

Aspergillus oryzae 유래의 리파제 Lipolase-100T에 의한 물고기 기름의 가수분해 특성 규명

우 동 진 · 조 귀 준 · 허 병 기
인하대학교 공과대학교 화공 · 고분자 · 생물공학부
(접수 : 1998. 8. 24., 게재승인 : 1999. 5. 3.)

Investigation of the Hydrolysis Characteristics of Fish Oil by Means of Aspergillus oryzae Lipase Lipolase-100T

Dong-Jin Woo, Kwi-Joon Cho, and Byung-Ki Hur†
School of Chemical, Polymer, and Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received : 1998. 8. 24., Accepted : 1999. 5. 3.)

Fish oil was hydrolyzed with *Aspergillus oryzae* lipase, Lipolase-100T. The hydrolysis characteristics of Lipolase-100T were investigated. Lipolase-100T showed 1,3-positional specificity which hydrolyzed acyl chains combined on the 1 or 3 position of triglyceride into free fatty acids. Lipolase-100T represented another property that the saturated fatty acids composing the triglyceride were hydrolyzed more easily than the polyunsaturated fatty acids (PUFAs). n-3 PUFAs, such as C16:4, C20:5 and C22:6, were hardly hydrolyzed, so that the concentrations of those in the mixture of glycerides were increased according to hydrolysis time. Especially docosahexaenoic acid (DHA), C22:6 showed the highest increase in the concentration. This result explained that n-3 PUFAs were combined on 2-position of triglyceride. When the hydrolysis of fish oil with Lipolase-100T 0.4 wt% was performed for 120 hr, n-3 PUFAs wt% was increased to 50 wt% in the mixture of glycerides. This result was obtained due to the 1,3-positional specificity of Lipolase-100T and positional specificity of n-3 PUFAs.

Key Words : *Aspergillus oryzae* lipase, 1,3-positional specificity, Lipolase-100T polyunsaturated fatty acids (PUFAs), docosahexaenoic acid (DHA)

서 론

지질의 가수분해효소인 리파제는 기질과의 반응특성에 따라서 위치특이성(positional specificity) 리파제, 아실체인특이성(acyl chain specificity) 리파제, 부분글리세라이드 분해특이성 리파제, 인지질 및 지단백질 분해특이성 리파제로 구분된다(1,2).

위치특이성을 나타내는 리파제로는 *Rhizopus javanicus* lipase(3), *Rhizopus niveus* lipase(4) 및 *Aspergillus niger* lipase(1) 등이 있으며 이들은 주로 지질을 구성하고 있는 글리세롤 탄소의 1과 3의 위치에만 작용하여 가수분해반응을 일으키는 1,3-위치특이성을 나타내고 있다. 아실체인특이성을 나타내는 리파제로는 *Mucor miehei* lipase(5), *Candida cylindracea* lipase 및 *Rhizopus arrhizus* lipase(6) 등이 있으며 이들 리파제는 지질을 구성하는 지방산의 탄소수, 이중결합 수에 따라서 반응속도를 달리하는 특성을 나타내고 있다(7). 부분글리세라이드 분해특성을 나타내는 리파제는 트리글리세라이드보다 디글리세라이드나 모노글리세라이드를 분해하는 속도가 훨씬 큰 반응

특성을 나타내고 있으며 인지질 및 지단백질을 분해하는 특성의 리파제는 대부분 반응속도가 느리고 1,3-위치특이성을 나타낸다(2). 리파제의 반응특이성은 지질을 구성하는 특정 지방산의 농축공정이나 유리지방산 생산을 위한 가수분해공정에 많이 이용되고 있다.

V. B. Yadwad(4)는 다중불포화 지방산이 글리세라이드의 2번 위치에 많이 존재한다는 지질의 구조적 특성과 리파제의 1,3-위치특이성을 이용하여 글리세라이드 혼합물내의 eicosapentaenoic acid(EPA)와 docosahexaenoic acid(DHA)의 농도를 20.08 wt%와 18.30 wt%까지 농축하기도 하였다. Yuji Shimada(7)와 Yukihisa Tanaka(1)는 아실기의 탄소수와 이중결합 수에 특이성을 나타내는 리파제를 이용하여 글리세라이드 혼합물내의 DHA 함량을 20 내지 30 wt% 범위까지 농축하기도 하였다.

본 연구에서는 Novo Nordisk사에서 생산판매하고 있는 *Aspergillus oryzae* 유래의 Lipolase-100T를 사용하여 물고기 기름의 가수분해특성을 규명하였다. 특히 Lipolase-100T의 가수분해특이성을 규명함은 물론 이들 특이성을 바탕으로 물고기 기름을 구성하고 있는 지방산의 위치특이성과 다중불포화 지방산의 농축 특성도 규명하려고 하였다.

† Corresponding Author · Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel. : 032-860-7512, Fax : 032-875-0827

재료 및 방법

Aspergillus oryzae 유래의 리파제를 사용하여 물고기 기름의 가수분해 특성을 규명하는 실험을 수행하였다. 회분식 반응기에서 기름과 물의 부피비를 1대1, 반응온도를 38°C, 교반속도를 250 rpm으로 고정한 후 가수분해 반응을 진행시켰다. 가수분해반응 시작후 0.5, 2, 4, 7, 10, 15, 24, 48, 72 및 120 시간 후에 각각의 시료를 시험관에 취한 후 즉시 100°C의 끓는 물에 넣어 효소의 반응을 정지시켰다.

각 시료의 일부는 생성혼합물내의 트리글리세라이드, 디글리세라이드, 모노글리세라이드 및 유리지방산의 조성을 확인하기 위하여 Thin Layer Chromatography(TLC) 분석에 사용하였으며 나머지 시료는 탈산공정을 거친 후 생성물내의 글리세라이드 혼합물을 구성하고 있는 지방산의 조성비를 확인하기 위하여 가스 크로마토그래피 분석에 사용하였다.

효 소 : *Aspergillus oryzae* 유래의 Lipolase-100T를 Novo Nordisk사에서 구입하여 사용하였다. 건조상태의 Lipolase-100T를 4°C냉장실에서 보관하면서 가수분해 반응에 사용하기전 그 역가가 구입시의 역가와 동일한지를 확인한 후 실험에 사용하였다. Lipolase-100T의 역가는 문헌(8)의 방법을 사용하여 측정하였다.

기 질 : 본 연구에서 기질로 사용한 물고기기름은 노르웨이 LIPRO AS社의 제품으로 정어리와 넵탕이류의 해양어류를 잘게 썰어 삶은 후 압착하여 원료유를 얻은 후 탈산, 진공건조, 냉각여과, 탈취 등의 공정을 거쳐 얻은 것으로 EPA를 약 19%, DHA를 약 13%를 함유하고 있다.

탈산공정 : 한국공업규격(9)과 Yukihsa Tanaka의 방법(1)을 변형시켜 탈산공정을 수행하였다. 반응 시간별로 2 mL의 시료를 취하여 에펜도르프튜브에 주입한 후 100°C 끓는 물에서 10분간 가열함으로써 효소의 활성을 정지시켰다. 3600 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상을 분리한 후 기름 층에서 0.6 mL의 시료를 취하여 시험관에 주입한 후 아세톤과 헥산을 각각 3 mL씩 첨가하고 교반시켜 용해시켰다. 유리지방산을 제거하기 위하여 용해된 시료를 0.2 N NaOH 수용액 100 mL에 가한 후, 약 5분 가량 교반시키고 2시간 가량 정지시켰다. 상분리가 일어나면 하층은 제거하고 상층은 증류수로 여러 번 세척하여 기름층 내의 잔여 NaOH를 제거시켰다. 유리지방산이 제거된 상층을 분리하여 용매를 증발시켜 가수분해되지 않은 트리글리세라이드, 디글리세라이드 및 모노글리세라이드의 혼합건조시료를 얻었다.

에스테르화 반응 : Guy Lepage의 방법(10)을 변형시켜 사용하였다. 탈산공정을 거친 시료 400 mg에 아세틸클로라이드-메탄올 용액 3mL을 첨가한 후 질소분위기하에서 100°C로 1시간 중탕가열하여 에스테르화반응을 시켰다. 중탕 가열 후 상온에서 냉각하고 헥산 6 mL를 첨가하여 60초동안 교반하였다. 여기에 증류수 3 mL를 첨가하고 30초동안 교반하면 용액은 두 상으로 분리된다. 아래 상은 아세틸클로라이드와 물 및 수용성물질의 혼합상이고 위상은 메틸에스터 지방산이 용해되어있는 헥산용액이다. 이 헥산용액을 분리하여 가스 크로마토그래프의 분석시료로 사용하였다.

GC 분석 : Hewlette-Packard社의 HP 6890 series GC System을 사용하여 가수분해되지 않은 트리글리세라이드, 디글리세라이드 및 모노글리세라이드 혼합시료내의 지방산 조성을

분석하였다. 이때 사용한 Column은 HP 19091J-413이었으며 detector로는 FID를 사용하였다. 오븐의 온도는 150°C(2min)+7°C/min+265°C(2min)이었으며 detector의 온도는 300°C이었다.

TLC-FID 분석 : 반응 시간 별로 채취한 시료를 100°C 끓는 물에서 효소의 반응을 정지시킨 후 3600 rpm에서 15분간 원심 분리하고, 기름층에서 100 μL의 시료를 취하여 10 mL의 클로로포름에 녹인 후 박층 크로마토그래피(CHROMAROD-SIII)에 시료 1 μL를 점적하여 100 mm의 높이로 전개하였다. 전개용매로는 부피비가 70:30:2인 헵텐, 클로로포름, 아세트산의 혼합물을 사용하였다. TLC-FID의 분석에서 수소 가스의 유속은 160 mL/min, 공기 유속은 2.0L/min으로 하였으며 scan speed는 30초로 하였다. 결과처리는 일본 IATRON社의 IATROCODER TC-21을 사용하였다.

결과 및 고찰

Lipolase-100T의 가수분해 특이성

Table 1은 여러 종류의 유지에 대한 구성지방산의 종류와 무게 퍼센트를 나타내고 있다. 이중 본 연구에서 사용한 물고기 기름을 구성하고 있는 지방산의 종류와 무게조성을 살펴보면 EPA가 총지방산의 19.64 wt%로 가장 많고 그 다음이 15.53 wt%인 팔미트산이며 불포화 탄소수가 6개인 DHA는 13.08 wt%이다.

지질이 리파제에 의하여 가수분해되는 일반메커니즘은 Figure 1과 같이 가정할 수 있다. 리파제가 사슬특이성(chain specificity)

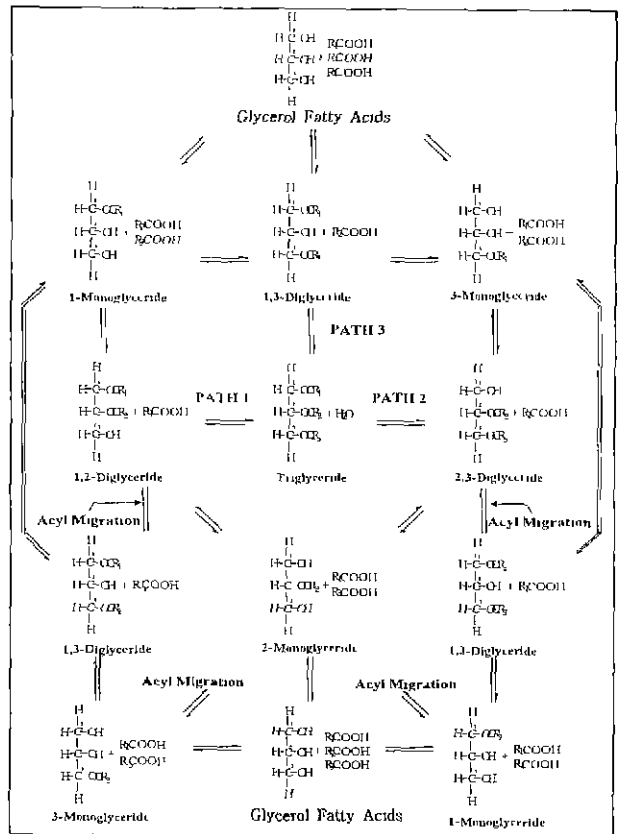


Figure 1. Hydrolysis mechanism of triglyceride (1,2-Diglyceride → 2,3-Diglyceride ; 1-Monoglyceride = 3-Monoglyceride).

을 나타내면 Figure 1에 표시된 지질의 기본골격탄소의 위치 1, 2 및 3에 상관없이 결합된 지방산의 이중결합수, 구성탄소수 등 지방산의 구조특성에 따라서 가수분해 순서가 결정된다. 반면 리파제가 위치특이성(positional specificity)을 나타내면 지질의 기본골격탄소의 위치 1, 2 및 3에 따라서 가수분해 순서가 결정된다.

Figure 2는 Lipolase-100T의 양이 물고기 기름의 0.1 wt%인 경우 가수분해 시간에 따라서 생성되는 1,3-디글리세라이드, 1,2-디글리세라이드, 모노글리세라이드 및 유리지방산의 무게조성을 나타내고 있다

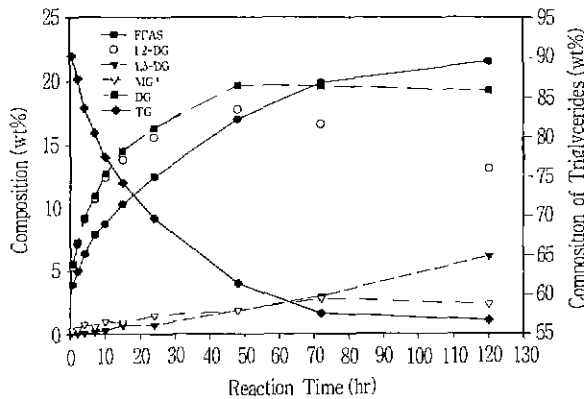


Figure 2. Changes of weight percent(wt%) of 1,3-DG, 1,2-DG, MG and FFAs produced according to various hydrolysis time. Lipolase-100T ; 0.1 wt% of fish oil.

가수분해 24시간까지는 생성물 내에 모노글리세라이드와 1,3-디글리세라이드는 다른 화합물에 비하여 그 농도가 대단히 낮고 일정한 값을 나타내었으나 1,2-디글리세라이드와 유리지방산의 농도는 반응시간에 따라 생성물의 15.60 wt%와 12.49 wt%까지 각각 증가하였다 또한 반응 30시간까지는 생성된 1,2-디글리세라이드 농도가 생성된 지방산의 농도보다 높았으나 반응 40시간 이후에는 시간에 따라 1,2-디글리세라이드의 농도는 감소하나 유리지방산의 농도는 지속적으로 증가하는 경향을 나타내어 반응 50시간 이후에는 유리지방산의 농도가 1,2-디글리세라이드 농도보다 높은 값을 나타내었다

가수분해시간에 따른 1,3-디글리세라이드에 대한 1,2-디글리세라이드의 무게비가 Figure 3에 표시되어있다. 이 결과에 의하면 가수분해 3시간까지는 생성된 1,3-디글리세라이드에 대한 1,2-디글리세라이드의 무게비가 75.72까지 증가하나 7시간 이후에는 감소경향을 나타내어 가수분해반응 120시간에서는 무게비가 2.13까지 감소하였다. 따라서 Lipolase-100T는 트리글리세라이드의 1과 3의 위치특이성 리파제라고 결론지을 수 있다. 반면 가수분해반응 7시간이후의 1,3-디글리세라이드에 대한 1,2-디글리세라이드의 무게비가 감소하는 경향은 1,2(2,3)-디글리세라이드는 화학적으로 불안정하여 반응이 장시간 지속되면 1,3-디글리세라이드로 전위가 된다는 연구결과로 설명될 수 있다(7).

물고기 기름을 구성하고 있는 지방산사슬의 가수분해특이성

Lipolase-100T로 물고기 기름인 트리글리세라이드를 가수분해시키면 그 생성물은 지방산이 전혀 분해되지 않은 트리글리세라이드, 지방산의 일부가 분해된 디글리세라이드와 모노글리세

Table 1. Weight percent of fatty acids of oils.

Fatty Acids	Beef Tallow	FAT	Palm Kernel	RBD	Fish Oil
C8	0.10	0	3.02	0	0
C10	0.07	0	3.29	0	0
C12	0.12	0.32	46.06	0.35	0
C14	3.08	2.44	16.06	1.31	6.34
C14 1	0.40	0.38	0	0	0
C15	0.54	0.14	0	0	0
C16	26.73	24.68	9.08	57.67	15.53
C16 : 1	2.42	3.47	0	0	10.30
C16 : 4	0	0	0	0	3.43
C17	1.27	0.67	0	0	0
C18	21.55	14.62	2.12	4.42	3.46
C18 : 1 n-9	39.40	45.07	17.20	29.85	13.21
C18 : 1 n-7	0	0	0	5.89	2.41
C18 2	3.56	7.07	2.88	0	0
C18 : 4 n-3	0	0	0	0	2.63
C20	0.22	0.26	0.11	0.34	0
C20 1	0.54	0.87	0.18	0.18	2.78
C20 : 4 n-6	0	0	0	0	1.18
C20 : 5 n-3	0	0	0	0	19.64
C21 5 n-3	0	0	0	0	0.78
C22 1	0	0	0	0	2.67
C22 : 5 n-3	0	0	0	0	2.24
C22 : 6 n-3	0	0	0	0	13.08

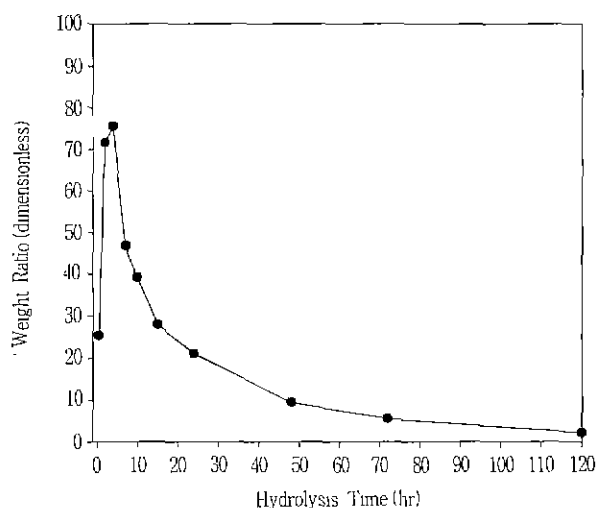


Figure 3 Weight ratio of 1,2-diglycerides to 1,3-diglycerides according to hydrolysis time. Lipolase-100T; 0.1 wt% of fish oil

라이드, 유리지방산과 글리세롤의 혼합물이다. 이 중 글리세라이드 혼합물 내에 존재하는 지방산의 wt%를 가수분해시간에 따라 분석한 결과가 Table 2이다. 글리세라이드 혼합물을 구성하고 있는 지방산의 wt%가 가수분해 시간에 따라 증가하는 지방산은 C16:4, C18:0, C20:4, C21:5, C22:5 및 C22:6이다. 이 중 가수분해시간에 따른 wt%의 증가가 두드러진 지방산은 C16:4, C18:0 및 C22:6이다. 반면 가수분해시간에 따라서 지방산의 wt%가 감소하는 지방산은 C14:0, C16:1, C16:0, C18:1, C18:4, C20:1 및 C22:1이다.

이 분석 결과에 의하면 글리세라이드 혼합물 내에 존재하는 지방산의 wt%증감은 지방산 탄소수의 계수와 어떤 연관성을

나타내지 않음을 알 수 있다. 그러나 지방산을 구성하고 있는 이중결합 탄소 수는 글리세롤내의 지방산 wt%증감과 연관성이 있음을 알 수 있다.

동일한 탄소수 16개인 C16:4와 C16:0 및 C16:1을 비교하여 보면 이중결합 탄소수가 4개인 C16:4는 가수분해시간에 따라 wt%가 증가하나 이중결합탄소수가 적은 C16:0과 C16:1은 wt%가 감소하고 있다. 이런 경향은 탄소수가 20 및 22개인 지방산에서도 찾아볼 수 있다

Lipolase-100T가 트리글리세라이드 기본골격 탄소의 1과 3의 위치에 가수분해 특이성을 나타낸다는 앞의 결과와 연계하여 해석하면 불포화도가 큰 지방산일수록 글리세라이드의 2번 탄소에 결합되는 경향이 크다는 것을 알 수 있다

불포화 지방산중 n-3 PUFA가 특히 트리글리세라이드의 2번 위치에 존재한다고 보고되어 있다. 본 연구에서 사용한 Lipolase-100T는 1,3-위치특이성의 효소라는 것과 가수분해 시간에 따라서 글리세라이드내에 존재하는 n-3 PUFA(C21:5, C22:5 및 C22:6)의 농도도 증가하는 이 실험결과는 n-3 PUFA가 트리글리세라이드의 2번 위치에 많이 존재한다는 연구결과와도 일치함을 알 수 있다(4,12,13)

다중불포화 지방산 n-3 PUFA의 농축공정

Lipolase-100T의 양을 기질의 0.4 wt%, 가수분해 반응시간을 120 시간으로 고정시켰을 때 생성되는 트리글리세라이드 혼합물내의 n-3 PUFA의 wt%와 초기 물고기기름내에 포함되어 있는 n-3 PUFA의 wt%를 비교한 결과가 Figure 4에 표시되어 있다. 이 결과에 의하면 n-3 PUFA 중 C18:4만이 가수분해에 따라 wt%가 감소하였으나 그 외의 성분은 모두 wt%가 증가하는 경향을 나타내었다. 이 중 DHA라고 불리는 C22:6의 n-3 PUFA가 가장 두드러진 증가를 나타내었다 n-3 PUFA의 총 wt%를 비교하여 보면 반응시작 전 물고기 기름내의 n-3

Table 2 Weight percent of fatty acids consisting of glyceride mixture according to various hydrolysis time. (Lipolase-100T; 0.1 wt% of fish oil)

Fatty Acids	Reaction Time										
	0.5	2	4	7	10	15	24	48	72	120	
C14	5.81	5.72	5.74	5.68	5.66	5.62	5.65	5.66	5.55	5.58	
C16	14.47	14.32	14.30	13.95	14.11	13.99	13.96	13.99	13.67	13.73	
C16:1	9.73	9.57	9.59	9.57	9.40	9.35	9.26	9.17	8.96	8.97	
C16:4	3.84	3.87	3.91	4.09	3.98	4.01	4.09	4.20	4.32	4.34	
C18	3.81	3.83	3.85	3.99	3.97	3.96	4.07	4.12	4.20	4.25	
C18:1 n-9	12.60	12.35	12.28	11.97	12.03	11.83	11.61	11.26	10.86	10.85	
C18:1 n-7	2.55	2.53	2.55	2.61	2.45	2.48	2.47	2.41	2.48	2.45	
C18:4 n-3	2.64	2.54	2.52	2.46	2.52	2.42	2.45	2.33	2.26	2.25	
C20:1	2.61	2.60	2.59	2.51	2.54	2.52	2.48	2.43	2.36	2.36	
C20:4 n-3	1.19	1.20	1.20	1.22	1.23	1.24	1.24	1.27	1.30	1.30	
C20:5 n-3	21.09	21.37	21.34	21.51	21.63	21.72	21.76	21.78	21.98	21.84	
C21:5	0.83	0.84	0.86	0.87	0.87	0.89	0.90	0.92	0.96	0.96	
C22:1	2.49	2.42	2.44	2.45	2.40	2.37	2.33	2.28	2.20	2.21	
C22:5 n-3	2.31	2.35	2.36	2.45	2.40	2.43	2.44	2.45	2.52	2.51	
C22:6 n-3	14.03	14.48	14.49	14.69	14.83	15.16	15.29	15.73	16.38	16.40	

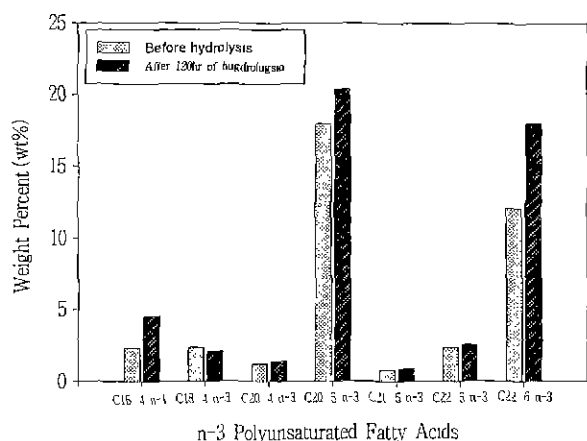


Figure 4. Comparison of weight percent(wt%) of n-3 PUFAs contained in fish oil with that of n-3 PUFAs in glyceride produced after 120 hr of hydrolysis. Lipolase-100T ; 0.4 wt% of fish oil.

PUFA의 wt%는 38.37이었으나 120시간 가수분해 반응 후 생성된 글리세라이드 내의 n-3 PUFA의 wt%는 49.89까지 상승하여 Lipolase-100T에 의한 n-3 PUFA의 농축이 상당히 진척됨을 알 수 있다.

요 약

물고기 기름에 대한 *Aspergillus oryzae* 유래의 Lipolase-100T의 가수분해 특성을 규명하였다. Lipolase-100T는 트리글리세라이드의 1과 3의 위치에 작용하여 이 위치에 결합되어 있는 아실 체인을 유리지방산으로 가수분해시키는 1,3-위치특이성을 보였다. 또한 Lipolase-100T는 물고기 기름을 구성하는 다중불포화지방산 보다 포화지방산을 쉽게 가수분해시키는 특성도 나타내었다. 이 특성으로 인하여 가수분해 시간에 따라서 생성되는 글리세라이드 혼합물내의 다중 불포화 지방산중 n-3 PUFAs인 C16:4, C20:5 및 C22:6의 농도는 모두 증가하였으며 특히 C22:6의 농도증가가 가장 뚜렷하였다. 이 결과로부터 물고기 기름을 구성하는 n-3 PUFAs는 트리글리세라이드의 2번 위치에 결합하고 있음을 알 수 있었다. 지방산의 결합위치특이성과 Lipolase-100T 1,3-위치특이성으로 인하여 Lipolase-100T를 반응물의 0.4 wt% 사용하여 물고기 기름을 120시간 가수분해시켰을 때 생성된 글리세라이드 혼합물내의 n-3 PUFAs농도는 50 wt%까지 상승하였다.

감 사

본 연구는 1997학년도 인화대 연구비지원에 의하여 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Tanaka, Y., J. Hirano, and T. Funada (1992), Concentration of Docosahexaenic Acid in Glyceride by Hydrolysis of Fish Oil with *Candida cylindracea* Lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**(12), 1210-1214.
2. Okumura, S., M. Zwai, and Y. Tsujisaka (1980), Purification and Properties of Partial Glyceride Hydrolase of *Penicillium cyclopium* M 1. *J. BioChem.*, **87**, 205-211
3. Boswinkel, G., J. T. P. Derksen, K. van't Riet, and F. P. Cuperusa (1996), Kinetics of Acyl Migration in Monoglycerides and Dependence on Acyl Chain Length, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**(6), 707-711.
4. Yadwad, V. B., O. P. Ward, and L. C. Noronha (1991), Application of Lipase to Concentrate the Docosahexaenoic Acid (DHA) Fraction of Fish Oil, *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 956-959.
5. Li, Z. Y., and O. P. Ward (1993), Enzyme Catalysed Production of Vegetable Oils Containing Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid. *Biotechnol. Lett.*, **15**, 185-188.
6. Mukherjee, K. D., I. Kiewitt, and M. J. Hills (1993), Substrate Specificities of Lipases in View of Kinetic Resolution of Unsaturated Fatty Acids, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 489-493.
7. Shimada, Y., K. Maruyama, S. Okazaki, M. Nakamura, A. Sugihara, and Y. Tomina (1994), Enrichment of Polyunsaturated Fatty Acids with *Geotrichum candidum* Lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**(9), 951-954.
8. 박진규 외 다수 (1997), 효소에 의한 생분해성 계면활성제 및 지방산의 공업적 생산기술개발, *통산산업부 연구개발보고서*, 29-39.
9. 한국공업규격 시료유지의 탈산방법 (1985), KSM 2731.
10. Lepage, G., and C. C. Roy (1984), Improved Recovery of Fatty Acid through Direct Transesterification without Prior Extraction or Purification, *J. of Lipid Res.*, **25**, 1391-1396.
11. Macrae, A. R. (1983), Lipase-Catalyzed Interesterification of Oils and Fats, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **60**(20), 291-294.
12. Christie, W. W. and Carroll, K. K. (1986), In: R. J. Hamilton and J. B. Rossell (ed.), *Analysis of Oils and Fats*, Elsevier Applied Science Publishers, London.
13. Sugihara A., Y. Shimada, N. Takada, T. Nagao, and Y. Tomnaga (1996), *Penicillium abeanum* Lipase Purification, Characterization, and Its Use for Docosahexaenoic Acid Enrichment of Tuna Oil, *J. Fert. Bioeng.*, **82**(5), 498-501.