

환경인자가 리파제의 가수분해 특성에 미치는 영향

박 건 규 · 김 은 기 · 허 병 기

(주) 무궁화/부설 NUVO 연구소, ¹인하대학교 공과대학교 화공·고분자·생물공학부
(접수 : 1999. 7. 31., 게재승인 : 1999. 8. 13.)

The Effect of Environmental Factors on the Hydrolysis Characteristics of Lipase

Kun-Kyu Park, Eun-Ki Kim¹, and Byung-Ki Hur^{†1}

NUVO R&D Institute, Mukunghwa Co., Ltd., Seoul, Korea

¹School of chemical, Polymer, and Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

(Received : 1999. 7. 31., Accepted : 1999. 8. 13.)

The effects of environmental and composition factors, such as reaction time, metal ions, pH, agitation speed, the weight ratio of water to oil, and the weight of enzyme, on the hydrolysis of oils by Lipase-OF were investigated. In case of oils with low melting point, the optimum temperature of hydrolysis where the enzyme activity was maximum was 37°C. However, when the melting temperature was higher than 40°C, the optimum temperature was around the fusion temperature. The activity of Lipase-OF decreased very rapidly with the increase of temperature in the range of higher than 45°C and the activity perished above 65°C. The effect of agitation speed was investigated from 150 to 650 rpm. The hydrolysis of oils increased as the agitation speed increased up to 350 rpm, but it did not increase any more above 350 rpm. The weight ratio of water to oil was changed from 1 : 9 to 9 : 1 for the investigation of the effect on the hydrolysis. The weight ratio for maximum hydrolysis was 1 : 1. Ca²⁺ and Mg²⁺ among various metal ions had some effect on the stimulation of hydrolysis. The optimum concentration of the ions was about 100ppm at which the hydrolysis increased, compared with that of distilled water, by 2 to 3%. The Optimum pH of Lipase-OF was 7. The hydrolysis decreased as the pH decreased and also decreased as the pH increased. The content of enzyme affected the hydrolysis of oil. The hydrolysis increased with the content of Lipase-OF in the range of less than 0.013 wt% of substrate. However, the increase of hydrolysis with the content of Lipase-OF ceased above 0.013 wt%. The experiments investigating the effect of environmental and composition factors on the hydrolysis of oils showed that the optimum temperature was 37°C, the pH 7, the concentration of Ca²⁺ or Mg²⁺ 100 ppm, the agitation speed 350 rpm, the weight ratio of water to oil 1 : 1, and the content of Lipase-OF 0.013 wt% of substrate.

Key Words : environmental and composition factor, hydrolysis, enzyme activity, agitation speed

서 론

지방산은 유지를 가수분해할 때 글리세롤과 함께 생성된다. 지방산 생성의 주원료로는 우지(beef tallow), 팜유(palm oil) 등이 사용된다. 생성된 지방산은 비누, 화장품 및 식품 유효제의 원료로 사용된다. 현재 이용되고 있는 유지의 가수분해방법으로는 고온·고압분해법(Colgate-Emery process), 검화법(saponification), 알콜리시스법(alcoholysis method) 및 효소가수분해법(enzymatic hydrolysis method) 등이 알려져 있다(1,6-8). 이들 공정중 상업적 목적으로 가장 많이 이용되는 공정은 고온·고압 열분해법이다(1). 온도 190°C 및 압력 14기압에서 가수분해시키

면 9내지 10시간의 비교적 짧은 반응시간동안, 90% 이상의 가수분해율을 얻을 수 있는 것이 고온·고압의 장점이다. 반면, 에너지소비가 과다하고, 고온고압에 따른 특수설비 투자비와 소요 부지가 클 뿐만 아니라 생성지방산의 착색, 저급지방산과 불순물의 생성에 따른 품질저하와 폐수발생량의 증가라는 여러 단점도 내포하고 있다(2-4). 이에 비하여 효소 리파제에 의한 지방산 생성공정은 상온·상압 공정으로 에너지 비용의 절감, 공장 설비 및 부지의 절감, 생성지방산 및 글리세롤의 품질향상이라는 장점이 있다. 그러나 효소가격이 고가일 뿐만 아니라 온도, pH, 금속이온농도, 교반속도 등 여러 환경 인자에 영향을 크게 받는다는 단점도 있다(5).

효소 리파제에 의한 유지의 가수분해반응은 가역반응이다. 반응계 내의 수분이 충분할 경우에는 유지가 리파제에 의하여 유리지방산과 글리세롤로 가수분해되는 정반응이 일어나나 효소의 활성을 유지시키는데 필요한 최소한의 물만 존재하는 경우 글리세롤과 유리지방산이 에스테르화 반응에 의하여 유지로 전환되

[†] Corresponding Author : School of Chemical, Polymer, and Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : 032-860-7512, Fax : 032-875-0827
e-mail : biosys@dragon.inha.ac.kr

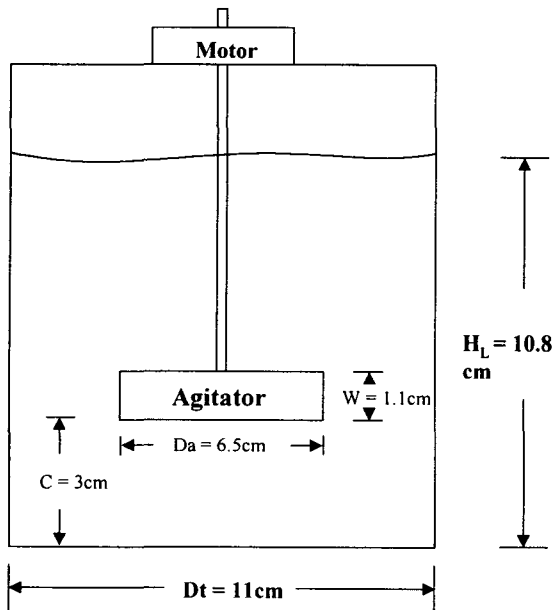


Figure 1. Enzyme reactor.

는 역반응이 일어나게 된다. 리파아제의 이런 특성을 이용하여 반응계 내의 물의 양을 적절히 조절하면 화학적 방법으로는 생산하기 어려운 이성질체의 합성도 가능하게 된다(9-11). 유지 분자인 트리글리세라이드는 글리세롤 한 분자와 지방산 세분자의 에스테르 결합으로 이루어져 있다. 리파제중에는 세 종류의 에스테르 결합 위치에 따라서 특이하게 반응하는 특성을 나타내는 리파제도 있다. 글리세롤의 첫 번째 탄소와 세 번째 탄소에 결합한 지방산 분자에 공격하여 유리지방산으로 가수분해시키는 리파제는 1,3-특이적 리파제라고 하며 에스테르 결합 위치에 관계없이 가수분해시키는 리파제는 비특이적 리파제라고 한다. 1,3-특이적 리파제는 특수한 위치에만 촉매작용을 한다는 특성이 있으나 유지를 지방산으로 가수분해시키는 반응속도가 느리다는 단점도 있다(9,10). 이에 반하여 비특이적 리파제는 위치에 대한 특이성이 없는 반면 일반적으로 가수분해 속도가 빠르다는 특성을 지니고 있다.

리파제에 의한 유지의 가수분해공정이 실용화되기 위하여서는 온도, pH, 금속이온농도, 물과 유지의 부피비, 효소량 등의 환경 및 조성인자가 리파제의 반응특성에 미치는 영향을 정확히 규명하여야 한다. 따라서 본 연구는 현재 공업적으로 응용되고 있는 유지의 고온고압 가수분해공정을 리파제를 사용한 생물공정으로 전환시키기 위한 기초연구로 위의 환경 및 조성인자가 비특이성 리파제인 Lipase-OF의 반응특성에 미치는 영향을 정량적으로 규명하였다.

재료 및 방법

Figure 1은 본 연구에서 사용한 작동부피 1 L의 회분식 반응기를 나타내고 있다. 여러 종류의 유지를 가수분해시켜가면서 반응온도, pH, 교반속도, 금속이온, 유지와 물의 무게비 및 효소량 등의 환경 및 조성인자가 *Candida cylindracea*에서 유래된 리파제의 가수분해 특성에 미치는 영향을 규명하였다. 반응온도는 35°C와 75°C 사이의 범위, pH는 2.66과 11.3사이의 범위, 교

반속도는 150 rpm과 650 rpm사이의 범위, 유지와 물의 무게비는 9:1과 1:9사이의 범위, 금속이온은 Ca^{2+} 와 Mg^{2+} , 효소량은 반응유지의 0.0002 wt%와 0.1 wt% 사이의 범위에서 각각의 환경 및 조성인자의 변화가 리파제의 가수분해 특성에 미치는 영향을 규명하였다.

효소 및 기질

Candida cylindracea 유래의 비특이적 효소 Lipase-OF 360,000을 일본 MEITO SANGYO 社에서 구입하여 사용하였다. 이 리파제는 360,000 U/g의 높은 역가를 나타내는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 정제 올리브유(Olive oil, Junsei chemical), 정제우지(beef tallow), 정제 팜스테아린(RBD palm stearin), 국산우지(fat), 팜커널(palm kernel) 및 옥수수유를 기질로 사용하였다.

유리지방산의 정량

본 연구에서는 생성된 유리지방산의 양을 흡광도법과 TLC (Thin Layer Chromatography)법에 의하여 측정하였다. 가수분해시간에 따라서 채취한 시료의 상층부로부터 50 μ L를 취하여 50 mL의 아이소옥탄에 주입한 후 큐퍼릭아세테이트 1 mL를 첨가하고, 1분 동안 와동시켰다. 상등액을 취하여 715 nm에서 흡광도를 측정한 후 표준곡선과 비교하여 지방산의 양을 결정하고 다음식에 대입하여 유지의 가수분해율을 계산하였다.

$$\text{가수분해율} = \frac{\text{유리지방산}(\mu\text{mol})}{(\text{비누화값})(1000/56.1)(\text{유지g})} \times 100(\%)$$

반응시간에 따라 채취한 시료를 3600 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 기름층에서 100 μ L의 시료를 취하여 10 mL의 클로로포름에 녹였다. 박층크로마토그래피(CHROMROD-SIII)에 시료 1 μ L를 점적하여 100 mm의 높이로 전개하였다. 전개용매로는 부피비가 70:30:2인 벤젠, 클로로포름, 아세트산의 혼합물을 2.0 L/min로 하였으며 scan speed는 30초로 하였다. 결과처리에는 일본 IATRON社의 IATROCODER TC-21을 사용하였으며 Attenuation chart speed는 10.0 cm/min으로 하였다.

결과 및 고찰

온도의 영향

반응온도가 Lipase-OF 360,000의 역가에 미치는 영향에 대한 연구결과에 의하면 30°C 내지 40°C 사이에서 최대 활성을 나타내며 45°C까지는 온도의 증가에 따라 역가의 감소가 크지 않고 보고되어 있다(12,13). 실제 가수분해에 사용되는 유지중 율점이 낮은 올리브유, 팜커널, 야자유에 대하여서는 최적온도 범위에서 가수분해반응을 수행하는데 문제가 없으나 율점이 40°C 이상인 팜스테아린, 우지 등은 효소활성이 최적온도범위에서 가수분해반응을 수행하기 어렵다. 따라서 본 연구에서는 반응온도에 따른 효소 Lipase-OF 360,000의 가수분해율이 최대가 되는 최적온도를 구하고자 하였다.

Figure 2는 가수분해반응 24시간에서 여러 가지 종류의 유지의 온도에 따른 가수분해특성을 나타내고 있다. 사용된 효소 Lipase-OF 360,000의 양은 기질의 0.013 wt%, 사용된 rpm은 350, 물과 유지의 무게비는 1 대 1, pH는 7이었다. 이 결과에

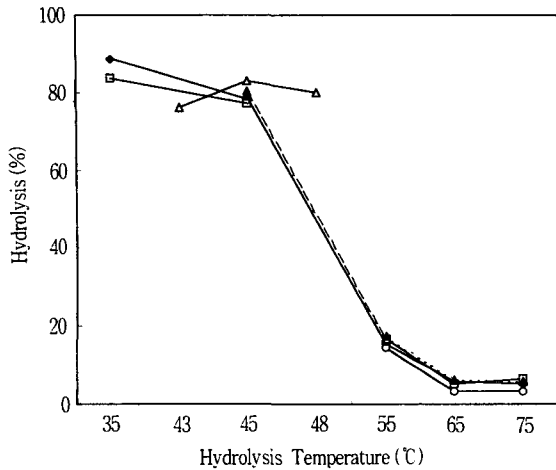


Figure 2. Hydrolysis characteristics of olive oil(◆), corn oil(□), beef tallow(▲), palm oil(○), fat(△) according to hydrolysis temperature.

의하면 반응온도 45°C 이상에서는 유지의 종류에 관계없이 온도가 상승하면 반응 24시간에서의 가수분해율은 급격히 감소하였다. 현재 지방산생산에 산업적으로 사용되고 있는 국산우지의 용융점이 40.5°C인 점을 고려하여 45°C 근방의 온도에 대한 가수분해율을 비교하여 보면 42°C인 경우 반응 24시간의 가수분해율은 76%, 45°C인 경우 83%, 48°C인 경우 80%를 나타내어 45°C에서 가수분해율이 가장 높았다. 물-유지 계에서 온도가 일정하면 가수분해속도는 유화된 물의 입자 분포 즉 입자 표면적에 영향을 크게 받는 것으로 보고되어있다(14). 온도가 상승하면 유화된 물 입자의 크기가 작게되어 표면적이 상승하여 가수분해율이 증가하나 온도상승에 따른 효소활성의 저하로 인하여 가수분해속도가 감소하게 된다. 따라서 용융점이 40°C를 상회하는 유지인 경우 가수분해율을 최대로 하기 위한 최적온도는 이들 두 인자의 영향을 동시에 고려하여 규명하여야 한다.

교반 속도의 영향

다른 환경인자의 조건이 동일할 경우 물-유지 계의 유화상태는 교반자의 교반속도에 영향을 크게 받는다(12). Figure 3은 기질로 국산우지를 사용하고, 효소 Lipase-OF 360,000의 양을 기질의 0.013 wt%, 물과 국산우지의 무게비를 1 대 1, 반응온도를 37°C, pH를 7 rpm을 매개변수로한 경우, 반응시간에 대한 가수분해율의 결과이다. 가수분해시간이 4시간 이하이고 교반속도가 450 rpm 이하인 경우, 가수분해율은 rpm에 따라 큰 차이를 나타내었으나 450 rpm 이상에서는 교반속도증가가 가수분해율의 증감에 영향을 미치지 아니하였다. 가수분해 24시간에서 교반속도에 따른 가수분해율을 고찰하여 보면 350 rpm 이상에서는 교반속도의 증가에 상관없이 일정한 가수분해율을 나타내었다. 에너지 소비량을 감안하면 유지의 최적교반속도는 350 rpm 부근의 값을 알 수 있었다.

유지와 물의 무게비의 영향

물-유지 계에서 효소는 분산상의 표면에 단층을 형성하여 유지와 접촉에 의하여 촉매역할을 수행하는 것으로 보고되어 있다(15). 교반속도와 효소량을 일정하게 고정시켰을 경우 유지에 대한 물의 양은 분산상의 액적입자크기 분포에 큰 영향을 미칠 뿐

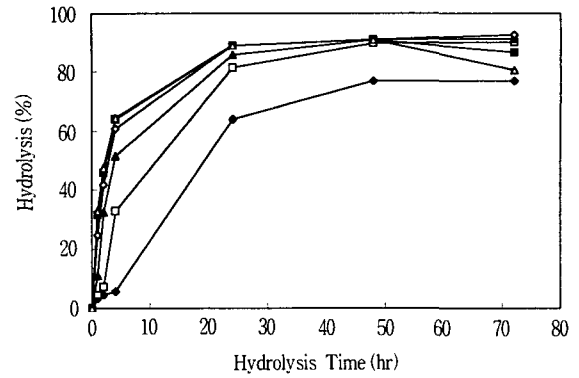


Figure 3. Effect of agitation speed on the hydrolysis. ◆ : 150 rpm, □ : 250 rpm, ▲ : 350 rpm, ◇ : 450 rpm, ■ : 550 rpm, △ : 650 rpm.

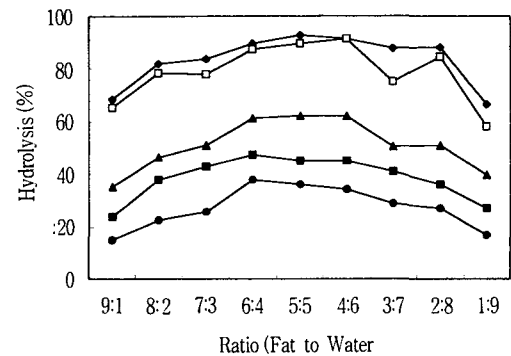


Figure 4. Effect of the weight ratio of water to fat on the hydrolysis. ◆ : 48 hr hydrolysis, □ : 24 hr hydrolysis, ▲ : 4 hr hydrolysis, ■ : 2 hr hydrolysis, ● : 1 hr hydrolysis.

만 아니라 물-유지 계면에 분포하는 효소의 농도에도 많은 영향을 미칠 것이다. Figure 4는 기질을 국산우지로 하고, 효소량을 기질의 0.013 wt%, 교반속도를 350 rpm, 반응온도를 37°C, pH를 7로 한 경우, 유지와 물의 무게비와 가수분해율 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 가수분해시간에 관계없이 유지에 대한 물의 무게비가 5:5 근방에서 최대의 가수분해율을 나타내었다. 실제 산업현장에 적용할 경우 가수분해반응이 끝난 후 물층을 증류하여 글리세린을 생산하므로 물의 양이 많으면 많을수록 증류하는데 소요되는 에너지 비용이 증가하게 된다. 따라서 유지와 물 사이의 무게비를 6:4 내지 5:5 사이로 결정하는 것이 바람직하다.

금속이온의 영향

가수분해에 사용되는 물의 영향을 규명하기 위하여 글리세린, 증류수, 지하수, 수돗물 및 이온교환수를 사용하여 가수분해실험을 수행하였다. Figure 5는 팜스테아린과 우지의 무게비가 7:3인 혼합기질에 Lipase-OF 0.013 wt%를 첨가한 후 42°C, 350 rpm, pH 7, 반응시간 48시간으로 가수분해한 실험결과이다. 동일한 가수분해시간에서 사용한 물이 가수분해율에 미치는 영향을 분석하여 보면 이온교환수를 사용한 경우의 가수분해율이 가장 낮았으며 지하수를 사용한 경우의 가수분해율이 가장 높았다. Wills(16)는 금속이온이 유지의 가수분해율에 미치는 영향에

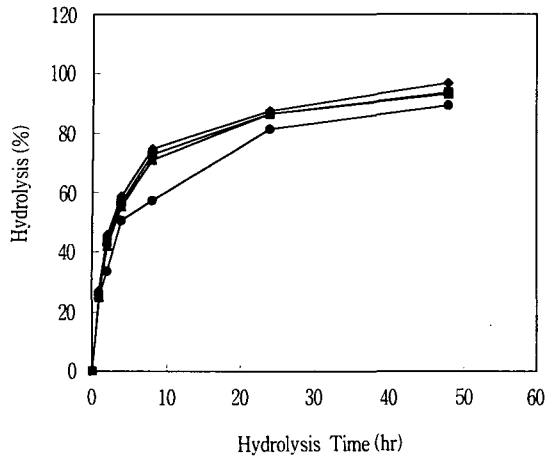


Figure 5. Effect of metal ions on the hydrolysis.
 ◆ : underground water, ■ : water distilled from the solution of glycerin and water, ▲ : tap water, ● : water ion exchanged.

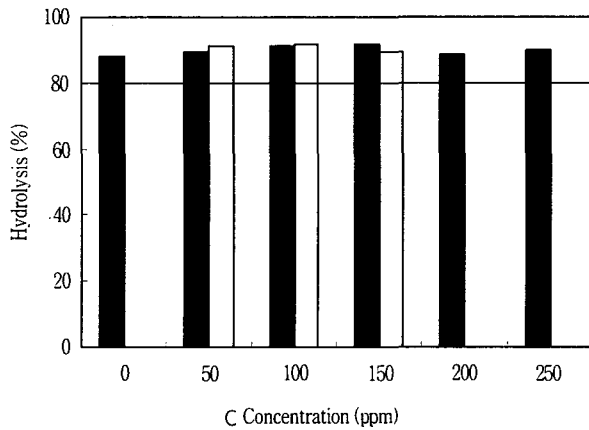


Figure 6. Effect of Ca^{2+} (■) and Mg^{2+} (□) ions on the hydrolysis.

대한 연구를 통하여 Ca^{2+} 이온은 트리글리세라이드의 구성지방산 중 탄소사슬이 긴 지방산의 가수분해속도를 증가시킬 뿐만 아니라 탄소 사슬이 짧은 지방산의 가수분해속도증가에도 영향을 미친다고 보고하였다. 따라서 본 연구의 지하수에 의한 가수분해율의 상승효과는 지하수 속에 존재하는 금속이온 특히 Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 이온의 영향이 큰 것으로 해석할 수 있다. Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 이온이 가수분해율에 미치는 영향을 보다 정량적으로 규명하기 위하여 가수분해 48시간에서의 증류수를 이용한 가수분해율과 증류수에 Ca^{2+} 이온과 Mg^{2+} 이온을 첨가할 경우에 대한 가수분해율을 비교하였다(Figure 6). Ca^{2+} 이온의 경우 150 ppm 부근에서 가장 큰 가수분해율 상승효과를 나타내었으며 Mg^{2+} 인 경우 100 ppm 근방에서 상승효과가 컸다. 따라서 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 이온 모두 효소 Lipase-OF 360,000의 활성에 기여하여 가수분해율을 상승시키는 효과를 나타낸다고 해석할 수 있다.

pH의 영향

본 연구에서는 pH 변화가 Lipase-OF 360,000의 가수분해율에 미치는 영향을 규명하기 위하여 Table 1에 제시된 6가지 타

Table 1. Various buffer solutions.

기준 pH	완충용액	실제 pH
3	0.05 M 시트르산 완충용액	2.66
4	0.1 M 아세트산 완충용액 0.05 M 시트르산 완충용액	3.99 3.85
5	0.1 M 아세트산 완충용액 0.05 M 시트르산 완충용액	5.14 4.97
6	0.05 M 시트르산 완충용액 0.1 M 인산 완충용액	5.94 6.15
7	0.1 M 인산칼륨-인산나트륨 완충용액 0.1 M 인산 완충용액	7.10 7.13
8	0.1 M 인산칼륨-인산나트륨 완충용액 0.1 M Tris 완충용액	8.18 8.19
9	0.1 M Tris 완충용액 0.1 M 탄산 완충용액	9.12 8.97
10	0.1 M 탄산 완충용액	10.29
11	0.1 M 탄산 완충용액	11.30

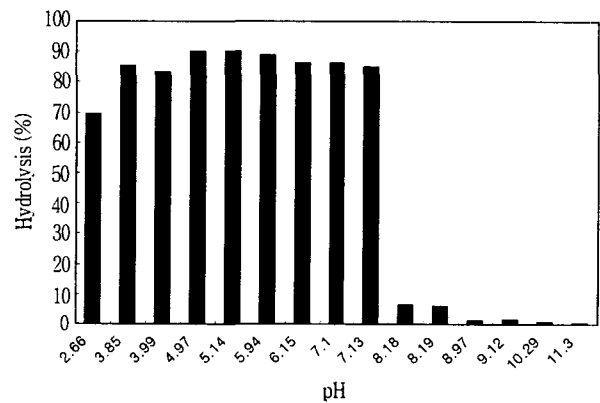


Figure 7. Effect of pH on the hydrolysis.

입 15종류의 완충용액(17)을 사용하였다. 교반속도를 350 rpm, 유지와 물과의 무게비를 1 : 1, 반응온도를 37℃, 효소량을 0.013 wt%, 기질을 우지로 하고, 48시간 가수분해시킨 후의 가수분해율을 사용한 완충용액에 따라서 나타낸 결과가 Figure 7이다. 이 결과에 의하면 pH 8 이상에서는 pH가 증가하면 가수분해율은 급격히 감소하였으며, pH 7을 중심으로 하여 산성쪽으로 pH가 감소하면 가수분해율이 완만하게 감소하였다. 또한 pH 5 내지 7 범위에서는 pH의 변화가 Lipase-OF 360,000의 가수분해율에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 이런 결과는 본 연구에서 사용한 효소 Lipase-OF 360,000은 pH는 물론 반응에 관여한 이온에 의해서도 영향을 받기 때문에 동일한 pH조건 하에서도 사용된 완충용액의 이온이 서로 다르면 역가가 다르게 나타날 수 있다고 해석할 수 있다. 그러나 문헌에서 제시한 최적 pH의 범위와 본 연구의 최적 pH범위는 5내지 7로 서로 일치하였다(13).

효소량의 영향

Lipase-OF 360,000은 고가이기 때문에 가능한 적은 양의 효

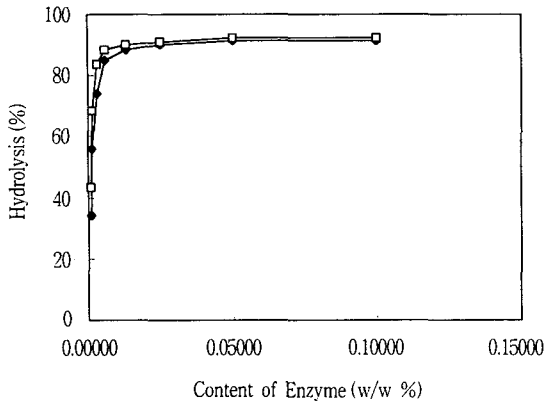


Figure 8. Effect of amount of enzyme on the hydrolysis.

◆ : 24 hr hydrolysis, □ : 48 hr hydrolysis.

소로 짧은 반응시간에 최대의 가수분해율을 얻는 것이 중요하다. Figure 8은 반응온도 37°C, 교반속도 350 rpm, 유지와 물의 무게비 1 : 1, pH 7, 반응시간을 24시간, 48시간으로 고정시켰을 때 Lipase-OF 360,000의 사용량과 가수분해율 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 효소량이 기질량의 0.013 wt% 이하에서는 효소량이 증가하면 가수분해율은 급격히 증가하나 0.013 wt% 이상에서는 효소의 증가량에 따른 가수분해율의 증가는 대단히 완만하게 되며 0.05 wt% 이상에서는 가수분해율이 일정하였다. 물-유지의 가수분해 반응계에서 물의 부피가 유지의 부피보다 적을 경우 분산되는 물의 액적 표면에 효소가 단층을 형성하여 유지와의 접촉을 통하여 촉매작용을 하고 있다는 연구결과가 보고되어 있다(12). 반응계 내에서의 물의 양이 고정되었을 경우 물 표면에 분산되어 단층을 형성하는 효소량은 최대값을 갖게 되며 그 이상의 효소는 이중층을 형성하는데 소요될 것이며 이중층의 밀층을 형성하는 효소는 실제반응의 촉매역할을 수행하지 못하게 될 것이다. Figure 8의 연구결과에 의하여 물과 유지의 무게비가 1 : 1인 경우 물표면에서 효소가 단층을 형성하는데 필요한 효소의 최대량은 기질의 0.013 wt% 근방의 값을 알 수 있다.

요 약

유지의 가수분해시, 반응온도, 금속이온, pH, 교반속도, 물-유지의 무게비 및 효소량 등의 환경 및 조성인자가 효소 Lipase-OF의 역가 및 가수분해특성에 미치는 영향을 규명하였다. 융점이 낮은 유지의 경우 Lipase-OF의 활성이 가장 높은 온도는 37°C 근방이었으나 융점이 40°C 이상인 유지에 대하여서는 융점근방에서 가수분해율이 가장 높았다. 45°C 이상의 온도 범위에서는 유지의 종류에 관계없이 온도가 상승하면 Lipase-OF의 활성이 급격히 감소하여 65°C 이상에서는 효소의 활성이 정지되었다. 교반속도를 150, 250, 350, 450, 550 및 650 rpm으로 변화시켜가면서 유지의 가수분해실험을 수행하여 350 rpm 이하에서는 교반속도가 상승하면 가수분해율도 상승하였으나 교반속도 350 rpm 이상에서는 교반속도 상승에 대한 가수분해율의 변화를 찾아볼 수 없었다. 유지와 물의 무게비를 9 : 1에서 1 : 9까지 변화시켜가면서 가수분해실험을 수행하여 일정한 가수분해 시간에서 가수분해율이 가장 높은 무게비가 1 : 1 근방의 값

임을 규명하였다. 금속 이온 중 Ca²⁺와 Mg²⁺ 이온이 가수분해율 상승에 기여하였다. 금속이온이 없는 경우에 비하여 Ca²⁺ 또는 Mg²⁺ 이온 농도가 100 ppm 근방의 값일 때 2 내지 3%의 가수분해율 증가효과를 나타내었다. Lipase-OF에 대한 최적 pH는 7근방이었다. pH가 산성쪽으로 감소하면 가수분해율도 감소하였으며 알카리쪽으로 증가하여도 가수분해율이 감소하였다. 기질의 0.00075 wt% 와 0.1 wt% 범위내에서 Lipase-OF량이 가수분해율에 미치는 영향을 규명하였다. 효소량 0.013 wt% 이하에서는 효소량이 증가하면 가수분해율도 증가하였으나 0.013 wt% 이상에서는 효소량이 증가하여도 가수분해율은 증가하지 않았다. Lipase-OF의 가수분해율에 미치는 환경 및 조성인자의 영향에 대한 실험을 통하여 최적온도는 37°C, 최적 pH는 7, Ca²⁺ 또는 Mg²⁺의 최적농도는 100 ppm, 최적교반속도는 350 rpm, 유지와 물의 최적무게비는 1 : 1 및 최적 효소량은 유지의 0.013 wt%임을 규명하였다.

감 사

본 연구는 통상산업부의 공업기술기반기초사업(942-06-01)의 일환으로 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Taylor, F., M. J. Kurantz and J. C. Craig, Jr (1992), Kinetics of Continuous Hydrolysis of Tallow in a Multi-Layered Flat-Plate Immobilized-Lipase Reactor, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 591-594.
2. Linfield, W. M. (1988), Enzymatic fat splitting, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, 131-132.
3. Park, Y. K., G. M. Pastone, and M. Mitui de Almeida (1988), Hydrolysis of Soybean Oil by a Combined Lipase System, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, 252-254.
4. Kodera, Y., H. Nishimura, A. Matsushima, M. Hiroto, and Y. Inada (1994), Lipase Made Active in Hydrophobic Media by Coupling with Polyethylene Glycol, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**, 335-338.
5. 岩井美枝子(1990), *油脂*, **43**, 83-92.
6. 各糖産業(株) (1971), 油脂の分解方法, *日本特許公報* 昭 46-16509.
7. 各糖産業(株) (1971), 油脂分解酵素による 固體脂肪の分解方法, *日本特許公報* 昭 46-28039.
8. 日本油脂(株) (1982), 脂肪の加水分解方法, *日本特許公報* 昭 57-57799.
9. Miller, C., H. Austin, L. Posorske and J. Gonzalez (1988), Characteristics of an Immobilized Lipase for the Commercial Synthesis of Esters, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, 927-931.
10. Holmberg, K. and E. Osterberg, (1988), Enzyme Preparation of Monoglycerides Microemulsions, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, 1544-1548.
11. Pecnik, S. and Z. Knez (1992), Enzymatic Fatty Esters Synthesis, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 261-265.

12. Yamane, T., M. Mozammel. Hoq., I. Sumiyo. and S. Shoichi., (1986), Glycerolysis of Fat by Lipase, *J. Jpn. oil chem. soc.*, **35**, 625-631.
13. 김인호, 박태현 (1991), 효소에 의한 우지의 가수분해반응, *Kor. J. Appl. Microbiol.*, **19**, 377-382.
14. J. G. T. Kierkels and L. F. W. Vleugels, (1994), Pseudomonas Fluorescence Lipase Adsorption and Kinetics of Hydrolysis in a Dynamic Emulsion System, *Enzyme Microb. Technol.* , **16**, 513-521.
15. Torres, C. and C. Otero (1996), Influence of the Organic Solvents on the Activity in Water and the Conformation of Candida Rugosa Lipase : Description of a Lipase-Activating Pretreatment, *Enzyme Microb. Technol.*, **19**, 594-600.
16. Wills, E. D. L (1960), The Relation of Metals and -SH Groups to the Activity of Pancreatic Lipase, *Biochim. Biophys. Acta*, **40**, 481-490.
17. 한국 생화학회 교재편찬위원회, (1990), 실험생화학, 5th ed, p. 498-500, 탐구당.