

방선균으로부터 Phospholipase D 생산균주의 탐색

손동화* · 심재용 · 윤석후
한국식품개발연구원, 이화학연구부

Screening of Phospholipase D Producing Actinomycetes

Shon, Dong-Hwa*, Jae-Yong Shim and Suk-Hoo Yoon

Division of Food Science, Korea Food Research Institute, Songnam 463-420, Korea

Abstract — In order to screen microorganisms producing phospholipase D (PLD) [EC 3.1.4.4], culture broths of about 900 strains of soil bacteria were subjected to examine for the PLD activity. When the hydrolytic activity of PLD (H-activity) in the supernatant was determined, 64 strains produced PLD more than 0.3 unit/ml and all of them were actinomycetes. Among 26 culture broths tested, 6 ones had transphosphatidylolation activity (T-activity) of 30~68%. When the strains except one were cultivated on 3 different media at 30°C for 3 days under aerobic condition, strain #1090 on medium B (yeast extract 1%, peptone 1%, glucose 1.5%, glycerol 1%, CaCO₃ 0.4%, and pH 7.2) produced PLD with much higher H- and T-activity, which were 8.3 units/ml and 76.3%, respectively. Subsequently, time course of PLD production of the strain #1090 during cultivation with aeration of 1 v/v/m and agitation of 400 rpm at 30°C for 5 days on medium B in jar fermentor was investigated. H-activity of PLD reached almost maximum (about 9 units/ml) after 32 hours and maximal T-activity was found to be about 80%.

유화제는 식품산업에서 매우 중요한 첨가물의 하나이다. 근래에는 기존의 천연유화제를 변형하거나(modify) 합성유화제를 혼합하므로써 우수한 유화력을 나타내는 유화제를 개발하고 있으며, 유지에 유화제를 첨가하여 특수용도의 유화유지를 생산하고 있다(1).

그 중에서도 새로운 유화제로 주목받고 있는 변형 레시틴(modified lecithin)은, 대두유의 제조시 부산물로 다량 얻어지는 레시틴(lecithin, phospholipid, PL)을 변형하므로써 얻을 수 있다. 즉, 천연유화제인 레시틴은 고염농도나 저 pH에서 유화능이 낮으며, 물에 난용성을 나타내므로써 기능상에 제약이 되고 있으나, 이런 결점을 개선한 변형레시틴은 유화능이 매우 뛰어나기 때문이다(2).

레시틴의 변형에 사용되는 효소인 phospholipase는 여러 종류가 있는데, 그 중에서 식품유화제로서 우수한 변형레시틴의 생산에 활용될 수 있는 효소는 A₂ 및 D(PLA₂, PLD)가 있다. 이들 효소를 레시틴에 처리하므로써 얻어지는, 유화력이 뛰어난 전이레시틴은

각각 lysolecithin과 phosphatidylglycerol(PG)이다. 그 중 PG는 제과, 제빵, whip cream의 제조 등 식품산업에 널리 활용될 수 있으며, 화장품산업에도 유용하게 활용될 수 있다(3, 4).

PLD [E.C. 3.1.4.4]는 반응조건에 따라 분해활성(H-activity)과 전이활성(T-activity)을 동시에 갖고 있다(5)(Fig. 1).

이 전이활성은 PG의 생산 이외에 다른 용도로도 활용가능하다. 예를 들면, 레시틴의 -R₃기를 ascorbic acid(비타민 C)로 치환하므로써 phosphatidylascorbate라는 항산화성의 신기능성 레시틴 유도체를 만들 수 있고, antitumor nucleoside를 부착시킨 인지질 유도체를 만들 수도 있다(6, 7).

PLD는 아직까지 상업적인 생산단계에 와 있지는 않으나, 근년 일본의 여러 회사에서 미생물(주로 방선균)로부터 전이활성이 높고 pH나 열안정성도 높은 PLD를 분리해 오고 있다(8). 또한, 최근에는 유전자 조작으로 안정된 균주를 확립하려는 연구도 시도되고 있다(9). 특히 야쿠르트사(일본)는 PG의 대량생산기술 확립을 목표로 효소반응 시스템 및 반응기의 개발 등의 기술개발을 서두르고 있다(10). 그러나, 이러한 연구내용들은 거의 대부분이 기업의 특허로 되어 있

Key words: Phospholipase D, transphosphatidylolation, actinomycetes

*Corresponding author

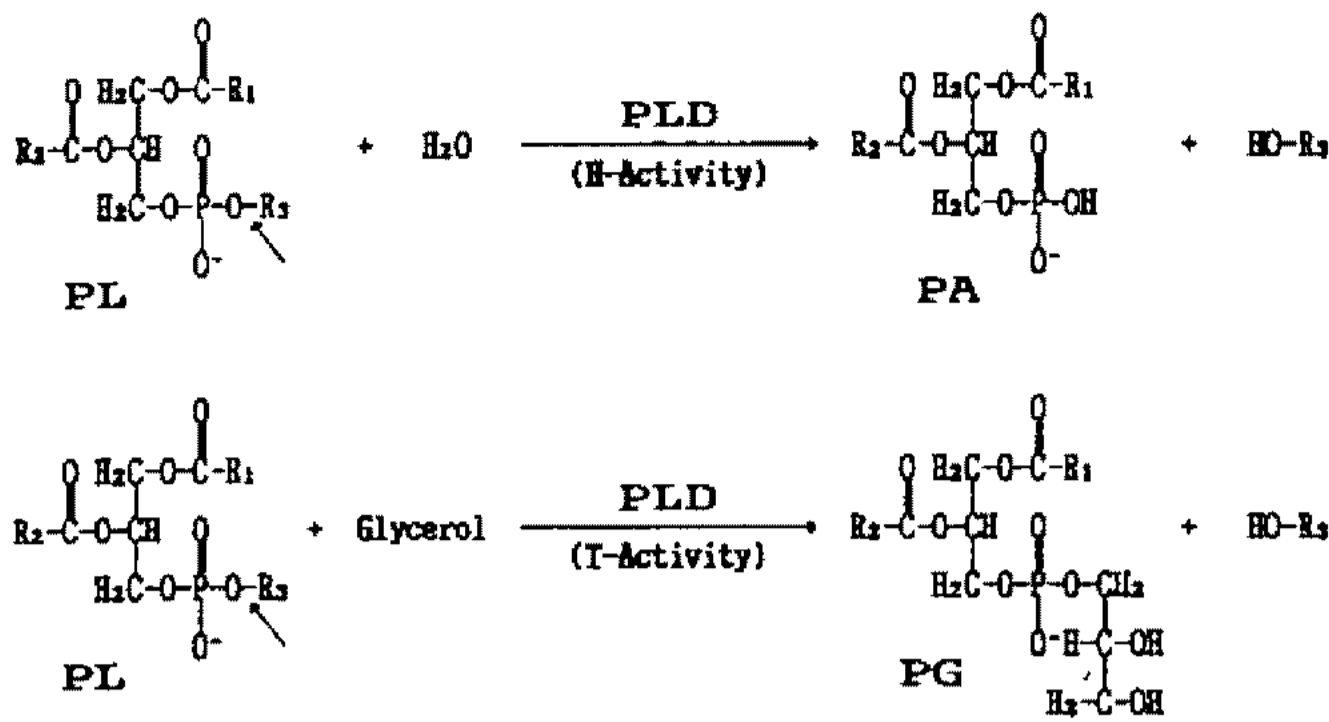


Fig. 1. Mode of action of phospholipase D(PLD) to produce phosphatidic acid(PA) and phosphatidylglycerol (PG) from phospholipid(PL) by the hydrolytic activity (H-activity) and transphosphatidylation activity(T-activity), respectively(5).

으며, 국내의 경우 지금까지 이 분야에 대한 연구가 거의 이루어지지 않고 있다.

따라서 이와 같은 문제를 극복하기 위하여 우수한 균주의 확보에서부터 새로운 용도의 개발에 이르기 까지 독자적인 연구를 서두를 필요가 있어, 일차로 토양미생물 배양액으로부터 PLD의 분해 및 전이활성 측정방법을 확립하고 약 900개의 배양액중 PLD의 활성이 비교적 양호한 균주를 선발하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양액

토양미생물의 배양액 및 균주는 KIST, 유전공학 연구소 미생물탐색연구실로부터 분양받았다. 일차적인 탐색에 사용한 배양액은 HV 한천배지(humic acid 1 g, Na_2HPO_4 0.5 g, KCl 1.7 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, CaCO_3 0.02 g, B-vitamins 0.75 mg, cycloheximide 50 mg, agar 18 g, distilled water 1l, pH 7.2) 상에서 분리한 토양미생물을 GSS 배지(soluble starch 1%, glucose 2%, soybean meal 2.5%, beef extract 0.1%, yeast extract 0.4%, NaCl 0.2%, K_2HPO_4 0.025%, CaCO_3 0.2%, pH 7.2) 또는 P 배지(beef extract 1%, polypepton 1%, glucose 1.5%, glycerol 1%, CaCO_3 0.4%, pH 7.2)에서 28°C , 6일간 교반배양한 것이다. 기타의 시약은 G.R. 또는 E.P.를 정제 않고 사용하였다.

PLD의 분해활성 측정

PLD의 분해활성측정을 위해서는 효소에 의해 기질인 PC로부터 유리된 콜린을 측정하는 방법(11)을 사용하였다. 즉, 포스포리파제 D에 의해 생성된 콜

린을 두가지 효소를 사용하여 quinone dye로 만든 후 500 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 미리 작성해 놓은 표준식으로부터 분해활성을 정량할 수 있었다. 구체적으로는 다음과 같다.

PC emulsion(crude egg PC 500 mg을 1 ml의 diethyl ether에 녹이고 이를 10 ml의 증류수와 함께 얼음물 중에서 초음파처리하여 만든 현탁액) 0.1 ml, 0.1 M Na-citrate buffer(pH 6.0) 0.1 ml, 0.1 M CaCl_2 soln. 0.05 ml, 7.5% Triton X-100 soln. 0.15 ml, enzyme soln.(or culture supernatant) 0.1 ml을 혼합하여 37°C , 10분간 처리한 후 50 mM EDTA(1 M tris-Cl buffer, pH 8.0) 0.2 ml을 첨가하고 끓는 물에서 5분간 처리하여 반응을 정지시키고 냉각하였다. 상기 용액에 choline 정색시약 4 ml(10 mM tris-Cl (pH 8.0), choline oxidase 4 units, peroxidase 4 units, 4-amino-antipyrine 2 mg, phenol 1 mg, Triton X-100 20 mg)을 첨가하고 37°C , 20분간 반응 후 나타나는 붉은 색을 500 nm의 파장에서의 흡광도로 측정한 후 이를 표준검정곡선에 견주어 choline의 함량을 구하였다. PLD 효소의 1 unit는 위 조건하에서 1분간 1 μmol 의 choline을 생성하는 활성으로 정의하였다.

PLD의 전이활성 측정

Egg yolk PC(99%) 1 μmol , 0.4 M acetate buffer (pH 5.6) 0.2 ml, 0.2 M CaCl_2 0.2 ml, 50% glycerol 0.08 ml, H_2O 0.32 ml, diethyl ether 0.5 ml, culture supernatant 0.2 ml의 혼합액을 25°C , 30분간 처리한 다음 1.6 M citric acid 0.12 ml을 첨가하여 반응을 정지시켰다(11, 12). 반응액을 diethyl ether-ethanol (4 : 1), 2 ml로 추출한 후 N_2 stream 하에서 농축하고 이를 TLC plate에 apply 하여 2차원적으로 전개하였다(13, 14). 1차 전개액으로는 chloroform : MeOH : 7 N ammonium hydroxide(130 : 60 : 8, v : v : v)를, 2차 전개액으로는 chloroform : MeOH : acetic acid : H_2O (170 : 25 : 25 : 6, v : v : v : v)를 사용하였다. 전개 후 인지질의 발색시약인 molybdenum blue를 분무하여 나타나는 청색의 spot을 표준품과 비교하므로써 반응생성물을 동정하고 2D-scanning densitometer(Zeinh SoftlazerTM, Biomed Instruments Co.)로 측정하였다. 즉, PC, PG, PA에 해당하는 각 spot의 3차원 image 상의 volume을 구한 후 $\text{PG}/(\text{PC} + \text{PG} + \text{PA}) \times 100(\%)$ 의 값으로 전이활성을 표시하였다.

선택균주의 시험관 배양

PLD의 전이 및 분해활성이 양호한 다섯 균주를

다음과 같은 조건에서 배양하였다. 우선, 배지는 문헌을 참고하거나 약간 변형하여 medium A, B 및 C로 나타낸 세 종류를 사용하였다(12, 15, 16). Medium A : glucose 0.5%, yeast extract 0.5%, corn steep liquor powder 2%, pH 7.0 ; Medium B : yeast extract 1%, peptone 1%, glucose 1.5%, glycerol 1%, CaCO₃ 0.4%, pH 7.2 ; Medium C : glucose 0.5%, corn steep liquor powder 1%, yeast extract 0.5%, peptone 0.5%, K₂HPO₄ 0.2%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, pH 7.0. 이들 배지 4 ml 씩에 각 균주의 aerial mycelium을 접종하여 시험관(Φ15.5×135 mm)을 45°로 기울인 상태에서 reciprocal type의 shaking incubator 내에서 100 rpm의 속도로 교반하면서 30°C 에서 3일간 배양하였다. 배양 후 각 배양액중의 PLD 활성을 측정하였다.

선발균주의 발효조 배양

Medium B를 배양배지로 사용하여, 위에서 같이 준비한 시험관 배양액 4 ml(5%)을 80 ml의 배지에 옮겨 배양하였다. 즉, 500 ml 용의 baffled 삼각플라스크에 넣고, 이를 rotary type의 shaking incubator 내에서 190 rpm로 교반하면서 30°C, 3일간 배양하였다. 그 다음으로 이를 1.7l의 본 배양으로 옮겨 배양하였다. 본 배양은 2.5l의 발효조 BioFlo IIC(New Brunswick Scientific Co., N.J., U.S.A.)를 사용하였다. 분당 공기공급은 배지의 부피와 같게 하였고(1 v/v/m), 교반은 400 rpm으로 하였으며 30°C, 5일간 배양하였다. 시료채취는 8시간마다 한번씩 행하였다. 배양중 pH의 측정은 발효조에 부착된 pH meter를 사용하였으며, PLD의 활성은 앞에서의 방법에 따랐고, 기타의 측정 항목은 다음의 방법으로 분석하였다.

건조중량의 측정 : 균체의 건물량은 건조법에 의하여 측정하였다. 단, 배지중에는 난용성의 Ca 염이 많이 함유되어 있어 배양초기의 배양액에는 상당량 침전되어 정확한 균체중식의 측정을 방해하므로써 이를 제거하기 위하여 모든 배양액(5 ml 씩)을 동량의 0.025 N HCl로 3회 원심(2,500 rpm, 3분) 세척 후 분석하였다.

Glucose 함량의 분석 : DNS 법(17)으로 측정하였다. 즉, 배양상징액 50 μl에 950 μl의 증류수를 넣고 여기에 DNS 시약을 3 ml 첨가하고 교반 후, 100°C에서 3분간 가열하였다. 냉각 후 8 ml의 증류수를 첨가하고 vortex 한 후, 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Glucose의 함량은 미리 작성한 표준곡선으로 산출하였다.

Glycerol 함량의 분석 : Glycerol complex 법(18)으로 측정하였다. 즉, 배양상징액 0.5 ml에 증류수 0.5

ml과 21%의 NaOH, 1 ml 및 95%의 ethanol, 6 ml을 첨가하여 교반하였다. 이를 교반하면서 여기에 10%의 CuCl/ethanol, 0.6 ml을 점적한 후, 2분간 vortex 하였다. 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 635 nm에서 상징액의 흡광도를 측정하였다. Glycerol의 함량은 미리 작성한 표준곡선으로 산출하였다.

조단백질의 정량 : Micro-Kjedahl 법(19)으로 분석하였다. 즉, 배양상징액 1 ml을 분해제 및 5 ml의 황산과 함께 혼합 가열하여 분해하였다. 분해가 끝난 시료를 Kjeltac Auto-1030 analyzer(Tecato Co., Sweden) 장치를 이용하여 titration 하였다. 질소계수 6.25로 조단백질의 양을 구하였다.

결과 및 고찰

배양액의 PLD 분해활성

시험한 방선균 배양액 830개 중 분해활성 0.2~0.3 unit/ml인 것을 21개, 0.3 unit/ml 이상인 것을 64개 선발하였는데, 이중 최고의 분해활성은 3.2 units/ml로 나타났다. 시험한 일반세균 배양액 130개 중 분해활성 0.1 unit/ml 이상인 것은 하나도 없었다. 문헌에 나타난 PLD 생산은 중온성 방선균이 월등하게 우수하였는데, 본 연구에서도 PLD 생산균주는 중온성 방선균으로 추정된다(3). 분해활성시험에 사용한 방선균 균주 및 그 배양액은 PLD 생산균주를 분리하기 위한 최적의 조건이 아님에도 불구하고 높은 활성을 갖고 있었다. 문제점으로 배양액 중의 PLD 분해활성이 냉장보관중 점차 감소하였음을 들 수 있다.

배양액의 PLD 전이활성

실험방법에 기술한 densitometer에 의한 인지질의 정량성은 양호함을 Fig. 2에서 알 수 있다. 즉, phosphatidylcholine(PC)을 이용하여 측정하였을 때, PC의 량과 spot의 광학적 부피와는 그 상관성이 양호하였다. 따라서, 인산의 양을 측정하는 기존의 방법과 비교하여 그 방법의 간편성 때문에 PLD 전이활성의 screening시 유용하였다. 발색처리를 끝낸 대표적인 TLC plate 상의 chromatogram을 Fig. 3에 나타내었다.

보관 중에도 분해활성이 높은 26개의 배양액에 대하여 전이활성시험을 행하였다. 그 결과, 전이활성이 30% 이상인 것은 6개였으며, 최고의 전이활성은 68%로 나타났다. PA의 생성비율은 0~4%로 낮게 나타나 양호하였다. 일반세균 배양액은 분해활성이 매우 낮아 전이활성시험에서 제외하였다. 그리고, 일차로 선발된 6균주가 생산한 PLD의 분해 및 전이활

성을 요약하면 Table 1과 같다. 또한, 각 활성들간에 상관관계를 검토하였으나 상관성은 나타나지 않았으며, 이는 기보고(12)와 일치하였다. 여기에서 비교적 높은 전이활성의 균주(#1090 및 #2120)를 선발할 수 있었다.

시험관 배양에 의한 PLD 생산성의 비교
위에서 선택한 여섯 균주중 다섯 균주를 세 종류의

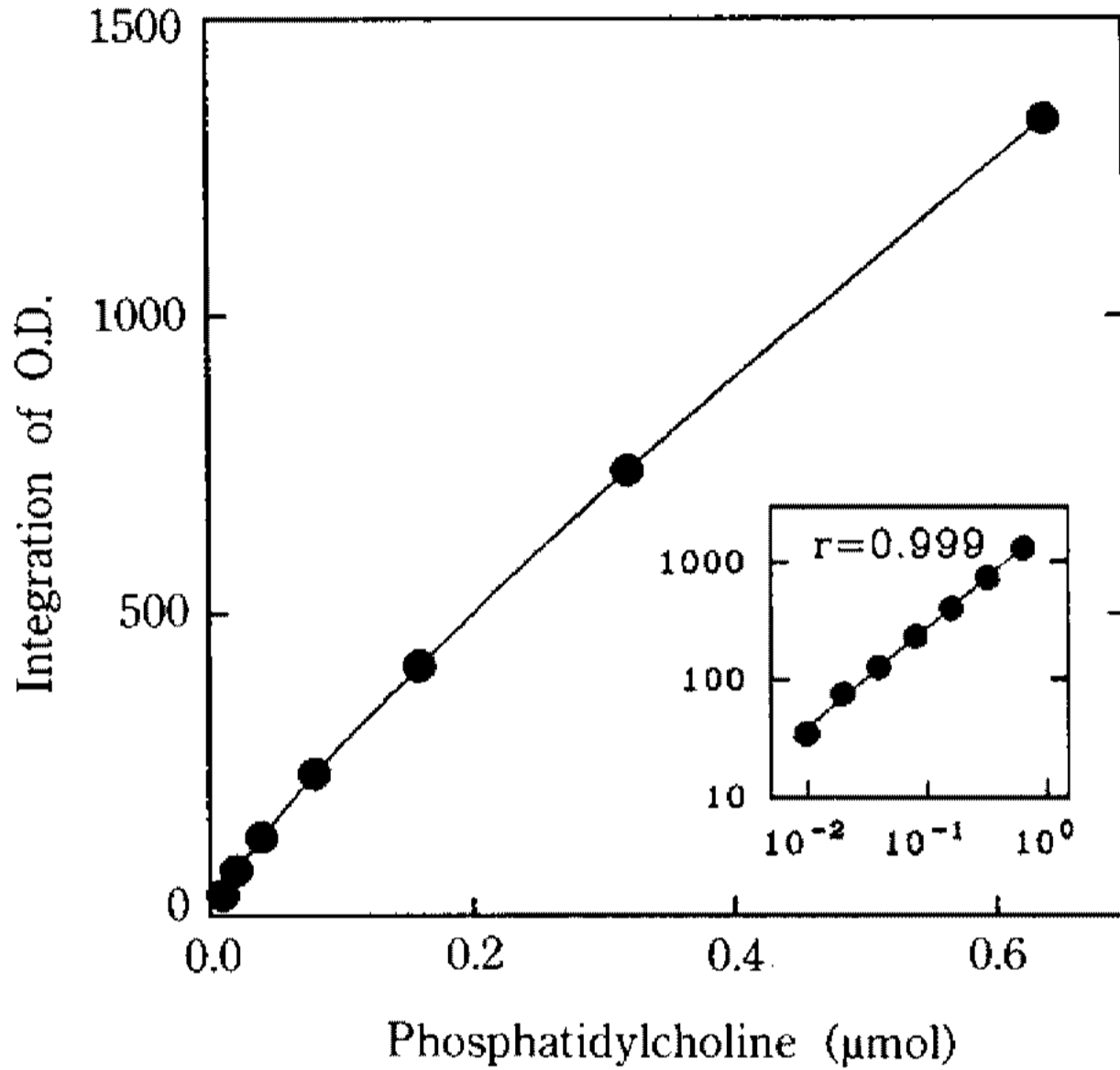


Fig. 2. Linearity between the mount of phosphatidylcholine and the integration value of O.D. determined by 2D-scanner in the phospholipid quantitation for the T-activity assay of PLD.
The unit of integration value is arbitrary.

다른 배지에 시험관에서 배양하였을 때, 균주 및 배지에 따라 생산된 PLD의 활성이 차이가 많았다(Table 2). 그러나, 새로이 3일간 배양하여 얻은 신선한 배양상징액 중의 효소활성은 전체적으로 상당히 높게 나타났다. 또한 대체로 분해활성이 높게 나타난 균주에서 전이활성도 높게 나타났다. 특히 그 중에서도 균주 #1090과 #2120의 경우 최고의 분해활성이 각각 8.3 및 7.0 units/ml이었고, 최고의 전이활성은 각각 76.3 및 79.5%로 나타나 양질의 PLD를 생산하였다. 그리고 이들은 spore chain의 형태, 흰색의 spore mass, 갈색의 substrate mycelium, 그리고 높은 레시틴의 분해활성 등의 점에서 *Streptomyces* 속인 것으로 추정된다. 그외 균주 #1147이나 #1248의 PLD 활성도 비교적 양호하였으나 #2142는 대체로

Table 1. Summary of the primary screening for PLD from 960 culture broths

Strain ^a No.	Hydrolytic activity unit/ml	Transphosphatidylation activity ^b %
1090	0.6	68
1146	3.2	45
1147	1.6	40
1248	0.6	30
2120	1.2	65
2142	0.7	49

^aAll were actinomycetes.

^bProductivity of phosphatidic acid by PLD was very low (0~4%) in the assay.

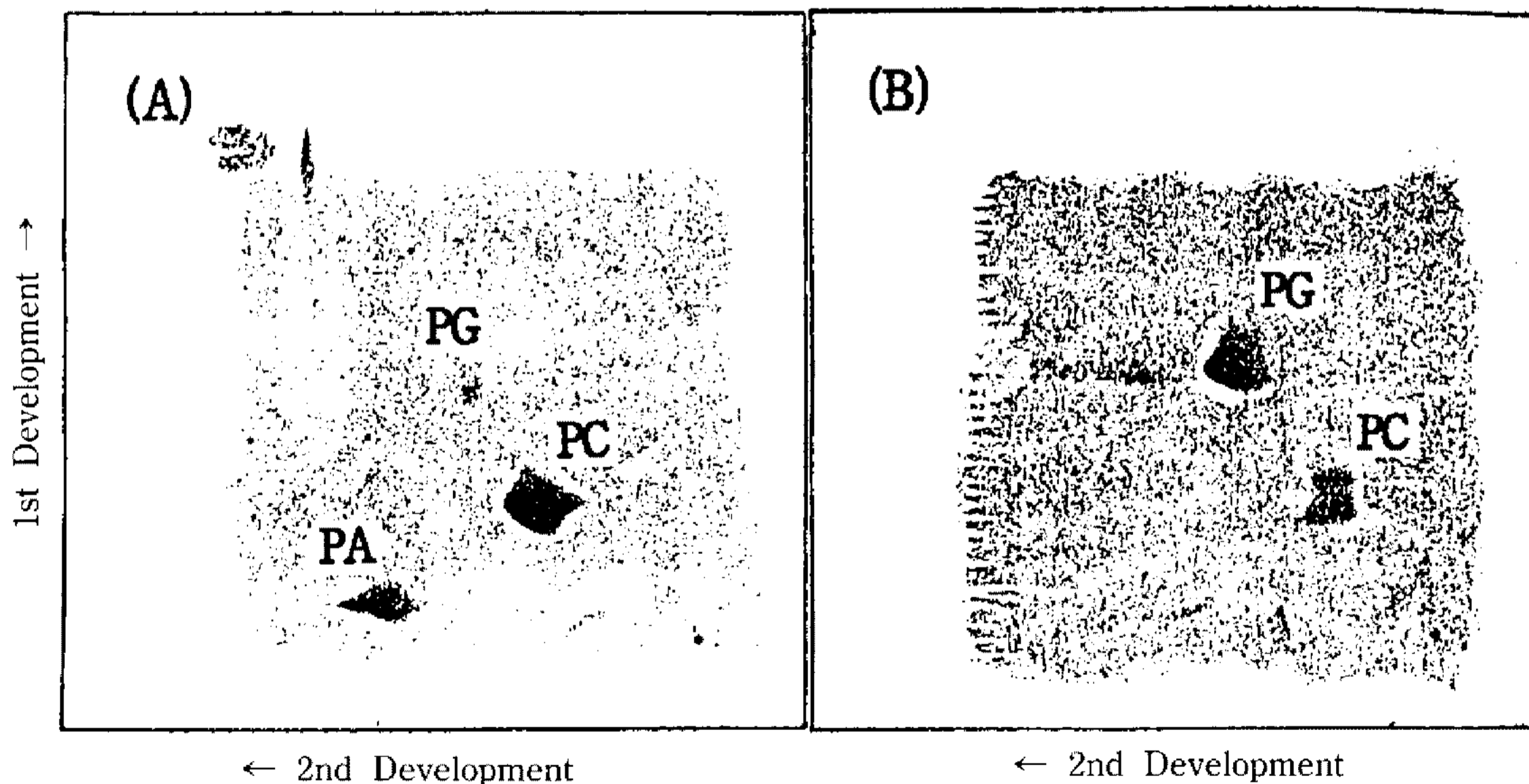


Fig. 3. Typical TLC chromatograms in the T-activity test of PLD.
Culture supernatants containing low (A) and high enzyme activity (B) were employed in the assay. PG: phosphatidylglycerol, PC: phosphatidylcholine, PA: phosphatidic acid

분해 및 전이활성이 매우 낮았다. 배지의 종류에 따른 효소활성은 일정하지 않았다. 그러나, 특기할 점은

Table 2. PLD activities of the fresh culture supernatants when the selected actinomycetes were cultivated on 3 different media for 3 days at 30°C

Strain No.	Hydrolytic activity unit/ml			Transphosphatidylase activity %		
	A ^a	B ^b	C ^c	A ^a	B ^b	C ^c
1090	4.1	8.3	5.6	69.0	76.3	63.6
1147	4.3	2.0	4.9	48.9	48.3	44.4
1248	2.4	2.2	2.7	30.0	16.1	56.8
2120	7.0	4.3	3.8	49.8	79.5	10.9
2142	1.3	0.9	1.0	53.9	16.8	9.9

^aMedium A: glucose 0.5%, yeast extract 0.5%, corn steep liquor powder 2% (pH 7.0).

^bMedium B: yeast extract 1%, peptone 1%, glucose 1.5%, glycerol 1%, CaCO₃ 0.4% (pH 7.2).

^cMedium C: glucose 0.5%, corn steep liquor powder 1%, yeast extract 0.5%, peptone 0.5%, K₂HPO₄ 0.2%, MgSO₄·7H₂O 0.05% (pH 7.0).

medium B에서 균주 #1090과 #2120의 전이활성이 매우 높게 나타났다. 이는 아마도 medium B중의 glycerol이 전이활성을 높이는 역할을 하는 때문인 것으로 추측된다. 최근 Haas 등(20)은 *Rhizopus delamar*의 lipase 생산시 탄소원으로서 glucose는 그 합성을 억제하나, glycerol은 그 합성을 촉진함을 보고하였는데, 이 경우에도 glycerol이 PLD의 생산을 촉진한 것으로 생각되나 정확한 원인은 좀더 검토할 필요가 있다. 또한, 균주 #1090은 세 종류의 모든 배지에서 높은 전이활성의 PLD를 생산하므로써 #2120보다 배지 선택성이 낮아 대량생산에 유리한 조건이 될 수 있을 것으로 생각한다.

발효조배양에 의한 균주생육 및 PLD 생산의 경시적 검토

앞의 시험관 배양시험에서 생산된 PLD의 분해 및 전이활성이 양호한 균주(#1090)를 선발하여 이를 발효조에 5일간 medium B에서 배양하면서 경시적인 PLD 생산을 검토하였다. Fig. 4에 그 결과를 나타내었다.

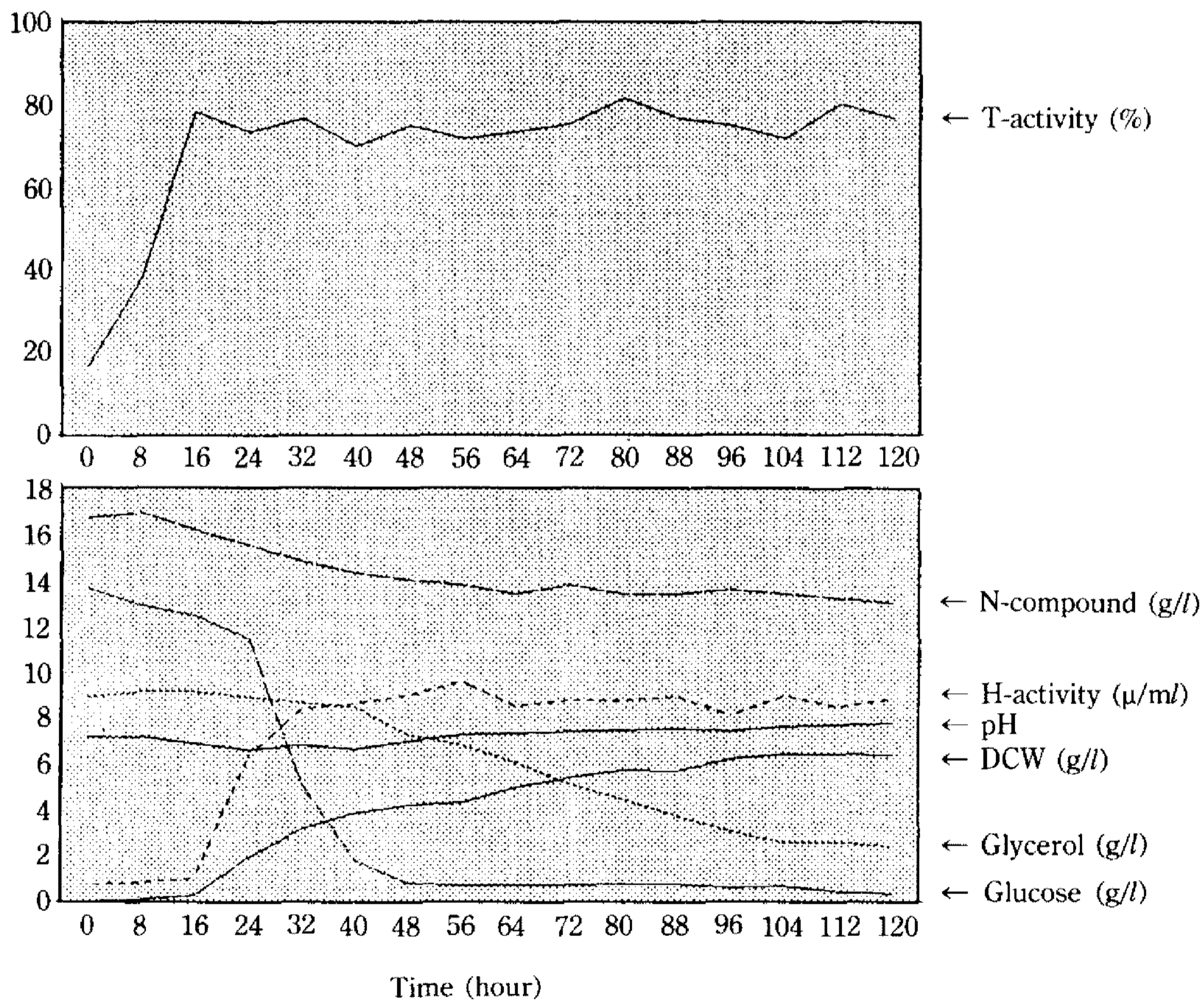


Fig. 4. Time course of phospholipase D production by a *Streptomyces* strain #1090. The strain was cultivated under aerobic condition (1 v/v/m) and agitation (400 rpm) at 30°C for 5 days in medium B, whose composition is same as shown in Table 2

균주의 생육곡선은 비교적 완만하여 배양 4일 후에 최고치(DCW : 6.4 g/l)를 나타내었다. 이는 아마도 이 균주의 탄수화물 소비곡선과 관련이 있는 것으로 생각된다. 즉, 초기에 탄소원으로 glucose를 소비하다가 40시간 이후에 거의 바닥에 다다르면서 이번에는 glycerol을 소비하기 시작하는데, 그 전환점에서 균주 #1090은 새로운 탄소원에 적응하여 56시간 후에 2차적인 생육을 하는 것이 가능한 것으로 추측된다.

PLD의 효소활성을 검토하여 보면, 비교적 생육의 초기단계(32시간)에 많은 효소를 분비하여 그 분해활성이 거의 최고치(9 units/ml 가량)에 도달했다. 또한, 전이활성은 이보다 빨리(약 16시간 후) 최고치(80% 가량)를 나타내고 있다. 이는 PLD가 이 균주의 대사 및 생육에 유용한 효소이기 때문으로 생각된다.

한편, 균주의 생육중 pH의 변화는 40시간 부근에서 약간 감소(pH 6.5 가량)하다가 다시 증가하여 배양 후기에는 pH 8 가량으로 나타나 비교적 큰 변화가 없었다. 이는 배지중에 함유되어 있는 CaCO₃의 완충효과에 의한 것으로 생각된다. 따라서, 이 경우 pH는 균의 생육이나 효소생산에 거의 문제되지 않음을 알 수 있다.

그외에 배양상징액중의 질소화합물(조단백질) 함량의 변화를 검토하였을 때, 배양중 크게 감소하지 않았는데(17→13 g/l) 이는 아마도 PLD가 분비형 효소이기 때문에 균주가 소비한 질소원의 실제량과는 다소 차이가 있을지도 모른다. 그러나, 기보고에 의하면 정제된 PLD의 활성이 mg당 1만 units까지 달하는 것으로 보아(21) 상징액중에 효소가 차지하는 단백질 비율은 낮을 것으로 생각된다(0.1 mg/l 가량). 따라서, 위 조건에서 배지중의 질소화합물이 균주의 생육이나 PLD 생산에 직접적으로 미치는 영향은 크지 않은 것으로 생각한다.

이상과 같이 #1090 균주의 생육특성 및 PLD 생산성의 경시적 변화를 조사하였는데 여기서 가장 중요한 것은 생산된 PLD의 분해 및 전이활성이 상업적으로 유용한가 하는 점이다. 문헌에 의하면, Kato 등(16, 21)은 3.2 units/ml을, Shimbo 등(12)은 4.3 units/ml을, Shimbo 등(15)은 9.8 units/ml을 탐색초기균주의 PLD 생산으로 보고하였으며, Hasegawa 등(9)은 유전자조작에 의하여 15 units/ml(원균주의 15배)의 생산성을 보고하였다. 특히 Shimbo 등(13)은 두 방선균주로부터 생산한 PLD의 전이활성이 96.2% 및 97.3% 임을 보고하였다. 여기서 배양조건 등에 따라 동일균주라도 활성이 다르게 나타날 수 있으므로, 효소활성의 수치를 직접 비교하는 것은 곤란하다. 그러나, 본 연구에서 #1090 균주가 생산한 PLD의

최고분해활성은 각각 9 units/ml 가량이고 전이활성은 80% 가량으로서, 전이활성을 좀 더 개량하여 95% 이상의 수준으로 높이거나, 그러한 균주를 새로이 분리한다면 충분히 산업화에 활용가능하다고 생각한다.

요 약

Phospholipase D(PLD) [EC 3.1.4.4]의 생산균주를 탐색하기 위하여 약 900개의 토양미생물 배양액의 PLD 활성을 검색하였다. 배양상징액중 PLD의 분해활성(H-activity)이 0.3 unit/ml 이상인 것을 64개 분리하였으며, 이들은 모두 방선균 배양액이었다. 전이활성(T-activity)을 분석한 결과, 시험한 26개중 6개가 전이활성 30~68%인 것으로 나타났다. 한 균주를 제외한 이들 5균주를 세 종류의 배지에 30°C, 3일간 호기적 조건으로 배양하였을 때, #1090 균주는 B배지(yeast extract 1%, peptone 1%, glucose 1.5%, glycerol 1%, CaCO₃ 0.4%, and pH 7.2)에서 높은 분해 및 전이활성의 PLD를 생산하여 각각 8.3 units/ml 및 76.3%이었다. 다음으로 #1090 균주를 발효조배양시 PLD 생산의 경시적 변화를 조사하였다. B배지 상에서 공기공급(1 v/v/m) 및 교반(400 rpm)하면서, 30°C, 5일간 배양한 결과, 배양 32시간 후에 배양액중 PLD의 분해활성이 거의 최고에 달하였으며(9 units/ml 가량), 전이활성은 최고 80% 가량으로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 1992년 과학기술처 선도기술개발과제로 수행되었으며 연구비지원에 감사드립니다. 또한, 본 연구에서 사용한 미생물배양액 및 균주를 제공하여 준 KIST, 유전공학연구소, 미생물화학그룹의 유익동 박사 및 김창진 박사께 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

1. 編輯部. 1990. 油脂關聯新素材. 食品と開發 25: 48-49.
2. Aoi, N. 1990. 大豆レシチンの酵素による改質. *Bio Industry (Jpn)* 7: 484-493.
3. 食品産業 Bioreactor System 技術研究組合. 1988. Phosphatidic acid 誘導體の製造法. 日本特許公報 昭63-245684.
4. 花王株式會社. 1989. 化粧料. 日本特許公報 昭64-75409.
5. Yang, S.F., S. Freer, and A.A. Benson. 1967. Transphosphatidylolation by phospholipase D. *J. Biol.*

- Chem.* **242**: 477-484.
6. Kudo, S. and A. Kuroda. 1990. 酵素による轉移レシチンの製造と應用. *Bio Industry (Jpn)* **7**: 494-500.
 7. 編集部. 1991. 食品産業と新しい酵素利用技術. 食品と開発 **26**: 31-36.
 8. 編集部. 1990. 伸張するレシチン. 食品と開発 **25**: 14-16.
 9. 協和醸酵工業株式會社. 1992. Phospholipase D-Kの製造法. 日本特許公報 平4-88981.
 10. 日本工業新聞. 1993. レシチンの乳化特性大幅向上. July, 14.
 11. Shimbo, K., H. Yano, and Y. Miyamoto. 1990. Purification and properties of phospholipase D from *Streptomyces lydicus*. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 1189-1193.
 12. Shimbo, K., H. Yano, and Y. Miyamoto. 1989. Two *Streptomyces* strains that produce phospholipase D with high transphosphatidylolation activity. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 3083-3085.
 13. Watanabe, M., T. Itoh, M. Iida, A. Okabe, Y. Kawaguchi, K. Shimbo, R. Sono, T. Murui, and T. Kaneko. 1986. Quantitative analysis of phospholipid composition by two dimensional thin-layer chromatography followed by lipid phosphorus de-termination. *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)* **35**: 1018-1024.
 14. Christie, W.W. 1982. *Lipid analysis*, Pp. 117-119. 2nd ed. Pergamon Press, New York.
 15. 株式會社 Honen Corporation. 1992. Phospholipase D及びその製造法. 日本特許公報 平4-166083.
 16. Kato, S., Y. Kokusho, H. Machida, and S. Iwasaki. 1984. Isolation and identification of phospholipase D producing Actinomycetes. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 2181-2188.
 17. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-431.
 18. 社団法人日本分析化学會. 1971. 分析化学便覧. P. 352. 改正2版. 丸善株式會社, 東京.
 19. Steyermark, A.L. 1961. *Quantitative organic microanalysis*, 2nd ed. Academic Press, New York.
 20. Haas, M.J. and D.G. Bailey. 1993. Glycerol as a carbon source for lipase production by the fungus *Rhizopus delemar*. *Food Biotechnol.* **7**: 49-73.
 21. 名糖産業株式會社. 1983. Phospholipase Dの製造法. 日本特許公報 昭58-63388.

(Received June 17, 1994)