

## 역미셀계내에서 인지질분해효소 A<sub>2</sub>에 의한 레시친의 가수분해

장판식

서울산업대학교 식품공학과

### Hydrolysis of Phosphatidylcholine in Aerosol-OT/Isooctane Reversed Micelles by Phospholipase A<sub>2</sub>

Pahn Shick Chang

Department of Food Science and Technology, Seoul National Polytechnic University

#### Abstract

Bee venom (*Apis mellifera*) phospholipase A<sub>2</sub> solubilized in reversed micelles containing small amount of water stabilized by surfactant could catalyze the hydrolysis of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC). A sensitive and simple high performance liquid chromatographic (HPLC) methodology of phospholipase A<sub>2</sub> assay for the hydrolysis of DPPC was developed. Kinetic analysis of the phospholipase A<sub>2</sub>-catalyzed reaction was found to be possible in reversed micelles. Among the surfactants and organic solvents tested, aerosol-OT and isooctane were most effective for the hydrolysis of DPPC in reversed micelles. Optimal temperature, optimal pH, K<sub>m,app</sub>, V<sub>max,app</sub> and activation energy were determined to be 35~40°C, 7.0, 8.73 mM, 2.83 units/mg protein and 12.31 kcal/mole, respectively. The hydrolysis activity was dependent on water content and maximum activity was obtained at R value ( $=[\text{water}]/[\text{aerosol-OT}]$ ) of 10.0.

Key words: phospholipase A<sub>2</sub>, HPLC, lysophosphatidylcholine, reversed micelles

#### 서 론

경제의 급속한 발전에 따른 식생활 구조의 다양한 변화 및 고급화의 추세에 의하여 예전의 영양적인 측면보다는 오히려 전분제품의 질감 개선에 의한 제품의 고급화에 관심이 집중되고 있다<sup>(1)</sup>. 특히 식품유화제 첨가에 의한 제품 물성 증진에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는 바<sup>(2)</sup>, 효과적인 식품 물성 증진제로 많이 사용되는 것으로서는 ethoxylated monoglyceride, sucrose tallowate, sucrose mono- 및 di-stearate, sucrose monopalmitate, sodium stearoyl-2-lactylate 등이 있으며 적절한 첨가농도는 0.5~2% 정도로 보고되고 있다<sup>(3-5)</sup>.

한편, 이러한 식품유화제들은 원료전분을 구성하고 있는 amylose의  $\alpha$ -helix구조 내부로 삽입되어 amylose-emulsifier complex를 형성하게 되며 이로 인하여 전분제품의 탄성이 증가하거나, 부피가 증대되어 전체적인 질감이 향상되는 것으로 알려져 있다<sup>(6-12)</sup>.

그런데 상기한 식품유화제들은 물에 대한 용해도가 매우 낮은 소수성이 강한 종류들이므로 원료전분에 첨가하여 혼합할 때 잘 섞이지 않으며, 이에 따라 다량의 식품유화제를 첨가해 주거나 혹은 최종제품들의 물성이 불균일해지는 결정적인 단점을 가지고 있다.

따라서, amylose-emulsifier complex 형성능력이 우수하여 제품물성을 크게 증진시키면서 또한 물에 대한 용해도도 높은 식품유화제의 개발이 시급히 요구되었는 바, 최근 일본의 태양화학연구소의 연구결과 리소레시친(lysophosphatidylcholine)을 이러한 요구에 가장 근접한 식품유화제로 추천하였으며, 이러한 리소레시친을 대량으로 구득하는 방법에 대한 필요성을 강조한 바 있다<sup>(13)</sup>. 그런데, 리소레시친이 자연계에서는 미량 존재하며, 더구나 다른 물질들과 강하게 결합한 형태로 분포되어 있으므로 천연적으로 직접 구득하는 과정은 여러가지 어려운 점을 지니고 있는 바, 효소공학의 기법을 이용하여 리소레시친을 생산해 내는 방법을 모색할 필요가 있다.

따라서, 본 연구에서는 Fig. 1에서 보는 바와 같이, 순한 조건하에서 phospholipase A<sub>2</sub> 효소를 촉매로 사용하고 레시친(dipalmitoylphosphatidylcholine; DPPC)

Corresponding author: Pahn Shick Chang, Department of Food Science and Technology, Seoul National Polytechnic University, 172 Kongnung-dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

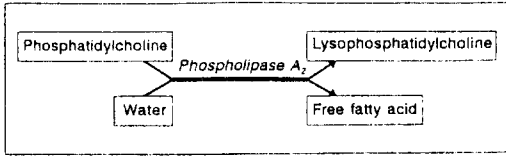


Fig. 1. Schematic diagram for the phospholipase A<sub>2</sub> reaction.

을 가수분해하여 리소레시틴(lyso-DPPC)을 생산해낼 때의 동력학적 연구를 수행하여 순도 높은 양질의 리소레시틴 생산을 위한 효소 생물반응계의 작동 최적 조건을 확립하고자 하고 또한 역미셀계 내에서의 DPPC 가수분해 반응특성을 규명하고자 하였다.

한편, 물에 불용성인 기질(중성지질, sterol 및 인지질 등)의 가수분해를 위한 효소생물반응계에는 물과 유기용매로 이루어진 이상계(two phase system)<sup>(14,15)</sup>, 물, 계면활성제 및 유기용매로 이루어진 에멀전계(emulsion system)<sup>(16)</sup> 및 역미셀계(reversed micellar system)<sup>(17-19)</sup>, 유기용매로만 이루어진 유기용매계(organic solvent system)<sup>(20,21)</sup> 등으로 구분될 수 있는 바, 본 연구에서는 미셀입자의 직경이 매우 작아 투명하면서 안정한 구조를 하고 있으며, 입자의 균일한 분배특성에 의한 반응의 높은 재현성 및 효소와 기질사이의 넓은 계면적에 의한 효소반응의 고효율성을 지니고 있는 역미셀계 효소 생물반응계를 선택하여 DPPC를 가수분해하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료

각종 유기용매는 HPLC 등급의 Burdick & Jackson 사 (Muskegon, U.S.A.) 제품을 사용하였으며, HPLC 작업시 사용한 표준물질은 순도 99.99%의 Sigma사 (St. Louis, U.S.A.) 제품이었다. 또한 효소반응에서 기질로 사용된 레시틴은 순도 99.99%의 dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC)으로서 Nattermann Phospholipid GmbH사 (Hamburg, Germany) 제품을 구입하여 사용하였으며 Bee venom (*Apis mellifera*)에서 유래한 phospholipase A<sub>2</sub>는 Sigma사로부터 구입하여 사용하였으며 그외 유효제 및 기타의 재료는 EP 등급의 시약을 사용하였다.

#### 효소 생물반응계의 설정

레시틴(DPPC의 순도가 99.9%인 제품)과 aerosol-OT (dioctyl sulfosuccinate)를 각각 35 mM 및 50 mM

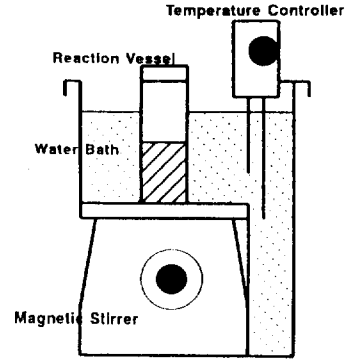


Fig. 2. Schematic representation of enzyme bioreactor containing aerosol-OT/isooctane reverse micelle solution.

Table 1. HPLC conditions for the assay of phospholipase A<sub>2</sub>

Content	Condition
Column	Shimpack-NH <sub>2</sub>
Detector	UV, 206 nm
Eluent	Acetonitrile:Methanol:0.05 M-Acetic acid =10.0:5.0:0.4 (v:v:v)
Flow rate	2.0 ml/min
Sample solvent	Isooctane
Temperature	25°C

Table 2. Each retention time peak on the HPLC chromatogram for the analysis of phospholipase A<sub>2</sub>-catalyzed reaction mixtures

Component	Retention time <sup>1)</sup> , min
Sample solvent	1.53±0.2
Palmitic acid	2.32±0.2
Dipalmitoylphosphatidylcholine	3.57±0.4
Lyophosphatidylcholine	5.04±0.5

<sup>1)</sup>Mean value ± standard deviation is based on the experimental data of ten trials.

의 농도가 되게 isooctane 용매속에 용해시킨 후, 그 용액 9.91 mL 내에 90 µL의 phospholipase A<sub>2</sub> 용액(0.1 M-phosphate buffer (pH 7.0)에 효소를 녹인 수용액)을 첨가시켜 15초간 200 rpm의 속도로 교반하므로써 미셀의 입자 직경이 매우 작으면서 투명한 역미셀계 반응액을 제조하였다.

#### Phospholipase A<sub>2</sub>의 효소활성도 정의

Phospholipase A<sub>2</sub>의 효소활성을 측정하기 위하여, 상술한 방법에 의하여 50 mM aerosol-OT/isooctane 역미셀계 용액을 제조한 다음 Fig. 2의 장치하에서 효소 반응을 시작하였다. 일정 시간이 경과한 후 반응액 10

$\mu$ 를 취한 다음 HPLC 기술을 이용하고 Table 1의 조건 및 Table 2의 결과를 이용하여 DPPC, lyso-DPPC, palmitic acid 등의 정량분석을 수행하였는 바, phospholipase A<sub>2</sub> 효소의 1 unit는 반응 최적 조건하에서 1분동안에 1 mole의 레시친(DPPC)을 가수분해하여 1 mole의 리소레시친(lyso-DPPC)을 유리시키는 능력을 갖는 효소량으로 정의하였다.

#### 효소반응의 최적화 및 효소동력학 연구

20 units의 효소량, 35 mM의 DPPC 농도, 10분의 초기반응시간 및 역미셀계를 이용하여 효소반응을 수행하였는 바, 각종 유기용매, 유화제, 역미셀 입자의 수분함량( $R=[\text{water}]/[\text{aerosol-OT}]$ ) 및 pH, 그리고 전체 효소반응기의 온도 등이 DPPC의 가수분해에 미치는 영향을 검토하여 최적화하였으며, 구축된 최적 조건하에서 Michaelis-Menten 방정식과 Arrhenius 방정식을 사용하여 DPPC 가수분해반응을 위한  $K_{m,app}$ ,  $V_{max,app}$  및 활성화에너지를 계산하였다.

### 결과 및 고찰

#### 역미셀계내에서 유기용매의 최적화

역미셀계 효소생물반응계를 구성하는 요인 중 가장 넓은 부위를 차지하는 분산매인 유기용매의 종류를 변화시켜 DPPC의 가수분해에 최적인 유기용매를 선별하였는 바, Table 3의 결과를 얻을 수 있었다. 이때 isooctane을 분산매로 사용한 실험구에서 DPPC를 가수분해하는 활성이 가장 높은 것으로 판명되었으며, 이러한 결과는 역미셀계 내에서 유지의 glycerolysis<sup>(18,19,22-25)</sup> 및 synthesis<sup>(26)</sup> 등의 결과와 일치하였다. 한편, ethanol 및 acetone과 같은 친수성이 강한 유기용매는 phospholipase A<sub>2</sub> 효소를 함유하고 있는 역미셀 입자의 안정성 및 효소활성 유지에 불리하기 때문에 낮은 효소

**Table 3. Effect of various kinds of organic solvents on the phospholipase A<sub>2</sub>-catalyzed hydrolysis activity in 50 mM aerosol-OT/isooctane reversed micelles**

Kinds of organic solvent	Relative activity, %
Octane	61
Hexane	93
Chloroform	71
Isooctane	100
Heptane	79
Benzene	84
Acetone	36
Ethyl ether	59
Ethanol	17

활성도를 나타낸 것으로 판단되었으며, 적절한 소수적 특성을 가진 isooctane은 aerosol-OT와 함께 효소반응을 위한 가장 안정한 역미셀계를 형성하므로써 phospholipase A<sub>2</sub>의 DPPC 가수분해 반응에 가장 높은 활성을 보이는 것으로 생각하였다.

#### 역미셀계내에서 유화제의 최적화

역미셀계 효소생물반응계내에서 효소반응의 기질인 DPPC를 가수분해하여 lyso-DPPC를 생산하기 위하여는 phospholipase A<sub>2</sub>의 활성부위(active site)와 결합하여 분해반응이 일어나야만 된다. 이때 물에 대한 용해도가 높은 효소의 활성부위와 물에 난용성 기질인 DPPC는 수용액상(aqueous phase)과 유기용매상(organic solvent phase)의 경계면에서 결합하여 가수분해반응이 유발되는데, 이러한 계면(interface)은 유화제에 의하여 형성되며 역미셀계 효소생물반응계에서는 계면형성능력이 효소반응속도를 결정하는 중요한 요소가 된다고 알려져 있다<sup>(16,24)</sup>. 따라서 본 연구에서는 aerosol-OT를 비롯한 16종의 유화제를 사용하여 역미셀계를 형성시킨 후, DPPC가 가수분해되는 정도를 비교하였는데, aerosol-OT가 가장 효과적인 유화제인 것으로 판단하였다(Table 4).

Glycerol 골격에 소수성 tail 부분이 1개 부착되어 있는 monoglyceride 형태의 유화제는 역미셀을 형성하는데 기하학적으로 어려운 점을 지니고 있으며, Tween 85 및 Tween 20의 경우처럼 HLB값이 높은 친수성 유화제는 수용성부분이 극히 적은 역미셀계(W/O 형태의 emulsion과 유사한 미셀계)를 형성하지

**Table 4. Effect of various kinds of emulsifiers on the phospholipase A<sub>2</sub>-catalyzed hydrolysis activity in 50 mM aerosol-OT/isooctane reversed micelles**

Kinds of emulsifiers	Relative activity, %
Aerosol-OT	100
Glycerol monoricinoleate	74
Sorbitan trioleate	61
Glycerol distearate	70
Propyleneglycol monostearate	32
Glycerol Monostearate	49
Sorbitan monostearate	14
Sorbitan monooleate	19
Sorbitan monopalmitate	21
Sorbitan monolaurate	35
Tween 85	0
Tween 20	0
Brij 35	36
Triton X-100	59
Cetyltrimethylammoniumbromide	61
Polyethyleneglycol 6000	17

못하는 특성 때문에 효소활성이 매우 저조한 것으로 판단하였다.

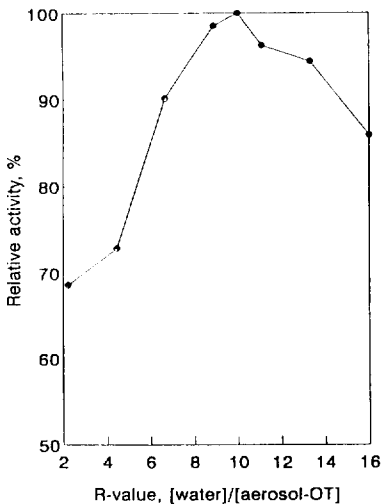
**역미셀계내 수분함량의 최적화**

Isooctane 용매속에 50 mM의 농도로 aerosol-OT를 용해시킨 후, 수분함량( $R=[\text{water}]/[\text{aerosol-OT}]$ )을 변화시키면서 DPPC가 가수분해되는 정도를 비교하여 실험하였는 바, Fig. 3과 같이  $R=10.0$ 일 때 가장 큰 효소활성도를 나타내었다.

이는 Han 등의 보고<sup>(17)</sup>와도 일치하는 결과로서, R-value가 10.0 이하인 경우는 수분의 부족에 의하여 가수분해반응이 비효율적으로 야기되며, R-value가 10.0 이상인 실험구에서는 역미셀계의 불안정성 및 효소의 변성속도 증가 등의 이유로 인하여 효소반응속도가 저하되는 것으로 추측된다.

**역미셀 입자내 pH의 최적화**

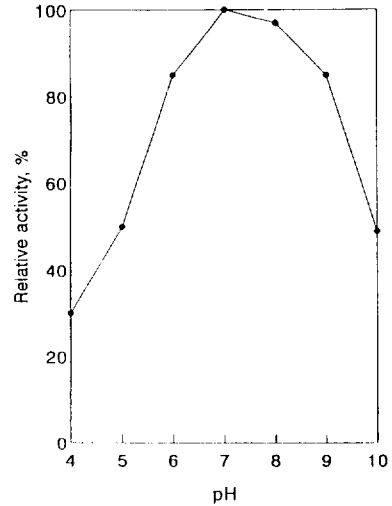
Sodium citrate buffer (pH 4.0~pH 6.0), sodium phosphate buffer (pH 6.0~pH 8.0) 및 Clark and Lubs solution (pH 8.0~pH 10.0)을 준비한 다음, 효소를 용해시켜 역미셀계를 구축하여 DPPC를 가수분해시켜 수용액계내에서의 pH 변화가 phospholipase A<sub>2</sub>의 활성도에 미치는 영향을 검토하였는 바(Fig. 4), pH 7.0 근처에서 가장 높은 효소활성도를 나타내었으며 pH가 산성쪽으로 혹은 알칼리성쪽으로 치우칠 경우, 효소의 활성도가 빨리 실활됨을 알 수 있었다.



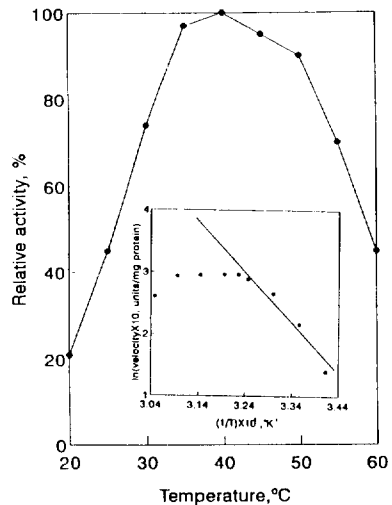
**Fig. 3. Effect of water content on the phospholipase A<sub>2</sub>-catalyzed hydrolysis activity in reversed micelles (50 mM aerosol-OT in isooctane).** The enzyme concentration is 20 units/10 mL of reactor and the temperature is 37°C.

**효소생물반응계 온도의 최적화**

Fig. 2에서 나타낸 기구 및 장치를 이용하여 온도의 효과를 살펴보았는 바, 항온수조의 온도를 20~60°C 범위에서 변화시키면서 역미셀계의 온도를 조절하여 DPPC 가수분해에 미치는 영향을 검토한 결과, 35~



**Fig. 4. Effect of pH on the phospholipase A<sub>2</sub>-catalyzed hydrolysis activity in reversed micelles (50 mM aerosol-OT in isooctane) at R=10.0.** The buffers (0.1 M) used are as follows: pH 4.0-6.0, sodium citrate; pH 6.0-8.0, sodium phosphate; pH 8.0-10.0, Clark and Lubs solution.



**Fig. 5. Effect of temperature on the phospholipase A<sub>2</sub>-catalyzed hydrolysis activity in reversed micelles (50 mM aerosol-OT in isooctane) at R=10.0.** The reaction was carried out at pH 7.0 for 10 min at various temperature; The insert shows the Arrhenius plot for the enzyme reaction.

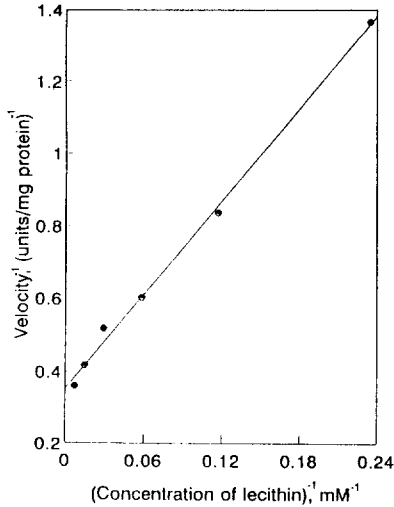


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot of initial velocity as a function of lecithin (dipalmitoylphosphatidylcholine) concentration at a fixed concentration of water (R value of 10.0) and aerosol-OT concentration of 50 mM.

40°C가 효소반응에 가장 적합한 것으로 판명되었으며 (Fig. 5), DPPC 가수분해를 위한 활성화에너지는 12.31 kcal/mole인 것으로 산출되었다.

#### 효소동력학 상수의 결정

역미셀계내에서의 효소반응을 위한 최적조건을 확립한 후, DPPC를 가수분해하여 lyso-DPPC를 생산해낼 때의 동력학적인 연구를 수행하였는 바, Lineweaver-Burk plot을 이용하여 phospholipase A<sub>2</sub> 효소의 K<sub>m,app</sub> 값과 V<sub>max,app</sub> 값을 계산하였다 (Fig. 6). K<sub>m,app</sub>는 8.73 mM, V<sub>max,app</sub>는 2.83 units/mg protein로 각각 계산되었으며, 이는 역미셀계내에서 phospholipase A<sub>2</sub>에 의한 DPPC의 가수분해반응이 Michaelis-Menten 모델을 완전히 따르는 것처럼 보인다.

결론적으로 볼 때, 미셀입자가 극히 작으며 (입자 직경=1~2 nm), 미셀입자 외부의 소수층에는 기질분자 (DPPC)가 내부의 친수층에는 효소(phospholipase A<sub>2</sub>)가 각각 존재하면서 미셀입자표면 및 외부와의 계면에서 가수분해반응이 야기되는 역미셀계 효소반응계는 수용액상에서의 다른 효소반응계와 마찬가지로 Michaelis-Menten 방정식을 적용할 수 있었는 바, 극히 작은 크기의 역미셀 입자로 구성된 역미셀계 효소반응계는 DPPC를 가수분해하여 lyso-DPPC를 생산해내기 위한 매우 효율적인 효소 생물 반응계인 것으로 판단되었다.

## 요 약

물을 극미량 함유하는 미수계 효소반응계인 aerosol-OT/이소옥탄으로 구성된 역미셀계내에서 레시틴의 일종인 DPPC (dipalmitoyl phosphatidylcholine)의 가수분해반응을 phospholipase A<sub>2</sub>가 촉매할 수 있었다. 또한 phospholipase A<sub>2</sub>에 의한 가수분해반응을 정량분석하기 위한 고성능 액체 크로마토그래피에 의한 예민하고 간편한 방법을 고안하였는 바, 이에 의하여 aerosol-OT/이소옥탄 역미셀계내에서 phospholipase A<sub>2</sub>에 의한 가수분해반응의 동력학적인 분석이 가능하였다. 한편, 여러가지 유화제와 유기용매 중 aerosol-OT와 이소옥탄일 때 효소반응이 가장 효과적이었으며, 반응 적정온도는 35~40°C, 적정 pH는 7.0이었다. 또한 역미셀계내에서의 가수분해반응은 수분 함량변화에 민감하였으며, R-값(=[water]/[aerosol-OT])이 10.0일 때 가장 높은 효소활성을 나타내었다. 효소반응을 위한 최적조건하에서의 K<sub>m,app</sub> 및 V<sub>max,app</sub>는 각각 8.73 mM, 2.83 units/mg protein이었으며, 역미셀계내에서 phospholipase A<sub>2</sub>에 의한 DPPC가수분해반응의 활성화에너지는 12.31 kcal/mole로 산출되었다.

## 감사의 글

이 논문은 한국학술진흥재단의 1994년도 신진연구 과제 연구비에 의하여 이루어졌으며, 한국과학재단의 1995년도 해외 post doc. 연수지원 및 서울산업대학교 교내연구비지원에 의한 연구결과의 일부이므로 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. 김용범, 김지용, 이철호: 압출조리와 단순 열처리에 의한 쌀전분의 분자량 분포변화와 효소민감성에 관한 연구. 한국식품과학회지, 25, 703 (1993)
2. Rosen, M.J.: Relationship of structure to properties in surfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 51, 461 (1974)
3. Lauridsen, J.B.: Food emulsifiers: surface activity, edibility, manufacture, composition, and application. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 53, 400 (1976)
4. Krog, N.: Functions of emulsifiers in food systems. *J. Am Oil Chem. Soc.*, 54, 124 (1977)
5. Titus, T.C., Wiancko, N.N., Barbour, H.F. and Mickle, J. B.: Emulsifier efficiency in model systems of milk fat or soybean oil and water. *Food Technol.*, 22, 1449 (1968)
6. Mickle, J.B., Titus, T.C. and Johnston, M.: Influence of emulsifier type and solubility on the stability of milk fat-water emulsions. *J. Food Sci.*, 36, 423 (1971)
7. Titus, T.C. and Mickle, J.B.: Stability of milk fat-water

- emulsions containing single and binary emulsifiers. *J. Food Sci.*, **36**, 723 (1971)
8. Smith L.M. and Dairiki, T.: Stability of milk fat emulsions. I. Preparation of model oil-in-water emulsions and evaluation of their stability. *J. Dairy Sci.*, **58**, 1249 (1974)
  9. Hahn, D.E. and Hood, L.F.: Factors influencing corn starch-lipid complexing. *Cereal Chem.*, **64**, 81 (1986)
  10. Zobel, H.F.: Molecules to granules: A comprehensive starch review. *Starch*, **40**, 44 (1988)
  11. Dziezak, J.D.: Emulsifiers: the interfacial key to emulsion stability. *Food Technol.*, **42**, 172 (1988)
  12. Flack, E. and Krog, N.: Emulsifiers in modern food production. *Lipid Tech.*, **2**, 11 (1990)
  13. Nobuyuki, A.: Enzymatic modification of soybean lecithin. *Bioindustry*, **7**, 54 (1990)
  14. Kwon, D.Y. and Rhee, J.S.: Effect of organic solvents on lipase for interesterification of fats and oils. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **17**, 490 (1985)
  15. Antonini, E., Carrea, G. and Cremonesi, P.: Enzymatic catalyzed reactions in water-organic solvent two-phase systems. *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 291 (1981)
  16. Yamane, T., Hoq, M.M., Itoh, S. and Shimizu, S.: Glycerolysis of fat by lipase. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **35**, 45 (1986)
  17. Han, D. and Rhee, J.S.: Characteristics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil in AOT-isooctane reversed micelles. *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1250 (1986)
  18. Chang, P.S. and Rhee, J.S.: Characteristics of lipase-catalyzed glycerolysis of triglyceride in reversed micelles. *Biocatalysis*, **3**, 343 (1990)
  19. Chang, P.S., Rhee, J.S. and Kim, J.J.: Continuous glycerolysis of olive oil by *Chromobacterium viscosum* lipase immobilized on liposome in reversed micelles. *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 1159 (1991)
  20. Zaks, A. and Klibanov, A.M.: Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. *Science*, **224**, 1249 (1984)
  21. Torchilin, V.P. and Martinek, K.: Enzyme stabilization without carriers. *Enzyme Microb. Technol.*, **1**, 74 (1979)
  22. Martinek, K., Levashov, A.V., Klyachko, N.L., Pantin, V.I. and Berezin, I.V.: The principles of enzyme stabilization. VI. Catalysis by water-soluble enzymes entrapped into reversed micelles of surfactants in organic solvents. *Biochim. Biophys. Acta*, **657**, 277 (1981)
  23. Tamamush, B. and Watanabe, N.: The formation of molecular aggregation structures in ternary system: Aerosol OT/isooctane. *Coll. Polymer Sci.*, **258**, 174 (1980)
  24. Grandi, C., Smith, R.E. and Luisi, P.L.: Micellar solubilization of biopolymers in organic solvents: Activity and conformation of lysozyme in isooctane reverse micelles. *J. Biol. Chem.*, **256**, 837 (1981)
  25. Hoq, M.M., Yamane, T., Shimizu, S., Funada, T. and Ishida, S.: Continuous synthesis of glycerides by lipase in a microporous membrane bioreactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 776 (1984)
  26. Fletcher, P.D.I., Freedman, R.B., Robinson, B.H., Rees, G.D. and Schmacker, R.: Lipase-catalyzed ester synthesis in oil-continuous microemulsions. *Biochim. Biophys. Acta*, **912**, 278 (1987)

---

(1996년 11월 1일 접수)