한 4% paraformaldehyde에 3시간동안 단일고정 하였다. 탈수과정은 alcohol 농도 30%에서는 0℃를 유지하며 30 분 동안 실시하였으며, 50%에서는 -20℃에서 1시간, 70%에서는 -35℃에서 1시간, 95%에서는 -35℃에서 1시간, 100%에서는 -35℃에서 1시간씩 2회 실시하였다. 침투과정은 -40℃를 유지한 채 resin과 ethanol 비율 1 : 1에서 1시간, 2 : 1에서 1시간 pure resin에서 1시간, 다시 pure resin에서 15시간 넣어 두었다. 투명한 gelatin capsule을 사용하여 Lowicryl K4M에 포매 한 후 계속 -40℃를 유지하며 UV(360 nm)에서 3일간 중합하였다. 완성된 Lowicryl K4M block을 ultramicrotome을 이용해서 70 mm 두께로 박

편을 제작하여 grid에 얹었다..

3. Immunogold Labeling

비특이적인 항원항체 반응을 제거하기 위해서 3% BSA(bovine serum albumen)에 20분간 처리한 후, 1차 항체(anti-cellulase in phosphate buffer pH6.0)에 grid를 띄운 후, 4℃ humidity chamber에서 overnight 하고 5분씩 3회 PBS로 세척하였다. 2차 항체(20 nm gold-conjugated anti-rabbit IgG, Sigma사)를 PBS (pH 7.4)에 80 : 1로 희석하여 humidity chamber에 넣어 상온에서 2시간동안 반응시킨 후 5분씩 3회 PBS에 grid를 띄워서 세척한 후 2차 증류수로 철저히 닦아내었다.

면역염색이 끝난 grid는 uranyl acetate로 10분, lead citrate로 2분간 대조염색하여 투과전자현미경(JEM-1010)으로 관찰하였다.

결 과

1. 항체의 확인

Cellulase 활성을 확인한 결과 Fig. 1에서와 같이 기질이 존재하는 부분이 붉은 색으로 염색이 되었고, 달팽이의 체액에서 존재하는 cellulase에 의해 CMC가 분해된 부분은 염색이 되지 않았다. 이로서 동양달팽이의 체액에는 cellulase가 있음을 확인 할 수 있었다.

Non-SDS PAGE의 각 lane에서 Fig. 2와 같이 gel 상에서 염색이 되지 않는 부분을 cellulase의 띠로 간접 확인하는 방법에 의해 gel 상에서 cellulase의 위치를 확인할 수 있었다.

Cellulase가 확인 된 gel에서 cellulase를 추출한 후 이를 항원으로 하여 gel diffusion을 시행한 결과 가운데 hole과 1, 2, 4, 5번 hole 사이에 생성된 immunoprecipitin line을 확인함으로써 항체가 형성된 사실을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

항체의 형성을 확인한 후 DEAE Sephacell column chromatography를 통해 얻어진 각 분획들의 OD 값을 280nm(UV)에서 측정한 결과를 그래프로 도식화하였다(Fig. 4). 그래프의 X축은 fraction number 이며, Y축은 OD값을 나타낸다(Fig. 4).

2. 전자현미경 관찰

1) 세포화학적 실험결과

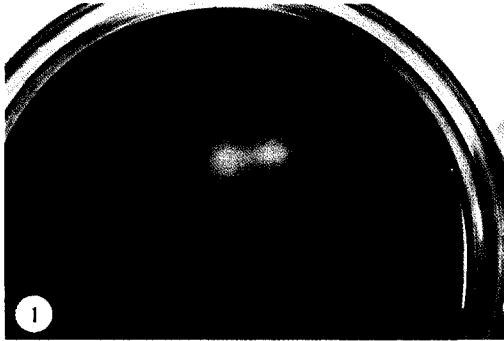


Fig. 1. Cellulase activity confirmed in the agar medium by congo red stain. The white spot indicates the place where cellulase exists.

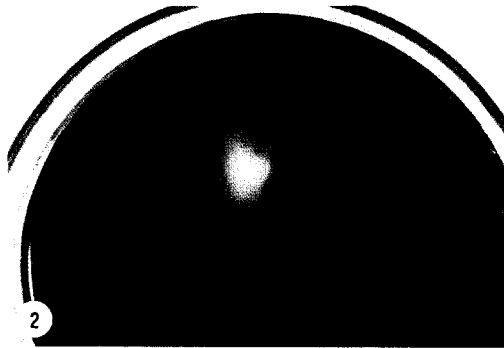


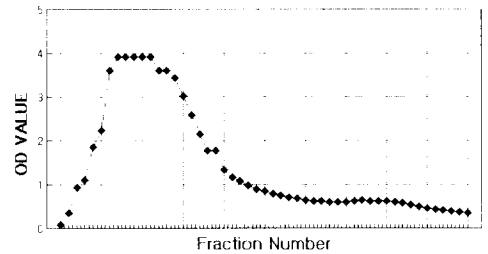
Fig. 2. Cellulase localization the acrylamide gel by electrophoresis

동양달팽이 위는 단층원주상피로 이루어졌고 이 상피를 이루는 세포들은 Type 1, 2, 3의 세가지 유형의 세포들이 관찰되었다. 이들의 공통점은 세포의 유리표면 즉, 위의 내강과 연관 표면에는 한결같이 길이 1.8 μm 정도의 미세융모가 발달되어 있고, 세포들이 기저막과 연관 부위의 원형질막은 위의 세포질 내로 심한 주름을 이루고 있다.

Type 1 세포들은 상피세포의 대부분을 차지하고 있는 세포로 세포질 내에 많은 중성점액분비과립을 내포하고 있고, Type 2 세포는 Type 1 세포들 사이에 가끔씩 개재하며 세포질의 전자밀도가 높고 rER과 골지체가 상당히 발달하였으며 산성점액 물질을 내포한 세포이다. Type 3 세포는 내부 구조가 Type 1 세포와 일반적으로 유사하나 세포의 유리표면에 섬모가 있는

③

Fig. 3. Result of double diffusion. The immunoprecipitation bands indicate that the antibody has already produced



④

Fig. 4. Determination of optical density in the 280 nm (UV) by the UV spectrophotometry

점이 다르다.

Benedict 반응을 실시한 위의 상피세포 세포질들이 많은 변형을 일으킨 까닭에 세포질 내에 수많은 vacuole을 형성하였고 cellulase활성을 보여주는 양성반응이 주로 vacuole과 원형질과의 경계면에서 강하게 나타났다(Figs. 6, 8, 9, 10).

2) Immunogold labeling 결과

1차 항체와는 반응시키지 않고, 2차 항체 처리 등의 다른 과정은 모두 똑같이 수행한 결과 대조군에서는 전체적으로 반응이 일어나지 않아 비특이적으로 표지된 gold particle이 간혹 관찰되는 경우는 있었으나 rER 및 apical cytoplasm 및 기타 세포 소기관에는 아무런 표지가 되지 않았음을 관찰할 수 있었다(Figs. 11, 13, 15).

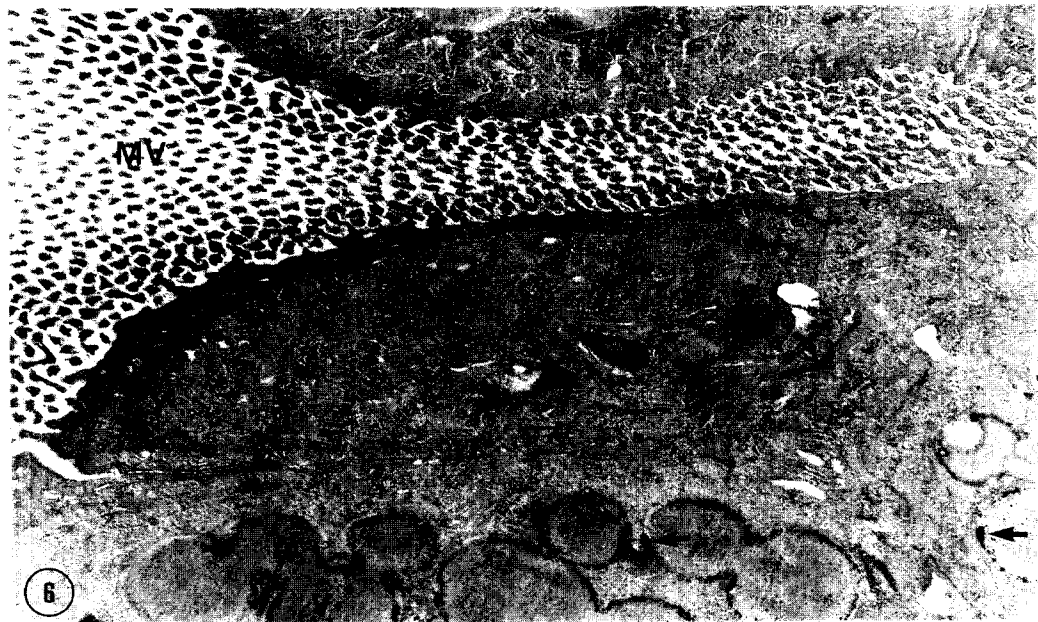
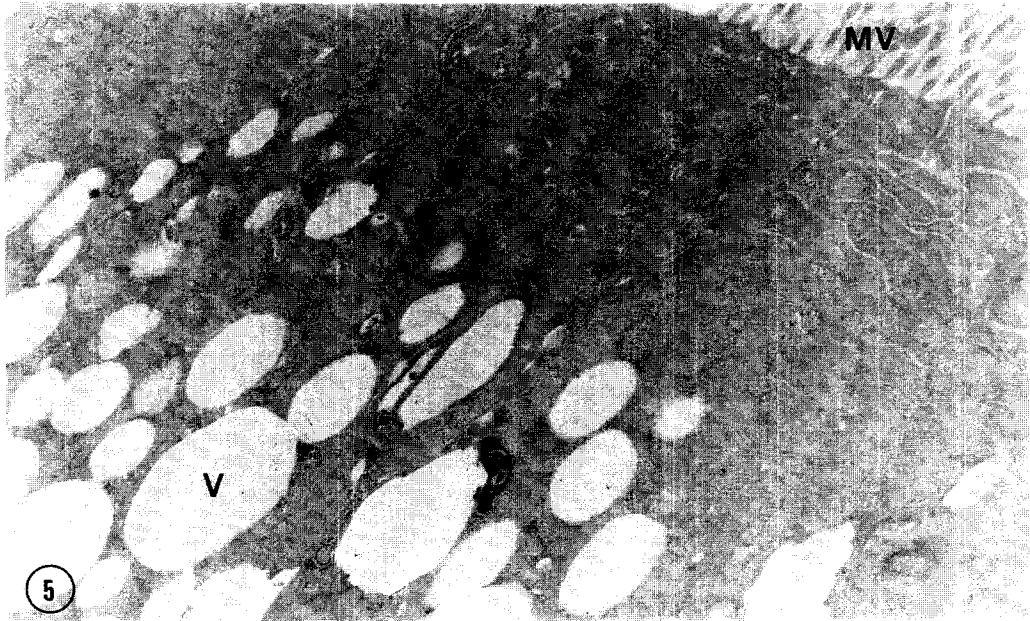


Fig. 5. Control epithelial cells not showing any cellulase activity. Numerous vacuoles are clear. $\times 16,000$.

Fig. 6. Type 1 cells containing vacuoles with the cytochemical reaction products in the peripheral regions. $\times 11,000$.

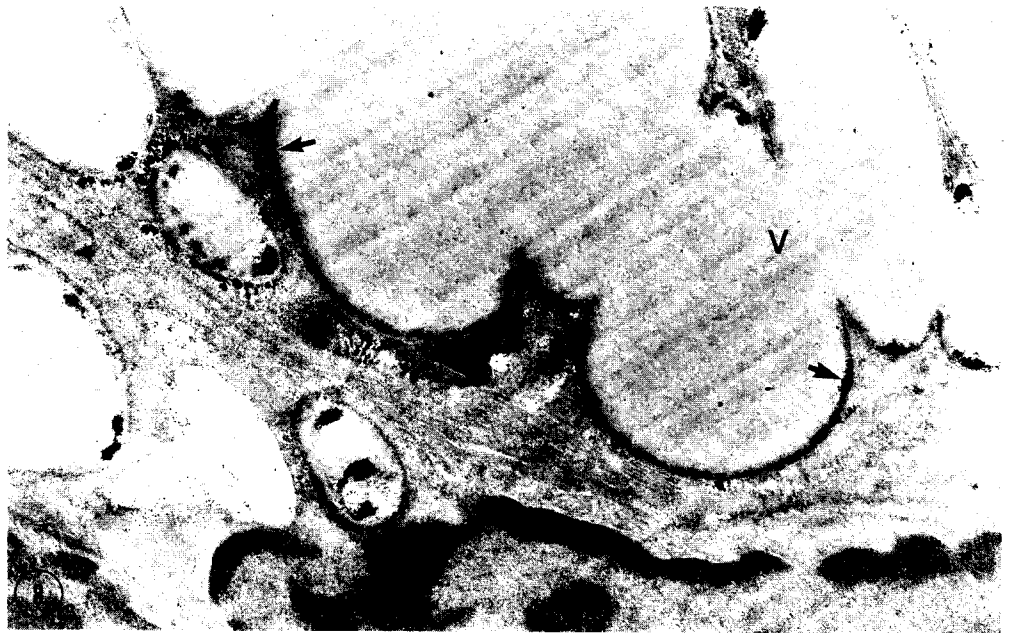
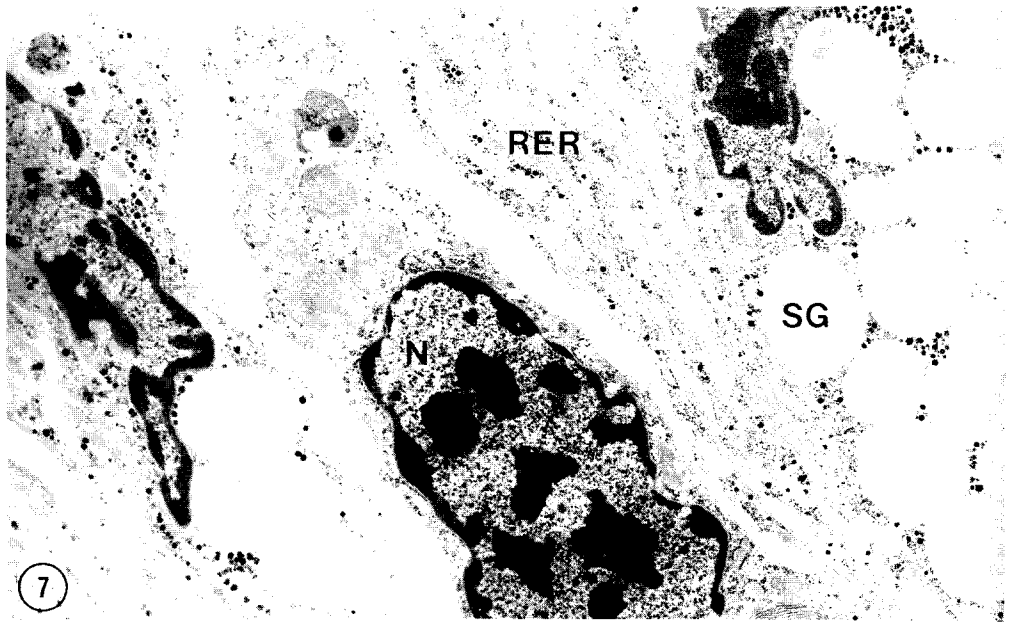


Fig. 7. Normal Type 1 and Type 2 cells with secretory granules. $\times 16,000$.

Fig. 8. Type 1 cells with large vacuoles. Cytochemical reaction products lined the walls. $\times 40,000$.

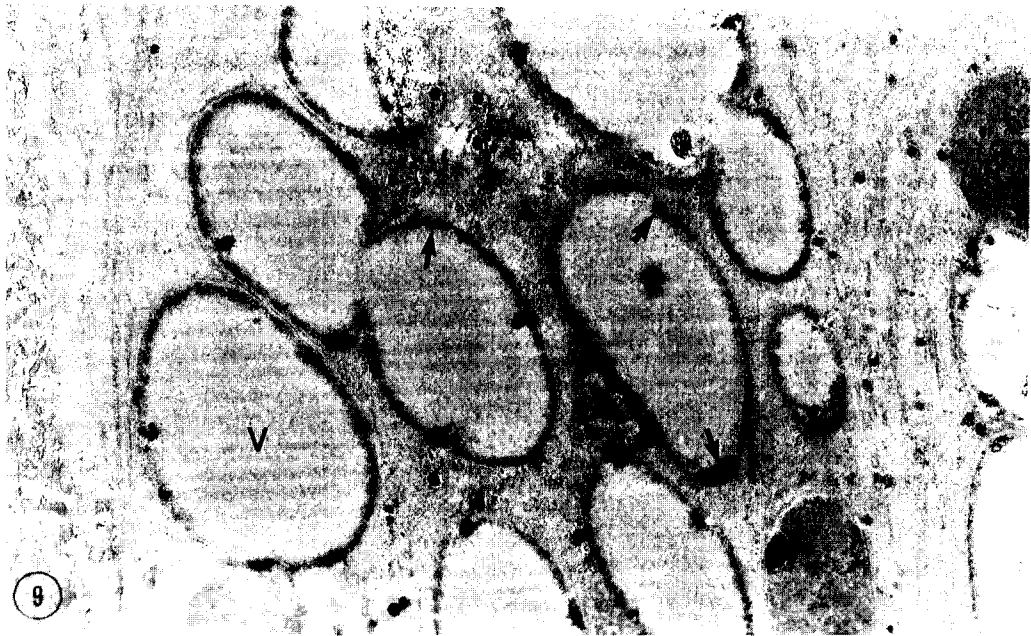


Fig. 9. The vacuoles showing the cytochemical reaction products along the periphery. $\times 22,000$.

Fig. 10. High magnification of vacuoles showing the cytochemical products(arrowed). $\times 40,000$.

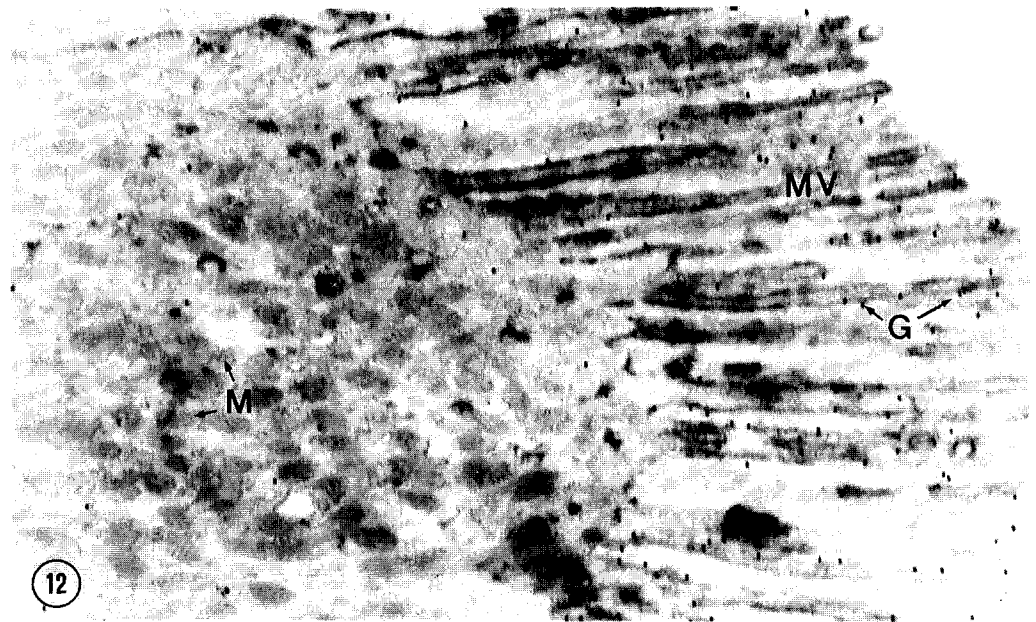
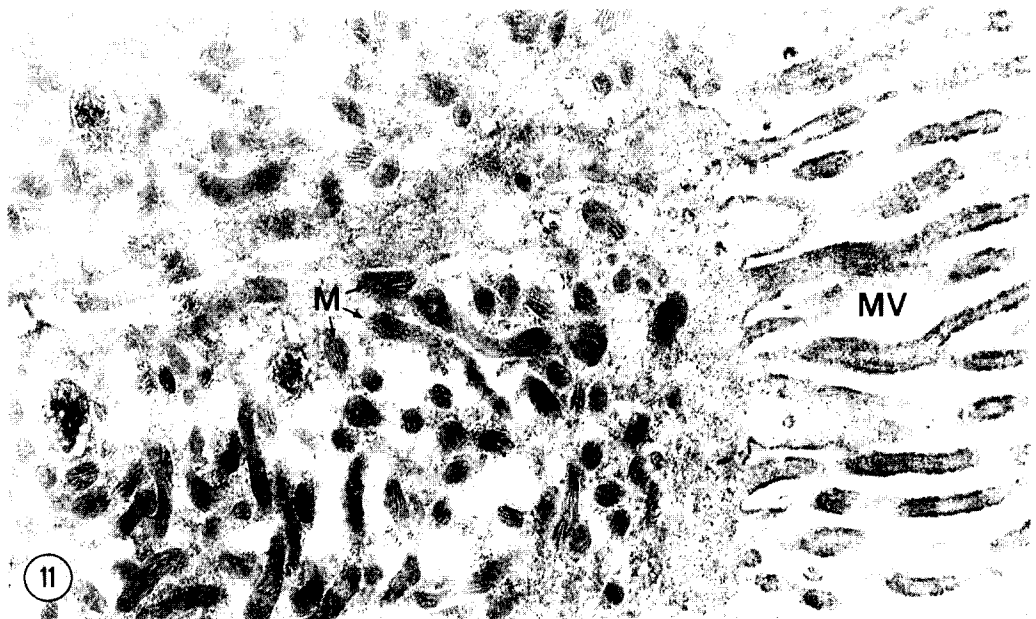


Fig. 11. Control Type 1 cell without any immunogold particles labeled.

M: mitochondria, MV: microvilli $\times 40,000$.

Fig. 12. Apical portion of Type 1 cell labeled with protein-A gold. Membranes of the microvilli(MV) and apical cytoplasm are labeled but mitochondria(M). $\times 20,000$.

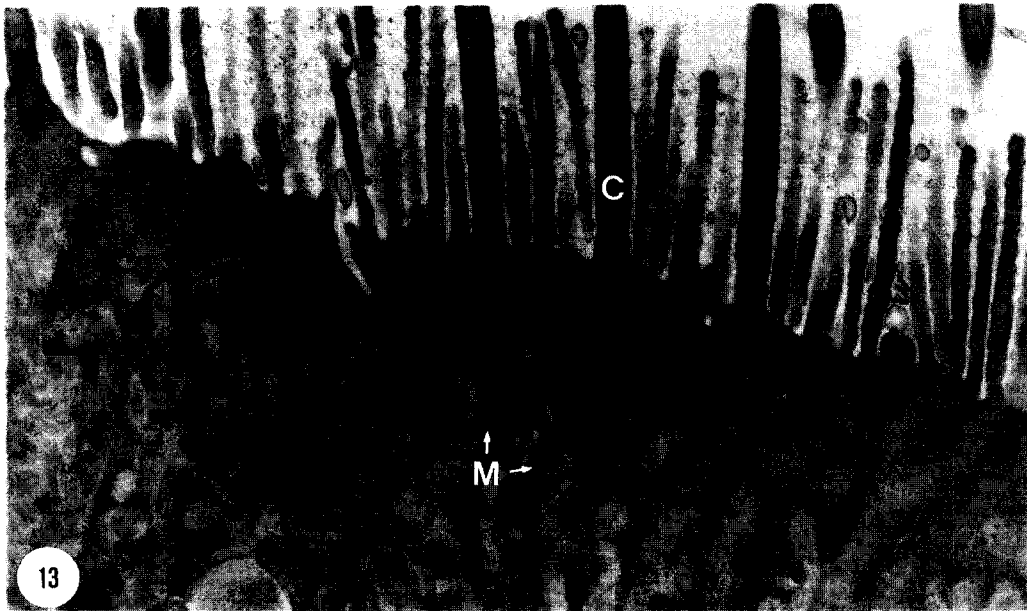


Fig. 13. Control Type 3 cells with microvilli and cilia(C) on the free surfaces. None of protein-A gold particles are labeled. $\times 16,000$.

Fig. 14. Apical portion of Type 3 cell. The cytoplasm is selectively labeled with protein-A gold. Mitochondria are free from the gold particles. $\times 15,000$.

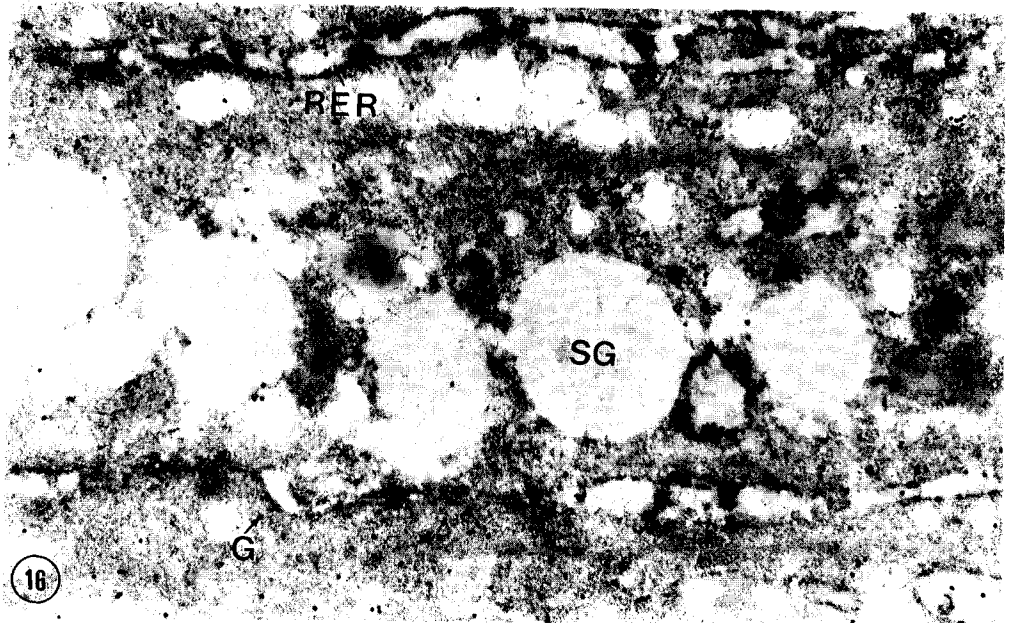


Fig. 15. Control Type 1 cell cytoplasm free from the protein-A gold particles.

SG: secretory granule, rER: rough surfaced endoplasmic reticulum $\times 20,000$.

Fig. 16. Type 1 cell cytoplasm labeled with the protein-A gold particles but the secretory granules are free from the gold. $\times 30,000$.

Gold particle은 상피세포의 rER의 막과 주변 세포질, 분비과립의 주변, 미세음모의 막과 그 주변에 분비물로 추측되는 부위에 표지되었으며, 세포 내에 있는 분비과립 내부와 mitochondria 및 위의 내강에는 표지되지 않았다(Figs. 12, 14, 16)

고 찰

연체동물의 소화관 상피에서는 여러 종류의 세포유형이 존재하는 것으로 과거의 연구결과 알려져 있다. Owen(1956)이 Lamellibranchia의 위에서 3개의 region이 있어 각 부위의 기능이 다를 것임을 예견한 이후, Demian과 Michelson(1971)은 *Marisa cornuarietis*의 소화관 상피의 구성세포들은 6개의 유형이 존재하며 4종류의 mucosubstance를 분비한다고 보고하였으며, Rudman(1972a, b)은 Bullomorpha의 장 상피 세포들을 2개의 유형으로 분류하였고 Roldan와 Garcia(1988)는 *Theba pisana*의 소화관 상피에서 2개의 세포유형을 분류한 바 있다. 본 연구결과 동양달팽이의 위에서는 3개의 세포유형으로 분류되었는 바 Type 1 세포들이 가장 많았고 이들 세포질 내에는 많은 수의 중성점액다당류인 분비과립을 가지고 있었고, Type 2 세포들은 수가 적고 산성점액다당류를 주로 분비하는 세포로 생각되고, Type 3 세포는 역시 수가 적고 유리표면에 섬모를 가지고 있으며 균을 이루어 존재하는 경우가 많았다. 연체동물의 위에 존재하는 섬모는 Morton(1953, 1960), Smith(1967) 그리고 Rudman(1972a, b) 등에 의해 이미 발견된 바 있는데, 위 속의 mucous의 운반기능을 하는 것으로 알려져 있다. 초식성인 연체동물의 일부 소화기관 상피세포들이 섬유소를 분해하기 위하여 cellulase를 분비하거나 아니면 공생하는 미생물 등이 cellulase를 공급할지도 모른다는 종래의 여러 보고가 있었다(Theodore, 1946; Newell, 1953) .

Cellulose는 동물의 장기 내에 이를 소화시킬 소화효소가 없어서 소화되지 못하는 식물세포의 세포벽성분을 말하는데, glucose가 β -1,4 결합으로 이루어진 중합체로써, 동물의 에너지원인 당과는 결합형태만 다르며, 자연상태에서는 단독으로 존재하는 경우가 드물어 녹말(starch), 펙틴(pectin), 목질소(lignin)등의 다당류와 결합되어 있는 물질로써, 자연상태에서는 분해속도가 매우 느리며, 척추동물이 섭취했을 경우 미생물이 공생하는 경우를 제외하고는 배설물로 배출될 뿐 소화되지 않

는다. 이러한 섬유소의 분해과정은 다음과 같이 3가지 효소의 활성이 필요한데, 우선 endo-glucanase(β -1,4-D glucanohydrolase)는 β -1,4 결합을 무작위적으로 분해하고 carboxymethyl cellulose (CMC), 저분자량의 수용성 섬유소, 인산 가수분해된 섬유소 등을 쉽게 분해하나 결정형 섬유소를 단독으로 분해하지는 못한다. Exoglucanase(β -1,4-glucan cellobiohydrolase)는 섬유소의 말단에 작용하여 cellobiose를 생성한다. 특히 기질이 결정상으로 존재할 때 중요하다. β -glucosidase(β -glucoside glucohydro-lase, cellobios)는 cellobiose와 저분자량의 수용성 섬유소를 분해하여 glucose를 생성한다. 이러한 섬유소 분해효소는 과거 미생물에서만 분비되어지는 것으로 알려져 왔으나, 최근의 보고에 의하면 붉은 지렁이(*Lumbricus rubellus*), 아프리카산 왕달팽이(*Achatina fluica*)등에서도 분비된다고 한다(송, 1994).

본 연구에서 위 조직에 대하여 Benedict 반응을 실시하고 조직의 초박절편을 관찰하여 cellulase의 활성을 조사한 것은 CMC기질에 의해 포착된 cellulase의 활성은 glucose의 형태로 존재하게 되는데 환원당인 포도당은 높은 온도(85-90°C)의 Benedict용액에서 황산동의 결정체 형태로서 전자현미경에 의해 관찰이 가능한 원리를 이용한 것인데 이 경우 전고정 후에 조직에 열을 가하는 과정에서 세포의 미세구조가 변형되는 것으로 사료된다. 이같은 원리를 이용하여 조직 내의 cellulase 존재를 밝히고자 Bal(1974), Kim과 Mahlberg(1989) 등이 식물을 대상으로 한 연구가 있다.

면역세포화학적 실험을 위하여 항원으로 사용될 cellulase의 항원성을 유지하려는 목적으로 Huvard(1993)는 ostracods에서 luciferase라는 효소를 gold labeling하기 위해서 O_3O_4 를 이용하는 후고정 과정을 생략한 바 있다. 본 연구에서도 동일한 목적으로 전고정만 하고 O_3O_4 를 이용하는 후고정 과정을 생략하였다. Huvard도 그의 연구 보고서에서 언급하였듯이 O_3O_4 를 이용하여 후고정을 하지 않은 조직은 gold labeling은 잘 되지만 조직의 상태는 좋지 않은 편이었다.

역시 항원성을 유지하기 위하여 즉, 온도에 의한 단백질변성을 방지하기 위하여 저온(-40°C)에서 자외선(UV)을 조사하여 중합하는 Lowicryl K4M을 사용하여 포매하였는 바 이 과정은 동일 조직을 60°C에서 Spurr에 포매하였을 때보다 gold labeling이 잘 되어 성공적이었다.

Gold particle 표지 결과 primary Ab(anti-cellulase)가 polyclonal antibody이기 때문에 특이도가 약간 떨어지지만, 위 상피세포에 존재하는 분비과립 주위와, rER의 막과 주변 세포질, 미세융모 막 및 주변에 분비물로 추측되는 부위에 gold particle이 표지되었으며, 세포의 첨단부 세포질에도 표지되었지만 분비과립 자체, mitochondria와 위 내강에는 표지되지 않았는 바 이는 gold particle이 주로 cellulase활성이 있는 부위에 표지되었을 것으로 생각된다.

이상의 세포화학적 및 면역세포화학적 연구의 모든 결과는 동양달팽이의 위 상피세포들이 분명히 cellulase를 분비하고 있다는 사실을 증명하는 충분한 자료가 된다고 사료된다.

요 약

동양달팽이의 위 상피에서 섬유소 분해효소의 분비 여부를 확인하기 위해 세포화학적 방법과 immunogold labeling method를 수행되었다.

*Nesiohelix samarangae*의 위에선 3가지 종류의 원주상피가 관찰되었다. 이 중 Type 1 세포는 microvilli가 발달하고 매우 많은 분비과립을 함유하고 있었으며, Type 2 세포는 위로 치우친 핵과 전자밀도가 높은 세포질에 rER이 매우 발달해 있었다. Type 3 세포는 섬모와 미세융모를 함께 가지고 있는 세포로서 분비과립을 약간 함유하는 것으로 관찰되었다. 세포화학적 방법으로 위 상피에서의 cellulase의 활성을 시험해 본 결과 상피세포의 대다수를 차지하는 Type 1 세포들과 Type 3 세포들의 분비과립들의 주변에서 cellulase 활성이 높았고, immunogold staining 결과는 황금입자가 위 상피의 분비과립 주위의 세포질과 rER의 막과 주변세포질, 그리고 상피세포들의 첨단부 세포질 등에서 표지되었다.

이상의 모든 실험 결과는 동양달팽이의 위 상피세포에서 cellulase가 분비된다는 사실을 알았다.

참 고 문 헌

- Alba, Y., Villaro, A.C., Sesma P., Vazquez, J.J. and Abaurrea, A. (1988) Gut endocrine cells in the snail *Helix aspersa*. *General and Comparative Endocrinology*. **70**: 363-373.
- Bal, A.K. (1978) Principles and method. *In*: Electron Microscopy of Enzymes. (ed. by Hayet. M.A.) 3: 68-78. Van Nostrand Reinhold Co., New York.
- Boer, H.H. and Kits, K.S. (1990) Histochemical and ultrastructural study of the alimentary tract of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Morphology*. **205**(1): 97-111.
- Demian, E.S. and Michelson E.H. (1971) Histochemistry of the epithelial mucins in the alimentary tract of the snail *Marisa cornuarietis*. *Journal of Morphology*. **135**: 213-238.
- Huvar, A.L. (1993) Ultrastructure of the light organ and immunocytochemical localization of luciferase in luminescent marine ostracods (Crustacea: Ostracoda: Cypridinidae). *Journal of Morphology*. **218**: 181-193.
- Johnston, A. and Thorpe, R. (1982) Immunocytochemistry in practice. Blackwell Scientific Publ.
- Kim, E.S. and Mahlberg (1989) Cytochemical localization of cellulase activity associated with secretory cavity formation in gland of *Cannabis* (Cannabaceae).
- Lufty, R.G. and Demian, E.S. (1967) The histology of the alimentary system of *Marisa cornuarietis* (mesogastropoda: ampullariidae). *Malacologia*. **5**(3): 375-422.
- Maeda, I., Shimohigashi, Y., Kihara, H. and Ohno, M. (1996) Purification and characterization of a cellulase from the giant snail *Achatina fulica*. *Biosci Biotechnol Biochem*. **60**: 122-124.
- Morton, J.E. (1953) The functions of the gastropod stomach. *Proc. Linn. Soc. London*. **164**:240-246.
- Morton, J.E. (1960) The functions of the gut in ciliary feeders. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* **35**: 92-140.
- Newell, B.S. (1953) Cellulolytic activity in the Lamellibranch crystalline style. *Journal of Marine Biology. Ass. U.K.* **32**:491-495.
- Owen, G. (1956) Observations on the stomach and digestive diverticula of the Lamellibranchia. *Quarterly Journal of Microscopical Science*.

- 97(4):541-567.
- Purchon, R.D. (1956) The stomach on the Probranchia and Septibranchia(lamellebranchia). *Proc. Zool. Soc. London.* 127: 511-525.
- Roldan, C. and Garcia, C. (1988) Anatomy and histology of the alimentary tract of the snail *Theba pisana* (Gastropoda : Pulmonata). *Malacologia.* 28(1-2): 119-130.
- Rudman, W.B. (1972a) Structure and functioning of the gut in the Bullomorpha (Opisthobranchia), Part II. Acteonidae. *Journal Natural History.* 6: 311-324.
- Rudman, W.B. (1972b) Structure and functioning of the gut in the Bullomorpha (Opisthobranchia), Part 3. Philinidae. *Journal of Natural History.* 6: 459-474.
- Smith, E.H. (1967) The neogastropod stomach, with notes on the digestive diverticula and intestine. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh.* 67(2): 23-42.
- Theodore, F.L. (1946) A study of the enzymatic and other properties of the crystalline style of clams. Evidence for the presence of a cellulase. *Journal Cell Comp Physiology.* 28: 183-195.
- Yonge, C.M. (1923) Studies on the comparative physiology of digestion. The mechanism of feeding and assimilation in the lamellibranch. *Mya. Brit. Journal Exp. Zool.,* 1: 15-63
- Yonge, C.M. (1926) Structure and physiology of the organs of the feeding and digestion in *Ostrea edulis*. *Journal of Marine Biology. Assn.,* 14: 295-386.
- Yonge, C.M. (1932) Notes on feeding and digestion in Pterocera and Vermetus, with a discussion on the occurrence of the crystalline style in the Gastropoda. *Sci. Rep. Gt. Barrier Reef. Exped.,* I(10): 259-81
- 송영숙 (1994) *Lumbricus rubellus*의 cellulose 분해효소. 연세대학교 대학원 생화학과 석사학위논문.
- 정계현, 이훈섭, 박종안 (1993) 韓國産 淡水 腹足類 2種의 消化器官에 關한 電子顯微鏡的 研究. 한국패류학회지. 9(1):1-6.

Received November 5, 1997

Accepted December 11, 1997