

***Rhizopus oryzae*의 燐脂質과 그 分解酵素에 미치는 界面活性劑의 영향**

尹喜周 · 曹基勝\* · 崔榮吉

한양대학교 생물학과\*생화학과

**Effect of Sodium deoxycholate and Sodium dodecyl sulfate on Phospholipid Composition and Phospholipases of *Rhizopus oryzae***

Youn, Hee-Ju, \*Key-Seung Cho, and Yong-Keel Choi

Dept. of Biology, \*Biochemistry, Hanyang University, Seoul, Korea

Effect of sodium deoxycholate and sodium dodecyl sulfate on *Rhizopus oryzae* were investigated. Morphological change was obtained by supplement of these surfactants into culture media during the submerged culture. In accordance with morphological changes, composition of phospholipid was changed. In case of surfactant-free culture, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylserine were measured more than 95% of total phospholipid. But cardiolipin and phosphatidylinositol were conspicuously increased by treatment of both surfactants. Presence of phospholipase A, C, and D were detected from mycelium. Phospholipase A and D were activated by supplement of sodium deoxycholate and C was activated by sodium dodecyl sulfate. These results were interpreted in respect of polymorphism of phospholipid and membrane stability against solubilization effect of surfactants.

사상체 균류의 형태학적 분화는 주로 세포벽의 구성성분인 chitin이나 cellulose등의 탄수화물 복합체의 생합성 내지는 분해측면에서 연구되어 왔다. 그러나 이들 물질의 대사에 관여하는 효소의 생성 및 분비는 생체막계에서 주로 이루어지므로 생체막에 영향을 미치는 계면활성제를 이용하여 미생물의 형태적인 변화를 일으킨 보고는 많이 있으나 이에 따른 인지질 성분 변화에 관한 연구는 별로 많지 않았다(Packer, 1977; Jacques, 1980).

계면활성제는 성격에 따라 차이는 있지만 일반적으로 농도에서는 세포막을 분해시키지만 낮은 농도에서는 생체막과의 높은 친화력을 보이며 이에 따른 투과성의 변화 및 세포막 부착

효소의 활성도 증가와 같은 생체막의 성질변화를 일으킨다고 하였다(Helenius, 1975; Maher, 1984) 또한 Cullis(1979)와 Sanderman(1978) 등은 인지질은 생체막의 구조적인 역할 외에 성분의 공간적 재구성과 phase transition등을 통하여 투과성의 변화와 생체막 부착효소의 활성 조절과 같은 생리적 기능에 주요한 역할을 한다고 하였다.

이에 산업적으로 유용한 균주의 하나인 *Rhizopus oryzae*를 택하여 비교적 그 특성이 잘 알려진 sodium deoxycholate(DOC)와 sodium dodecyl sulfate(SDS)를 낮은 농도로 처리하여 실험한 결과 성장균락의 형태와 인지질의 성분 함량이 다르게 나타났고 아울러 인지질 대사

에 중요한 역할을 하는 인지질 분해효소의 존재 및 활성에 대한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양조건

본 실험실에 보관중인 *Rhizopus oryzae* 를 사용하여 potato dextrose agar에서 30°C로 7일간 전배양시킨 다음 포자가 형성된 균체를 수확하여 glass wool과 멸균수를 이용하여 포자 현탁액을 제조하였다. 이 현탁액은 4°C에서 보관하면서 20일 이내에 사용하였다.

배지의 조성은 포도당 3%, 펩톤 1%, 효모 추출물 0.3%를 기본 조성으로 하여 실험코자하는 계면활성제를 농도별로 첨가하였다.

배양조건은 배양액 90 ml를 300 ml 용량의 플라스크에 넣고 최종 포자농도는 1 ml의 배양액에  $1 \times 10^8$  개의 포자수가 존재하도록 접종하여 New Brownsky사의 회전식 진탕배양기에서 회전수 150 rpm으로 30°C에서 배양하였다.

### 지질의 추출 및 정량

Bleigh & Dyer (1959)의 방법을 수정하여 아래와 같이 추출하였다. 성장단계별로 수확한 균체 5g을 dryice로 급냉시켜 고형화시킨 다음 해사(sea sand)가 담긴 냉각된 막자 사발에서 균질한 세포 마쇄물을 만든다.

이 마쇄물에 chloroform 5 ml과 methanol 10 ml를 가한 다음 5분간 진탕한 후 실온에서 3-4시간 방치한다. 다시 chloroform 5 ml와 물 5 ml를 넣고 30분간 실온에서 진탕시킨 다음 whatman No. 1 여과지를 이용하여 신속하게 여과한 다음 여과물의 chloroform층을 모은다.

남은 균체의 찌꺼기는 chloroform 5 ml로 재차 추출한 후 12.5 ml의 chloroform으로 여과지 및 깔때기를 세척하여 최초로 모은 chloroform 용액과 합친다.

이와 같이 수확한 chloroform용액을 0.9% NaCl 용액 0.2 volume으로 2-3회 세척하여 chloroform층의 수용성 불순물을 제거한 다음 evaporator에서 chloroform을 증발시켜 얻은 지질을 총지질량으로 계산하였다.

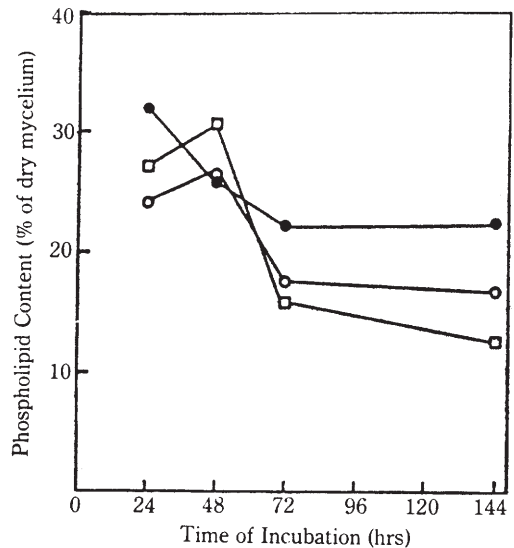


Fig. 1. Changes of phospholipid content in mycelia of *Rhizopus oryzae* in submerged culture in presence of surfactants. Control (not added), ●-●; DOC (0.48mM), ○-○; SDC (0.18mM), □-□.

### 인지질의 분리 및 정량

Thin layer chromatography를 이용하여 아래와 같이 분리·정량하였다. 추출된 총지질을 일정량 chloroform에 녹인 후  $\text{CHCl}_3$ -MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (65:25:4)를 전개용매로 하여 0.25mm두께의 silica gel G로 도포된 판에서 분리하였다. 전개된 각 인지질의 fraction은 Sigma 회사 제품의 standard와 동시에 전개하여 확인하였으며 또한 phosphatidylethanolamine (PE)과 phosphatidylserine (PS)는 Ninhydrin 염색액으로, phosphatidylinositol (PI)는 periodate-schiff's reagent로 재확인하였다(Fig. 1 참조).

전개된 인지질의 각 성분은 chromatogram에서 끊어서 chloroform으로 재용출한 다음 chen (1956)의 방법으로 인정량한 후 24배로 환산하여 인지질의 양을 계산하였다.

### phospholipase의 효소원 및 기질제조

대수기(24 hr)의 균사체 3-5g을 냉각된 증류수로 3회 세척한 후 액체질소로 급냉시킨 다음 냉각시킨 막자 사발에서 마쇄하면서 5배의 증류수를 서서히 가하여 균질의 마쇄물을 만들고 이어서 3,000g로 원심분리시켜 얻은 상등액을 효소원으로 하였으며 Lowry (1951) 방법으로 단백질 정량하였다.

효소기질의 제조는 Bacto 펩톤 1.5%, 효모 추출물 0.1%, NaCl 0.5%, Glucose 1% 조성의 배지를 pH 7.4로 조절한 2l의 배양액에 대수기의 *E. coli*를 접종하여 약 12시간 배양한 후 원심분리에 의하여 균체를 수확한 다음 마쇄시킨다.

이 마쇄물에  $C^{14}$ -palmitic acid를 (50  $\mu$ Ci) 0.5ml의 0.1 N NaCl로 sodium palmitate로 전환시킨 다음 0.1N HCl로 중화한 용액을 넣어 5시간 동안 37°C에서 반응시킨다.

이 반응물을 Bleigh와 Dyer (1959)의 방법으로 지질을 추출하고 난다음 상기의 방법으로 thin layer chromatography에 의하여  $C^{14}$ -phosphatidyl glycerol (PG)와  $C^{14}$ -PE 그리고  $C^{14}$ -cardiolipin (CL)을 용출하여 효소 기질로 사용하였다.

#### phospholipase A, C, D활성도의 측정

Phospholipase A의 활성도 측정은 *E. coli*에서 추출한  $C^{14}$ -phospholipid (50,000 cpm)가 들어있는 시험관에 1ml의 ether, 0.1ml의  $CaCl_2$  (0.1 M), 0.6ml의 각각의 완충용액과 0.8ml의 효소용액을 넣고 완전히 밀봉하여 1시간 동안 반응시킨후 ether층을 제거한다.

이 반응액을 Bleigh & Dyer 방법으로 지질을 추출하여  $CHCl_3$ -MeOH- $H_2O$  (65:25:4, v/v)의 전개용매로 thin layer chromatography하여 lyso phospholipid 부위를 2,2-P-phenylene-bis (5-phenyloxazol) (popo) 0.175g과 2,5-diphenyloxazole (PPO) 7.5g이 500ml의 toluene에 녹아있는 cocktail용액 10ml에 넣어 packard 4530의 scintillation counter로 그 방사능의 활성도를 측정하였다.

Phospholipase C (E. C. 3. 1. 4. 3)의 측정은 pH 7.4의 Tris-HCl 완충용액을 제외하고는 phospholipase A와 동일조건 및 순서로 반응 및 지질을 추출한 다음 전개용매는 Petroleum ether-diethylether-formic acid (55:45:1.5, v/v)로 chromatography하여 monoacylglycerol과 diacylglycerol에 나타나는 방사능 활성도를 측정하였다.

Phospholipase D의 측정은 1ml의 ether와 0.1ml의 ATP (2.8 mM), 0.1ml의  $MgCl_2$  (10

**Table 1.** Effect of surfactant-addition into culture media on morphological change and growth yield of *Rhizopus oryzae* in submerged culture

Treatment	Concn (mM)	Morphology of colony	Growth yield (mg of dry wt. / flask)
Not added	-	turfy	540-570
DOC	0.48	pulpy	580-600
	4.8	-	severely inhibited
SDS	0.18	pellet	610-630
	1.8	-	completely inhibited

Average Molecular weight and critical micellar concentration (CMC) of DOC is 415 and 5mM, and those of SDS is 288 and 8.2mM respectively. Growth yield is the dry weight of mycelia harvested at stationary phase.

mM)와 0.1ml의 EDTA (30 mM)와 0.4ml의 pH 7.3의 Tris-HCl 완충용액, 그리고 0.8ml의 효소용액을 기질이 들어있는 시험관에서 phospholipase A와 동일한 방법으로 반응 및 지질을 추출한후 chloroform-methanol-acetic acid- $H_2O$  (80:13:8:0.3, v/v)의 전개용매로 분리하여 얻은 phosphatidic acid fraction에서 나타나는 방사능 활성도를 측정하였다.

#### 결과 및 고찰

DOC 및 SDS 첨가에 의한 형태 및 생체 수율 (growth yield) 변화는 Table 1에서 요약했다.

계면활성제를 첨가하지 않았을 때의 filamentous형의 성장균락은 SDS의 경우, critical micellar concentration (CMC)의 4.6배로 희석시킨 농도가 minimum inhibition concentration (MIC)이 되는 성장저해를 나타냈으며, 순차적으로 낮은 농도로 처리하면 장기간의 유도기 (lag phase)가 점차 줄어들면서 형태는 견고한 pellet형으로 성장하였으며 수율은 대조군보다 약 10% 증가하였다.

DOC 첨가는 CMC와 동일한 농도에서 심한 성장저해 현상이 보였으나 10배 희석농도인 0.48 mM에서는 그 성장형태가 pulp와 같이 균사가 풀어진 형으로 자라면서 생체량은 약간 증가하

는 것을 알 수 있었다(Table 1).

Amphipathic 물질이 CMC 이상의 고농도에 서는 세포막을 분해하지만 저농도에서는 세포막의 재구성이 유도되어 투과성 변경등과 같은 새로운 생리적 기능을 나타냈기 때문에 이러한 수율증가 및 형태변화가 초래되었다고 본다.

배양시기별 균체의 인지질 함량의 변화는 Fig. 1에서 보는 바와같이 증식속도가 빨라지면 함량이 높아지고 속도가 퇴보하면 줄어드는 비례 관계를 나타냈다. 또한 계면활성제를 첨가할 경우, 대조군에 비해 유도기와 대수기가 지체되고, 그리고 비교적 짧은 정지기를 나타낸 다음 곧바로 autolysis가 진행된다는 주장(Youn, 1985)과 일치하였으며 다만 대조군이 정지기에 서 인지질이 증가되는 것은 액체배양시 사상체 균류는 포자형성을 하지 못하지만 그 세포질내

환경은 생식을 위한 분화가 준비되어 있는 상태를 보여주는 것으로 생각된다(Fig. 2).

Fig. 2는 실험균주의 인지질 성분은 6종이 다양하게 존재하는 것을 보여준다. 그러나 그동안 Rhizopus 속의 인지질 성분연구는 별로 되어 있지 않았으며 다만 Weete(1970, 1980)가 *Rh. arrhizus*에서 polar lipid가 총지질의 44%를 차지하고 주로 PE와 PC가 존재한다고 보고했을 뿐이다.

Table 2는 계면활성제를 첨가하지 않은 경우, 성장단계에 따른 인지질의 성분별 변화를 표시한 것으로서 PE가 60% 이상의 대부분을 차지하며 또한 PE, PC, PS의 세 종류가 총 인지질량의 95% 이상 차지함을 보여준다(Table 2).

효모나 대부분의 사상체 균류는 PC가 인지질의 주성분인데 반하여 (Weete, 1980) *Rh. oryzae*는 PE가 주요성분이 되는 특이성이 나타났다.

또한 경시별 변화는 PE가 감소하면서 PC가 늘어나는 성향을 나타내는데 이는 PC가 PE보다 생체막의 성질에서 삼투압과 양이온 및 계면활성제에 대한 안정성이 높다는 사실(Hossack, 1977, Pringle, 1979)에 비추어 볼때 균체가 성장함에 따라 안정성이 증가하는 것으로 오래된 균사가 신장성장을 하는 정단부위보다 상대적으로 많아짐으로서 총체적으로 막의 안정성이 높아지는 것으로 사료된다(Table 3).

Table 3은 DOC 처리 효과를 나타낸 것으로서 대조군과 마찬가지로 PE는 급격히 감소하면서 PC, PS가 증가하는 성향이 나타났으나 미량으로 존재하던 CL과 PI 그리고 lysopl의

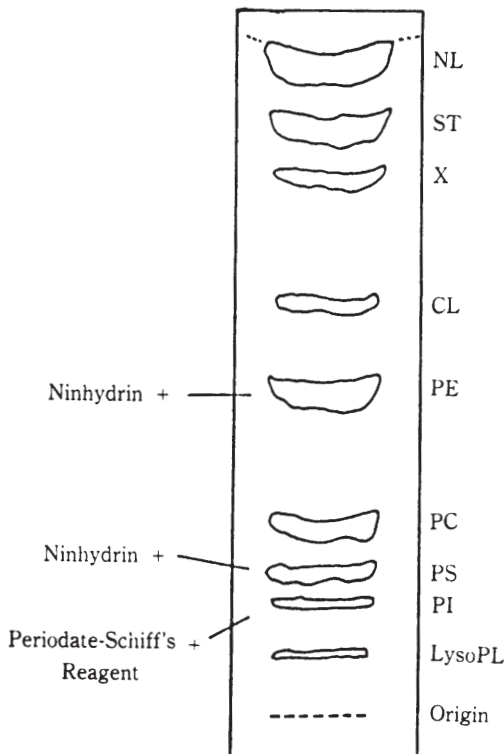


Fig. 2. Thin layer chromatogram of phospholipids of *Rhizopus oryzae*. Adsorbent; silicagel G. Thickness  $0.1 \pm 0.05$  mm. Solvent system; chloroform-methanol-water (65:25:4). NL, neutral lipid; ST, sterols; X, unidentified lipid; CL, cardiolipin; PE, phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine; PS, phosphatidylserine; PI, phosphatidylinositol; Lyso PL, lysophospholipid; LC, cardiolipin; ST, free and esterified sterols; X, unidentified lipid.

Table 2. Relative distribution of phospholipid components in mycelia of *Rhizopus oryzae* during submerged culture in absence of surfactants.

Growth phase	Component in total phospholipid (percentage weight)					
	PE	PC	PS	CL	PI	Lyso PL
Logarithmic	80.4	6.1	12.4	trace	trace	trace
Early transition	68.2	15.0	15.0	0.9	0.8	trace
Late transition	70.2	16.6	11.5	1.5	trace	trace
Stationary	60.1	17.6	8.0	1.6	1.2	trace



**Table 3.** Relative distribution of phospholipid components of mycelia in DOC-supplemented culture.

Growth phase	Component in total phospholipid (percentage weight)					
	PE	PC	PS	CL	PI	Lyso PL
Logarithmic	74.0	6.4	8.5	8.4	2.3	trace
Early transition	59.8	17.6	13.5	7.0	2.0	trace
Late transition	56.8	9.6	10.4	10.9	9.6	2.6
Stationary	33.8	15.4	11.9	6.2	27.4	6.5

Concentration of DOC in media is 0.48 mM

증가가 현저하였다. Lysopl의 증가는 후술할 Table 5에서 보는 바와같이 DOC에 의한 phospholipase A의 활성도 증가에 주로 기인된다고 여겨지며 CL의 증가는 정단 부위에서 DOC의 Wedge effect (Dawson, 1978)에 따른 인지질 용해를 최소화 하기 위한 방어기작으로 세포질쪽의 세포막에서 Hexagonal ( $H_{II}$ ) phase의 구조로 대응함으로써 세포막의 bilayer 구조의 안정성에 기여하는 것으로 추정된다.

PI는 growth factor로서 인지질은 물론 생체 내 성분의 대사조절 및 정보전달에 관여하는 것으로 연구가 많이 진행되고 있는데 (Yasutomi, 1984; Barbara, 1980; Becker, 1977) 이러한 PI의 증가는 생리적 활성 측면에서 고찰되어야 하며 따라서 좀더 연구되어야 할 과제로 생각되어진다 (Table 4).

Table 4는 SDS에 의한 변화를 나타낸 것으로서 DOC와 거의 유사한 양상을 띄우나 DOC보다 PC, PS의 증가가 현저하고 CL과 PI,

**Table 4.** Relative distribution of phospholipid components in mycelia in SDS-supplemented culture

Growth phase	Component in total phospholipid (percentage weight)					
	PE	PC	PS	CL	PI	Lyso PL
Logarithmic	62.8	15.7	10.8	9.1	1.6	trace
Early transition	59.1	9.9	18.3	10.7	2.3	trace
Late transition	66.2	15.0	10.5	7.8	0.4	1.0
Stationary	49.3	30.0	13.4	4.9	2.5	1.4

Concentration of SDS in media is 0.18 mM

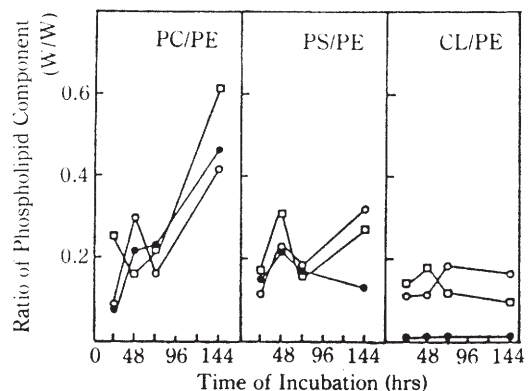
그리고 lysopl의 증가가 배양후기에서 DOC보다 둔화되는 것은 SDS 첨가량이 상대적으로 적기 때문에 배양초기에 세포막의 흡착으로 발생된 농도차이에 의하여 유도된 현상으로 보인다.

Fig. 3은 PC, PS, CL을 PE의 함량에 대한 비율로 나타낸 도표로서 PS, PC는 대체적으로 정지기로 갈수록 높아지며 다만 대조군에서 PS가 줄어들고 CL은 대수기에서 급격히 증가하는 것을 볼 수 있다 (Fig. 3).

이와같이 낮은 농도의 계면활성제를 첨가하면 인지질의 독특한 함량변화가 일어나는데 이는 균체내에서 인지질의 상호전환이 왕성하게 일어난다는 것을 의미하기 때문에 *Rh. oryzae*에서 여러가지 phospholipase 존재 및 활성도를 알아보기 위하여 인지질 전환이 가장 활발한 대수기의 균체에서 추출하여 조사하였다 (Fig. 4).

Fig. 4는 phospholipase A의 최적 pH를 나타낸 것으로서 3개의 optimum pH가 나타났다. Proulx (1969)는 *E. coli*의 phospholipase A는 최적 pH가 pH 5와 pH 8.4의 두개, 그리고 charavarti (1981)는 *Neuspora crassa*에서 exocellular phospholipase A가 pH 5.5라고 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 intracellular phospholipase로서  $A_1$ 과  $A_2$ 를 구분하지 않았기 때문에 이 효소들의 특성에 따른 세개의 optimum pH가 나타난 것으로 보인다.

Table 5는 각 optimum pH에서 계면활성제 처리군과 대조군의 phospholipase A의 활성도 비교치이며 DOC의 활성도가 가장 높게 나타났

**Fig. 3.** Effect of surfactant-supplement on change of content ratio of PC, PS, and CL to PE control (not added), ●-●; DOC, ○-○; SDS, □-□.

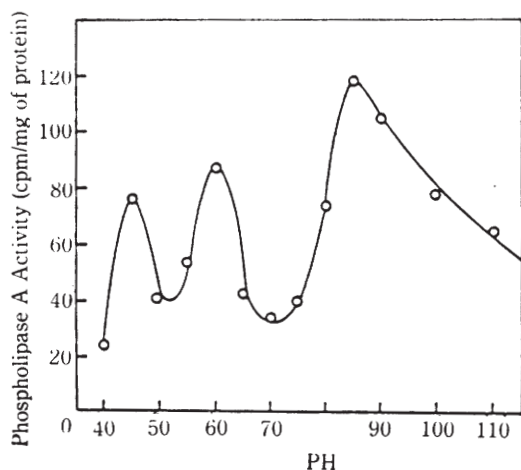


Fig. 4. Determination of optimum pH of phospholipase A activity in the homogenate of mycelia. The assay mixture was as under material and methods. Solutions from pH's 4.0-6.0 on 0.1 M acetate buffer and from pH's 6.5-8.0 on 0.1 M phosphate buffer were maintained. solutions from pH's 8.5-11.0 were maintained with 0.05 M glycine-NaOH buffer.

다. 이는 변환기에서 DOC 처리군의 lysopl 의 함량이 높은 것과 일치하였으며 이는 DOC 의 활성화 결과로서 여겨진다. 또한 SDS는 별반 활성화도 증가효과는 없으며 오히려 pH 4.5 에서 는 저해되었다(Table 5).

Phospholipase C와 D는 모든 생물체에서 보편적으로 존재하지 않고 C는 주로 몇몇 세균에서, 그리고 D는 식물체에서만 존재하는 것으로 알려져 왔다(Yoshie, 1970; Weete, 1980). 그러나 *Rh. oryzae*에서 두 효소가 모두 존재하고

Table 5. Comparison of phospholipase A activity in mycelia of *Rhizopus oryzae* with supplement of surfactants.

Treatment	Radioactivity in lysophospholipid (cpm) at pH of incubation		
	4.5	6.0	8.5
Not added	761	863	1180
DOC	841	1181	2345
SDS	630	983	1543

Enzyme source was prepared from the mycelia harvested at logarithmic phase and activity was assayed to 10 mg of protein in reaction mixture. Detailed condition of assay is described in the text.

Table 6. Effect of surfactants on activity of phospholipase C and D in mycelia at logarithmic phase

Treatment	Radioactivity (cpm) in lipid products by		
	phospholipase C	phospholipase D	
	MG	DG	PA
Not added	2843	6812	17891
DOC	3857	2917	21038
SDS	3115	8415	14669

Activity of enzyme source was assayed to 10mg of protein in reaction mixture. Detailed condition of assay is described in the text.

또한 계면활성제 종류에 따라 활성 내지는 저해되는 것을 Table 6에서 볼 수 있다. 특히 SDS 첨가에 의한 pellet형의 균체내 phospholipase C의 활성화 증가는 효소활성과 형태변화가 서로 관련이 있는 것으로 보인다. 인지질을 분해하여 중성지방으로 전환시키는 phospholipase C의 기능은 *Rh. oryzae*의 형태변화에 중요한 역할을 할 것으로 사료되는데 Bayer (1985)도 *E. coli*를 가지고 행한 세포막의 phospholipase C와 인지질 함량 분석연구에서 세균 세포벽의 morphogenesis에 중추적 역할을 한다고 주장한 바 있다(Table 6).

Phospholipase D가 다른 효소보다 활성도가 높은 것은  $^{14}\text{C}$ -PE,  $^{14}\text{C}$ -PC, 그리고  $^{14}\text{C}$ -CL의 기질에서 CL뿐만 아니라 CL의 분해에서 오는 PG를 비롯하여 기질고유의 PG 그리고 PE 등 다양한 기질 특이성을 가지고 있다고 여겨지며, Charavarti (1981)에 의해 *Neurospora crassa*의 분생포자에서 추출한 phospholipase D가 Triton X-100과 DOC에 의해 활성화되고 SDS에 의해서는 저해되었다는 결과와 동일한 계면활성제의 효과를 나타냈다.

이상과 같은 실험결과에서 인지질의 성분함량에 의한 구조적 분석 및 인지질의 세포내 상호 전환(turn over), 그리고 전환에 필수불가결한 phospholipase의 연구는 외부환경에 대한 균류의 형태 분화는 물론 세포의 노화, autolysis, vesicle의 plasma membrane으로의 fusion등의 세포 생리학적 기능의 연구에 접경이 될 수 있다고 생각된다.

## 摘 要

*Rhizopus oryzae* 균사체 내의 인지질 구성 성분은 6 종으로 나타났고 sodium deoxycholate와 sodium dodecyl sulfate를 각각 0.48mM, 0.18mM의 낮은 농도로 영양배지에 첨가했을때 성장균락의 형태변화와 아울러 미량 존재하던 cardiolipin과 phosphatidylinositol 그리고 lysophospholipid의 함량이 증가하였다.

또한 phospholipase는 A와 C, 그리고 D가 존재하였으며 A와 D는 sodium deoxycholate에 의하여, C는 sodium dodecyl sulfate에 의하여 활성도 증가를 나타냈다.

## REFERENCES

- Barbara, A.H. and R.L. Lester, 1980. Effects of inositol starvation on phospholipid and glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 1: 79-89.
- Bayer, M.H. and M.E. Mayer, 1985. Phosphoglycerides and phospholipase C in membrane fractions of *Escherichia coli* B.J. Bacteriol. 1: 50-54.
- Becker, G.W. and R.L. Lester, 1977. Changes in phospholipids of *Saccharomyces cerevisiae* associated with inositol-less death. J. Biol. Chem. 23: 8684-8691.
- Bleigh, E.G. and W.J. Dyer, 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.
- Chakravarti, D.N. and P. Chakravarti, 1981. Studies on phospholipase activities in *Neurospora crassa* conidia. Arch. Biochim. Biophys. 2: 392-502.
- Chen, P.S. Jr., T.Y. Toribara, and H. Warner, 1956. Microdetermination of phosphorous. Anal. Chem. 28: 1756-1758.
- Cullis, P.R. and B. De Kruijff, 1979. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. Biochim. Biophys. Acta. 559: 399-420.
- Dawson, C.R., A.F. Drake, J. Helliwell, and R.C. Hider, 1978. The interaction of bee melittin with lipid bilayer membranes. Biochim. Biophys. Acta. 510: 75-86.
- Helenius, A. and K. Simons, 1975. Solubilization of membranes by detergents. Biochim. Biophys. Acta. 415: 29-79.
- Hossack, J.A., V.C. Sharpe, and A.H. Rose, 1977. Stability of the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae* enriched with phosphatidylcholine or phosphatidylethanolamine. J. Bacteriol. 2: 1144-1147.
- Jacques, N.A., L. Hardy, K.W. Knox, and A.J. Wicken, 1980. Effect of tween 80 on the morphology and physiology of *Lactobacillus salivarius* strain IV CL-37 grown in a chemostat under glucose limitation. J. Gen. Microbiol. 119: 195-201.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Maher, P. and S.J. Singer, 1984. Structural changes in membranes produced by the binding of small amphiphatic molecules. Biochemistry. 23: 232-240.
- Packer, N.H. and A.M. Bersten, 1977. Effect of tween 80 on the morphology of *Trigonopsis variabilis*. J. Gen. Microbiol. 101: 233-236.
- Pringle, A.T. and A.H. Rose, 1979. Phospholipid composition and the effect of sodium dodecyl sulfate on *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 111: 337-342.
- Proulx, and C.K. Fung, 1966 Metabolism of phosphoglycerides in *E. coli*. IV. The positional specificity and properties of phospholipase A. Can. J. Biochem. 47: 1125-1128.
- Sandermann, H., 1978. Regulation of membrane enzymes by lipids. Biochim. Biophys. Acta. 515: 209-237.
- Weete, J.D., D.J. Weber, and J.L. Laseter, 1970. Lipids of *Rhizopus arrhizus* Fisher. J. Bacteriol. 3: 536-540.
- Weete, J.D., 1980. Glycerophospholipids. Lipid biochemistry of fungi and other organisms. Plenum Press, New York. 157-179.
- Yasutomi, N., 1984. Turnover of inositol

- phospholipids and signal transduction. Science. Sep.: 1365-1369.
21. Yoshie, O. and D.C. White, 1970. Cardiolipin-specific phospholipase D activity in *Haemophilus parainfluenzae*. J. Bacteriol. 1: 111-115.
  22. Youn, H.J. and Y.K. Choi, 1985. The productivity of amylase and phosphatases in submerged culture of *Rhizopus oryzae* supplemented with surfactants. J. Kor. Ind. Microbiol. in press.

(Received Oct. 25, 1985)