

다중 교반형 생물반응기에 의한 배추 Phospholipase D의 특성연구

박 동 훈 · 정 의 호 · *이 해 익 · 이 상 영
강원대학교 농과대학 식품공학과
*강원대학교 농과대학 생물응용공학과

Characterization of Chinese Cabbage Phospholipase D by a Multistirring Batch System Bioreactor

Park Dong-hun, Eui-ho Chung, Hae-ik Rhee*, Sang-young Lee
Department of Food Science and Technology and *Department
Of Applied Biotechnology, Kangweon National University

ABSTRACT

Phospholipase D catalyzes the phosphatidohydrolysis and transphosphatidylation of phospholipid in the biological systems. In this study we were partially purified phospholipase D from Chinese cabbage and the characterization of the enzyme was carried out in a multistirring batch system bioreactor. The enzyme showed optimum activity at pH 5.6, highest activity at 37°C and Ca²⁺ is important for the enzyme activity. Optimum concentrations of Ca²⁺ for phosphatidohydrolysis was 20 mM and for transphosphatidylation was 40 mM, respectively. Some organic solvents such as diethylether, isopropylether and butylacetate were activated the enzyme activity. On the other hand, EDTA, Ba²⁺, Mn²⁺ and Zn²⁺ showed inhibitory effect on the enzyme activity. The base acceptors in transphosphatidylation by the Chinese cabbage phospholipase D were tested. Various poly- and monohydroxy alcohols were found to be active.

서 언

Phospholipase D(PLD: EC 3.1.4.4)는 인지지방질의 가수분해 반응과 염기 전이반응을 촉매하는 효소이다. 분효소는 시금치, 당근, 양배추, 땅콩, 목화씨 등의 식물조직과(1, 2) 토끼 및 쥐의 뇌조직(2) 그리고 *Corynebacterium bovis*, *Streptomyces chromofuscus*, *Porphyridium cruentum* 등의 미생물(2)에 이르기까지 생물계에 널리 분포되어 있으며 이에 관한 효소학적 연구, 신생아의 RDS(respiratory distress syndrome) 예방 신물질 합성 등에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. PLD의 특이적인 두가지 반응 중에서도 염기 전이반응은 생물 세포막을 구성하는 인지지방질의 결합 비율과 깊은 관계가 있는 것으로 연구

되어 왔으며 이와같은 성질을 이용하여 최근에는 생물반응기 내에서 lecithin으로부터 phosphatidylglycerol(PG)이나 phosphatidylethanolamine(PE)등을 대량 생산할 수 있는 기술개발이 활발히 진전되고 있다(4). 또 한편으로는 인지지방질 가운데 cardiolipin(CP)이 약리적 작용이 있다는 사실 등이 확인됨으로써 lecithin으로부터 염기전이 반응을 이용한 공업적인 생산방법도 시도되고 있으며 의료계에서는 매독혈청 진단용 등 병리학적인 연구도 전개되고 있다(5, 6).

이와같이 PLD의 특성을 이용한 인지지방질의 임상 병리학적 연구가 양배추 기원의 효소를 위시하여 급진적으로 발전되어 오고있는 것에 반하여 우리나라에서 식용으로 다량 재배되고 있는 배추에 관해서는 아직 연구 보고된

것이 없다. 따라서 본 연구에서는 배추로부터 PLD를 부분정제하여 다중교반형 생물반응기를 이용한 PLD의 생화학적 성질에 대한 특성을 규명하여 얻은 몇가지 결과를 보고 하고자 한다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용한 재료는 신선한 결구 배추를 시중에서 구입하여 녹색부분을 제거하고 내부 황색부분을 효소 조제 원료로 사용하였다. 효소반응기질인 lecithin(phosphatidylcholine, PC)과 표준물질인 phosphatidylglycerol (PG)은 Sigma사 제품을, 그리고 염기수용체인 glycerol 및 유기용매 기타 분석시약은 시판 특급품을 사용하였다.

배추 PLD의 정제

시료 배추를 4℃에서 juicer로 즙액을 만든 다음 gauze로 여과하고 여액을 5,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 50℃에서 5분간 열처리한 후 급냉시켜 5,000×g에서 다시 원심분리하여 상등액을 얻었다(4, 7).

이 상등액에 미리 냉각 시켜둔 아세톤(-15℃)을 2배량 가하여 단백질을 침전 시킨다음 다시 5,000×g로 원심분리한 후 잔사에 남아있는 아세톤을 질소가스 기류 하에서 날려 보낸다음 동결 건조하여 아세톤 분말효소를 만들었다. 분말효소는 50mM sodium acetate buffer (pH 5.6)로 3% 용액을 만들어 잘 용해한 후 원심분리하여 얻은 상등액을 효소용액으로 사용하였다.

단백질은 Lowry법(8)에 의하여 정량 하였고 이때 검량곡선은 bovine serum albumin를 사용하여 측정하였다.

효소 활성도 측정

배추 PLD의 활성도 측정은 Reineckete 법(9)을 이용하였다 즉 반응이 끝난 반응액 1.5ml에 chloroform:methanol (1:2 v/v) 6ml를 가하여 효소 단백질을 변성시킨 후 원심분리하여 침전물을 제거하고 상등액을 취하여 chloroform:methanol:water(4:3:3.5 v/v/v)로 조정하여 효소 단백질을 재침전 시키고 원심분리하여 얻은 상등액 5ml를 4℃ 냉장실에서 3시간 방치하였다. 이것을 다시 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전물을 5ml의 증류수로 두번 세척한 후 5ml의 아세톤을 가하여 충분히 용해시킨 후, 원심분리하여 얻은 상등액을 520nm에서 흡광도를 측정하여 choline의 양을 정량하였다. 배추 PLD

의 효소 활성도 1 unit는 37℃에서 1분 동안에 PC로부터 choline 1.0μ mole을 생성하는데 필요한 효소의 양으로 하였다.

생물 반응기의 구조와 반응조건

본 실험에 사용한 생물반응기는 Fig. 1에 나타낸 것과 같은 다중 교반형 batch system으로서 중심부에 magnet가 설치되어 있고 주변에 8개의 소형 시험관을 수직으로 세워서 각 시험관에 magnetic bar를 수직으로 회전시키게 되어있다. 다중 교반형 생물반응기의 특성은 같은 조건하에서 효소의 농도별, 시간별 또는 기질농도별 차이를 쉽게 비교해 볼 수가 있고 소형 시험관으로 되어있어 소량의 반응액으로 목적하는 실험을 단 시간내에, 그리고 경제적으로 이행할 수 있는 장점을 가지고 있다.

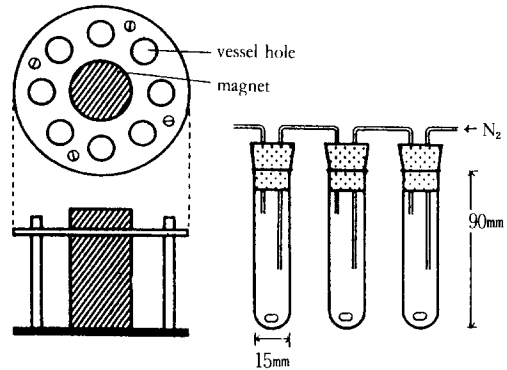


Fig. 1. Structure of multistirring bioreactor.

기질로서 lecithin을 50mM sodium acetate buffer(pH 5.6)로 7.5% 용액을 만든다음 ultrasonic vibrator에서 충분히 분산시켜 기질 용액으로 사용하였다. 한편으로는 lecithin을 각종 유기용매에 용해시켜 7.5% 용액으로 만든 다음, 두 용매층에서 인 지방질의 염기전이 반응에 대한 실험을 실시하였다.

기질농도는 lecithin 28μM, Ca²⁺ 40mM, 효소 0.4mg, glycerol 20%, ethyl ether 20%로 조절하여 반응 혼합액의 총량을 1.5ml로 하였다. 기본조건으로서 반응 온도는 37℃, pH 5.6, 반응시간 30분으로 하였으며 효소의 최적 온도, 최적pH 기타 반응시간 등을 비교하기 위하여 조건을 여러가지로 변화시켰고, 반응 촉진제로 사용한 diethyl ether의 휘발을 방지하기 위하여 시험관을 고무마개로 막아 반응시켰다. 자석 교반기의 교반속도는 300rpm으로 조절하고 반응정지는 chloroform:methanol (1:2 v/v) 용액 6ml를 가하여 효소작용을 중지시켰다. 위와 같은

조건으로 ethylene glycol 등 13종의 염기 수용체의 종류별로 인지지방질의 염기전이 반응을 비교 실시하였다.

반응액 중의 인 지방질의 분석

반응액 중의 인 지방질 분리는 Folch법(9)의 변법에 의하였다. 즉 반응액 1.5ml에 반응 정지액 chloroform : methanol (1:2 v/v) 6ml를 잘 섞은 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 변성된 효소 단백질을 제거하고 상등액에 chloroform 2ml와 증류수 2ml를 가하여 잘 혼합한 후 다시 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 하층액에서 2ml씩 취하여 인 지방질의 정성과 정량에 사용하였다. 인 지방질의 정성은 TLC로 하였고 정량은 요오드-전분용액 방법으로 발색시킨 TLC의 densitometry에 의하였다.

결과 및 고찰

PH 및 온도의 영향

배추 PLD의 인 지방질 염기전이 반응에 대한 pH 범위는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 산성 영역에서 활성을 나타내고 있다. 이것은 Masaki 등(11)이 양배추에서 조제한 PLD의 pH 영역과는 다른 경향을 나타내었다. 즉 양배추 PLD는 인 지방질 염기 가수분해 반응을 pH 5.6으로, 그리고 염기전이 반응을 pH 9.0으로 보고 하였으나 본 실험에서는 공히 pH 5.6으로 최적 조건을 나타내었다.

식물을 기원으로하는 PLD의 반응최적 pH는 일률적인 값이라기 보다는 조건에 따라 약간의 차이를 나타낸다. Chen 등(12)은 lecithin을 초음파 처리한 liposome에서 pH 4.9를 나타낸 반면 diethyl ether를 반응 촉진제로 사용하는 경우는 pH 5.2에서 강한 활성을 나타내는 것으로 보고 하였다. 또한 Rakhimov 등(13)은 lecithin과 sodium dodecyl sulfate(SDS)의 mole 비율이 10:3인 조건에서 반응시킬 때 최적 pH를 6.4로 보고하였다. PLD의 최적 pH는 Hermen(14)이 강낭콩에서 pH 5.2, Takano 등(15)은 미강에서 pH 5.5, 그리고 Mandel 등(16)은 시금치에서 pH 5.6으로 보고한 바와 같이 대체적으로 산성 영역이지만 값의 차이를 나타내고 있음을 알 수 있다. 배추 PLD에 대한 온도의 영향은 Fig. 3과 같다. 온도범위는 25~45°C에서 비교적 안정성을 보였고, 반응최적 온도는 37°C였다.

PLD의 열안정성

Dawson(7)에 의하면 PLD 정제과정에서 가장 먼저 행하는 것이 55°C에서 5분간 열처리하여 분자량이 큰

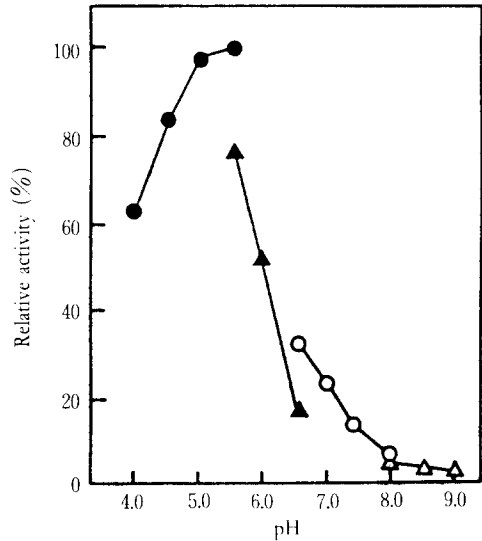


Fig. 2. The effect of pH on the transphosphatidylation of Chinese cabbage phospholipase D.

The reaction was carried out using 50mM buffers of various pH. Activity was determined by the standard method as described in Materials and Methods and the activity at pH 5.6 was taken as 100%. Buffers used were: ●, sodium acetate, ▲, citrate, ○, Tris-HCl and △, glycine-HaOH.

단백질을 제거하는 방법을 보고 하였으며 Atwal 등(17)도 땅콩 PLD의 특성에 관한 연구에서 50°C까지 매우 안정한 것으로 보고한 바 있다. 본 실험에서 45~60°C의 온도 범위에서 시간에 따른 배추 PLD의 열안정성을 실험한 결과는 Fig. 4와 같다. 45°C와 50°C에서는 30분까지 약 5%의 활성도차를 나타내었고, 55°C에서는 5분까지는 비교적 안정성을 나타내었으나 10분 후부터는 활성이 감소하는 경향을 보이고 있어 배추 PLD도 열에 대하여 비교적 안정함을 알 수 있었다.

효소 반응에 미치는 Ca^{2+} 의 영향

Dawson 등(7)은 PLD가 칼슘 의존성 효소로서 반응과정 중에 칼슘이온이 PLD-기질 복합체 형성에 관여한다고 보고한바 있다. 본 실험에서 배추 PLD의 가수분해 반응과 염기전이 반응에 관한 Ca^{2+} 의 영향을 알아보기

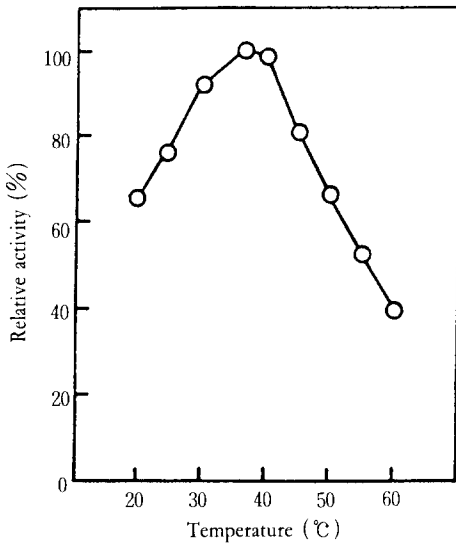


Fig. 3. The effect of temperature on the trans-phosphatidylolation of Chinese cabbage phospholipase D.

The reaction was carried out as described in Materials and Methods at various temperature. The activity at 37°C was taken as 100%.

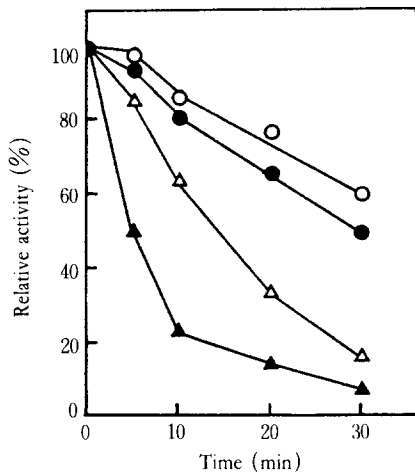


Fig. 4. Heat stability of Chinese cabbage phospholipase D.

The enzyme was incubated at 45(○), 50(●), 55(△) and 60(▲)°C for 5~30 min, and the remaining activity was measured.

위해 Ca^{2+} 농도를 0~80mM로 조정하면서 활성을 검토한 결과는 Fig. 5와 같다.

그림에서 보는바와 같이 배추PI.D의 반응에서 Ca^{2+} 의 최적농도는 가수분해 반응에서 20mM, 염기전이 반응에서 40mM로 나타났으며 60~80mM 범위에서도 반응에 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 인 지방질의 염기 가수분해 반응에서는 20mM 이상의 농도에서는 반응 생성물이 감소하는 경향을 나타내었다. 지금까지 보고된 식물성 PI.D의 Ca^{2+} 의존성이나 본 실험에서 배추 PI.D의 Ca^{2+} 영향에 대한 결과 등으로 미루어 볼 때 PI.D의 반응에서 Ca^{2+} 은 필수요소임을 재확인 할 수 있었다.

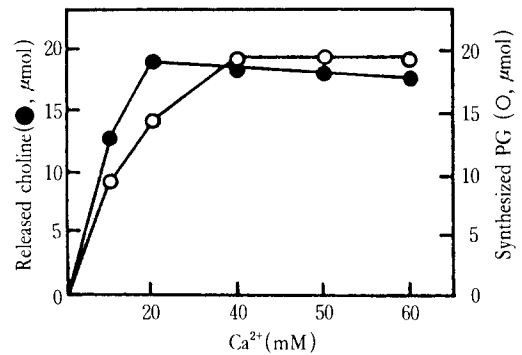


Fig. 5. The effect of Ca^{2+} concentration on the hydrolytic and synthetic reactions of Chinese cabbage phospholipase D.

유기용매의 영향

Diethyl ether 등 몇 종의 유기용매는 PI.D의 반응을 촉진하는 것으로 알려져 있다. Sastry 등(18)은 ether류, ketone류, ester류 등이 양배추와 당근 PI.D의 반응을 촉진한다고 보고 하였다. 본 실험에서 n-haxane, benzene, diethyl ether, diisopropyl ether, butyl acetate 등이 배추 PI.D의 활성에 미치는 영향을 알아본 결과는 Table 1과 같다. 표에서 보는바와 같이 diethyl ether와 diisopropyl ether, butyl ether 등은 배추 PI.D의 활성에 영향을 준다는 것을 알 수 있다. Diethyl ether와 butyl acetate에 대한 농도별 활성도를 측정하여 본 결과는 Fig. 5와 같으며 PI.D에 대한 반응 촉진제의 농도는 20%가 적합하며 diethyl ether는 그 이상의 농도에서 반응성이 감소하는 것으로 나타났다. Batch system에서 유기용매의 농도가 높아질수록 반응액이 2중 용매계로 되기 때문에 교반 과정이 필수적이라는 것과 유기용매의 량의 범위가 PI.D 활성에 크게 영향을 준다는 것을 알 수 있다.

Table 1. The effect of several organic solvents on the Chinese cabbage phospholipase D

Solvents (20%)	Relative activity (%)
None	100
n-Hexane	94
Benzene	75
Diethyl ether	202
Diisopropyl ether	191
Butyl acetate	199

The reaction mixture contained in 1.5ml: 0.4% phosphatidyl choline, 50mM Ca²⁺, 50mM acetate buffer (pH 5.6) and 20% organic solvents. The reaction was carried out at 37°C for 30 min and terminated by adding 6ml of chloroform: methanol (1:2, v/v) mixture. The activity obtained in the absence of organic solvent was taken as 100%.

저해제의 영향

Imamura 등(5) *Streptomyces chromofuscus* 기원의 PLD에 대해 EDTA, Ba²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ 등이 저해제로 작용한다고 보고하였다. 본 실험에서 배추 PLD에 EDTA 등 몇가지 시약을 첨가하여 반응성을 실험한 결과는 Fig. 6과 같다. 그림에서 보는바와 같이 4가지 시약들이 PLD에 미치는 영향을 검토하여 본 결과 모두 효소 활성을 저해하는 것으로 나타났으며 저해작용의 세기는 Mn²⁺ > Zn²⁺ > Ba²⁺의 순서였다.

염기 수용체의 영향

Phosphatidylcholine은 1,2-diacyl glycerol에 choline이 인산 ester 결합을 한 화합물로서 PLD에 의해 염기 수용체인 glycerol, ethanolamine, serine, methanol, ethanol, inositol 등과 쉽게 염기전이 반응이 일어난다는 것이 알려져 있다(18). 본 실험에서는 15종의 알콜 화합물을 염기 수용체로하여 배추 PLD의 반응성을 비교하여 본 결과는 Table 2와 같다. 이 표에서 보는바와 같이 알콜 화합물 가운데서 glycerol과 ethylene glycol, propylene glycol의 염기전이 반응은 염기 수용체의 량, 그리고 반응 시간에 따라 다르지만 본 실험에서는 30분간 반응 시킨

Table 2. The effect of base acceptors on the transphosphorylation of Chinese cabbage phospholipase D

Base acceptors (20%)	Transphosphorylation (%)
Glycerol	85
Ethylene glycol	82
Propylene glycol	81
Methyl alcohol	76
Propyl alcohol	62
Isopropyl alcohol	24
Butyl alcohol	15
Amyl alcohol	12
Isoamyl alcohol	7
Benzyl alcohol	14
Inositol	8
Mannitol	5
Sorbitol	3

The reaction was carried out by adding 20% base acceptors in the standard reaction mixture. Other reaction conditions were as described in Table 1.

결과 PEG, PPG, PG 등은 80% 이상이 전이 되었고 PMA, PEA 등은 60~70% 그외의 염기 수용체들은 거의 30% 이하의 저조한 전이율을 나타낸 반면 Inositol 등은 10% 미만으로 나타났다. 이것은 Lee 등(4)의 보고에서와 같이 phosphatidylglycerol을 생물반응기 내에서 glycerol 수용체를 사용하여 쉽게 합성할 수 있다고 한것과 잘 일치 하였다. 특기할만한 사실은 ethylene glycol과 propylene glycol은 새로운 염기 수용체로서 PLD에 의하여 쉽게 이용될 수 있다는 것을 발견하였으며, 여기에서 얻어진 phosphatidyl ethylene glycol이나 phosphatidyl propylene glycol 등은 새로운 인 지방질 화합물로서 앞으로 식품 공업의 효율적인 유허제로 이용 가능성이 있음을 암시 해주고 있다.

배추 PLD에 있어서 적절한 염기 수용체의 농도를 알아보기 위하여 glycerol을 5~60%의 농도범위로 조절하여 염기전이 반응성을 비교하여 얻은 결과는 Fig. 6과 같다. 이 그림에서 보는바와 같이 glycerol의 농도는

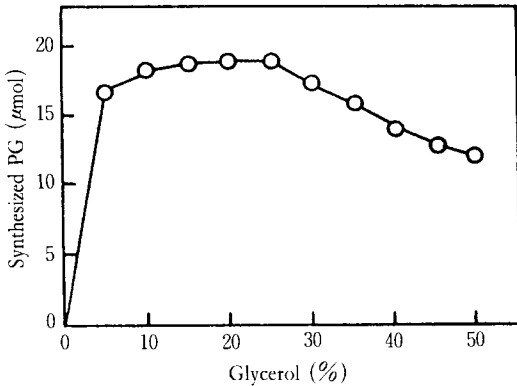


Fig. 6. The effect of glycerol concentration on the transphosphatidylation of Chinese cabbage phospholipase D.

5~25%의 범위가 전이반응에 가장 적당하였고 30%이상의 농도에서는 반응액의 점도에 영향을 주어 반응성이 낮아진다는 것을 알 수 있으며, 또한 5%의 낮은 농도에서는 고농도에 비하여 높은 반응성을 보여주고 있다. 염기 수용체의 종류에 따라 최적 농도의 차이를 나타내지만 glycerol의 경우 최적농도는 20%가 가장 적당 하였고, 이것은 Lee 등(4)이 보고한 막반응기 내에서의 반응성과 같은 경향을 나타내었다.

요 약

다중 교반형 생물반응기 내에서 배추 PLD에 의한 지방질의 염기 가수분해 반응 및 염기전이 반응에 대한 특성 실험에서 다음과 같은 결론을 얻었다. 반응 최적 조건으로서 pH 5.6, 온도 37°C였고 반응 촉진제로서 Ca^{2+} 의 농도는 가수분해 반응시 20mM, 염기전이 반응에서는 40mM이었다. Diethylether와 butylacetate도 강력한 반응 촉진제로서 반응성을 높였고 이들의 농도는 20%가 효과적이었으며, 반면에 EDTA 및 Ba^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} 등은 PLD의 활성을 강력하게 저해하였다. 염기 수용체로서 glycerol을 비롯한 알콜 화합물은 대부분이 반응성을 양성으로 나타내었으며 15종의 알콜 화합물 가운데 glycerol, ethyleneglycol, propyleneglycol 등이 반응성이 높게 나타났으며 이들의 최적농도는 20%가 효과적이었다.

참 고 문 헌

1. M. Caffrey, and R. L. Roger(1986), *Plant Cell Physiol.*, **27**, 1091
2. H. Michael(1978), *Advances in Lipid Research*, **16**, 284
3. M. Waite(1985), *J. Lipid Research*, **26**, 1379
4. S. Y. Lee, N. Hibi, T. Yamane, S. Shimizu(1985), *J. Ferm. Tech.*, **63**, 37
5. S. Imamura, and Y. Horiuti(1979), *J. Biochem.*, **85**, 79
6. M. Hallman, L. Gluck(1976) *J. Lipid Research*, **17**, 257
7. R. M. C. Dawson, and N. Hemington(1967), *Biochem. J.*, **102**, 76
8. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, (1951) *J. Biol. Chem*, **193**, 265
9. S. F. Yang, S. Freer, and A. A. Benson(1967), *J. Biol. Chem*, **242**, 477
10. T. Folch, M. Lees, and S. G. H. Sloane(1957), *J. Biol. Chem*, **226**, 497
11. S. Masaki, B. Elizabeth, and K. Julian(1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**, 420
12. S. J. Chen, and P. G. Barton(1971), *Can. J. Biochem.*, **49**, 1362
13. M. N. Rakhimov, S. R. Mmadyarov, and A. R. Abdumalikov(1976), *Biokhimiya*, **41**, 452
14. M. E. Hermen, and J. M. Chrispeel(1980), *Plant Physiol.*, **66**, 1001
15. K. Takano, I. Kamio, and T. Obara(1987), *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **34**, 8
16. S. B. Mandel, S. K. Biswas, and P. Chakbarti(1980), *J. Chromatogr*, **188**, 292
17. A. S. Atwal, N. A. M. Eskin, and H. M. Henderson (1979), *Lipids*, **14**, 11
18. P. S. Sastry, and M. Kates(1965), *Can. J. Biochem.*, **43**, 1443

(Received: April 12, 1990, Accepted: July 6, 1990)