

## Immobilization of Phospholipase C by sol-gel method

Ok-Jae Sohn<sup>1,3</sup>, Yong-Sik Yim<sup>3</sup>, Jin-Su Jung<sup>2</sup>, Yong-Jun Lee<sup>2</sup>,  
Hye-Na Lee<sup>2</sup> and Jong Il Rhee<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Material and Biochemical Engineering, <sup>2</sup>Faculty of Applied Chemical Engineering,

<sup>3</sup>BioProcess Technology lab., Chonnam National University,

Yong-Bong dong 300, 500-757 Gwangju, Republic of Korea

Tel: 82-062-530-0847, Fax: 82-062-530-0846

### Abstract

Phospholipases C (PLCs) from *B. cereus* 318 and recombinant *Pichia pastoris* were immobilized on sol-gel coated glass beads. The pH and temperature on immobilized PLC activity were investigated. Operational and storage stability of the immobilized PLCs was measured by spectro- photometric assay. The PLCs immobilized on sol-gel coated glass beads were photographed by scanning electron microscope (SEM).

### 서론

Phospholipase C (PLC)는 의약품, 식품첨가제, 화장품 그리고 세척제 등에 많이 이용되는 Phospholipid의 가수분해를 촉매하여 diacylglycerol (DAG)과 phosphate monoester를 생산하는 효소로서 mammalian PLC와 유사한 역할을 한다. 또한 최근 광학 이성질적으로 DAG의 생산을 위해 산업적으로 사용되어지고 있다. 이러한 PLC는 주로 미생물 *Bacillus*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Clostridium* 등의 배양으로부터 얻어지는데, 정제된 PLC를 얻기는 쉽지않다. 따라서 고가의 PLC를 보다 경제적으로 산업에 응용하기 위해서는 PLC의 고정화기술 개발이 필수적이다. 본 연구에서는 야생균주인 *B. cereus* 318과 *B. cereus* ATCC10987에서 분리된 PLC 유전자를 pPICZa C에 삽입하여 메탄올 자화 효소인 *pichia pastoris* GS115, X-33, KM71H에 도입한 재조합 균주로부터 얻어진 PLC를 고정화하였다. PLC의 고정화를 위해 Sol-gel 방법을 사용하여 고정화 담체인 glass beads에 공유결합 하였다. 그리고 고정화 PLC의 물리·화학적 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

본 연구에서 사용된 PLC는 *B. cereus* 318과 재조합 *pichia pastoris*의 발효로부터

얻어진 효소를 사용하였다. 그리고 고정화 효소 담체로서 Sigma로부터 구입하였고, 각각 직경이 1000, 100  $\mu\text{m}$  glass beads를 이용하였다. 그리고 담체와 효소간의 공유결합을 위해 3-glycidoxypropyl-dimethoxymethylsilane (Sigma Co.)을 사용하였다.

### 효소의 고정화

고정화 담체인 glass beads에 PLC가 공유결합할 수 있는 작용기는 3-glycidoxypropyl-dimethoxymethylsilane에 ethanol을 용매로 하고 acid로 처리하여 sol-gel을 준비하였다. 준비된 sol-gel을 24시간동안 담체 표면에 코팅처리하였다. 그 후 본 연구실에서 생산된 PLC용액을 하루동안 sol-gel로 처리된 담체와 반응시켰다(Figure 1). 그리고 PLC가 고정화된 glass beads는 인산완충용액(pH 7.0, 0.1 M)으로 수차례 세척 후 4°C 냉장보관하였다.

### 분석 방법

고정화된 PLC의 활성을 측정하기 위해 *p*-nitrophenylphosphoryl-choline (p-NPPC)를 이용하여 spectrophotometric assay를 사용하였다. p-NPPC는 PLC에 의해 *p*-nitrophenol과 phosphorylcholine으로 분해되는데 이때 생성된 *p*-nitrophenol이 유색반응을 하고 이를 405 nm에서 흡광을 측정하였다. 그리고 검출기로는 microplate reader Wallac 1420 VICTOR2 (PerkinElmer Co., USA)와 OPTIZEN 2020(MECASYS Co. Korea)을 사용하였다.

### 결과 및 고찰

각종 미생물로부터 생산되어지는 PLC를 실제 생물공정에 적용하기 위해 PLC의 고정화 기술을 개발하였다. 3-glycidoxypropyl-dimethoxymethylsilane을 처리한 glass beads에 공유결합시킨 PLC의 물리·화학적 특성을 조사하기 위해 단백질 정량법을 이용하여 고정화 효율을 조사하였다. 그리고 고정화 PLC가 최적활성을 나타내는 PH 및 반응온도를 살펴보았다. 그리고 고정화 된 효소의 결합 및 활성 안정상태를 조사하기 위해 저장안정성과 조작안정성을 테스트하였다. 고정화 효소의 저장안정성은 20일 동안 하루 5회 효소반응을 시켜 활성을 테스트 하였으며, 조작안정성은 24시간 동안 연속하여 효소반응을 일으켜 고정화 효소의 활성상태를 살펴보았다. 또한 주사전자 현미경 (SEM)을 통하여 sol-gel이 코팅된 glass beads 및 PLC가 고정화 된 glass beads의 입자 크기 및 구조를 고찰하였다.

### 요약 및 전망

본 연구에서는 미생물로부터 생산되는 PLC를 실제 생물산업에 적용하기 위해 PLC의 고정화 기술을 개발하였다. 고정화 효소의 실제 공정으로의 적용가능성을 알아보기 위해 저장 및 조작 안정성을 조사하였고, 각종 물리·화학적 변수들이 고정화 효소에 미치는 영향성을 조사하였다. 그리고 주사전자현미경 사진을 통하여 고정화 PLC 및 담체의 구조적 특성을 고찰하였다. 향후 본 연구에서 개발된 PLC의 고정화 기술과 생산된 PLC를 실제 유지산업에 적용하고자 한다.

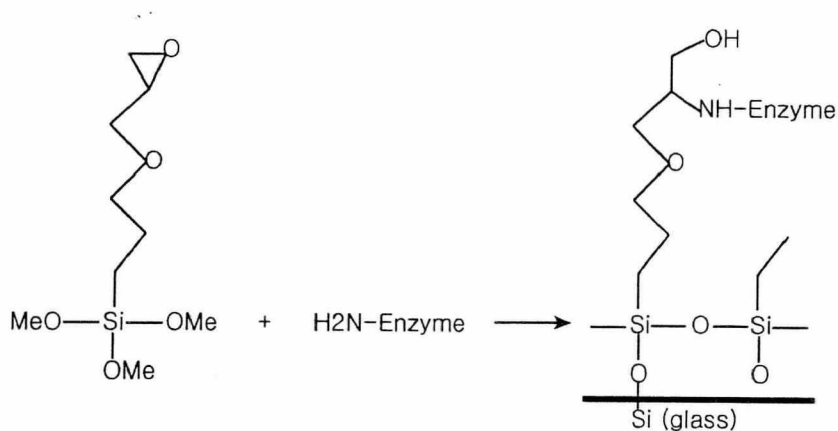


Figure 1. Immobilization of PLC on sol-gel activated glass.

### References

1. V. M. Balcao, A. L. Paiva and F. X. Malcata, "Bioreactors with immobilized lipases: Atate of the art", (1996), *Enzyme and Microbial Technology*, **18**:392-416.
2. J. Lin, C. W. Brown, "Sol-gel glass as a matrix for chemical and biochemical sensing", (1997), *Trends in analytical chemistry*, **16**(4):200-211.
3. P. C. Pandey, S. Upadhyay, H. C. Pathak, "A new glucose sensor based on encapsulated glucose oxidase within organically modified sol-gel glass", (1999), *Sensors and Actuators B*, **60**:83-89.