한국생물공학회지 제6권 제3호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 6. No. 3. 271-279(1991)

Phospholipase D에 의한 비천연 인지방질의 합성: I. 에멀젼계 내에서의 합성

*정 의 호 · **이 해 익 · 이 상 영
강원대학교 식품공학과, **생물응용공학과
*강원도 보건환경연구원

Biosynthesis of Unnatural Phospholipids by Phospholipase D: I. Synthesis in A Emulsion System

Eui-ho Chung*, Hae-ik Rhee** and Sang-young Lee
Department of Food Science & Technology and
***Applied Biology & Technology, Kangweon National University, Chuncheon 200-701*
**Institute of Health and Enviornment, Kangweon Do, Chuncheon 200-093*

ABSTRACT

Phosphatidylglycerol(PG) and two unnatural phospholipids, phosphatidylethyleneglycol(PEG) and phosphatidylpropyleneglycol(PPG), were synthesized from ovolecithin using cabbage phospholipase D(PLD) in a emulsion system. Optimum pH and temperature for the enzymatic synthesis of PG, PEG and PPG in the emulsion system was 5.0-5.6 and 37℃, respectively. The maximum activity for transphosphatidylation was obtained with 30-80 mM Ca^{++}. Addition of 25% glycerol was required to convert completely ovolecithin to PG, whereas 16% glycerol was sufficient to attain the highest rate of conversion for both PEG and PPG syntheses, the highest conversion rate was obtained with addition of either 10% ethyleneglycol or propyleneglycol. However, the concentration of alcoholic acceptor should be increased up to 20% to improve selectivity up to 100% for PEG or PPG synthesis. Identification of PEG and PPG was made by analyzing the polyvalent alcohols released after their hydrolysis by HCl or PLD.

서 론

인지방질의 가수분해에 관여하는 phospolipase는 자연계에 널리 분포되어 있으며 기질 분자내 작용점에 따라 phospholipase A1, A2, B, C, D로 구분된다. 이들중 phospholipase D(PLD, EC 3.1.4.4)는 phosphatidylcholine (PC)를 지용성인 phosphatidic acid(PA)와 수용성인 choline으로 가수분해시키는 반응을 촉매할 뿐만 아니라 phosphatidyl기를 다른 알코올성 수용체에 전이시키는 phosphatidyl기 전이반응도 촉매한다. 이와같은 효소 활성으로 인하여 PLD의 활용분야로는 첫째, 원래의 인지방질과 동일한 지방산 조성을 갖고 있으면서 극성부분을 달리하는 인지방질의 전이합성(1), 둘째, 생체막 인지방질의 극성부분 모식(2, 3), 세째, 막인지방질의 극성 부분에 대한 친화성 차이를 이용하여 생체막의 비대칭성이나 인지방질의 위치결정(4) 등에 이용된다.

한편, 인지방질은 식품이나 의약품 분야 등에서 오래전부터 유화제로 이용되어 왔으나 근래에 와서는 리포좀

을 만들어 의약품, 항생물질, 항원 혹은 호르몬 등의 담체로 이용하므로서 이들의 생리 활성을 안정하게 유지시키는데도 이용되고 있다(5-10). 인지방질은 동식물계에 널리 분포되어 있으나 양적으로 풍부하지 못할 뿐만 아니라 그 종류도 PC나 phosphatidylethanolamine(PE)에 편중되어 있고, 더우기 PC나 PE는 칼슘 이온의 농도가 높은 경우 유화력이 현저히 감소되는 결점도 있다. 그러므로 다양한 용도에 맞추어 적절하게 인지방질을 활용하기 위해서는 인지방질의 극성부분을 모식하여 자연계내 분포가 적은 phosphatidylglycerol(PG), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol(PI) 등을 비롯하여 기타 새로운 인지방질을 얻는 것은 매우 필요하다.

따라서 본 연구에서는 천연 인지방질 및 PC을 기질로 하고 양배추에서 분리한 PLD를 촉매로하여 phosphatidylglycerol (PG)과 자연계에 분포하지 않는 비천연 인지방질인 phosphatidylethyleneglycol(PEG), phosphatidylpropyleneglycol(PPG)의 합성을 시도하였다.

재료 및 방법

시약

TLC 표준품으로 사용한 PC, PE, PG, PA와 ovolecithin (PC 함량 60%)은 Sigma사 제품을 구입하였으며, 기질로 사용한 정제 PC는 T. Yamane교수(일본 나고야대)로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 정제 PC는 TLC 상에서 PC의 단일 spot만 확인 되었다. PLD는 신선한 양배추 (*Brassica olerocea* L.)를 시중에서 구입하여 녹색의 외피를 제거하고 내부의 미황색 부분 일정량을 취하여 Lee 등(1)의 방법에 따라 PLD 활성을 갖는 조효소를 조제하여 실험에 사용하였다.

Phospholilase D의 활성 측정

반응기: 인지방질의 가수분해 및 전이반응은 반응용기 8개를 동시에 설치하여 동일 조건으로 가동할 수 있는 소형의 다중 교반장치를 이용하였다(11).

효소 용액의 조제: 양배추에서 얻은 조효소에 50mM 초산 완충액 (pH 5.6)을 가하여 3% (W/V)로 현탁시킨 다음 Potter-Elvehjen homogenizer로 균질화 시키고 4℃에서 10,000 g로 20분간 원심분리하여 그 상등액을 효소 용액으로 하였다. 효소 용액의 단백질 농도는 5±0.3mg/ml이었다.

가수분해 활성: PLD의 가수분해 활성 측정은 Imamura 등(12)의 choline oxidase법에 준하였다. 즉, 반응액은 0.2M초산 완충용액(pH 5.6) 0.6ml, 0.2MCaCl$_2$ 0.1ml, 25 mM PC 현탁액 0.2ml를 혼합하여 30℃의 항온수조에서 온도평형을 유지시킨후 효소용액 0.1ml를 가하고 30℃에서 10분간 반응 시킨 다음 유리된 choline의 양을 정량하였다. PLD 1 unit는 1분당 PC로 부터 1μmole의 choline을 유리 시키는데 필요한 효소의 량으로 정의하였다.

Phosphatidyl기 전이활성: 반응액의 칼슘이온 농도를 40mM로 하고 glycerol을 20%(W/V) 농도로 첨가하는 것을 제외하고는 PC 가수분해 효소활성 측정시와 동일하게 반응 시키고 반응액중 생성된 PG량을 TLC-FID 법(13)으로 측정하여 분당 생성된 PG량을 환산하였다.

단백질의 정량

조효소중 단백질은 semimicro Kjeldhal 법으로 정량하였으며 효소용액중 단백질 농도는 Lowry 등(14)의 방법으로 측정하였다.

선택성의 계산

반응 생성물의 선택성은 식 ([PG]/[PG]+[PA])×100 %로 부터 계산하였다. PEG나 PPG 합성시에는 [PG] 대신 [PEG]나 [PPG]를 대입하여 각각의 선택성을 계산하였으며 이때 [PG], [PEG], [PPG] 혹은 [PA]는 TLC-FID chromatogram 의 peak면적으로 표시하였다.

인지방질의 확인

합성된 인지방질을 TLC상에서 분리추출하여 염산, 혹은 양배추 PLD로 가수분해하여 생성된 다가 알코올을 TLC로 확인하여 PEG나 PPG를 동정하였다. 흡착제는 Silica gel G, 전개액은 chloroform-acetone-5N 암모니아수 (1:8:1), 발색제로는 chromic acid-sulfuric acid혼합 용액을 사용하였다(15).

결 과

PLD의 반응 조건

pH: 초산 완충액(pH 5.6-6.5), Tris-HCl 완충액 (pH 6.5-8.0) 그리고 글리신-수산화나트륨 완충액 (pH 8.0-9.0)으로 반응액의 pH를 조정한 다음 PLD에 의한 PC의 가수분해및 phosphatidyl기 전이활성을 측정한 결과, pH에 따른 PLD활성의 변화는 PC의 가수분해 반응과 glycerol을 수용체로하는 phosphatidyl기 전이 반응에서 유사한 경향을 보였으며, pH 5.0-5.6 부근의 초산 완충용액에서 활성이 가장 높았다. 한편, 같은 pH 조건하에서도 인산 완충액에 비하여 초산 완충액내에서 높은 활성을 나타내었다. 이와같은 pH와 PLD활성과의 관계는 ethyleneglycol이나 propyleneglycol을 수용체로 하는 phosphatidyl 기 전이반응에서도 같은 경향을 보였다(Fig.1).

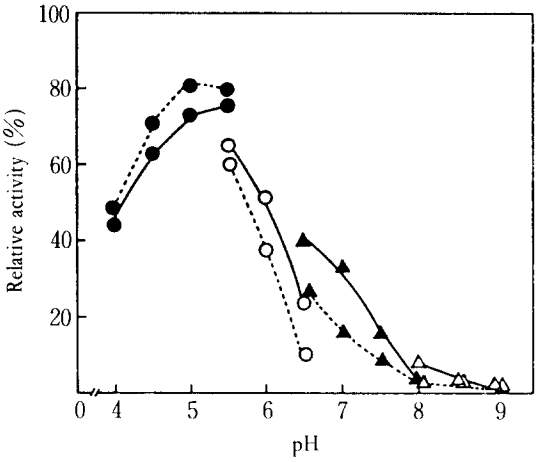

Fig. 1. Effect of pH on the activity of phopholipase D from cabbage. The values of pH are those of bulk reaction mixture. ●, 50mM-acetate buffer; ○, 50mM-Phosphate buffer; ▲, 50mM-Tris HCl buffer; △, 50mM-glycine-NaOH buffer. real line, phosphatidohydrolase activity; broken line, transphosphatidylase activity.

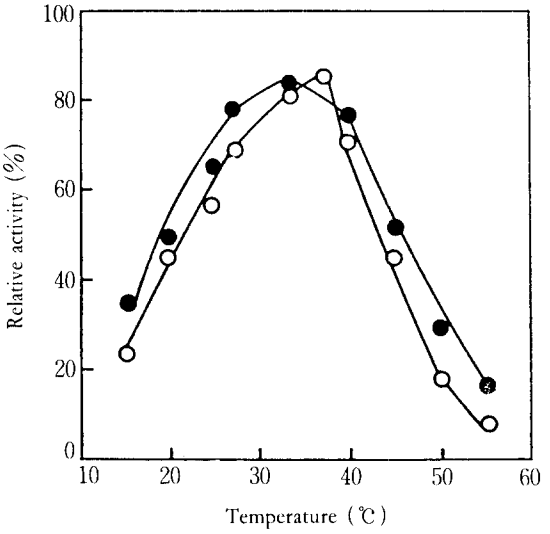

Fig. 2. Effect of temperature on the activity of phospholipase D from cabbage. ●, phosphatidohydrolase activity; ○, transphosphatidylase activity.

온도: PLD의 반응에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 pH 5.6에서 온도만을 달리하는 조건에서 PC 가수분해 반응이나 glycerol을 수용체로하는 전이반응을 각각 20분간 시키고 이때 생성된 choline이나 PG의 양을 측정하여 온도에 따른 상대적 활성을 대비하였다(Fig. 1). PC의 가수분해 반응시에는 30℃에서 평균반응속도가 가장 빨랐으며, glycerol을 수용체로하는 전이반응에서는 37℃에서 평균반응속도가 가장 빨랐다. 한편 45℃ 이상의 온도에서는 평균반응속도가 현저히 감소되었다. 온도와 반응속도의 관계를 Arrhenius 방정식 [lnv = lnA − Ea / (RT)]에 적용하여 활성화 에너지를 계산한 결과 가수분해 반응에서는 7,240 cal / mole, phosphatidyl기 전이반응에서는 10,300cal / mole 이었다.

칼슘 이온 농도: PLD의 효소활성에 미치는 칼슘이온의 영향을 알아보기 위하여 PC 20mM, glycerol 20%를 함유한 초산 완충액 (pH 5.6)에 일정량의 효소를 첨가하고 칼슘이온 농도만 변화시키면서 일정시간 전이반응을 시켜 생성된 PG량을 정량하고 단위시간당 생성량으로 환산하였다. Fig. 3에서 나타낸 바와 같이 칼슘이온을 첨가하지 않으면 PG는 거의 생성되지 않았으며 20mM 이내의 칼슘이온 농도범위에서는 PG 생성속도와 칼슘이온농도는 직선관계를 나타내고 있다. 또한, 최대 활성을 나타내는 칼슘이온 농도 범위는 30−80mM 이었으며, 100mM 이상의 농도에서는 PG 생성 속도가 감소되는 경향이 나타났다. 한편, 본 실험에 사용한 반응용기는 모두 묽은 염산으로 세척하였으며, 조효소는 습식 분해하여 원자흡광 광도법으로 칼슘이온을 정량하였다. 그 결과 조효소 자체의 칼슘이온 함량은 1ppm 이하였다.

에멀젼계에서 인지방질의 전이합성

기질농도의 영향: 기질농도의 효과를 알아보기 위하여 0.5−4% 농도의 PC와 25%의 glycerol(혹은 10% ethyleneglycol, 10% propyleneglycol), 40mM의 칼슘이온을 함유하는 초산 완충액 (pH 5.6)에 diethyl ether 10%를 혼합시킨 다음 효소용액을 가하여 반응기내에서 10분간 반응시키고 생성된 PG량을 측정하여 초기반응 속도를 계산하였다(Fig. 2). 이때 기질로는 정제된 PC를 사용하였으며 PC를 초산 완충액(pH 5.6)에 7.5%(W / V) 농도로 현탁 시킨 다음 4℃에서 10분간 초음파를 조사하여 인지방질 리포좀을 만들어 반응액에 첨가하였다.

Fig. 4에서와 같이 PG를 합성하는 반응에서는 PC농도가 2%일때 PG합성 농도는 50 mg / min / mg protein으로 가장 높았으며, PEG나 PPG를 합성하는 반응에서는 1.5%의 PC농도에서 반응속도가 각각 44, 39 mg / min /

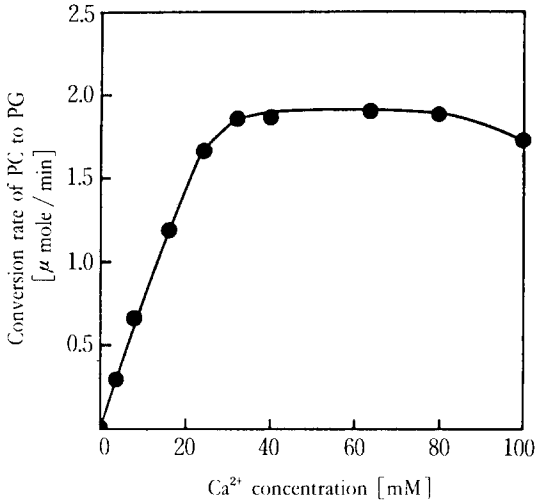

Fig. 3. Effect of Ca ion concentration on the transphosphatidylation of phosphatidylcholine to phosphatidylglycerol by cabbage phospholipase D. The reaction mixture containing 20mM phosphatidylcholine, 20% glycerol, 50 mM acetate buffer(pH 5.6) and various concentrations of Ca ion as indicated were incubated at 37℃ for 10 min.

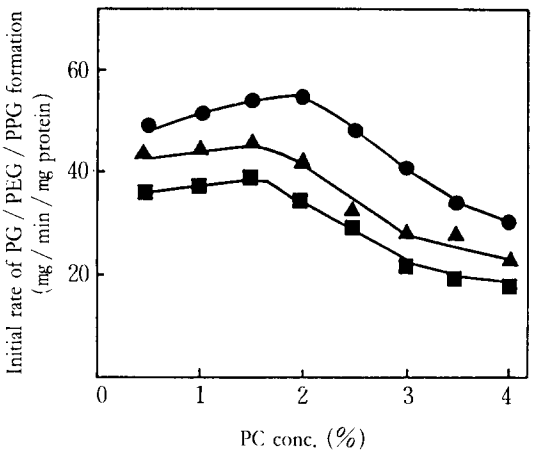

Fig. 4. Effect of phosphatidylcholine concentrations on the transphosphatidylation in emulsion system. The reaction mixture contains 40 mM Ca ion and 25% glycerol (20% ethyleneglycol or 20% propyleneglycol) in 50 mM acetate buffer(pH 5.6). ●, PG; ▲, PEG; ■, PPG.

mg protein으로 가장 빨랐다. 한편, 칼슘이온을 고농도(80mM)로 첨가한 경우에는 3% 부근의 PC농도에서 전이반응 속도가 높았으나, 저농도의 칼슘이온(4mM)을 첨가한 경우는 전반적으로 반응속도가 낮았으며, 최대 반응속도를 나타내는 기질의 농도도 1.5% 수준으로 낮아졌다. 이와같은 실험결과는 칼슘이온이 효소활성화에 필요할 뿐만 아니라 기질과 작용하여 효소와의 친화력을 증가시키는데도 기여한다는점을 시사하고 있다. 여기서 합성된 PEG나 PPG의 정량은 반응액중 감소된 PC량에서 생성된 PA량을 뺀 값으로 환산하였다.

수용체 농도의 영향: PC와 칼슘이온농도, pH의 조건 및 효소첨가량을 일정하게 하고 수용체(glycerol, ethleneglycol, propyleneglycol)의 농도만 변화 시키면서 일정시간 반응시킨 다음 전이 합성된 인지질량을 정량하여 수용체의 농도가 전이합성에 미치는 효과를 살펴보았다. Fig. 5는 glycerol 농도를 달리하는 조건에서 PG 합성반응을 수행하면서 반응액중 인지질을 분석한 실험결과로서 glycerol 농도가 증가하면 PLD의 활성은 현저히 감소하였다. 즉, 일정시간동안에 가수분해 되었거나 PG 등으로 전이되어 감소된 PC량을 계산하여 상대적반응속도를 표시하면 glycerol의 농도를 4%, 24%, 50%로 증가시킴에 따라 반응속도는 각각 95%에서 62%, 22%로 감소하였다. 반응생성물중 PG의 선택성은 glycerol 농도가 4% 일때 62%이던 것이 glycerol 농도를 24% 이상으로 증가 시키면 PA는 생성되지 않았으며 따라서 PG의 선택성은 100%에 달하였다. 한편, 일정시간동안에 합성된 PG의 분율은 글리세롤을 16%로 첨가하였을때 74% 수준으로 가장 높았다. 즉, 저농도의 glycerol (4-8%)을 첨가하면 ovolecithin은 거의 소모 되었으나, 생성된 PG량은 적고 가수분해 산물인 PA가 주로 생성되었다.

Fig. 6은 ethyleneglycol이나 propyleneglycol을 수용체로 하여 PC를 PEG 혹은, PPG로 전이합성시키는 반응에 있어서 반응활성이나 생성물의 선택성에 미치는 수용체의 농도효과를 나타낸 실험 결과이다. 전반적으로 PG 합성반응에 미치는 glycerol 농도의 효과와 유사한 경향을 보이고 있으며 특히 PEG 합성반응과 PPG합성반응에 미치는 수용체의 농도효과는 거의 동일하였다. 즉, 수용체의 농도를 4%에서 20%로 증가시키면 반응속도는 85-88%에서 33-35% 수준으로 저하되었고, PEG나 PPG의 합성량은 수용체 농도가 10%일때 최고수준에

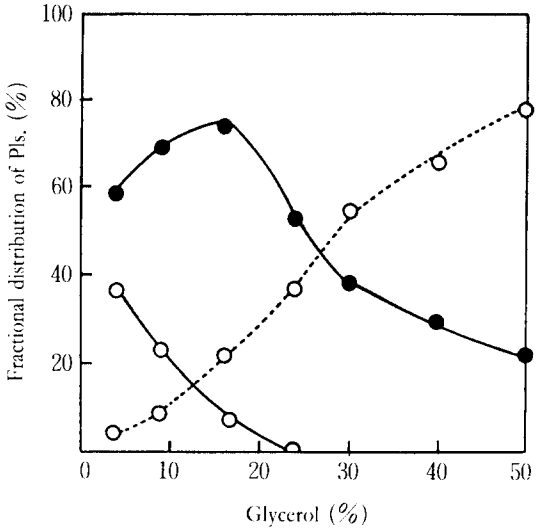

Fig. 5. Effect of glycerol concentration on enz ymatic conversion of phosphatidylcholine to phosphatidylglycerol in emulsion system.The reaction mixture containing 30 mM PC, 40 mM Ca ion, 12% diethylether and various concentration of glycerol was incubated at 37℃ for 15 min. Broken line ○, residual PC and solid line ●, synthesiz ed PG; ○, synthesized PA.

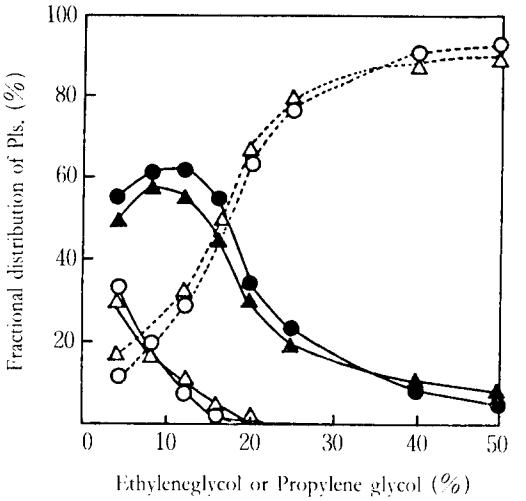

Fig. 6. Effect of base concentration on enzymatic conversion of phosphatidylcholine to phosphatidylethyleneglycol or phosphatidylpropyleneglycol in emulsion system. The reaction mixture and condition was same as Fig. 3 except base added. Circle, PEG synthesis; triangle, PPG synthesis; filled real line, synthesized PEG or PPG; open real line, synthesized PA and open broken line, residual PC.

달하였으며 이때 생성물중 PEG나 PPG의 선택성은 75-85% 수준이었다. 한편, 수용체 농도를 20% 이상으로 증가 시키면 PEG나 PPG의 선택성은 100%에 달하고 가수분해 산물인 PA는 생성되지 않았다.

PG의 합성: 이상에서 검토한 인지방질 전이합성 조건들을 고려하여 Table 1의 조건에서 인지방질 전이 합성 반응을 수행하였다. 즉 순수한 PC와 60% ovolecithin을 기질로 하고 20-25%의 수용체농도(25% glycerol, 20% ethyleneglycol 또는 propyleneglycol), 용매로는 12% (v/v) diethylether, Ca^{++} 50mM, 교반속도 700 rpm에서

Table 1. Operation conditions of multistirring bioreactor for transphosphatidylation on emulsion system

	PG	PEG	PPG
Acceptor	glycerol	ethyleneglycol	propyleneglycol
(%)	(25)	(20)	(20)
Phospholipid	ovolecithin or purified PC		
buffer	50 mM acetate buffer(pH 5.6)		
Ca^{++}	50 mM		
Solvent	12%(v/v) diethylether in water		
Temperature	37℃		
Agitation velocity	700 rpm		

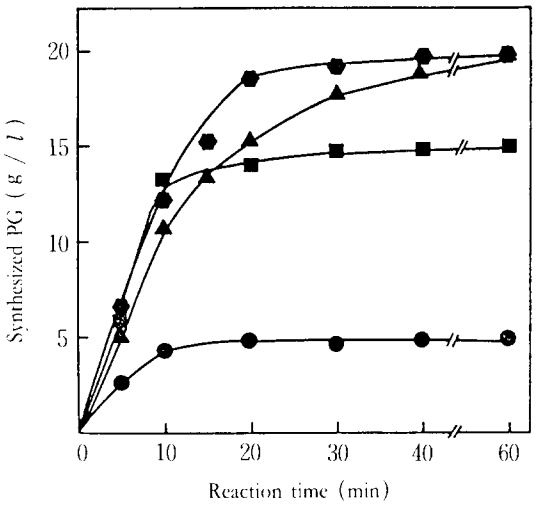

Fig. 7. The amount of phosphatidylglycerol synthesized at various phosphatidylcholine concentration in emulsion system. ●, 0.5%(w / v): ■, 1.5%(w / v): ⬢, 2.0% (w / v) and ▲, 4.0% (w / v).

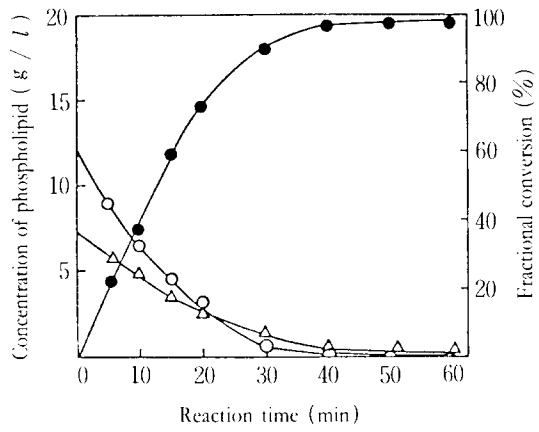

Fig. 8. Enzymatic synthesis of phosphatidylglycerol from ovolecithin in emulsion system. The composition of ovolecithin is 60% PC and 36% PE. The reaction mixture contains 2% ovolecithin, 25% glycerol, 50 mM Ca^{++}ion and 12% diethylether in 50 mM acetate buffer(pH 5.6). ●, Synthesized PG: ○, residual PC and △, residual PE.

양배추 PLD를 촉매로하여 분획형 생물 반응기내에서 PG를 전이합성 시켰다. 우선 순수한 PC를 기질로하여 PC농도를 변화 시키면서 반응기를 운전한 결과 반응시간에 따른 합성된 PG량은 Fig. 7과 같았다. 즉 2%와 4%의 PC농도에서 60분간 반응 시키면 반응액 1리터당 약 20 g의 PG합성이 가능하였으며, 0.5–1.5%의 기질농도에

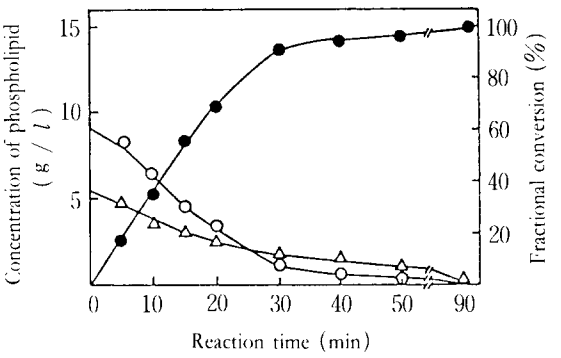

Fig. 9. Enzymatic synthesis of phosphatidylethyleneglycol from ovolecithin in emulsion system. The reaction conditions was same as Fig. 6 except adding 20% ethyleneglycol as base. ●, Synthesized PEG: ○, residual PC and △, residual PE.

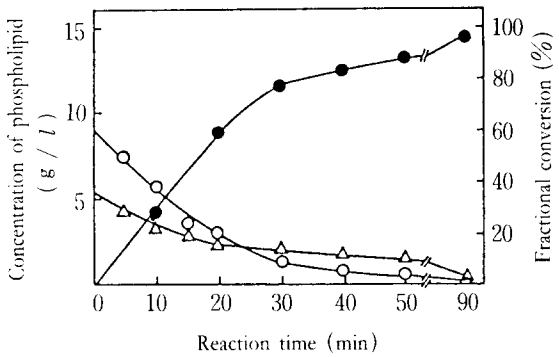

Fig. 10. Enzymatic synthesis of phosphatidylethyleneglycol from ovolecithin in emulsion system. The reaction condition was same as Fig. 6 except adding 20% propyleneglycol as base. ●, Synthesized PPG: ○, residual PC and △, residual PE.

서는 PG합성량은 5.0−15 g / l 수준에 불과했다. 따라서 전이합성율과 PG의 합성량을 고려할 때 2% 정도의 기질농도가 적당하였다. 순수하게 정제된 PC는 가격이 비싸므로 부분적으로 정제된 인지방질을 기질로하여 PG를 전이합성 시키는 것이 보다 실용적 의미가 있다하겠다. 따라서 50mM 초산완충액 (pH 5.6)에 2%의 ovolecithin, 25% glycerol, 50mM 칼슘 그리고 12%(V / V) diethyl ether를 혼합한 에멀젼계 반응액에 효소용액(단백질 0.25mg)을 첨가하여 37℃에서 700 rpm으로 교반하면서 반응기를 운전한 결과 반응시간에 따른 PG합성율은 Fig. 8과 같았다. 그림에서 보는 바와 같이 상기 조건하에서 60분간 반응 시키면 기질로 첨가한 인지질의 98%가 포스파티딜기 전이반응을 일으켜 반응액 1리터당 19.5 g의 PG가 합성되었으며 PA는 생성되지 않았다. 이때 PC는 비교적 빠른 속도로 PG로 전이되었으나 PE는 PC에 비하여 전이되는 속도가 늦었다.

PEG와 PPG의 합성: 리포좀 상태의 ovolecithin을 기질로 첨가하여 PEG나 PPG 전이합성 반응을 분획형 반응기내에서 수행하면서 시간에 따른 변화를 측정한 결과 Fig. 9, Fig. 10과 같았다. 즉, ovolecithin의 농도는 1.5%로 하고 수용체인 ethyleneglycol이나 propyleneglycol의 농도를 20%로 하였을 때 ovolecithin중의 PC와 PE와 같은 인지방질은 용이하게 PEG나 PPG로 전이합성 되었다. 9 g / l 이던 PC는 30분동안 반응시키면 1 g / l 수준으로 감소되어 90%가 PEG또는 PPG로 전이되었으나 PE의 경우는 30분 동안 반응시켜도 5.4 g / l 중 3.6 g / l 만 PEG 혹은 PPG로 전이되어 약 67% 전이율을 나타내었다. 한편, 60분동안 반응기를 운전하면 PEG는 14.2 g / l (전이율 95%), PPG는 12.3 g / l (전이율 82%)가 합성되었다.

합성한 PG, PEG 그리고 PPG의 확인: 합성된 PG는 TLC법으로 표준품과 Rf치를 대비하여 확인이 가능하였으나 PEG나 PPG는 표준품이 없어 TLC로 직접 확인할 수 없었다. 따라서 TLC로 분리한 PG, PEG 및 PPG의 spot를 TLC판으로부터 긁어내어 diethyl ether로 추출한 다음 일부는 염산으로 가수분해 시키고 또 다른 일부는 조제한 양배추 PLD를 이용하여 효소적으로 가수분해 시킨다음 생성물중 수용성 분획만을 분리하여 TLC법으로 다가 알코올류를 확인한 결과 PG는 염산으로 가수분해 시키던가 혹은, PLD로 가수분해 시켜 얻은 수용성 생성물중 확인 된 다가 알코올은 글리세롤 뿐이었으며 PEG의 경우는 염산으로 가수분해 시키면 glycerol과 ethyleneglycol 2종류의 다가 알코올류가 확인된 반면에 PLD로 가수분해 시키면 ethyleneglycol만 확인 되었다. 또한, PPG의 경우 염산 가수분해 생성물중에서는 glycerol 과 propyleneglycol을 확인할 수 있었으며, PLD에 의한 가수분해 생성물 중에서는 propyleneglycol만 확인되었다. 이상의 결과로부터 합성된 새로운 인지질이 PEG와 PPG라는 사실을 확인할 수 있었다.

고 찰

본 실험에서 사용한 부분정제한 양배추 PLD의 PC 가수분해반응 활성은 1.02 unit / mg이었으며 20% 글리세롤을 수용체로 한 전이반응 활성은 1.08 unit / mg 이었다.

PLD의 활성화에 칼슘이온이 필요하다는 것은 일반적인 사실이다. 본 연구 결과 20mM 농도의 리포좀형 PC를 기질로 하고 glycerol을 수용체로 하는 전이 반응시 최적 칼슘이온 농도 범위는 30−80mM 이었으며, 20mM 이내의 칼슘이온 농도 범위에서는 칼슘 이온 농도와 PLD활성은 직선관계를 유지하고 있다. 또한 기질인 PC의 농도가 높을 수록 고농도의 칼슘이온을 요구하는 경향을 보이고 있다. Heller(16)는 PLD의 최적 칼슘이온 농도는 효소농도에 독립적이며 오히려 PC 농도에 비례한다고 주장 하였으며 ovolecithin 1몰당 칼슘이온 15몰의 농도비를 유지할 때 최대의 PLD 활성을 나타냈다고 주장하고 있다. 이와같은 주장은 반응액중 모든 인지질이 칼슘이온과 자유롭게 접촉할 수 있는 조건 즉, 인지질이 단량체나 미셀상태로 존재할 때는 적용될 수 있겠으나 다중층 리포좀(multi lamellar liposome) 형태의 인지방질에 대해서는 최대 PLD 활성을 유지하는데 필요한 인지방질 1몰당 요구되는 칼슘이온 몰수의 비는 Heller(16)의 보고와 차이가 예상된다. 즉, 다중층 리포좀의 내부층을 이루고 있는 인지방질은 초기에는 기질로 작용하는데 제한성이 예상된다. 따라서 이런 경우 인지방질에 대한 칼슘이온의 몰비는 Heller가 주장한 15보다 훨씬 적은 값일 수도 있다. 실제로 본 실험결과에서는 최대의 활성을 나타내는 반응액중 인지방질 몰수대 칼슘이온의 몰수의 비는 약 1.5−5 범위에 불과하였다.

PLD의 효소작용은 인지방질과 물층의 내부계면에서 일어난다. 따라서 인지방질은 입자상으로 존재할 필요가 있다(16−18). 인지방질이 입자상으로 존재하려면 최소한 그 농도가 CMC이상이어야 하며 농도가 높아질수록 미셀형, 단층 리포좀 혹은 다중층 리포좀의 형태를 갖게 된다(19−21). 물론 이때 인지방질을 수층에서 기계적으로 교반하든가 초음파 조사를 하는 등의 조작이 필요하다(22, 23). PLD에 의한 PC의 가수분해 반응에 있어서 반응액에 계면활성제를 첨가하여 혼합 미셀(mixed micelle) 을 형성하여 효소활성을 제고 시키고자 하는

시도가 많이 이루어지고 있다(18, 24). 그러나 본 실험과 같이 인지방질을 전이합성 시켜 새로운 인지방질을 얻고자 하고자 하는 경우에는 계면활성제와 같은 미셀형성 촉진제를 첨가하는 것은 바람직하지 못하다. 왜냐하면 반응 종료후 새로이 합성된 인지방질을 회수하는 단계에서 이들 계면활성제는 분리 제거되어야 하기 때문이다. 더욱이 인지방질 전이합성을 목적으로 하는 경우에는 적정한 반응 속도를 유지하는 한도 내에서는 가능한 고농도의 기질을 첨가하는 것이 유리하며 인지방질양이 증가될 수록 혼합 미셀형성에 필요한 계면활성제의 첨가량도 적지 않게 된다. 이와같은 점을 고려할 때 에멀젼계에서 인지방질을 전이합성 시킬 때에는 인지방질을 초음파로 처리하여 미셀이나 리포좀형태로 만들어 기질로 이용하는 것이 바람직하다 하겠다. 실제로 많은 연구자들은 PLD를 촉매로하여 PC를 가수분해 시키거나 포스파티딜기를 전이 시키는 효소반응에 있어서 초음파로 처리한 인지방질을 기질로 사용하면 반응속도가 매우 빨라진다고 보고하고 있다(25-28). 본 실험에서도 인지방질을 초음파로 처리한 다음 0.5-4% 범위로 반응액에 첨가하고 전이반응을 수행하면서 반응속도를 측정한 결과 PG 합성반응에서는 2%의 기질 농도가 가장 적당하였으며, PEG나 PPG합성시에는 1.5%의 기질 농도에서 인지방질 전이합성 속도가 가장 빨랐다. 한편, 칼슘이온 농도를 80mM로 증가시키면 인지방질 농도가 3% 일때 오히려 반응속도가 빨랐다.

Phosphatidyl기 전이반응을 나타내는 일반식을 고려할 때 전이반응속도(Vt)와 PC 가수분해 반응속도(Vh)의 비 Vt/Vh는 수용체 농도의 함수일 것으로 예측된다. Yang등(25)의 실험결과를 검토해 보면 K값(Vt/Vh이 1이 되는 때 수용체의 % 농도) 부근에서는 수용체(glycerol, ethanol, ethanolamine)의 농도와 Vt/Vh값 사이에는 직선관계가 성립되므로 수용체의 농도가 K값의 2배가 되면 Vt/Vh도 거의 2배로 증가한다. 본 실험에서는 PC농도를 2%로 하고 글리세롤 농도를 4%, 8%, 16%로 증가 시키면서 반응을 실시한 결과 PA생성 속도에 대한 PG합성속도의 비[V PG/V PA]는 1.6, 2.9, 9로 증가하였다. 즉, 수용체 농도와 Vt/Vh가 직선관계를 나타내지 않았다. 그러나 이들 값을 그래프에 plot 하여 V PG/V PA 값이 1이 되는 glycerol의 농도(K)를 구하면 약 1%정도의 값이 얻어졌다. Yang등(25)의 결과와 본 실험결과로 보아 K값 부근의 glycerol 농도범위에서는 Vt/Vh가 수용체 농도와 1차함수관계를 나타내지만 K값보다 훨씬 큰 농도 범위에서는 glycerol 농도와 Vt/Vh 사이에 1차함수관계가 성립되지 않는다. 한편 수용체의 농도가 증가할 수록 반응속도는 감소하는데 그 이유로는 반응액의 유동성의 저하와 더불어 수용체에 의한 효소 활성의 저해에 기인하는 것으로 판단된다. 한편, PG 합성 속도만 고려한다면 16% 수준의 glycerol을 첨가하는 것이 가장 적당하지만 PG의 선택성을 100%로 높이기 위해서는 25%의 glycerol을 첨가해야 한다. 또한 PEG나 PPG 합성시에는 수용체 농도가 10%이하 일때 전이 합성 반응이 가장 빨랐으나 PEG나 PPG의 선택성은 80-85%이었다. 따라서 수용체 농도를 20%로 높여야 PEG나 PPG의 선택성을 100%로 유지할 수 있었다.

본 연구에서는 고순도의 비 천연 인지질을 PLD를 이용하여 대량생산할 가능성을 제시하였다. 이러한 방법으로 생산된 새로운 인지질의 폭 넓은 이용성에 대하여는 앞으로 여러 각도에서 검토하여야 할 것이다.

요 약

Phospholipase D(PLD)에 의한 phosphatidyl기 전이반응을 이용하여 ovolecithin으로 부터 phosphatidylglycerol(PG), 그리고 새로운 인지방질인 phosphatidylethyleneglycol(PEG)과 phosphatidylpropyleneglycol(PPG)을 합성하였다. 합성 반응의 최적 pH는 5.0-5.6, 최적 반응 온도는 37℃이었으며 칼슘 농도는 30-80 mM 범위 일때 전이 합성 속도가 가장 빨랐다. 알코올성 수용체의 농도는 PG합성시에는 25w/v%, PEG나 PPG 합성반응에서는 20 w/v% 일때 반응의 속도도 비교적 높고 특히 가수분해 산물인 PA가 생성되지 않았다. 이상의 조건을 고려하여 에멀젼계에서 30분간 반응시킨 결과 PG는 18 g/l를 합성할 수 있었고, PEG와 PPG는 각각 13.6 g/l, 11.5 g/l를 합성할 수 있었다. 새로운 인지방질인 PEG와 PPG는 산 혹은 PLD로 가수 분해한 다음 유리된다가 알코올을 확인하여 동정하였다.

사 사

본 연구는 한국과학재단의 일반기초연구비(KOSEF 891-1511-061-1)에 의하여 연구되었으며 이에 감사합니다.

참 고 문 헌

1. S. Y. Lee, N. Hibi, T. Yamane and S. Shimizu(1985), *J. Ferment. Tech.*, 63, 37
2. M. Caffrey and R. L. Roger(1986), *Plant Cell Physiol.*, 27, 1091

3. C. A. Mannella(1986), *Biochem. Biophys. Acta.*, 861, 67
4. T. A. Palladina and G. F. Nasyrova(1986), *Khim. Biol. Nauki.*, 7, 68
5. G. Poste(1980), Liposomes in Biological System (G. Gregoriadis ed), 101, Wiley, New York
6. C. R. Alving (1982), Targeting of Drugs (G. Gregoiadis and T. Tromet eds) 337, Plenum, New York
7. F. Ishii, M. Kitakaze and S. Noro(1986), JPN. Kokai Tokkyo Koho JP. 61, 721
8. R. Muntwyler and H. Hauser(1985), *Eur. Pat. Appl. EP* 152, 379
9. P. Aducci and A. Ballio (1986), *Plant Sci.*, 45, 83
10. A. M. Sauterear and T. F. Tocanne(1986), Drug Dispos., 7, 351
11. 박동훈, 정의호, 이해익, 이상영(1990), 한국생물공학회지, 5, 119
12. S. Imamura and H. Yoshifumi (1978), *J. Biochem.* 83, 677
13. T. K. Kaitaranta and N. Nicolaide(1981), *J. Chromatography*. 205, 339
14. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall(1951), *J. Biol. Chem.* 193, 264
15. E. Stahl(1969), Thin layer chromatography, 650, Springer-Verlag, New York
16. M. E. Heller and R. Arad(1970), *Biochem. Biophys. Acta.* 210, 276
17. M. Nakagaki and I. Yamamoto(1981), *Yakugaku Zasshi.* 101, 1099
18. M. Nakagaki and I. Yamamoto(1984), *Colloids and Surface*. 10, 181
19. R. M. C. Dawson(1967), *Biochem. J.* 102, 205
20. H. Brockerhoff and R. G. Jensen(1974), Lipolytic Enzymes, 201, Academic Press, New York
21. Y. Barenholz and B. Ceastaro(1980), *Adv. Exp. Med. Biol.*, 125, 105
22. C. Huang(1969), *Biochemistry.*, 8, 344
23. A. D. Bangham, M. M. Standish and J. D. Watkins(1965), *J. Mol. Biol.*, 13, 238
24. S. Imamura and H. Yoshifumi(1979), *J. Biochem.*, 85, 79
25. S. F. Yang, S. Freer and A. A. Benson(1967), *J. Biol. Chem.*, 242, 477
26. R. M. C. Dawson and N. Hemington(1967), *Biochem. J.*, 102, 76
27. M. Saito, E. Bourgue and J. Kanfer(1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, 164, 420
28. E. O. Lee and M. Nakagaki(1986), *Yakugaku Zasshi.*, 106, 371.

(Received; September 2, Accepted; October 15)