

## Phospholipase A<sub>2</sub>에 의한 인지질의 가수분해반응에서 기질의 미셀화가 반응속도에 미치는 영향

김형주 · 신우진 · 최태부\*  
건국대학교 공과대학 미생물공학과

### Effect of Substrate Micellization on the Hydrolysis Rate of Phospholipid by Phospholipase A<sub>2</sub>

Kim, Hyung-Joo, Woo-Jin Shin and Tae-Boo Choe\*

Department of Microbial Engineering, College of Engineering,  
Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea

**Abstract** — The effect of substrate micellization on the hydrolysis rate in the production of lysophosphatidylcholine (LPC) from phosphatidylcholine (PC) using hog pancreas phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>) was studied. The optimal temperature and pH for the reactions in aqueous phase was found 42°C and 7.2, respectively. For a given PC concentration, initial reaction rate was progressively increased with the addition of sodium deoxycholate (DOC), which could transform the bilayer of phospholipids into micellar structure. The dissolution of PC into micelles from bilayer structure could increase the contacting surface area between the phospholipids and enzyme, which increased the enzyme reaction rate. The minimum concentration of DOC required to attain the maximum reaction rate was named as critical DOC concentration and about two mole of DOC was necessary to dissolve one mole of PC, completely. Not only the initial reaction rate, but the yield of conversion at equilibrium was also determined by the amount of added DOC, because the latter one determines the amount of micellized substrate, only which can participate to the hydrolysis reaction.

세포막의 주요성분인 인지질은 분자내에 친수성과 소수성을 동시에 가지고 있는 amphipatic molecule 로써 천연 유화제로서의 이용 가능성이 높다. 1980 년을 기준으로 lecithin으로 통칭되는 인지질의 수요는 세계적으로 약 100,000 ton 이상이며 식품, 의약품, 화장품, 섬유, 윤활유제조, 고무생산, 합성수지, 향산 화제, tanning agent, insect control system 등에서 천연유화제로 응용되고 있다(1, 2). 근래에 와서는 liposome을 제조하여 의약품, 항생물질, 항원, 항체, 호르몬, 효소 등을 전달하는 담체로 사용하기도 한다. 인지질의 분포는 동, 식물의 조직과 곤충, 미생물 등 거의 모든 생물에서 그 존재가 확인되나 공업적 이용의 자원으로는 egg yolk lecithin과 콩기름 생산시

부산물로 발생되는 soy bean lecithin이 흔히 이용된다. 그러나 crude lecithin을 이용하여 생성된 emulsion은 pH, salt concentration, 온도, oil-water ratio, water hardness 등 여러가지 인자에 따라 안정도가 크게 변화를 받게 된다(3). 이러한 이유로 해서 lecithin을 유화제로 이용하기에는 한계가 있기 때문에 물리화학적인 방법이나 효소적인 방법으로 인지질을 적당한 형태와 물성으로 변형시키기 위한 연구가 진행되어져 왔다. 물리화학적인 처리를 통하여 변형된 인지질의 물성은 처리전에 비하여 크게 향상되지 않았으며 촉매의 회수, 반응잔여물의 독성, 반응 부산물의 생성, 생산성의 감소 등 여러 부작용을 가지고 있기 때문에 효소를 이용한 변환방법을 통하여 보다 양질의 유화능력을 갖는 물질을 탐색하게 되었고 그 중의 하나가 phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)를 이용하여 phosphatidylcholine(PC)의 sn-2 위치의 지방산을 제

**Key words:** Phospholipase A<sub>2</sub>, substrate micellization, phospholipid hydrolysis, lysophospholipid  
\*Corresponding author

거한 lysophosphatidylcholine(LPC)이다(2, 3). 또 최근에는 sn-2 위치에 O-methyl기를 가진 LPC가 유력한 항암제로 사용될 수 있다는 보고와 함께 PLA<sub>2</sub>에 의한 인지질의 변형에 보다 더 많은 관심이 집중되고 있다.

Phospholipase는 인지질의 작용부위에 따라 PLA<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C, D로 구분되며 이들중 PLA<sub>2</sub>는 1분자의 PC를 가수분해하여 1분자의 지방산과 1분자의 LPC를 생산하는 것으로 동물 조직과 몇종의 미생물에서 분리할 수 있다고 보고되었다. 지금까지 PLA<sub>2</sub>에 대한 연구는 효소화학적 측면에서 활발히 진행되어 왔으나(4-6) 반면에 우수한 유효제로 기대되는 LPC의 대량 생산에 대한 연구는 효소의 순수분리가 어렵고 작용기작이 복잡하여 그 연구가 아직 미진한 편이다. 특히 효소 활성 측정방법으로 쓰이는 pH stat(7), thioester PC (8), Radiometric assay(9) 등의 방법은 그 복잡성으로 인해 LPC를 공업적으로 생산하는데 방해가 되어 왔다. 또한 인지질은 수용액내에서 거대한 이중막구조(liposome)를 형성하여 효소의 접근을 방해함으로써 반응속도를 지극히 떨어뜨리게 된다(10-12). 따라서 이 구조를 미셀화(micellization)시키기 위해서는 지질의 가수분해반응에서와 마찬가지로 여러가지 계면활성제를 첨가하게 되는데 이에 대한 연구도 아직 미진한 편이다. 따라서 본 연구에서는 egg yolk에서 추출한 인지질내의 PC를 기질로하고 여기에 hog pancreas PLA<sub>2</sub>를 작용시켜 LPC를 생산하는 반응에서 간편한 반응속도 측정법을 개발하고 동시에 sodium deoxycholate에 의한 지질의 미셀화가 초기반응속도 및 반응전환율에 미치는 영향을 조사하여 보았다.

## 재료 및 방법

### 시약

TLC, HPLC의 표준품으로 사용한 PC, PE, PG, LPC 등의 인지질은 Sigma(미국) 제품을, sodium deoxycholate(DOC)는 Fluka(스위스) 제품을 구입 사용하였고, Porcine pancreas PLA<sub>2</sub>(specific activity : 700 U/mg)는 Boehringer Mannheim(독일)의 제품을 별도의 정제과정을 거치지 않고 사용하였다. 인지질 분석에 사용된 TLC plate는 Sigma(미국)의 silicagel general purpose type와 Merck(독일)의 silicagel 60 F<sub>254</sub>이며 dioctyl sulfosuccinate sodium salt(AOT)는 Janssen(벨기에) 제품을 사용하였고 그외 실험에 사용한 시약 및 유기용매는 시판 특급품과 HPLC급을

각각 사용하였다.

### 인지질의 분리

LPC의 대량생산을 위하여 사용되는 기질은 PC 함량이 낮은 저급 lecithin을 이용하여야 하므로 Egg yolk에서 직접 분리하여 사용하였다. 분리방법은 계란 노른자 500g을 acetone 1l에 분산시킨 후 25°C에서 10분간 homogenization(15,000 rpm)하고 1시간 방치 후 여과지를 사용하여 침전을 회수한 뒤 15°C로 냉각된 200 ml의 acetone으로 세척하여 95% ethanol 500 ml에 분산시키고 1시간 동안 방치한다. 이를 다시 여과하여 침전을 제거시키고 감압건조한 후 잔여물에 petroleum ether 300 ml을 가하여 잔여물내의 인지질을 추출 후 감압건조하여 최종 부피가 200 ml이 되게 한다. 여기에 냉각된 acetone 1l를 첨가한 후 빠른 속도로 저어준다. 상등액이 맑아질 때까지 방치하고 acetone층을 제거한 후 다시 냉각된 acetone으로 수회 세척한다. 여기서 얻은 침전에 methyl-tert-butyl-ether(MTBE)를 적량 가하여 녹인 다음 N<sub>2</sub> 가스를 이용하여 용매를 증발시키고 -16°C에 보관하면서 기질로 사용하였다.

### TLC를 이용한 인지질의 정성분석

LPC의 생성확인 및 반응전후의 인지질에 대한 정성분석은 TLC를 행하여 발생하는 band의 R<sub>f</sub>값을 표준 인지질과 비교하여 행하였다. 전개용매는 chloroform : methanol : 7 M ammonia(250 : 90 : 15, v/v/v)를 사용하였고 crude egg yolk 및 반응액은 Folch의 방법(13)을 이용하여 인지질을 추출하고 그외 시료는 HPLC mobil phase 용액에 녹여 점적 후 전개하였다. 발색은 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 분무한뒤 건조기에서 110°C로 1시간 동안 가열 후 발색된 band를 확인하였다.

### HPLC를 이용한 인지질의 정량분석

분리된 egg yolk crude lecithin중 PC 함량과 다른 인지질의 조성을 확인하기 위해 normal phase HPLC를 행하였다. 사용된 HPLC는 ERC-8710 Pump (Flow rate=1.2 ml, Erma Optical Co., Japan), ERC-7210 U.V. detector(AUFS=0.04, 206 nm, Erma Optical Co., Japan), Rheodyne Model-7125 Injector (Rheodyne, U.S.A.), μ-Porasil Column(30 cm×3.9 mm, Waters Co., U.S.A.)으로 구성되었으며 mobil phase는 MTBE : methanol : ammonium acetate(5 : 8 : 2, v/v/v)를 사용하였다. 정량분석은 mobil phase

solution에 표준인지질을 녹여 HPLC에 주사 후 얻은 곡선의 적분값을 graph에 도시하여 표준곡선을 그리고 분리된 egg yolk crude lecithin을 같은 조건에서 주사하여 얻은 곡선의 적분값으로 PC의 함량을 결정하였다.

### 반응기

내경 3 cm의 screw capped tube(working vol. 10 ml)에 일정량의 기질을 첨가 후 주위를 water jacket으로 감싸 온도를 유지하였고 수개의 glass bead와 함께 magnetic bar를 사용하여 300 rpm으로 agitation하면서 N<sub>2</sub> gas 기류하에서 반응을 진행시켰다.

### 기질의 조제

지 등(14)의 자료를 참조하여 산출한 egg yolk PC의 평균 분자량 770.14와 HPLC를 행하여 얻은 egg yolk crude lecithin의 PC 함량을 근거로 인지질을 정량하여 10 mM HEPES buffer에 PC 농도가 10 mM되게 분산시킨 후 CaCl<sub>2</sub>와 DOC를 각각 10 mM되게 첨가하고 수개의 glass bead와 함께 20분간 강하게 진탕한 다음 0.5 M NaOH 용액으로 pH를 7.2로 조정하여 기질로 사용하였다. 일정량의 기질을 반응기에 넣고 42°C 에서 10 분간 preincubation한 후 반응액 1 ml/당 20U의 효소를 첨가하여 반응을 진행하였다.

### 반응속도측정

Rhee 등(15)의 lipase assay 방법에 따라 oleic acid를 기준으로 지방산농도 표준곡선을 구하고 이 방법을 변형하여 PLA<sub>2</sub> 활성측정에 사용하였다. 즉 일정시간 반응 후 반응액 0.5 ml를 취하여 5 ml의 isooctane에 희석한 후 90초간 강하게 진탕하고 3,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 반응을 정지시켰다. 상등액을 취한 다음 cupiric acetate-pyridine 용액 1 ml를 첨가하여 90초 동안 강하게 진탕시켜 발색 후 3,500 rpm에서 2분간 원심 분리하고 상등액을 715 nm에서 흡광도를 측정 후 표준곡선에 적용하여 반응액내의 지방산 생성량을 구하였다. 이때 control은 효소를 첨가하기 전의 반응액으로 하였다. 효소 1 unit는 37°C, pH 8.0에서 1분간 1 μM의 지방산 또는 1 μM의 LPC를 생성하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다. 초기반응속도는 반응개시 후 10분 동안 생성된 지방산의 양으로 계산하였고 반응전환율(conversion yield, %)은 다음의 식에 따라 구하였다.

Conversion yield(%)

$$= \frac{\text{Produced fatty acid}}{\text{Initial concentration of PC}} \times 100$$

### 인지질 Liposome의 Size Distribution 측정

기질로 사용된 인지질이 수용액상에서 만드는 거대 분자구조, 즉 liposome과, DOC에 의해 만들어진 mixed micelle 구조의 size distribution을 조사하기 위하여 laser-scattered size analyzer를 이용하였다. 측정은 한국표준과학연구소 김명수 박사의 도움으로 실시하였다.

## 실험결과 및 고찰

### 인지질의 분리 및 TLC, HPLC를 이용한 정성, 정량분석

Egg yolk 500g에서 약 20g의 crude lecithin을 분리하였다. 분리된 인지질은 TLC를 행한 결과 PC와 함께 Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylglycerol, sphingomyelin 등을 함유하고 있었다(17). 또한 HPLC를 행한 결과 분리된 crude lecithin 중 약 50%가 PC임을 알 수 있었다(17).

### pH의 영향

PC 10 mM과 DOC 10 mM이 함유된 기질용액에 20U의 효소용액을 첨가하여 42°C 에서 초기 pH를 변화시켜가며 반응을 진행시켰다. 1시간 반응 후 반응액 0.5 ml를 취하여 지방산 증가량을 구하고 그 결과를 Fig. 1에 표시하였다. pH 7 부근에서 PLA<sub>2</sub>의 활성이 가장 좋은 것으로 나타났으나 이는 일반적인 PLA<sub>2</sub>의 최적 pH가 8로 보고된 것(4)과는 약간 상이하였다. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·NaOH buffer의 사용시 Ca-phosphate 침전으로 인해 반응이 저해되는 현상이 확인되었다. 이 결과를 근거로 본 실험에서는 HEPES buffer를 이용하였고 반응액의 pH는 7.2를 선택하였다.

### 온도의 영향

반응온도를 25°C 부터 50°C 까지 변화시켜 반응 1 시간 후의 지방산 생성량을 측정한 결과를 Fig. 2에 표시하였다. 35°C 와 45°C 사이에서 지방산 생성이 많았고 50°C 부근에서는 반응속도의 감소가 나타났다. 이 실험 결과로부터 42°C 를 최적 반응조건으로 취하였다.

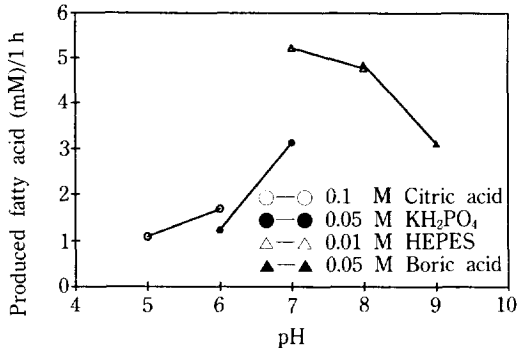


Fig. 1. Effect of pH variation on the hydrolysis rate of phosphatidylcholine by phospholipase A<sub>2</sub>.

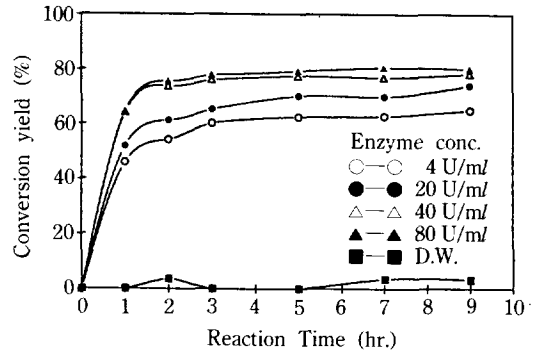


Fig. 3. Effect of enzyme concentration on the hydrolysis rate of phosphatidylcholine by phospholipase A<sub>2</sub>. D.W: Distilled water

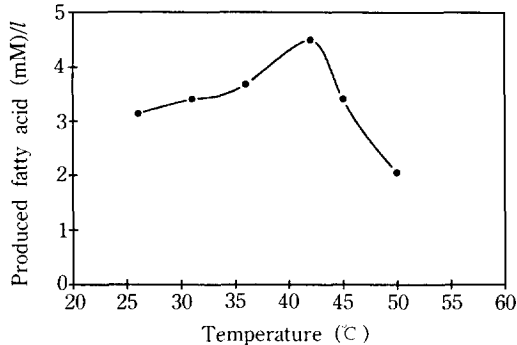


Fig. 2. Effect of temperature on the hydrolysis rate of phosphatidylcholine by phospholipase A<sub>2</sub>.

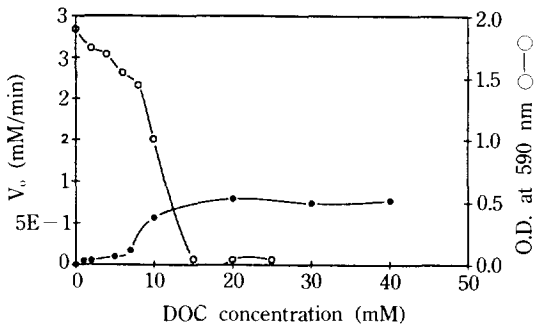


Fig. 4. Change of the initial reaction rate, V<sub>0</sub>, in the hydrolysis reaction of phosphatidylcholine by phospholipase A<sub>2</sub> and the change of turbidity of phospholipid solution with the addition of Na-deoxycholate.

효소농도의 영향

10 mM의 PC와 10 mM DOC가 함유된 기질용액에서 효소의 농도를 바꿔가며 반응시켰을 때 시간에 따른 반응전환율의 변화를 Fig. 3에 표시하였다. 효소 용액을 첨가하지 않은 경우 지방산의 증가는 전혀 보이지 않는 것으로 보아 지방산의 증가가 PLA<sub>2</sub>에 의한 PC의 가수분해반응에 의한 것임을 알 수 있었다. 또 생성된 LPC의 양이 지방산 증가와 정량적으로 비례함을 확인하였다(17).

DOC 농도가 초기 반응 속도에 미치는 영향

계면활성제는 기질의 미셀화를 촉진시켜 기질과 효소간의 계면면적을 증가시킴으로써 전체적인 반응 속도의 증가를 가져오는 역할을 한다(16-19). PLA<sub>2</sub> 반응에서 가장 좋은 효과를 보인 DOC를 계면활성제로 이용하여(17) DOC의 농도가 효소 반응속도에 미치는 영향을 조사하였다. PC를 10 mM로 고정하고 DOC의 농도를 0에서 40 mM까지 변화시키면서 용

액의 탁도(turbidity)와 초기 반응속도를 측정하여 Fig. 4에 표시하였다. 590 nm에서 측정된 탁도는 일반적으로 인지질 liposome이 계면활성제에 의해 가용화되는 정도를 측정하는데 사용하는 방법으로 DOC 농도가 10 mM 이상일 때부터 그 값이 급격히 감소하는 것으로 보아 여기서부터 기질이 급격히 가용화됨을 알 수 있다. 또 초기 반응속도는 DOC 농도가 7 mM 이상일 때부터 급격히 증가하였고 20 mM 이상에서는 더 이상의 증가가 없었다. 이는 계면활성제의 존재에 따라 수용액내에서의 인지질 이중막의 용해가 일어나면서 그 존재상태가 여러가지 형태로 변화한다는 Rigaud 등의 보고(16)와 일치하는 것으로, 즉 surfactant monomer가 phospholipid bilayer에 포화될 때까지 incorporation되는 단계(stage 1), mixed phospholipids-surfactant micelle의 형성단계(stage 2), lammella에서 mixed-micelle로의 transition

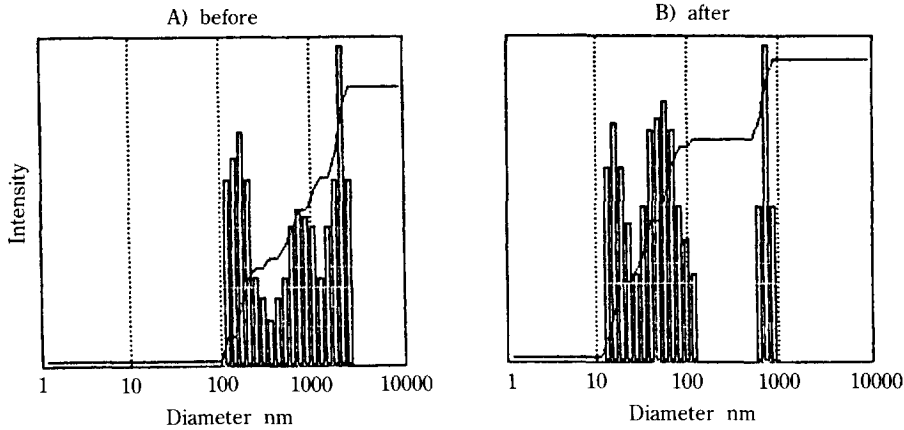


Fig. 5. Distribution of liposome vesicle size, A) before the addition of Na-deoxycholate, B) after the addition of Na-deoxycholate, 22 mM.

이 완전히 끝나는 단계(stage 3) 등의 과정을 거침에 따라 반응속도가 점차 증가하는 것으로 생각된다. 즉 그림 4에서 나타난 결과를 본다면 stage 1은 DOC 농도 7 mM 이하에 해당되고 stage 2는 반응속도가 급격히 증가하기 시작하는 7~20 mM 사이, 그리고 stage 3는 반응속도가 거의 포화상태에 이르는 20 mM 이상이 될 수 있을 것이다. 이 DOC의 농도를 한계 농도(critical concentration)라고 명명하였다. 기질로 사용된 인지질이 수용액상에서 만드는 거대분자구조, 즉 liposome과 DOC의 첨가에 의해 만들어지는 mixed micell의 size distribution을 조사하기 위하여 laser-scattered size analyzer를 이용하여 그 크기를 측정하였다. Fig. 5는 인지질 용액에 DOC를 첨가하기 전과 22 mM의 DOC를 첨가하였을 때 각각의 micelle size distribution을 실제로 측정하여 본 것으로, DOC를 첨가하기 전에는 liposome size가 100 nm부터 3000 nm까지 다양하게 분포되어 있으나 DOC 첨가 후에는 대부분이 미셀화하여 그 크기가 100 nm 이하로 작아졌음을 알 수 있다. 그러나 1000 nm 정도의 큰 size의 liposome은 여전히 존재함을 알 수 있다.

PC 농도에 따른 DOC 한계농도의 변화

Fig. 6은 DOC 농도를 일정하게 하고 PC 농도를 변화시켰을 때 측정한 초기 반응속도의 변화를 표시한 것이다. 실험결과에 의하면 일정량의 DOC가 포함된 반응액에서 PC 농도가 증가함에 따라 반응속도는 증가하다가 다시 감소하는 형태를 보였다. PC 증가에 따른 반응속도의 감소는 증가된 PC에 의해 DOC 농

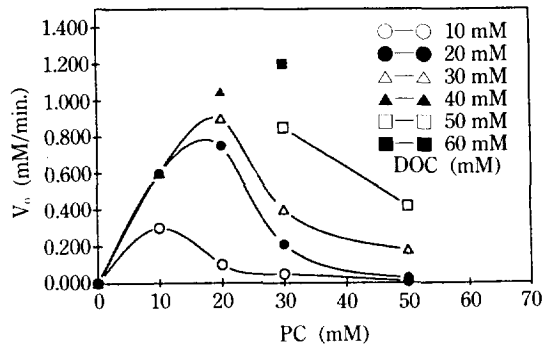


Fig. 6. Change of the initial reaction rate,  $V_o$ , in the hydrolysis reaction of phosphatidylcholine by phospholipase  $A_2$  with the change of PC concentration.

도가 상대적으로 희석되기 때문인데 최대 반응속도를 얻기 위해서는 한계농도 이상의 DOC가 요구됨을 알 수 있다. 즉, 기질 10 mM에서는 20 mM의 DOC가, 기질 20 mM에서는 40 mM의 DOC가, 기질 30 mM에서는 60 mM의 DOC가 한계농도에 해당함을 알 수 있으며 PC의 완전한 용해(stage 3)를 위해서는 대체로 PC 1 mole에 2 mole의 DOC가 필요한 것으로 보여진다. 그림 7은 DOC 한계농도 이상에서 기질농도의 증가에 따른 초기 반응속도의 변화를 보여주는 것으로 일반적인 효소반응의 형태를 나타내고 있으며 L-B plot에서 구한 가수분해반응의 최고 반응속도,  $V_m$ 는 1.45 mM/min.이고  $K_m$ 값은 12.7 mM PC-DOC mixed micelle이었다.

DOC 농도가 반응전환율에 미치는 영향

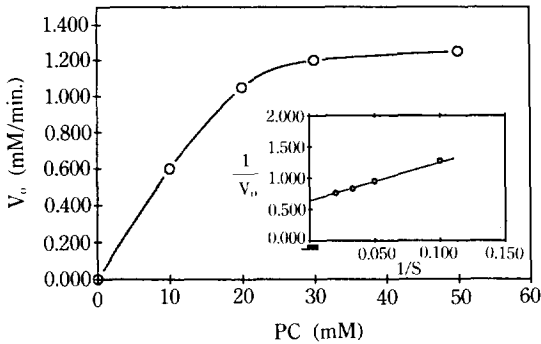


Fig. 7. Change of initial reaction rate,  $V_0$ , vs. PC concentration at the above critical concentration of DOC.

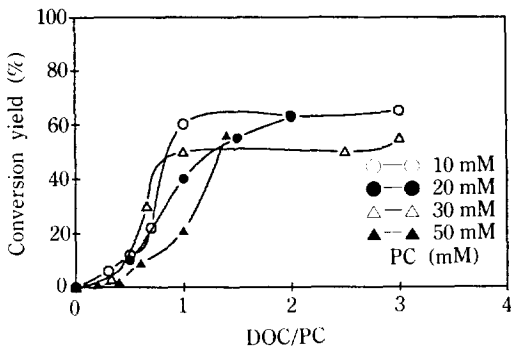


Fig. 8. Change of conversion yield with the change of DOC/PC ratio in the hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipase  $A_2$ .

DOC 농도는 초기 반응속도 뿐 아니라 평형에서의 반응전환율에도 영향을 미친다. Fig.8은 기질의 농도와 DOC 농도를 변화시켜가며 반응 5시간 후에 구한 반응전환율을 나타낸 것으로 DOC/PC값이 증가함에 따라 반응전환율이 증가하다가 그 값이 대체로 1과 2 사이에서 포화상태에 이르는 것으로 나타났다. DOC 농도가 반응전환율에 영향을 미치는 이유는 Fig.5에서 확인한 것처럼, DOC의 농도가 평형에서 미셀화되지 못하고 남아있는 거대 liposome의 양을 결정하게 되고 이 거대 liposome은 반응에 참여할 수 없으므로 반응전환율은 DOC에 의해 미셀화된 PC 농도에 의해서만 결정되기 때문이다. 이것으로부터 미셀화되지 못한 기질은 반응에 전혀 참여하지 못함을 아울러 알 수 있다. 반응전환율이 50~60%에서 포화현상을 보이는 것은 인지질이 이중막 구조를 가지고 있기 때문인 것으로 생각되나 기질 자체가 여러가지 인지질로 구성된 복합물이므로 여기서 그 원인을 정확히 규명

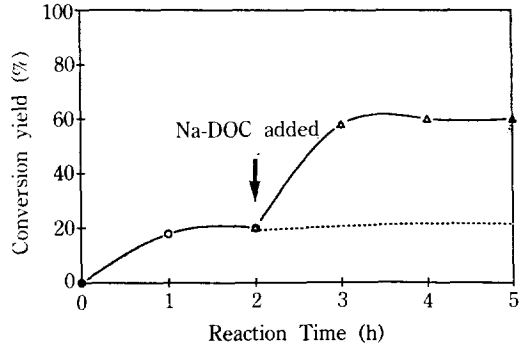


Fig. 9. The effect of Na-DOC addition on the conversion yield. 7 mM of DOC was added at the beginning of reaction and 15 mM of DOC was supplemented at the reaction time of 2 h.

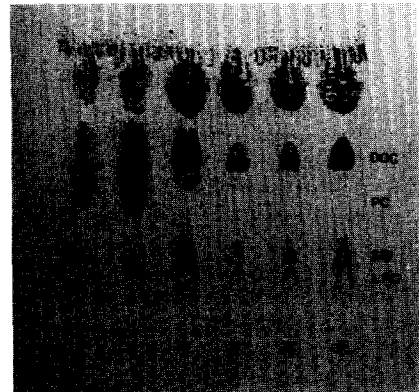


Fig. 10. TLC chromatogram of reactants and products in the hydrolysis reaction of phosphatidylcholine by phospholipase  $A_2$ .

1) crude phospholipid, 2) reaction time; 0 h., 3) 30 min., 4) 1 h., 5) 2 h., 6) 5 h.

하기는 어렵다. 또 최고 반응속도를 얻기 위한 DOC/PC값은 약 2인데 비해 포화 반응전환율 50~60%에 도달하기 위한 DOC/PC의 값은 1과 2 사이가 되는 것으로 나타났는데 이는 기질의 미셀화가 초기 반응속도에 영향을 미치는 것과 평형에서 반응전환율에 영향을 미치는 것과는 그 기작에 있어서 다소 차이가 있음을 뜻한다. 이는 기질을 DOC를 이용하지 않고 다른 방법으로 가용화했을 때(예를들어 ethanol 사용이나 sonication 등을 사용했을 때, 여기서는 그 data를 보이지 않았음) 그 차이가 더욱더 현저하게 나타나는데 이에 관한 연구는 앞으로 더 계속하여야 설명이 가능할 것 같다. Fig.9는 기질 10 mM에 DOC 7 mM을 첨가하여 반응을 시작하면 반응 전환율이 약

20%에 달하였다가 여기에 DOC 15 mM을 새로이 첨가하면 반응 전환율이 다시 60%까지 증가하는 것을 보여주는 것으로 첨가된 DOC의 양에 따라 반응전환율이 결정된다는 것을 보여주는 결과이다.

Fig. 10은 이상의 결과를 토대로 10 mM PC의 최적반응 조건에서 효소액 20 U/ml을 첨가하고 반응을 진행시키며 시간별로 반응액을 취하여 TLC을 행한 결과이다. 반응이 진행됨에 따라 PC의 감소와 함께 LPC의 생성이 확인되었다.

## 요 약

Porcine pancreas PLA<sub>2</sub>를 이용하여 egg yolk에서 분리한 crude PC를 기질로 LPC를 생산하기 위한 반응에서, DOC에 의한 기질의 미셀화가 초기 반응 속도 및 반응전환율에 미치는 영향을 조사하였다. 이 실험에서 초기 반응속도는 DOC에 의해 기질이 가용화됨에 따라 증가하였으며 주어진 기질농도에서 최고 반응속도를 얻기위한 한계농도의 DOC가 존재함을 알 수 있었고 기질 1 mole에 대해 약 2 mole의 DOC가 필요한 것으로 나타났다. 또 DOC는 평형에서 도달할 수 있는 반응전환율을 결정하게 되는데, 이는 첨가된 DOC가 반응에 참여할 수 있는 미셀화된 기질의 양을 결정하기 때문이다. 반응최적조건에서 반응시켜 지방산의 증가가 종료되었을 때 TLC를 행한 결과 생성된 LPC를 확인할 수 있었다.

## 참고문헌

- Cullis, P.R. and M.J. Hope. 1985. Physical properties and functional roles of lipids in membranes. Pp. 25-72. In Vance, D.E. and J.E. Vance (ed), *Biochemistry of Lipids and Membranes*. Benjamin & Cummings, Menlo park, California.
- Nieuwenhuyzen, W.V. 1981. The Industrial uses of special lecithins: A Review. Pp. 886-888. *JAACS*. Paper from a symposium presented at the AOCS annual meeting in New York City, April 28. 1980.
- 青井 暢之. 1990. 大豆 리놀레트친. 油化學, 제 39권, 제 1호. Pp. 10-15.
- Slotboom, A.J., H.M. Verhij and G.H. De Haas. 1982. The mechanism of phospholipase A<sub>2</sub>. Pp. 359-360. In Hawthorne, J.N. and G.B. Ansell (eds), *Phospholipids*. Elsevier Biochemical Press.
- Spectors, A.A. and M.A. Yolek. 1985. Membrane lipid composition and cellular function. *J. Lipid Res.* 26: 1025-1035.
- Robins, S.J. and G.M. Patton. 1986. Separation of phospholipid molecular species by high performance liquid chromatography: Potentials for use in metabolic studies. *J. Lipid Res.* 27: 131-139.
- De Haas G.H., N.M. Postema, W. Nieuwenhuyzen and L.L.M. Van Deenen. 1968. Purification and properties of phospholipase a from porcine pancreas. *Biochi. Biophi. Acta.* 159: 103-117.
- Cox J.W. and L.A. Horrocks. 1981. Preparation of thioester substrates and development of continuous spectrophotometric assays for phospholipase A<sub>1</sub> and monoacylglycerol lipase. *J. lipid Res.* 22: 469-505.
- Dobmeyer, D.J., P.B. Corr and M.H. Creer. 1990. A sensitive, radiometric assay for lysophosphatidylcholine. *Anal. Bioch.* 185: 36-43.
- Grainger, D.W., A. Reichert, H. Ringsdorf and C. Salses. 1990. Hydrolytic action of phospholipase A<sub>2</sub> in monolayers in the phase transition region: Direct observation of enzyme domain formation using fluorescence microscopy. *Biochi. Biophi. Acta.* 1023: 365-379.
- Kensil, C.R. and E.A. Dennis. 1985. Action of cobra venom phospholipase A<sub>2</sub> on large unilamellar vesicles: Comparison with Sm66all unilamellar vesicles and multibilayers. *Lipids* 20(2): 80-83.
- Deems, R.A., B.K. Eaton and E.A. Dennis. 1975. Kinetic analysis of phospholipase A<sub>2</sub> activity toward mixed micelles and its implications for the study of lipolytic enzymes. *J. Biol. Chem.* 250(23): 9013-9020.
- Folch, J., M. Less and G.H. Sloanestanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. of Biol. Chem.* 226: 497-501.
- 지성규. 1989. Pp. 263-292. 식품 첨가물. 밝음.
- Rhee, J.S, D.Y. Kwon and D.S. Han. 1987. Determination of lipase Activity in AOT-isooctane reversed micelles. *Agric. Biol. Chem.* 51(2): 615-618.
- Paternostre, M.T., M. Roux and J.L. Rigaud. 1988. Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) with Triton X-100, octyl glucoside, and sodium cholate. *Biochem.* 27: 2668-2677.
- 김형주. 1992. Phospholipase A<sub>2</sub>를 이용한 Lyso-phosphatidylcholine의 생산 조건에 대한 연구. Pp. 25. 미생물공학과, 건국대학교.

18. Almog S., B.J. Litman, W. Wimley, J. Cohen, E.J. Wachtel, Y. Barenholz and D. Lichtenberg. 1990. States of aggregation and phase transformations in mixture of phosphatidylcholine and octyl glucoside. *Biochem.* **29**: 4582-4592.
19. Nichols, J.W. and J. Ozarowski. 1990. Sizing of lecithin-bile saltmixed micelles by size-exclusion high performance liquid chromatography. *Biochem.* **29**: 4600-4606.

**(Received December 10, 1992)**