

방선균 KF9230이 생산하는 Phospholipase D의 정제 및 특성

곽보연 · 윤석후 · 김창진¹ · 손동화*

한국식품개발연구원 식품기능연구본부, ¹한국생명공학연구원

Purification and Characterization of Phospholipase D from Actinomycetes KF923. Kwak, Bo-Yeon, Suk-Hoo Yoon, Chang-Jin Kim¹, and Dong-Hwa Shon*. Division of Food Function Research. Korea Food Research Institute, 46-1 Baekhyung-dong, Bundang-gu, Seongnam, 463-746, Korea ¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 52, Oun-dong, Yusong-gu, Taejeon, 305-333, Korea – In order to screen microorganisms producing phospholipase D (PLD) had high transphosphatidylase activity, about 1,000 Actinomycetes strains were isolated from the 63 soil samples, collected over 6 local area in Korea. When the hydrolytic activity in the supernatant was determined, 131 strains produced PLD more than 0.3 U/ml. Among 131 culture broths tested, 23 ones had transphosphatidylase activity higher than 20% and finally one strain (Actinomycetes KF 923), which had highest hydrolytic and transphosphatidylase activity, was selected. Actinomycetes KF923 showed the highest hydrolytic activity (13 U/ml) and phosphatidylase activity (95%) after 48 h fermentation using the P medium (yeast extract 1%, peptone 1%, glucose 1.5%, glycerol 1%, CaCO₃ 0.4%, pH 7.2). PLD was purified from the culture broth of Actinomycetes KF923 and the specific activity of purified PLD was 567 U/mg. The molecular weight of PLD was about 55 kD and the optimum pH and temperature were 6.0 and 60°C, respectively. The stability of PLD toward pH and temperature were high around pH 8.0 and below 40°C. Special metal ions were not necessary to the PLD activity.

Key words: Purification, characteristics, phospholipase D, Actinomycetes

유화제는 식품산업에서 중요한 역할을 하는 첨가물 중의 하나로서 특수한 기능을 가지는 변형 레시틴(modified lecithin) 등의 특수한 유화제가 이용되고 있다[1]. 이들은 phospholipase D(PLD) 효소를 이용해 phosphatidyl glycerol(PG)를 생산함으로써 제과, 제빵 및 whip cream 등의 식품산업에 유용하게 활용될 수 있다. PG의 생산에 PLD 효소를 사용한 연구가 있고[7] 또한 일부 일본 기업에서는 특허를 내기도 하였다(K. Satoshi *et al.* 1988; *Jpn Pat.* S63-245684, K. Satoshi *et al.*, 1986; *Jpn Pat.* S61-199749). 또한 대두의 lecithin으로부터 phospholipase A₂(PL₂) 효소를 이용해 변형 lecithin의 하나인 lysolecithin 생산하기도 하였다[16]. PLD(E.C. 3.1.4.4)는 반응조건에 따라서 분해 또는 전이활성을 나타내는 데, 전이활성에 의해 변형 레시틴을 포함하는 항산화성 및 항종양성을 가지는 새로운 인지질 유도체를 생성함으로써 산업적으로 유용하게 이용될 수 있는 [4, 13, 14] 가능성을 보이고 있다. 이러한 유도체 생산이 효과적으로 수행되기 위해서는 높은 전이활성을 보이는 PLD의 확보가 중요하다. 식물 및 미생물에서 PLD를 생산하는 것들이 많이 보고되고 있고 그 중에서 *Streptomyces* 속의 방

선균에선 PLD 활성이 좋은 것이 보고되고 있다[3, 4, 10]. 다른 한편으로 PLD 또는 이를 생산하는 균주의 고정화를 통한 변형 lecithin의 생산성을 높이려는 시도가 있었고 [5, 6, 11, 17] 식물에서의 PLD 특성 조사와 함께 이 효소의 유전자를 클로닝한 시도가 있다[9, 15]. 산업화에 이용되기 위해서는 PLD의 전이활성이 높은 균주의 확보가 필요한 바, 국내에서 손 등[12]이 미생물 탐색을 통해 분해 및 전이 활성이 높은 PLD를 생산하는 균주를 탐색하였다. 선발된 균주 중 2개의 균주가 PLD 분해 활성이 높고(약 9 U/ml) 레시틴 유도체나 다른 유도체를 생산하는 데 필요한 PLD 전이 활성이 약 80% 가량으로 나타났다. 그러나 이들은 분해 활성은 양호하나 산업화에 활용 가능하기에는 전이 활성이 다소 떨어진다.

따라서 본 연구에서는 전이활성이 95% 이상으로서 산업화에 활용가능한 우수한 PLD 생산 균주를 토양으로부터 새로이 선발하고 이 균주가 생산하는 PLD 효소를 정제하고 이의 효소 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

경기도 성남시, 용인시 및 수원시, 강원도 홍천군, 충청북도 단양군, 충청남도 온양군 등 6개 지역에서 채취한 63점

*Corresponding author

Tel: 82-31-780-9133, Fax: 82-31-709-9876

E-mail: dhs95@kfri.re.kr

의 토양을 30 g가량씩 실온에서 하룻밤 풍건하였다. 여기에 6% yeast extract, 0.05% sodium dodecylsulfate의 처리 후 40°C, 20분간 열처리하고 회석하여 nalidixic acid(20 mg/l)를 첨가한 HV 한천배지(humic acid 1 g, Na₂HPO₄ 0.5 g, KCl 1.7 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.05 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, CaCO₃ 0.02 g, B-vitamins 0.75 mg, agar 18 g, distilled water 1 l, pH 7.2) 상에서 30°C, 3주간 배양하였다.

생성된 colony를 선별하여 Bennet agar(glucose 10 g, yeast extract 1 g, Bacto-peptone 2 g, beef extract 1g, agar 18 g, distilled water 1 l, pH 7.0)에 분리 배양하였다.

균주의 액체배양

분리된 각 colony들의 액체배양은 P배지(yeast extract 1%, peptone 1%, glucose 1.5%, glycerol 1%, CaCO₃ 0.4%, pH 7.2)에서 수행하였다. 각 균주의 aerial mycelium을 4 ml의 P배지에 접종하여 시험관(Φ15.5×135 mm)을 45°로 기울인 상태에서 reciprocal type의 shaking incubator 내에서 100 rpm의 속도로 교반하면서 30°C, 3일간 배양하였다.

발효조배양은 BioFlo IIC 발효조(New Brunswick Scientific Co., NJ, U.S.A.)를 사용하였다. 균주의 활성이 양호한 플라스크 배양액을 5% 접종하여 working volume 1.8 l로 배양하였다. 분 당 공기공급은 배지의 부피와 같게 하였고, 600 rpm으로 교반하면서 30°C, 3일간 배양하였다. 배양액을 10,000×g, 30분 원심분리한 다음 상층액을 phospholipase D(PLD) 활성시험에 사용하였다.

Phospholipase D(PLD)의 분해활성 측정

PC emulsion(crude egg PC 500 mg/diethyl ether 1 ml and H₂O 10 ml) 0.1 ml, 0.1 M Na-citrate buffer(pH 6.0) 0.1 ml, 0.1 M CaCl₂ 용액 0.05 ml, 7.5% Triton X-100 용액 0.15 ml, 효소용액 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. 이 용액에 choline 정색시약(choline oxidase 4 U, peroxidase 4 U, 4-amino-antipyrine 2 mg, phenol 1 mg, Triton X-100 20 mg/10 mM Tris-Cl buffer, pH 8.0) 4 ml을 첨가하고 37°C, 20분간 반응 후 500 nm에서의 흡광도를 측정한다. 이를 표준점정곡선에 견주어 choline의 함량을 구하였다. PLD효소의 1 U는 위 조건하에서 1분간 1 μmole의 choline을 생성하는 활성으로 정의하였다.

PLD의 전이활성 측정

Egg yolk PC(99%) 1 μmole, 0.4 M acetate buffer(pH 5.6) 0.2 ml, 0.2 M CaCl₂ 0.2 ml, 50% glycerol 0.08 ml, H₂O 0.32 ml, diethyl ether 0.5 ml, 효소용액 0.2 ml의 혼합액을 25°C, 30분간 처리한 다음 1.6 M citric acid, 0.12 ml을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응에 의하여 생성된 구

성 인지질을 diethyl ether-ethanol(4:1) 2 ml로 추출한 후 N₂ stream하에서 농축하고 이를 TLC plate에 점적하여 2차 원적으로 전개하였다. 1차 전개액으로는 chloroform:MeOH:7 N ammonium hydroxide(130:60:8, v:v:v)를, 2차 전개액으로는 chloroform: MeOH: acetic acid: H₂O(170:25:25:6, v:v:v:v)를 사용하였다. 전개 후 인지질의 발색시약인 molybdenum blue를 분무하여 나타나는 청색의 spot을 표준품과 비교함으로써 반응생성물을 확인하였다. 반응생성물의 정량을 위하여 2D-scanning densitometer(Zeinh Softlazer™, Biomed Instruments Co. Fullerton, CA U.S.A.)로 TLC plate상의 생성물 비율을 측정하였다. 즉, phosphatidylcholine(PC), phosphatidylglycerol(PG), phosphatidic acid(PA)에 해당하는 각 spot의 3차원 image상의 volume을 구한 후 PG/(PC+PG+PA)×100(%)의 값으로 전이활성을 표시하였다.

효소의 정제

발효조 배양 상정액으로부터의 효소정제는 amicon UF막인 PM10(Millipore, Billerica, MA U.S.A.)으로 초여과하여 농축후, 양이온교환 크로마토그래피, 겔투과 크로마토그래피 및 FPLC를 사용한 양이온교환 크로마토그래피로 정제하였다.

양이온교환 크로마토그래피는 발효 상정액을 약 50 ml로 농축하고 여기에 0.05 M Na-citrate buffer(pH 5.8)를 30 ml 첨가하여 pH를 조절할 것을 0.05 M Na-citrate buffer(pH 5.8)로 평형화된 Φ3.2×30 cm의 CM-Sephadex C-50칼럼에 loading하였고 동일 buffer로 수세한 후 농도 0-0.3 M의 NaCl 농도구배로 분리하였다. 겔투과 크로마토그래피는 앞서 분리된 것 중 PLD 활성이 있는 부분을 모아 농축한 후 0.05 M ammonium formate buffer(pH 5.8)로 평형화된 Φ2.6×84 cm의 Sephadex G-100칼럼으로 분리하였다. Mono S칼럼(HR 5/5)를 사용하여 FPLC(Amersham Biosciences AB, Uppsala Sweden)로 양이온교환 chromatography를 수행하였다. 0.05 M Na-citrate buffer(pH 5.0)를 용매로 하였고 0-0.2 M NaCl 농도구배에서 분리하였다. 정제된 효소의 확인은 Laemmli의 방법에 따라 SDS-PAGE로 수행하였다 [8].

효소의 특성 시험

정제된 PLD 효소의 최적 pH는 전술한 효소의 분해활성 측정법에서 사용된 0.1 M Na-citrate buffer(pH 6.0) 대신 여러 pH의 buffer(0.1 M)로 치환하여 활성을 측정하였다. pH 3-6은 Na-citrate buffer를, pH 7-9는 Tris-Cl buffer를 사용하였다. pH 안정성은 정제된 효소를 위의 여러 pH의 buffer(0.1 M)에서 37°C, 3시간 방치한 후, 각 시료에 대하여 20배량의 0.1 M Na-citrate buffer(pH 6.0)를 첨가하여 활성을 측정하였다. 최적 온도는 전술한 효소활성 측정법에서 반응온도를 20-80°C로 설정한 후 이의 효소 활성을 측정하였다. 열

안정성은 효소를 0.05 M Na-citrate buffer에서 위의 여러 온도에서 30분간 방치한 후, 잔존하는 효소활성을 측정하였다.

금속이온의 영향은 전술한 효소활성 측정법에서 효소반응계 중의 Ba, Ca, Co, Cu, K, Mg, Mn, Na, Zn 등의 이온 농도가 10 mM되게 첨가하여 PLD 활성을 측정하였다. 이들 이온의 Cl염을 이용하였다.

결과 및 고찰

우수 균주의 선발

앞선 연구[12]에서 선발한 균주가 생산하는 PLD의 분해활성은 비교적 양호하였으나 효소의 산업화에 직결되는 전이활성은 80%로 다소 낮아, 균주의 개량이나 새로운 균주의 선발이 요구되었다. 따라서, 확립한 PLD 생산 균주의 탐색방법에 따라 토양으로부터 PLD 생산 균주를 새로이 선발하였다. 즉, 채취한 국내 6개 지역 토양으로부터 분리한 1,183 종의 방선균주를 P 배지하에서 시험관 배양후 상징액 중 PLD의 생산이 양호한 균주를 탐색하였다. 그 결과, 분해활성이 0.3 U/ml 이상인 131 균주를 일차로 선발하였고, 이 중 전이활성이 20% 이상인 균주는 23개였으며, 최종적으로 분해활성이 12 U/ml이고 전이활성이 95%로 우수한 Actinomycetes KF923을 선발하였다. Fig. 1에 전이정도를 확인하는 TLC chromatogram을 나타내었다. 계속해서 이 방선균주의 특성을 조사중이다.

방선균 KF923의 발효조 배양특성

방선균 KF923 균주는 P 배지하에서 발효조 배양시 배양 48시간 후에 13 U/ml로 최고의 PLD 분해활성을 나타내었고 PLD 분해활성은 이후 약간의 감소가 있음을 알 수 있다 (Fig. 2). 배양 중 pH 변화는 배양 중 큰 변화가 없이 초기

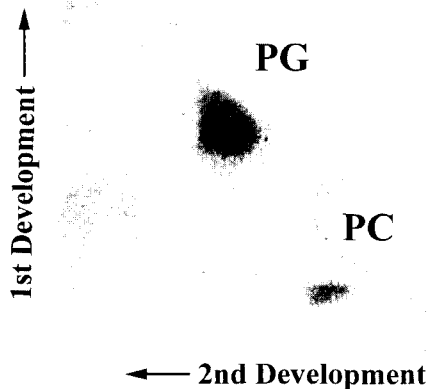


Fig. 1. TLC chromatogram in the T-activity test of PLD produced by Actinomycetes F923. TLC conditions were described in the material and methods. PG; phosphatidylglycerol. PC; phosphatidylcholine.

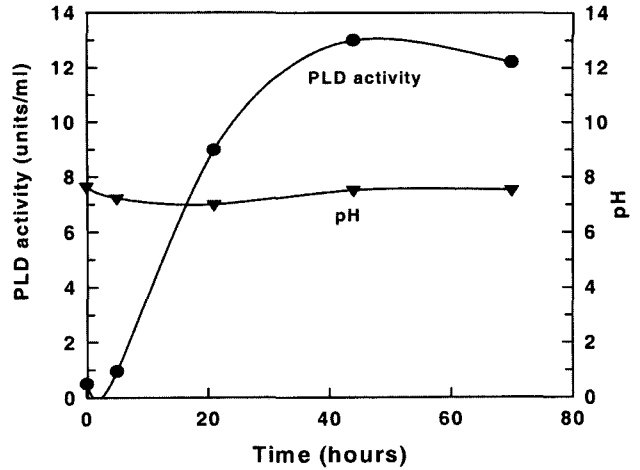


Fig. 2. Time course of PLD production by Actinomycetes KF923. The strain was cultivated under aerobic condition of 1 v/v/m and agitation of 600 rpm at 30°C in medium B.

(24시간 후에 일시적으로 약간 감소하였다가 회복되었다. 이때 생산된 PLD의 전이활성은 95%로 나타났다. 이는 Dittrich 등[5]이 대두의 PLD를 immobilization 시킨 후 전이활성(94%)을 확인하였을 때보다 약간 높게 나타났다. 또한, 선발된 방선균 KF923 균주는 앞선 연구[12]에서 선발된 #1090(분해 및 전이활성: 9 U/ml, 80%) 및 #2120(6.5 U/ml, 80%)보다 PLD의 전이활성이 훨씬 뛰어났다. 이후 효소를 분리·정제하여 특성을 조사하였다.

효소의 분리 및 정제

발효조 배양에서 방선균 KF923 균주가 생산한 PLD를 UF에 의한 농축후, CM-Sephadex C-50에 의한 양이온교환 크로마토그래피를 행하였다. 그 결과, Fig. 3에 나타난 바와 같

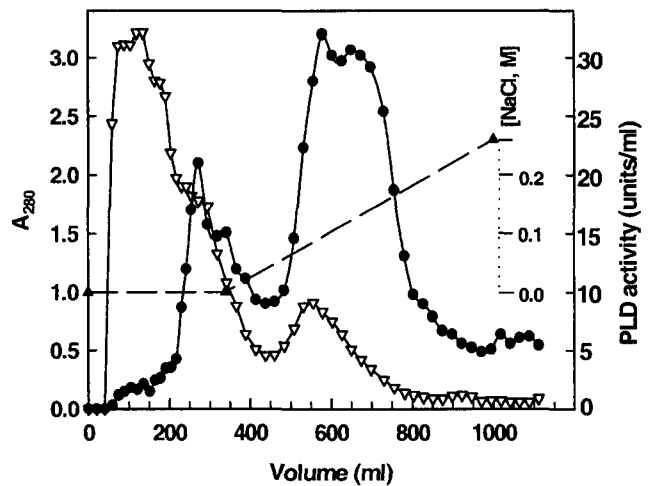


Fig. 3. Ion exchange chromatogram of PLD from culture supernatant of Actinomycetes KF923 on CM-Sephadex C-50. ▽, protein (A₂₈₀); ●, enzyme activity; ▼, NaCl gradient

이 PLD는 용출용적 250 ml 부근과 540 ml 부근에서 나뉘어 나타났다. 280 nm에서 매우 높은 흡광도를 나타낸 용출초기의 peak는 배양액 중의 갈색색소물질에 의한 영향이 매우 큰 것으로 생각된다. 첫 번째의 PLD활성 peak는 PLD가 색소물질과 분리되지 않고 용출되었는데 이는 아마도 양자간의 상호 작용 때문인 것으로 추정된다. 색소물질과의 분리가 용이하지 않아 후반부의 높은 PLD활성 회분들을 모아서 UF를 사용하여 농축하였다. 농축된 용액을 Sephadex G-100에 의한 겔투과 크로마토그래피로 분리하였다. 그 결과, Fig. 4에 나타난 바와 같이 회분 28-36번의 회분에서 PLD의 활성이 나타났다. 이들 회분에서도 색소물질이 소량 존재하였다. 겔투과 크로마토그래피로 분리한 PLD 회분을 음이온 교환칼럼인 Mono Q를 사용하고자 하였으나 PLD의 분리가 양호하지 못하여, 양이온 교환칼럼인 Mono S칼럼에 의해 정제하였다. 그 결과, Fig. 5에 나타난 바와 같이 retention time 2분 및 18분에서 PLD의 활성이 나타났다. 이 현상은 CM-Sephadex C-50에 의한 분리시와 비슷한 경향으로서 이 경우도 색소물질과 효소의 상호작용에 의하여 분리초기에 PLD가 용출된 것으로 생각된다. Retention time 18분에서 나타난 회분을 탈염하고 동결 건조하였다. 정제된 PLD 효소의 분자량은 SDS-PAGE를 통해 약 55 kD인 것으로 밝혀졌다(Fig. 6). 이는 Carrea 등[3]이 *Streptomyces* 속에서 분리 정제한 PLD 효소 (50 kD)와 비슷한 크기인 것

로 나타났다. 그러나 Shimbo 등[10] 등이 *Streptomyces antibioticus*에서 분리정제한 PLD의 분자량은 약 64 kD으로 나타나 이것보다는 약간 적은 분자량을 나타내고 있다.

이상과 같이, 방선균 KF923으로부터 생산된 PLD의 정제 과정을 Table 1에 요약하였다. 최종적으로 정제된 PLD의 비

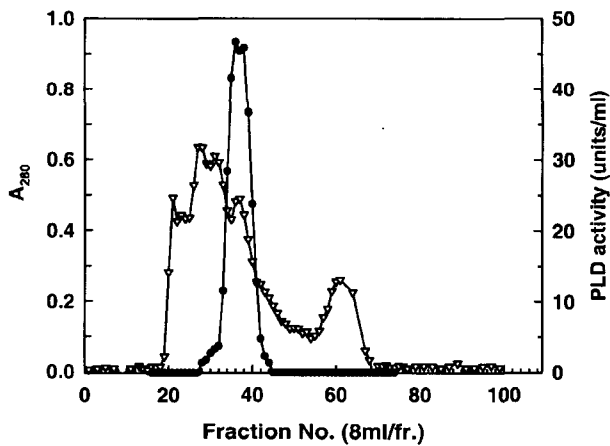


Fig. 4. Gel filtration chromatogram of PLD from culture supernatant of Actinomycetes KF923 on Sephadex G-100. ∇ , protein (A_{280}); \bullet , enzyme activity.

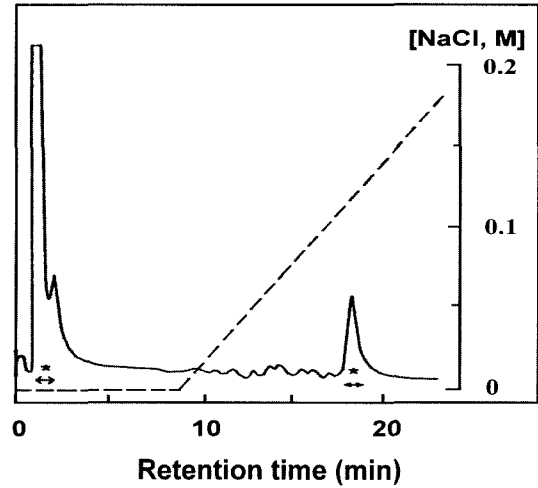


Fig. 5. Purification of PLD from Actinomycetes KF923 on Mono S. \star , peaks containing PLD activity.

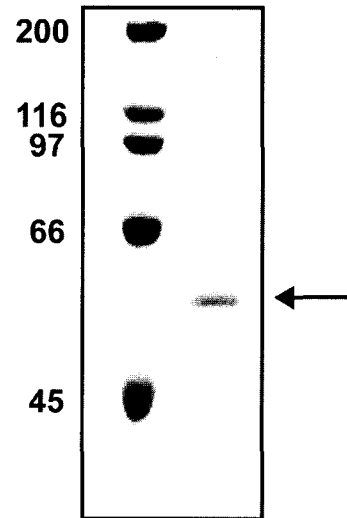


Fig. 6. SDS-PAGE of purified PLD from Actinomycetes KF923.

Table 1. Purification of Phospholipase D from Actinomycetes KF923.

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude supernatant	25,641	24,120	0.9	1	100
Ultrafiltration	1,956	12,864	6.6	7.03	53.3
CM-Sephadex C-50	180	3,113	17.3	19.2	12.9
Sephadex G-100	22.6	1,142	50.5	56.1	4.7
Mono S	0.54	306	566.7	629.7	1.3

활성은 567 U/mg이었고, 회수율은 비교적 낮은 1.3%로 나타났다. 이는 정제의 최적화를 통하여 개선될 수 있다고 생각한다.

효소의 특성

pH 및 온도가 정제된 PLD의 효소 활성과 안정성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 효소반응의 최적 pH는 6.0으로 나타났으며 pH 6.0-7.0에서 상대적으로 높은 활성을 보이고 있다(Fig. 7). 37°C, 3시간 처리시의 pH 안정성은 7-9 부근에서 안정한 것으로 나타났다(Fig. 8). 또한, 효소반응의 최적 온도는 60°C 이었고 50-60°C 사이에서 상대적으로 높은 활성을 유지했다(Fig. 7). 각 온도에서 30분간 처리 시 효소의 열안정성은 40°C 이하에서는 매우 안정하였으나 50°C 이상에서는 활성이 점차 감소하기 시작하여 60°C에서 약 60%의 열안정성을 보이다 70°C 이상에서 급속히 열안정성이 감소하였다(Fig. 8).

10 mM 수준에서 금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다. Table 2와 같이 무침가시의 활성에 비하여 금속이온의 존재시 효소활성이 약간 높게 나타났으나 특별한 금속이온의 요구성은 없는 것으로 나타났다. 이는 Shimbo 등 [10]이 *Streptomyces antibioticus*에서 분리 정제한 PLD 역시 여러 가지 금속이온에 대해 이의 영향을 본 결과 그다지 큰 차이(99-106%)를 보이지 않는 것과 비슷한 경향을 보이고 있다.

이상과 같은 효소 특성을 갖는 PLD는 높은 전이활성을 가지고 있어 산업화에 충분히 활용 가능한 것으로 생각되며,

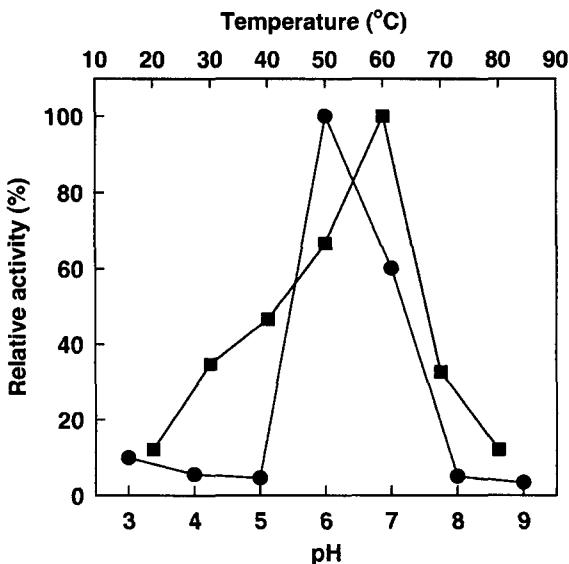


Fig. 7. Effects of pH (●) and temperature (■) on the activity of PLD from *Actinomycetes* KF923. The enzyme activities were measured at various pH in Na-citrate (pH 3-6) and Tris-Cl buffer (pH 7-9) and various temperature. The other conditions were the same as the standard enzyme assay.

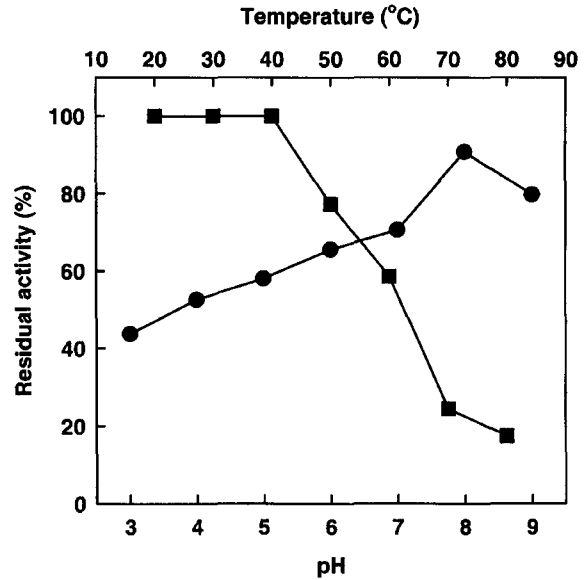


Fig. 8. Effects of pH (●) and temperature (■) on the stability of PLD from *Actinomycetes* KF923. The residual activities were measured after the enzymes in each pH buffer were incubated at 37°C for 2 hr or after the enzymes were incubated at each temperature for 30 min. The other conditions were the same as the standard enzyme assay.

Table 2. Effect of metal ions on the activity of phospholipase D from *Actinomycetes* KF923.

Ions ¹	Relative activity (%) ²
Ba	123
Ca	123
Co	119
Cu	117
K	113
Mg	123
Mn	128
Na	110
Zn	111
Control	100

¹10 mM of metal ions were added as chloride salt in the enzyme assay

²Relative activity in the presence of each metal ion was measured as the percentage of the control activity without metal ion.

산업화를 위하여 효소의 대량생산 시스템의 확립 및 효소반응을 위한 공정개발 등에 대한 연구가 향후 필요하다고 생각한다.

요 약

국내 6개 지역에 걸쳐 채취한 토양 63 점으로부터 1,000여 종의 방선균주를 분리하였다. 이들 균주의 배양 상징액 중 PLD의 생산이 양호한 균주를 탐색한 결과, 분해활성이

0.3 U/ml 이상인 131 균주를 일차로 선발하였다. 이중 전이 활성이 20% 이상인 균주는 23 개였으며, 최종적으로 분해 및 전이활성이 가장 우수한 균주(방선균 KF923)를 선발하였다. 방선균 KF923 균주는 P배지하에서 발효조 배양시 배양 48시간후에 최고의 분해활성을 나타내었고(13 U/ml) 전이활성은 95%로 나타났다. 방선균 KF923 균주가 생산한 PLD를 정제하여 비활성이 567 U/mg의 PLD를 얻었다. 정제된 PLD는 분자량이 약 55 kD으로 나타났고, 효소반응의 최적 pH는 6.0, 최적온도는 60°C였으며, 효소의 안정성에 미치는 pH 및 온도의 영향은 pH 8.0 부근 및 40°C 이하에서 가장 안정하였다. 또한, 특별한 금속이온의 요구성은 없는 것으로 나타났다. 방선균 KF923 균주가 생산한 PLD는 산업화에 충분히 활용 가능하며, 이를 위하여 효소의 대량생산 및 효소반응을 위한 공정개발 등의 연구가 필요하다고 생각한다.

REFERENCES

1. Anonym. 1989. New material of oil. *Food Processing (Jpn)* **25**: 48-49.
2. Aoi, N. 1990. Enzymatic modification of soybean lecithin. *Bio Industry (Jpn)* **7**: 484-493.
3. Carrea, G., P. D'Arrigo, F. Secundo, and S. Servi. 1997. Purification and applications of a phospholipase D from a new strain of *Streptomyces*. *Biotechnol. Lett.* **19**: 1083-1085.
4. D'Arrigo, D., L. de Ferra, V. Piergianni, A. Selva, S. Servi, and A. Strini. 1996. Preparative transformation of natural phospholipids catalyzed by phospholipase D from *Streptomyces*. *J. Chem. Perkin Trans I* **21**: 2651-2656.
5. Dittrich, N. and R. Ulbrich-Hofmann. 2001. Transphosphatidylolation by immobilized phospholipase D in aqueous media. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **34**: 189-194.
6. Fukuda, H., Y. Turugida, T. Nakjima, E. Nomura, and A. Kondo. 1996. Phospholipase D production using immobilized cells of *Streptovorticillium cinnamoneum*. *Biotechnol. Lett.* **18**: 951-956.
7. Kudo, S. and A. Kuroda. 1990. Modification and application of lecithin by transfer enzyme. *Bio Industry (Jpn)* **7**: 494-500.
8. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
9. Schaffner I., K. P. Rucknageil, J. Mansfeld, and R. Ulbrich-Hofmann. 2002. Genomic structure, cloning and expression of two phospholipase D isoenzymes from white cabbage. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **104**: 79-87.
10. Shimbo, K., Y. Iwasaki, T. Yamane, and K. Ina. 1993. Purification and properties of phospholipase D from *Streptomyces antibioticus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**: 1946-1948.
11. Shinonaga., M., Y. Kawamura, K. Shimbo, and T. Yamane. 1996. Continuous production of phospholipase D by *Streptomyces lydicus* D-121 immobilized with cross-linked chitosan beads. *J. Fermt. Bioeng.* **81**: 310-314.
12. Shon, D. H., J. Y. Shim, and S. H. Yoon. 1994. Screening of phospholipase D producing Actinomycetes. *Kor. J Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 333-339.
13. Shuto, S., H. Awano, N. Shimazaki, K. Hanaoka, and A. Matsuda. 1996. Nucleosides and nucleotides. 150. Enzymic synthesis of 5'-phosphatidyl derivatives of 1-(2-C-cyano-2-deoxy-beta-D-arabino-pentofuranosyl) cytosine (CNDAC) and their notable antitumor effects in mice. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6**: 1021-1024.
14. Takami, M. and Y. Suzuki. 1995. Transphosphatidylolation reaction of phosphatidylcholine to 4-methoxyphenol in water-immiscible organic solvents with immobilized phospholipase D. *J. Ferment. Bioeng.* **74**: 313-316.
15. Ueki, J., S. Morioka, T. Komari, and T. Kumashiro. 1995. Purification and characterization of phospholipase D (PLD) from rice (*Oryza sativa* L.) and cloning of cDNA for PLD from rice and maize (*Zea mays* L.) *Plant Cell Physiol.* **36**: 903-914.
16. Yamane, T. 1991. Reactions catalysed by lipid metabolizing enzymes. *Yukagaku* **40**: 965-973.
17. Yaqoob, M., A. Nabi, and M. Masoom-Yasinzai. 2001. Bioconversion of phosphatidylcholine to phosphatidylserine using immobilized enzyme mini-columns. *Process Biochem.* **36**: 1181-1185.

(Received Oct. 13, 2003/Accepted Nov. 29, 2003)