

포스포리파아제

Phospholipase

정 의 이 품목에는 포스포리파아제 A₂, 포스포리파아제 D 및 포스포리파아제 B가 있다. 각각의 정의는 다음과 같다.

포스포리파아제 A₂ : 돼지 췌장조직의 추출물에서 얻어진 효소제이다.

다만, 역가조정, 품질보존 등을 위하여 희석제, 안정제 등을 첨가할 수 있다.

포스포리파아제 D : *Streptomyces griseus*의 배양물에서 얻어진 효소제이다. 다만, 역가조정, 품질보존 등을 위하여 희석제, 안정제 등을 첨가할 수 있다.

포스포리파아제 B : *Aspergillus niger*의 배양물에서 얻어진 효소제이다. 다만, 역가조정, 품질보존 등을 위하여 희석제, 안정제 등을 첨가할 수 있다.

이 품목은 레시틴 및 포스파티딜콜린을 가수분해하여 카복실산 등을 생성한다.

성 상 이 품목은 백~진한 갈색의 분말, 입상, 페이스트상 또는 무~진한 갈색의 액상이다.

확인시험 이 품목의 활성시험법에 따라 시험할 때 활성을 나타내어야 한다.

순도시험 (1) 비소 : 이 품목을 비소시험법에 따라 시험할 때, 그 양은

4.0ppm 이하이어야 한다.

(2) 납 : 이 품목 5.0g을 취하여 원자흡광광도법 또는 유도결합플라즈마발광광도법에 따라 시험할 때, 그 양은 5.0ppm 이하이어야 한다.

(3) 대장균군 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물 시험법 중 대장균군에 따라 시험할 때, 제품 1g당 30 이하이어야 한다.

(4) 살모넬라 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물 시험법 중 살모넬라에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

(5) 대장균 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물 시험법 중 대장균에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

활성시험법(역가)

포스포리파아제 A₂는 제1법, 포스포리파아제 D는 제2법, 포스포리파아제 B는 제3법을 각각 적용한다.

제 1 법

분석원리 : 본 역가시험은 pH 8.0, 온도 40℃에서 기질의 5분간 가수분해에 근거를 두고 있다.

시험용액의 조제 : 검체 일정량을 취하여 0.5mL당 3~5 unit을 함유하도록 물로 희석한다.

시험조작 : 기질용액 25mL를 비이커에 취한 다음 40℃의 수욕조에 10분간 유지하여 평량시킨다. 시험용액 0.5mL를 40℃로 평형이 된 기질용액에 가해주고 시간을 측정한다. 정확히 5분이 지난 다음 변성알콜 10mL를 가해주고 즉시 저어 반응을 정지시킨 다음 수욕조에서 꺼내

pH 8.0까지 0.02N 수산화나트륨용액으로 적정한다. 여기에 소비된 양 (mL)을 S라 한다. 따로, 기질용액 25mL, 변성알콜 10mL 및 시험용액 0.5mL의 순으로 혼합한 액을 위의 시험조작에 따라 시험하여 0.02N 수산화나트륨용액의 소비 mL 수를 B라 한다.

다음의 계산식에 따라 효소제(포스포리파아제 A₂)의 역가를 구한다.

$$\text{역가(units/g)} = \frac{(S - B)}{5} \times \frac{N \times 10^3 \times F}{W}$$

N : 수산화나트륨용액의 규정도

10³ : 산의 mmol을 μmol로 변환시키는 계수

W : 검체의 채취량(g)

5 : 반응시간(분)

F : 시험용액의 희석배수

역가의 정의 : 1 Phospholipase A₂ unit는 상기시험조건 하에서 기질로부터 분당 1μmol의 산(H⁺)을 유리시키는 효소의 양이다.

시 액

0.016M 데옥시콜린산나트륨용액 : 데옥시콜린산나트륨(Sodium deoxycholate : C₂₄H₃₉NaO₄) 6.7g을 물에 녹여 전량을 1,000mL로 한다.

0.32M 염화칼슘용액 : 염화칼슘(CaCl₂·2H₂O) 4.7g을 물에 녹여 전량을 100mL로 한다.

기질현탁액 : 1개의 계란노른자에 물 100mL를 가하여 균질화한 다음 이중으로 된 거즈를 사용하여 여과한다. 이 여액에 0.32M 염화칼슘용액 5mL를 가한다.

기질용액 : 기질현탁액 100mL 및 0.016N 데옥시콜린산나트륨용액 50mL를 가하여 혼합한 다음 물을 가하여 250mL로 하고, 다시 0.5N 수산화나트륨용액을 사용하여 pH 8.0으로 조절한다.

제 2 법

분석원리 : 본 역가시험은 pH 5.5, 온도 37°C에서 레시틴의 가수분해에 근거를 두고 있다.

시험용액의 조제 : 검체 일정량을 취하여 mL당 0.1~0.2 unit을 함유하도록 트리스-말레인산완충용액으로 희석한다.

시험조작 : 기질용액 0.1mL, 트리스·말레인산완충용액 0.1mL, 0.1M 염화칼슘용액 0.05mL, 7.5% 및 Triton X-100 용액 0.15mL를 각각 정확히 취하여 넣고, 잘 섞은 다음 37°C에서 5분간 유지하여 평형시킨다. 시험용액 0.1mL를 정확히 가하고 즉시 섞은 다음, 37°C에서 정확히 10분간 방치한 다음, EDTA·트리스시액 0.2mL를 정확히 가하고 섞은 다음, 즉시 끓는 수욕에 넣고 정확히 5분간 가열한다. 식힌 다음 발색시액 4mL를 정확히 가하고 흔들어 섞은 다음, 37°C에서 20분간 방치한다. 이 액을 물을 대조액으로하여 파장 500nm에서 흡광도 A 를 측정한다. 따로, 시험용액 대신 물을 이용하여 동일 조작을 행하여 흡광도 A_B 를 측정한다. 따로, 시험용액 대신에 염화콜린 표준용액 0.1mL로 동일 조작을 행하여 흡광도 A_S 를 측정한다.

다음의 계산식에 따라 효소제(포스포리파아제 D)의 역가를 구한다.

$$\text{역가(units/g)} = \frac{A-A_B}{A_S-A_B} \times \frac{1.43}{10} \times \frac{1}{W}$$

A : 효소시험용액의 흡광도

A_B : 공시험액의 흡광도

A_S : 염화콜린표준용액의 흡광도

1.43 : 염화콜린 표준액의 농도(mmol/L)

10 : 반응시간(분)

W : 시험용액 1mL 중 검체의 양(g)

역가의 정의 : 1 Phospholipase D unit는 상기시험조건 하에서 기질로부터 분당 1 μ mol의 콜린을 생성하는 효소의 양이다.

시액

표준용액 : 염화콜린(choline chloride) 0.2g을 정확히 달아 물을 가하고 녹여 1,000mL로 한다(1.43mM)

기질용액 : 레시틴(Cargill사의 Epikuron 200 또는 이와 동등한 것) 0.5g을 정밀히 달아 물 9.5mL에 녹이고, 하룻밤 방치한다.

트리스·말레인산완충용액(pH 5.5) : 트리스[Tris(hydroxyethyl)aminomethane] 1.21g 및 말레인산 1.16g을 물에 녹여 100mL로 한다. 이 액 25mL를 취하여 0.1N 수산화나트륨용액으로 pH 5.5로 조정하고 다음 물을 가하여 100mL로 한다.

0.1M 염화칼슘용액 : 염화칼슘 1.47g을 물에 녹여 100mL로 한다.

Triton X-100 용액 : Triton- 100폴리옥시에틸렌(10) 옥틸페닐에테르) 7.5g에 물을 가하여 100mL로 한다.

EDTA·트리스시액 : 에틸렌디아민사초산이나트륨 22.6g을 트리스·염산완충용액(pH 8.0)에 녹여 1,000mL로 한다.

트리스·염산완충용액 : 트리스 12.1g을 물에 녹여 100mL로 한 다음, 2M 염산 32mL 및 물 800mL를 가하고 필요시에 수산화나트륨용액 또는 염산을 가하여 pH 8.0으로 조정한 후, 물을 가하여 1,000mL로 한다.

발색시액 : 콜린옥시다아제(choline oxidase) 3단위, 퍼옥시다아제(oxidase) 6단위, 페놀 0.001g, 4-아미노안티피린(4-aminoantipyrine) 0.0006g을 HEPES 완충액(pH 7.4) 4mL에 녹인다.

HEPES 완충액(pH 7.4) : *N*-2-히드록시메틸피페라진-*N'*-2-에탄술포산 11.9g을 달아 물 600mL를 가하여 녹이고 0.05N 수산화나트륨 용액으로 pH 7.4로 조정한 다음 물을 가하여 1,000mL로 한다.

제 3 법

분석원리 : 본 역가시험은 pH 4.5, 온도 55°C에서 리소포스파티딜콜린을 가수분해하여 생성된 non-esterified fatty acids를 코엔자임 A와 아실 CoA 합성효소로 아실화하고 옥시다아제와 퍼옥시다아제에 의해 생성된 자주색의 생성물을 분광학적 방법으로 550nm에서 측정하는데 근거를 두고 있다.

시험용액의 조제 : 검체를 증류수에 녹여 최종희석액 1mL가 0.4~0.9 unit을 함유하도록 시험용액을 조제한다.

시험조작 : 효소시험 시험관에 기질용액 0.5mL를 넣고 55±0.1°C에서 5분간 정치한다. 따로 발색시액 시험관에 발색시액 A 0.5mL를 넣고 37±0.1°C로 항온시킨다. 효소시험용 시험관에 시험용액 50μL를 넣고

10분간 반응 시킨 다음 반응액 50 μ L를 37 $^{\circ}$ C로 항온 중인 발색시액 시험관에 넣는다. 10분 반응 뒤 발색시액 B 1mL를 넣고 10분간 반응한다. 반응 후 각 시험관을 흔들어서 섞고 증류수를 사용한 것을 대조액으로 파장 550nm에서 흡광도를 측정한다. 기질공시험은 시험용액 대신 증류수 50 μ L를 넣고 효소시험과 동일하게 시험을 진행한다. 검량선의 작성 : NEFA C kit의 1.0 μ mol/mL oleic acid를 0.25, 0.5, 0.75 1.0 μ mol/mL의 농도로 희석하여 표준액으로 사용한다. 각 농도의 표준액 50 μ L를 미리 37 $^{\circ}$ C로 항온 중인 발색시액 A 0.5mL에 넣고 10분간 반응한다. 발색시액 B 1.0mL를 넣는다. 반응 후 각 시험관을 흔들어서 섞고 증류수를 사용한 것을 대조액으로 파장 550nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성한다. 다음의 계산식에 따라 효소제의 역가를 구한다.

$$\text{역가(Units/g)} = \frac{P}{W \times T}$$

P : 효소반응에서 생성된 지방산의 양(μ mole) =

$$\frac{\text{효소반응액 부피(0.55mL)}}{\text{발색반응액 부피(0.05mL)}} \times \text{생성된 지방산의 양*}$$

W : 효소시험액에 들어있는 효소의 양 =

$$\frac{\text{시료무게(g)}}{\text{희석액 부피(mL)}} \times \text{효소시험액량 (0.05mL)}$$

* : 생성된 지방산의 양은 검체의 흡광도에서 공시험액의 흡광도를 뺀 값

T : 반응시간(분)

역가의 정의 : 1 포스포리파아제 B unit는 상기 시험조건하에서 기질로부터 분당 1 μmol 의 지방산을 유리시키는 효소의 양이다.

시 액

기질용액 : L- α -lysophosphatidyl choline(Sigma L-4129 또는 이와 동등한 것) 0.05g을 5mL의 완충액에 녹이고 10mL 기질용액이 되도록 물로 정용한다.

0.05M 초산완충액(pH 4.5) : 0.5M 초산(아세트산) 6.1mL 및 0.5M 초산나트륨용액(4.1g의 초산나트륨무수물을 물에 녹여 전량을 100mL로 한 것) 3.9mL을 혼합한 다음 0.5M 초산나트륨 또는 0.5M 초산으로 pH 4.5로 조정하고 물을 가하여 100mL로 정용한다.

발색시약 A, B : NEFA kit(Wako chemical, Wako Diagnostics)의 시액 A, 시액 B를 사용한다.

표준용액 : NEFA kit에 첨가된 oleic acid 표준액을 사용한다.

보존기준

냉암소에서 밀봉 보존하여야 한다.