

포스포리파아제

Phospholipase

정의 이 품목에는 포스포리파아제 A₂, 포스포리파아제 D 및 포스포리파아제 B가 있다. 각각의

정의는 다음과 같다.

포스포리파아제 A₂ : 돼지 쇄장조직의 추출물에서 얻어진 효소제이다. 다만, 역가조정, 품질

보존 등을 위하여 희석제, 안정제 등을 첨가할 수 있다.

포스포리파아제 D : *Streptomyces griseus*의 배양물에서 얻어진 효소제이다. 다만, 역가조

정, 품질보존 등을 위하여 희석제, 안정제 등을 첨가할 수 있다.

포스포리파아제 B : *Aspergillus niger*의 배양물에서 얻어진 효소제이다. 다만, 역가조정, 품질보

존 등을 위하여 희석제, 안정제 등을 첨가할 수 있다.

이 품목은 레시틴 및 포스파티딜콜린을 가수분해하여 카복실산 등을 생성한다.

성상 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) 대장균균 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물시험법 중 대장균균에 따라 시험할 때, 제품 1g당 30 이하이어야 한다.

(4) 살모넬라 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물시험법 중 살모넬라에

따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

(5) 대장균 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물시험법 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°C에서 기질의 5분간 가수분해에 근거를 두고 있다.

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

시험조작 : 기질용액 25mL을 비이커에 취한 다음 40°C의 수욕조에 10분간 유지하여 평량시킨다. 시험용액 0.5mL을 40°C로 평형이 된 기질용액에 가해주고 시간을 측정한다. 정확히 5분이 지난 다음 변성알콜 10mL을 가해주고 즉시 저어 반응을 정지시킨 다음 수욕조에서꺼내 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.

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

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 deoxy-cholate, 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 100mL을 가하여 균질화한 다음 이중으로 된 거즈를 사용하여 여과한다. 이 여액에 0.32M 염화칼슘용액 5mL을 가한다.

기질용액 : 기질현탁액 100mL 및 0.016N 데옥시콜린산나트륨용액 50mL을 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-말레인산 완충용액으로 희석한다.

시험조작 : 기질용액 0.1mL, 트리스. 말레인산완충용액 0.1mL, 0.1M 염화칼슘용액 0.05mL, 7.5% 및 Triton X-100 용액 0.15mL을 각각 정확히 취하여 넣고, 잘 섞은 다음 37°C에서 5분간 유지하여 평형시킨다. 시험용액 0.1mL을 정확히 가하고 즉시 섞은 다음, 37°C에서 정확히 10분간 방치한 다음, EDTA. 트리스시액 0.2mL을 정확히 가하고 섞은 다음, 즉시 끓는 수욕

에 넣고 정확히 5분간 가열한다. 식힌 다음 발색시액 4mL을 정확히 가하고 흔들어 섞은 다음, 37°C에서 20분간 방치한다. 이 액을 물을 대조액으로하여 파장 500nm에서 흡광도 A를 측정한다. 따로, 시험용액 대신 물을 이용하여 동일 조작을 행하여 흡광도 A_B를 측정한다. 따로, 시험용액 대신에 염화콜린 표준용액 0.1mL로 동일 조작을 행하여 흡광도 A_S를 측정 한다.

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 1μmol의 콜린을 생성하는 효소의 양이다.

시 액

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(hydroxy ethyl)aminomethane] 1.21g 및

말레인산 1.16g을 물에 녹여 100mL로 한다. 이 액 25mL를 취하여 0.1N 수산화나트륨용액으로 pH 5.5로 조정한 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 물에 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 800mL을 가하고 필요시에 수산화나트륨용액 또는 염산을 가하여 pH 8.0으로 조정한 후, 물을 가하여 1,000mL로 한다.

발색시액 : 콜린옥시다아제(choline oxidase) 3단위, 퍼옥시다아제(peroxidase) 6단위, 폐놀 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-에탄술폰산 11.9g을 달아 물 600mL을 가하여 녹이고 0.05N 수산화나트륨용액으로 pH 7.4로 조정한 다음 물을 가하여 1,000mL로 한다.

제 3 볏

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 중류수에 녹여 최종희석액 1mL가 0.4~0.9 unit을 함유하도록

시험용액을 조제한다.

시험조작 : 효소시험 시험관에 기질용액 0.5mL을 넣고 55±0.1°C에서 5분간 정치한다. 따

로 발색시액 시험관에 발색시액 A 0.5mL을 넣고 37±0.1°C로 항온시킨다. 효소시험용

시험관에 시험용액 50μL를 넣고 10분간 반응 시킨 다음 반응액 50μL를 37°C로 항온

중인 발색시액 시험관에 넣는다. 10분 반응 뒤 발색시액 B 1mL을 넣고 10분간 반응한

다. 반응 후 각 시험관을 흔들어 섞고 중류수를 사용한 것을 대조액으로 파장 550nm에

서 흡광도를 측정한다. 기질공시험은 시험용액 대신 중류수 50μL를 넣고 효소시험과 동

일하게 시험을 진행한다.

검량선의 작성 : NEFA C kit의 1.0μmol/mL oleic acid를 0.25, 0.5, 0.75, 1.0μmol/mL

의 농도로 희석하여 표준액으로 사용한다. 각 농도의 표준액 50μL를 미리 37°C로

항온 중인 발색시액 A 0.5mL에 넣고 10분간 반응한다. 발색시액 B 1.0mL을 넣는

다. 반응 후 각 시험관을 흔들어 섞고 중류수를 사용한 것을 대조액으로 파장

550nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성한다. 다음의 계산식에 따라 효소제의

역가를 구한다.

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

P : 효소반응에서 생성된 지방산의 양(μmole) =

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

* : 생성된 지방산의 양은 검체의 흡광도에서 공시험액의 흡광도를 뺀 값

W : 효소시험액에 들어있는 효소의 양 =

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

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 사용 한다.

표준용액 : NEFA kit에 첨가된 oleic acid 표준액을 사용한다.

보존기준

냉암소에서 밀봉 보존하여야 한다.

Phospholipase

Definition Phospholipase includes Phospholipase A₂, Phospholipase D, and Phospholipase B. Phospholipase A₂ is an enzyme obtained from an extract of pig pancreas tissues. However, dilutant or stabilizer can be added for the purpose of activity adjustment and quality preservation. Phospholipase D is obtained from the culture of *Streptomyces griseus*. However, dilutant or stabilizer can be added for the purpose of activity adjustment and quality preservation. Phospholipase B is an enzyme obtained from the culture of *Aspergillus niger*.

Compositional Specifications of Phospholipase

Description Phospholipase is white~dark brown powder, particle, paste or colorless ~ dark brown liquid.

Identification When Phospholipase is proceeded as directed under Activity Test, it should have the activity as Phospholipase.

- Purity**
- (1) Arsenic : It should be no more than 4.0 ppm tested by Arsenic Limit Test.
 - (2) Lead : When 5.0 g of Phospholipase is tested by Atomic Absorption Spectrophotometry or Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy, its content should not be more than 5.0 ppm.
 - (3) Coliform Group : When Phospholipase proceed as directed under Microbiological Methods for Coliform Group in General Testing Methods in 「Standards and Specifications for Foods」, it should not contain more than 30 per 1 g of this product.
 - (4) Salmonella : When Phospholipase proceed as directed under Microbiological Methods for Salmonella in General Testing Methods in 「Standards and Specifications for Foods」, it should be negative (-).
 - (5) E. coli : When Phospholipase proceed as directed under Microbiological Methods for E. coli in General Testing Methods in 「Standards and Specifications for Foods」, it should be negative (-).

Activity Test (activity) Phospholipase A₂ is done by Method 1, and Phospholipase D is done by Method 2. Phospholipase B is applied by Method 3.

Method 1

- Analysis Principle : Activity test is based on hydrolysis of the substrate at 40°C for 5 minutes and pH 8.0.
- Preparation of Test Solution : A suitable amount of sample is diluted with water so that the solution contains 3~5 IU per 0.5 mL.
- Test Procedure : 25 mL of substrate solution is added to a beaker, which is maintained in a 40°C water bath for 10 minutes to equilibrate. 0.5 mL of Test Solution is added to the 4 0°C substrate solution. After exactly 5 minutes, 10 mL of modified alcohol is added and stirred immediately to stop the reaction. It is then taken out of the water bath and titrated with 0.02 N sodium hydroxide solution to pH 8.0. The consumed amount is S (mL). Separately, 25 mL of substrate solution, 10 mL of modified alcohol, and 0.5 mL of Test

Solution is sequentially mixed. This solution is tested by the Test Procedure above and the consumed amount of 0.02 N sodium hydroxide solution is B (mL).

Activity of an enzyme(phospholipase A₂) is calculated by the following equation.

$$\text{The phospholipase A}_2 \text{ Activity (U/g)} = \frac{(S - B)}{5} \times \frac{N \times 10^3 \times F}{W}$$

N : Normality of sodium hydroxide solution

10^3 : Conversion factor from mmol to μmol for acid

W : Weight of sample(g)

5 : Reaction time(minutes)

F : Dilution factor of test solution

Definition of Activity : 1 Phospholipase A₂ Unit(U) corresponds to an amount of enzyme that frees $1\mu\text{mol}$ of acid (H^+) from substrate per minute under the test conditions above.

Solutions

- 0.016 M Sodium Deoxy Cholate Solution : 6.7 g of sodium deoxy cholate (C₂₄H₃₉NaO₄) is dissolve in water (total volume = 1,000 mL).
- 0.32M Calcium Chloride Solution : 4.7 g of calcium chloride (CaCl₂ · 2H₂O) is dissolve in water (total volume = 100 mL).
- Substrate Suspension : One egg yolk is homogenized in 100 mL of water, which is filtered through a twofold gauze. 5 mL of 0.32 M calcium chloride solution is added to the filtrate.
- Substrate Solution : 100 mL of substrate suspension and 50 mL of 0.016 N sodium deoxy cholate solution are mixed, where water is added to bring the total volume to 250 mL. pH of the mixture is adjusted to 8.0 with 0.5 N sodium hydroxide solution.

Method 2

- Analysis Principle : Activity test is based on hydrolysis of Lecithin at 37°C, pH 5.5.
- Preparation of Test Solution : A suitable amount of sample is diluted with Tris-maleic acid buffer so that the solution contains 0.1~0.2 Units per 1 mL.
- Test Procedure : Weight accurately 0.1 mL of substrate solution, 0.1 mL of Tris-maleic acid buffer, 0.05 mL of 0.1 M Calcium Chloride, 0.15 mL of 7.5% Triton X-100 solution, and mix well. Equilibrate the mixture at 37°C for 5 minutes. Add accurately 0.1 mL of test solution to this solution, and shake immediately. Set it aside at 37°C for 10 minutes precisely, and add 0.2 mL of Tris-EDTA solution accurately. Mix this solution, and heat for 5 minutes in a boiling water bath precisely. After cooling, add 4 mL of colorizing solution accurately and shake. It is set aside for 20 minutes at 37°C. Absorption of the this solution is measured at 500 nm using water as a reference. Separately, absorption (A_B) is measured using water instead of test solution under same procedure. Separately, absorption (A_s) is measured using 0.1 mL of Choline Chloride standard solution instead of test solution by proceeding same

procedure.

Activity of an enzyme(phospholipase D) is calculated by the following equation.

$$\text{the phospholipase D Activity (U/g)} = \frac{A - A_B}{A_S - A_B} \times \frac{1.43}{10} \times \frac{1}{W}$$

A : Absorbance of enzyme test solution

A_B : Absorbance of enzyme blank test solution

A_S : Absorbance of Choline Chloride standard solution

1.43 : Content of Choline Chloride standard solution(mmol/L)

10 : Reaction time(minutes)

Definition of Activity : 1 Phospholipase D Unit(U) corresponds to an amount of enzyme that 1 μ mol of Choline from substrate per minute under the test conditions above.

Solutions

- Standard Solution : Dissolve 0.2 g of choline chloride exactly in water to make 1,000 mL(1.43mM).
- Substrate Solution : Dissolve 0.5 g of Lecithin(Epikuron 200 of Cargill Inc., or its equivalent) in 9.5 mL of water. Set it aside for a day.
- Tris-maleic acid Buffer(pH 5.5) : Weight separately 1.12 g of Tris(hydroxy ethyl)aminomethane and 1.16 g of Maleic acid, and dissolve each samples in water to make 1,000 mL. Measure 25 mL of the solution, and add 0.1N Sodium Hydroxide solution to adjust pH 5.5. Add water to make 100 mL.
- 0.1M Calcium Chloride Solution : Weight 1.47 g of Calcium Chloride in water to make 100 mL.
- Triton X-100 Solution : Weight 7.5 g of Triton- 100polyoxyethylene(10) octyl phenyl ether in water to make 100 mL.
- Tris-EDTA solution : Dissolve 22.6 g of Ethylenediaminetetraacetic acid in Tris-Chloride Buffer Solution(pH 8.0) to make 1,000 mL.
- Tris-Chloride Buffer Solution : Dissolve 12.1 g of Tris in water to make 100 mL, and add 32 mL of 2M Hydrochloric acid and 800 mL of water. If necessary, adjust pH 8.0 by adding Sodium Hydroxide solution or Hydrochloric acid, and make 1,000 mL with water.

- 0.1M Calcium Chloride Solution : Weight 1.47 g of Calcium Chloride in water to make 100 mL.
- Triton X-100 Solution : Weight 7.5 g of Triton- 100polyoxyethylene(10) octyl phenyl ether in water to make 100 mL.
- Tris-EDTA solution : Dissolve 22.6 g of Ethylenediaminetetraacetic acid in Tris-Chloride Buffer Solution(pH 8.0) to make 1,000 mL.
- Tris-Chloride Buffer Solution : Dissolve 12.1 g of Tris in water to make 100 mL, and add 32 mL of 2M Hydrochloric acid and 800 mL of water. If necessary, adjust pH 8.0 by adding Sodium Hydroxide solution or Hydrochloric acid, and make 1,000 mL with water.
- Colorizing solution : Dissolve 3 Unit of choline oxidase, 6 Unit of peroxidase, 0.001 g of phenol, 0.0006 g of 4-aminoantipyrine in 4 mL of HEPES Buffer Solution(pH 7.4).
- HEPES Buffer Solution(pH 7.4) : Weight 11.9 g of *N*-2-hydroxy ethylpiperazine -*N'*-2-ethanesulfonic acid and dissolve it in water to make 600 mL. Adjust pH 7.4 with 0.05 N Sodium Hydroxide solution, and make 1,000 mL with water.

Method 3

- Analysis Principle : This activity test is based on measurement of violet-colored product that is obtained by acylating non-esterified fatty acids, obtained by hydrolysis of lisophosphatidic choline at 55°C, pH 4.5, with coenzyme A and acyl coenzyme A synthetase and then activating by oxidase and peroxidase using spectroscopic method at 550nm.
- Preparation of Test Solution : Phospholipase B is dissolved with distilled water so that the solution contains 0.4~0.9 Units per 1mL.
- Test Procedure : Place 0.5mL of substrate solution into test tube for enzyme test and allow to stand for 5 minutes at 55±0.1°C. Separately, 0.5mL of colorizing solution A is transferred into test tube for colorizing solution and isothermalized at 37±0.1°C. Pipette 50µl of test solution into test tube for enzyme test and react for 10 minutes. 50µl of reacting solution is transferred into test tube for colorizing solution isothermalized at 37°C. After having a reaction for 10 minutes, add 1mL of colorizing solution B and react for 10 minutes. Then, shake each test tube to mix well. Using distilled water as a reference, absorbance of each solution is measured at 550nm. For substrate blank test, add 50µl of distilled water, instead of test solution. Process in the same manner with enzyme test.
- Preparation of calibration curve : 1.0 µmol/mL oleic acid in NEFA C kit is diluted to each concentration to 0.25, 0.5, 0.75, and 1.0 µmol/mL. These solutions is used as standard solution. Transfer 50µl of each of the standard solution into 0.5mL of colorizing solution A which is previously isothermalized at 37°C. React for 10 minutes and add 1.0mL of colorizing solution B. After having a reaction, shake each test tube to mix well. Using distilled water as a reference, absorbance of each solution is measured at 550nm and prepare calibration curve. The activity of the enzyme preparation is calculated by the following equation.

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

P : Amount of fatty acid that is produced by enzyme reaction(μmole) =

$$\frac{\text{Volume of enzyme reaction solution(0.55mL)}}{\text{Volume of colorizing reaction solution(0.05mL)}} \times \text{Amount of the produced fatty acid}^*$$

W : Amount of enzyme in enzyme test solution =

$$\frac{\text{Weight of the sample(g)}}{\text{Volume of diluted solution(mL)}} \times \text{Amount of enzyme test solution(0.05mL)}$$

* : The amount of the produced fatty acid is the value of the absorbance of the sample less that of the blank test solution

T : Reaction time(minutes)

Definition of Activity : 1 unit of phospholipase B is the amount of enzyme that decompose 1μ

mole of fatty acids from the substrate per minute under the test condition as above.

Solutions

Substrate solution : 0.05g of L-α-lysophosphatidyl choline(Sigma L-4129 or its equivalent) is dissolved in 5mL of buffer solution and is diluted with water to make 10mL of substrate solution.

0.05M Acetic acid buffer solution(pH 4.5) : 6.1mL of 0.5M acetic acid and 3.9mL of 0.5M sodium acetate(4.1g of sodium acetate anhydrous is dissolved in water to 100mL) are mixed, and adjusted to pH 4.5 by using 0.5M acetic acid. Then dilute the solution with water to make volume of 100mL.

Colorizing solution A, B : Use the solution A and B in NEFA kit(Wako chemical, Wako Diagnostics).

Standard solution : Use oleic acid standard solution in NEFA kit.

Storage Standards of Phospholipase

Phospholipase should be stored in cold and dark container.