

물고기 기름의 가수분해에 대한 리파제 Lipase-OF 360,000의 아실체인 특이성 규명

박지숙 · 김한옥 · 고혜원 · † 허병기
인하대학교 공과대학 생물공학과
(접수 : 2004. 12. 9., 게재승인 : 2004. 12. 23.)

Investigation of Acyl Chain Specificity of Lipase-OF 360,000 on the Hydrolysis of Fish Oil

Ji-suk Park, Han-Ok Kim, Hye-won Kho, and Byung-Ki Hurt
Department of Biological engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received : 2004. 12. 9., Accepted : 2004. 12. 23.)

The hydrolysis characteristics of various fatty acids composing the fish oil was investigated for function of acyl chain specificities using Lipase-OF 360,000 from *Candida cylindracea*. The hydrolysis of fatty acids decreased with the increase of the number of carbon and double bond in the fatty acids, in case that the number of double bond and the position of the first double bond from the methyl group of fatty acids were the same. The position of the first double bond was found to be an acyl chain specificity of Lipase-OF 360,000 for the hydrolysis of fish oil. Lipase-OF 360,000 also showed the another acyl chain specificity that the increase of double bond of fatty acids, having the same number of carbon and the position of double bond, brought about the decrease of hydrolysis.

Key Words : Hydrolysis, Acyl chain specificity, *Candida cylindracea*, Lipase-OF 360,000

서론

Eicosapentaenoic acid (EPA)와 docosahexaenoic acid (DHA)와 같은 다중불포화지방산 (PUFAs)의 n-3족은 그것들의 임상학적 효과 때문에 관심의 초점이 되어왔다. 특히 DHA는 망막과 뇌를 구성하고 있는 인지질의 주요 성분으로 중앙신경시스템의 필수물질로 알려져 있다. 인간은 체내에서 자체적으로 DHA를 합성할 수 없기 때문에 천연물 특히 해산물로부터 DHA를 섭취한다. 해산물 중 10-30%의 n-3족 다중불포화지방산을 포함하는 물고기 기름이 DHA 섭취의 가장 중요한 자원이다(1). 사슬의 길이가 긴 n-3족의 다중불포화지방산은 매우 불안정하여 가열하거나 공기와 접촉하게 되면 산화반응, 시스-트랜스 이성화 반응 및 이중결합의 전이 반응 등이 쉽게 발생됨으로 인해 다중불포화지방산의 cis n-3구조가 대부분 파괴된다(2). 이러한 측면에서 볼 때 다양한 종류의 지방산

으로 구성되어있는 물고기 기름으로부터 다중불포화지방산을 분리 또는 농축하는 공정에 고온을 필요로 하는 전통적인 화학공정을 적용하는 것은 많은 문제점을 유발시킬 수 있다. 이에 반하여 생체촉매효소를 이용하는 농축공정은 운전조건이 상온 및 상압이므로 다중불포화지방산의 cis n-3 구조를 자연 상태로 보존할 수 있다는 장점을 지니고 있다(3). 따라서 n-3족 다중불포화지방산 중 변성이 특히 쉬운 DHA와 EPA의 농축공정에 있어서 온화한 운전조건이 효과적 접근방식은 여러 이점이 있다고 기대되어질 수 있다. 효소의 가장 중요한 특징은 기질에 대한 선택성과 온화한 운전조건에서 촉매효율과 활성도가 높다는 것이다.

지질의 가수분해효소인 리파제는 기질과의 반응특성에 따라 위치특이성 (positional specificity) 리파제, 아실체인 특이성 (acyl chain specificity) 리파제, 부분글리세라이드 분해특이성 리파제, 인지질 및 지단백질 분해특이성 리파제로 구분된다(4, 5). 위치특이성을 나타내는 리파제로는 *Rhizopus Javanicus* lipase(6), *Rhizopus niveus* lipase(7) 및 *Aspergillus niger* lipase(4) 등이 있으며, 이들은 주로 지질을 구성하고 있는 글리세롤 탄소의 1과 3의 위치에만 작용하여 가수분해반응을 일으키는 1,3-위치특이성을 나타내고 있다. 아실체인특

† Corresponding Author : Department of Biological engineering,
Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : +82-32-860-8380, Fax : +82-32-872-4046
E-mail : biosys@inha.ac.kr

이성을 나타내는 리파제로는 *Mucor miehei* lipase(8), *Candida cylindracea* lipase 및 *Rizopus arrhizus* lipase(9) 등이 있으며 이들 리파제는 지질을 구성하는 지방산의 탄소수, 이중결합수에 따라서 반응속도를 달리하는 특성을 나타내고 있다(10). 부분글리세라이드 분해특성을 나타내는 리파제는 트리글리세라이드보다 디글리세라이드나 모노글리세라이드를 분해하는 속도가 훨씬 큰 반응특성을 나타내고 있으며 인지질 및 지단백질을 분해하는 특성의 리파제는 대부분 반응속도가 느리고 1,3-위치특이성을 나타낸다(5).

리파제의 반응특성은 지질을 구성하는 특정지방산의 농축공정이나 유리지방산 생산을 위한 가수분해공정에 많이 이용되고 있다. Yadwad(7)는 다중불포화지방산이 글리세라이드의 2번 위치에 많이 존재한다는 지질의 구조적 특성과 리파제의 1,3-위치특이성을 이용하여 글리세라이드 혼합물내의 EPA와 DHA의 농도를 20.08 wt%와 18.30 wt%까지 농축하기도 하였다. Shimada(10)와 Tanaka(4)는 아실기의 탄소수와 이중결합수에 특이성을 나타내는 리파제를 이용하여 글리세라이드 혼합물내의 DHA 함유량을 20 내지 30 wt% 범위까지 농축하기도 하였다. Lipase-OF 360,000은 아실체인 특이성을 나타내는 리파제로 지질을 구성하는 지방산의 탄소수 및 이중결합수에 따라서 반응속도를 달리하는 특성을 지니고 있다(3). 특히 물고기 기름에 다량 함유되어 있는 EPA와 DHA에 반응특이성을 나타낸다고 보고되어 있다(6). Shimada(10), Tanaka(4)와 Hur(11) 등은 아실기의 탄소수와 이중결합수에 특이성을 나타내는 리파제를 이용하여 글리세라이드 혼합물 내에 DHA의 함량을 20 내지 30 wt%까지 농축하기도 하였다.

그러나 이러한 리파제의 반응특이성을 이용한 다중불포화지방산의 농축에 관한 연구들은 최종생성혼합물 내에서 다중불포화지방산을 다량 포함하는 글리세라이드 혼합물을 효과적으로 분리하여야 한다는 문제점을 내포하고 있을 뿐만 아니라 트리글리세라이드를 구성하는 지방산의 구조적 특성에 따른 가수분해 과정을 명확히 해석하지 못하고 있다. 따라서 본 연구에서는 아실체인 특이성을 나타내는 *Candida cylindracea* 유래의 Lipase-OF 360,000의 지방산 구조특성에 따른 가수분해의 특이성을 지방산을 구성하는 탄소의 수, 이중결합수 및 이중결합이 시작되는 위치 등의 함수로 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

Candida cylindracea 유래의 Lipase-OF 360,000를 사용하여 물고기 기름을 가수분해 시켰다. 기름과 물의 부피비를 1:1로 하고 반응온도는 38℃, 교반속도는 250 rpm으로 고정하여 가수분해반응을 진행시켰다. 반응 시간별로 시료를 취하여 100℃의 끓는 물에서 효소의 반응을 정지시킨 후 일부는 생성혼합물의 트리글리세라이드, 디글리세라이드, 모노글리세라이드 및 유리지방산의 조성을 확인하기 위하여 Thin Layer Chromatography (TLC) 분석에 사용하였고, 나머지 시료는 탈산공정을 거친 후 미반응 트리글리세라이드, 디글리세라이드 및 모노글리세라이드의 지방산 구성성분 및 조성비를 확인하기 위하여 가스크로마토그래피 분석에 사용하

였다.

효소

비특이적 리파제인 Lipase-OF 360,000을 일본 MEITO SANGYO社에서 구입하여 사용하였다. 이 리파제는 360,000 U/g의 높은 활성을 갖고 있으며, 산성용액 내에서도 활성을 잃지 않는 특성을 지니고 있어 가수분해 시 산 또는 알칼리 등을 첨가할 필요가 없다. 이 효소의 최적반응온도는 30 내지 40℃이다.

기질

본 연구에서 사용한 기질은 노르웨이 LIPRO AS 제품으로 정어리와 밴댕이류를 잘게 썰어 삶은 후 압착하여 원료유를 얻은 후 탈산, 진공건조, 냉각여과 및 탈취 등의 공정을 거쳐 정제된 제품으로 EPA가 약 17%, DHA가 약 11% 함유되어 있다.

탈산공정

한국공업규격(12)과 Yukihiisa Tanaka의 방법(1)을 변형시켜 탈산공정을 수행하였다. 반응 시간별로 2 mL의 시료를 취하여 에펜도르프 튜브에 주입한 후 100℃ 끓는 물에서 10분간 가열함으로써 효소의 활성을 정지시켰다. 3,600 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상을 분리한 후 기름 층에서 0.6 mL의 시료를 취하여 시험관에 주입한 후 아세톤과 핵산을 각각 3 mL씩 첨가하고 교반시켜 용해시켰다. 유리지방산을 제거하기 위하여 용해된 시료를 0.2 N NaOH 수용액 100 mL에 가한 후, 약 5분가량 교반시키고 2시간가량 정치시켰다. 상분리가 일어나면 하층은 제거하고 상층은 증류수로 여러 번 세척하여 기름층 내의 잔여 NaOH를 제거시켰다. 유리지방산이 제거된 상층을 분리하여 용매를 증발시켜 가수분해 되지 않은 트리글리세라이드, 디글리세라이드 및 모노글리세라이드의 혼합건조시료를 얻었다.

에스테르화 반응

Guy Lepage의 방법(13)을 변형시켜 사용하였다. 탈산공정을 거친 시료 400 mg에 아세틸클로라이드-메탄올 용액 3 mL를 첨가한 후 질소 하에서 100℃로 1시간 중탕가열하여 에스테르화 반응을 시켰다. 중탕가열 후 상온으로 냉각하고 핵산 6 mL를 첨가하여 60초 동안 교반하였다. 여기에 증류수 3 mL를 첨가하고 30초 동안 교반하면 용액은 두 상으로 분리된다. 아래 상은 아세틸클로라이드와 물 및 수용성 물질의 혼합상이고 위상은 메틸에스터 지방산이 용해되어 있는 핵산용액이다. 이 핵산용액을 분리하여 가스크로마토그래피의 분석시료로 사용하였다.

GC 분석

Hewlette-Packard社의 HP 6890 series GC system을 사용하여 가수분해 되지 않은 트리글리세라이드, 디글리세라이드 및 모노글리세라이드 혼합시료내의 지방산 조성을 분석하였다. 이때 사용한 column은 HP 19091J-413이었으며 detector로는 FID를 사용하였다. 오븐의 온도는 150℃ (2 min) + 7℃/min + 265℃ (2 min)이었으며 detector의 온도는 300℃이었

다.

TLC-FID 분석

반응 시간별로 채취한 시료를 100℃ 끓는 물에서 효소의 반응을 정지시킨 후 3,600 rpm에서 15분간 원심분리하고, 기름층에서 100 μl의 시료를 10 ml의 클로로포름에 녹인 후 박층크로마토그래피 (CHROMAROD-SIII)에 시료 1 μl를 점적하여 100 mm의 높이로 전개하였다. 전개용매로는 부피비가 70 : 30 : 2인 벤젠, 클로로포름, 아세트산의 혼합물을 사용하였다. TLC-FID의 분석에서 수소 가스의 유속은 160 mL/min, 공기유속은 2.0 mL/min으로 하였으며 scan speed는 30초로 하였다. 결과 처리는 일본 IATRON社의 IATROCODER TC-21을 사용하였으며 Attenuation chart speed는 10.0 cm/min으로 하였다

결과 및 고찰

지방산의 탄소수에 대한 가수분해 특이성

물고기 기름을 구성하는 지방산 중 포화지방산은 C_{14:0}, C_{16:0} 및 C_{18:0}이다. 반응시간 2 hr, 10 hr, 24 hr 및 48 hr에서 리파제 Lipase-OF 360,000이 이들 포화지방산에 대하여 나타내는 가수분해 특성을 Fig. 1에 제시하였다. 이 결과에 의하면, 동일한 가수분해 반응시간에서 가수분해율이 가장 높은 포화지방산은 C_{16:0}이었으며, 그 다음으로 가수분해율이 높은 지방산은 C_{14:0}이었다. 동일 가수분해 반응시간에서 C_{18:0}의 가수분해율이 가장 낮았다.

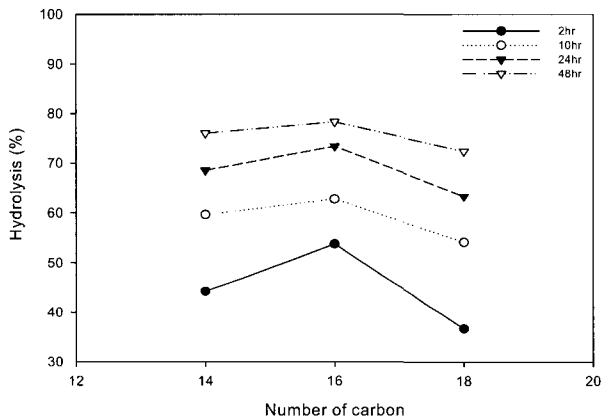


Figure 1. Hydrolysis characteristics of C_{14:0}, C_{16:0} and C_{18:0} fatty acids.

이중결합수가 하나인 불포화지방산 C_{16:1}, C_{20:1} 및 C_{22:1}에 대한 Lipase-OF 360,000의 가수분해 특성을 Fig. 2에 도시하였다. 반응시간 2 hr, 10 hr, 24 hr 및 48 hr에서 모두 탄소수가 증가할수록 가수분해율이 감소하는 경향을 뚜렷하게 나타내었다. n-3족 다중불포화지방산 중, 이중결합수가 5개이면서 사슬의 탄소수가 서로 다른 C_{20:5 (n-3)}, C_{21:5 (n-3)} 및 C_{22:5 (n-3)}에 대한 가수분해특성을 구성탄소수의 함수로 Fig. 3에 나타내었다. 탄소수가 증가하면 가수분해율은 감소하였다. 이 경향은 이중결합수가 1개인 경우와 같았다. 위의 세 가지 결과로부터, Lipase-OF 360,000의 아실체인 특이성중 하나는 나머

지 조건이 동일할 경우 지방산의 탄소수가 증가할수록 가수분해율이 감소하는 아실체인 특이성이다.

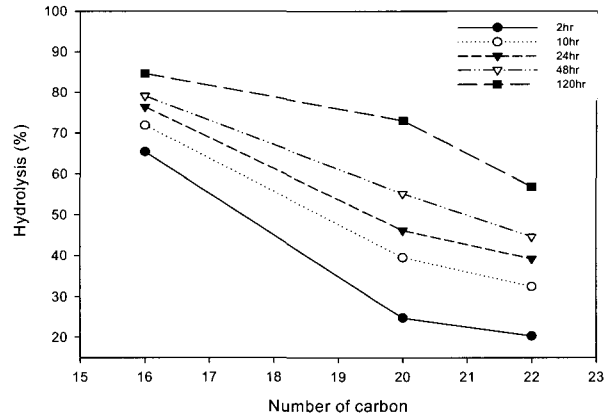


Figure 2. Hydrolysis characteristics of C_{16:1}, C_{20:1} and C_{22:1} fatty acids.

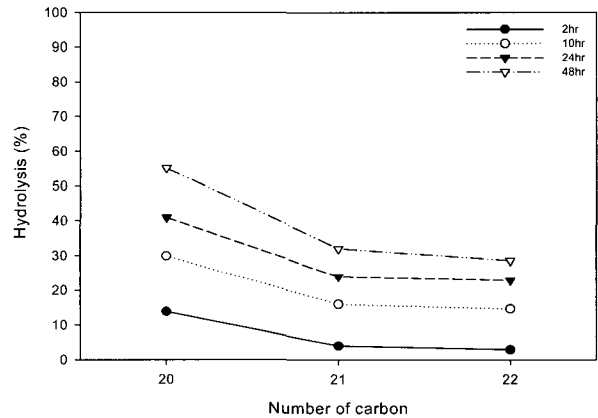


Figure 3. Hydrolysis characteristics of C_{20:5 (n-3)}, C_{21:5 (n-3)} and C_{22:5 (n-3)} fatty acids.

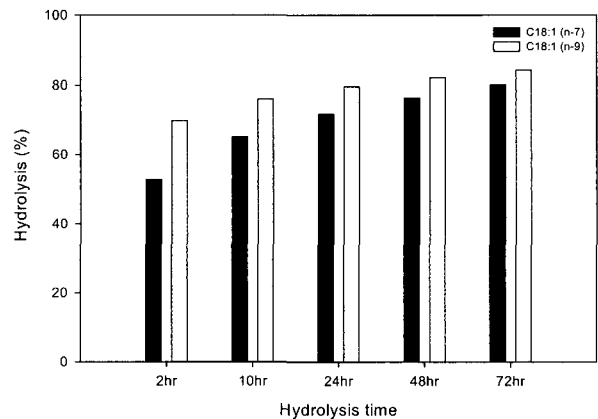


Figure 4. Hydrolysis characteristics of C_{18:1 (n-7)} and C_{18:1 (n-9)} fatty acids.

이중결합의 위치에 대한 가수분해 특이성

물고기 기름을 구성하고 있는 지방산 중 분자량과 분자식은 동일하나 이중결합의 위치가 서로 다른 지방산은 C_{18:1 (n-7)}과 C_{18:1 (n-9)}이다 Lipase-OF 360,000이 이들 두 지방산의 가수분해에 미치는 영향을 분석하여 Fig. 4에 제시하였다. 이 결과에 의하면 반응

시간 2 hr, 10 hr, 24 hr, 48 hr 및 72 hr 모두에서 C_{18:1 (n-9)}의 가수분해율이 C_{18:1 (n-7)}의 가수분해율보다 높았다. 이 결과로부터 Lipase-OF 360,000은 동일한 분자량과 분자식인 경우에도 이중결합의 위치에 따라 서로 다른 가수분해 특성을 나타내고 있음을 알 수 있다.

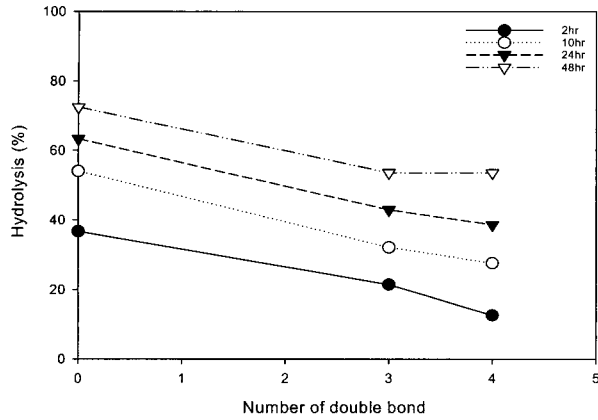


Figure 5. Hydrolysis characteristics of C_{18:0}, C_{18:3 (n-3)} and C_{18:4 (n-3)} fatty acids.

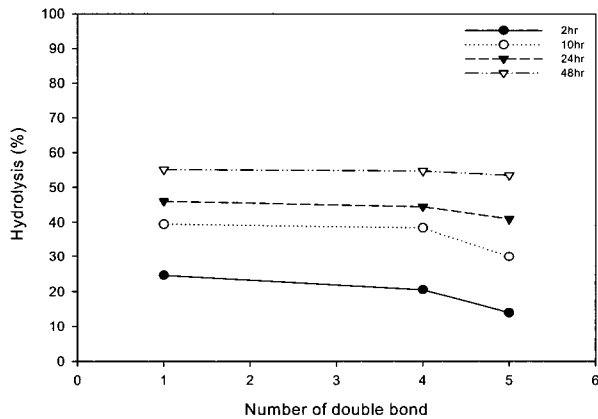


Figure 6. Hydrolysis characteristics of C_{20:1}, C_{20:4 (n-3)} and C_{20:5 (n-3)} fatty acids.

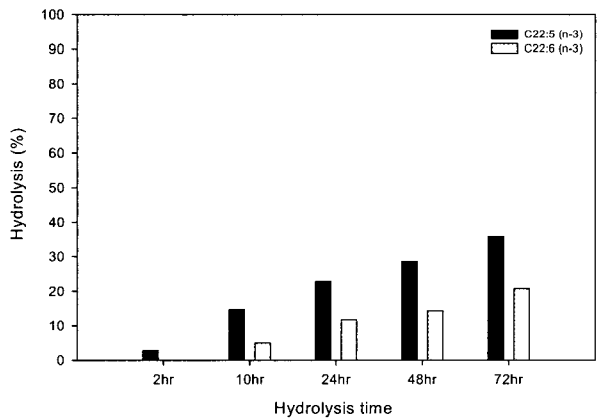


Figure 7. Hydrolysis characteristics of C_{22:5 (n-3)} and C_{22:6 (n-3)} fatty acids.

지방산의 이중결합수에 따른 가수분해특이성

Fig.5는 탄소수가 18개이고 이중결합수가 서로 다른 지방산 C_{18:0}, C_{18:3 (n-3)} 및 C_{18:4 (n-3)}에 대한 가수분해특이성을 나타내고 있다. 반응시간 2 hr, 10 hr, 24 hr 및 48 hr 모두에서 이중결합수가 증가할수록 가수분해율이 감소하였다. 탄소수가 20이나 이중결합수가 서로 다른 지방산 C_{20:1}, C_{20:4 (n-3)} 및 C_{20:5 (n-3)}에 대하여서도 동일한 경향을 Fig. 6에서 알 수 있다. Fig. 7은 탄소수가 22인 반면 이중결합수가 5개와 6개인 C_{22:5 (n-3)}와 C_{22:6 (n-3)}의 가수분해특성을 나타내고 있다. 이 경우 역시 이중결합수가 많은 C_{22:6 (n-3)}의 가수분해율이 C_{22:5 (n-3)}의 가수분해율보다 훨씬 낮다는 것을 알 수 있다.

앞의 세 종류의 분석결과로부터 Lipase-OF 360,000은 탄소수가 동일할 경우 이중결합수가 많은 다중불포화지방산의 가수분해율이 이중결합수가 적은 다중불포화지방산의 가수분해율보다 특이성을 지니고 있다고 해석할 수 있다.

Shimada(10)등은 *Candida cylindracea*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus delemar* 및 *Fusarium heterosporum*의 균주로부터 추출해낸 리파제를 이용하여 참치기름의 가수분해특성을 규명하였다. 이들의 결과에 의하면 네 종류의 리파제 모두 불포화도가 높은 C_{22:6 (n-3)}보다 불포화도가 낮은 지방산을 쉽게 가수분해시키는 경향을 나타내었다. 이들 연구결과는 동일한 탄소수에서 불포화도의 증가에 대한 가수분해결과는 아니나 불포화도가 가수분해특성에 영향을 미치고 있다는 결과로 본 연구의 결과와 그 경향이 일치한다고 할 수 있다. Yadwad 등(7)과 Hur 등(14)은 리파제의 위와 같은 아실체인 특이성을 이용하여 물고기 기름내의 DHA농도를 3배까지 농축시키는 결과를 얻었다. 이외에 Tanaka 등(4)도 *Candida cylindracea* 유래의 효소를 이용하여 물고기 기름으로부터 DHA를 3배까지 농축시킨 연구결과를 발표하였다.

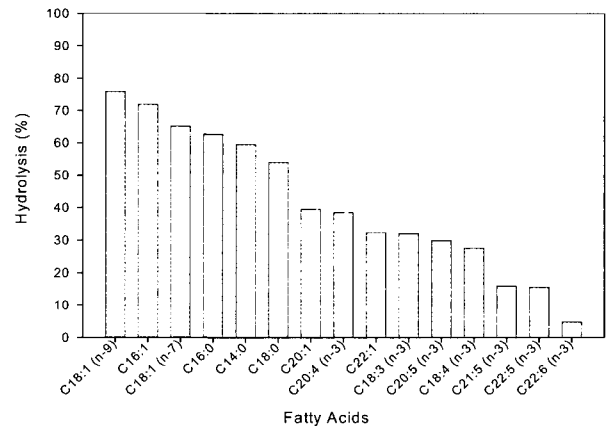


Figure 8. Hydrolysis of various fatty acids composing fish oil at 10hr of hydrolysis.

Lipase-OF 360,000의 아실체인 특이성

Fig. 8은 가수분해반응 10 hr 후, 물고기 기름을 구성하고 있는 각 지방산의 가수분해특성을 나타내고 있다. 이 실험 결과에 의하면, 가수분해율이 가장 높은 지방산은 C_{18:1 (n-9)}이었으며, 가수분해율이 50% 이상인 지방산은 C_{18:1 (n-7)}, C_{16:1}, C_{16:0}, C_{14:0} 및 C_{18:0}이었다. 가수분해율이 25% 이상 40% 미만인 지방산은 C_{20:1}, C_{20:4 (n-3)}, C_{22:1}, C_{18:3 (n-3)}, C_{20:5 (n-3)} 및

C_{18:4} (n-3)로 탄소수가 20개 이상이거나 이중결합수가 3개 이상인 경우로 특정 지을 수 있다. 탄소수가 21개 이상이고 이중결합수가 5개 이상인 지방산은 가수분해율이 대단히 낮은 것을 알 수 있다. 특히, 탄소수가 22개이며 이중결합수가 6개인 DHA는 물고기 기름의 구성 지방산 중 가수분해율이 가장 낮았다.

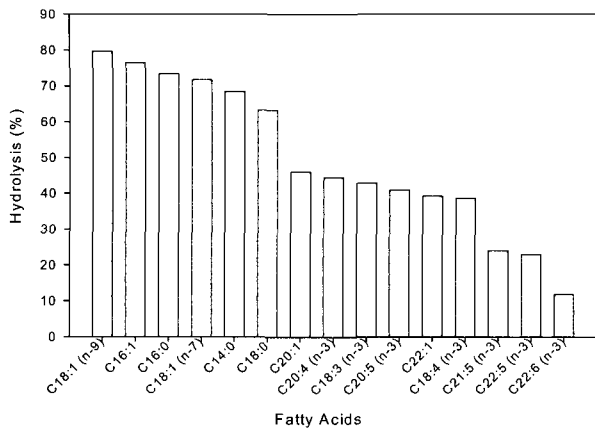


Figure 9. Hydrolysis of various fatty acids composing fish oil at 24hr of hydrolysis.

Fig. 9는 가수분해 반응 24hr에서의 각 지방산별 가수분해율을 나타내고 있다. 이 결과는 Fig. 8의 결과와 거의 동일한 경향을 나타내어, Lipase-OF 360,000의 아실체인 특이성을 이용하면 C_{22:6} (n-3)인 DHA를 미반응 글리세라이드 혼합물내로 농축시킬 수 있음을 알 수 있다. 특히 가수분해시간이 10 hr에서 24 hr로 증가했을 경우, 가수분해율이 뚜렷하게 차이를 나타내는 4개의 집단으로 구분되었다. 가수분해율이 60% 이상인 집단에는 C_{18:1} (n-9), C_{16:1}, C_{16:0}, C_{18:1} (n-7), C_{14:0} 및 C_{18:0}의 지방산이 있으며, 가수분해율이 30% 내지 50%사이인 지방산은 C_{20:1}, C_{20:4} (n-3), C_{18:3} (n-3), C_{20:5} (n-3), C_{22:1} 및 C_{18:4} (n-3)의 지방산이 있다. 가수분해율이 20% 내지 30%인 지방산은 C_{21:5} (n-3)과 C_{22:5} (n-3)이었으며, 물고기 기름을 구성하는 지방산 중 탄소수와 이중결합수가 가장 많은 DHA는 12%의 낮은 가수분해율을 나타내었다.

요 약

Candida cylindracea 유래의 Lipase-OF 360,000를 사용하여 물고기 기름을 구성하고 있는 여러 종류의 지방산의 아실 체인 특성과 가수분해율 사이의 함수관계를 규명하였다. 이중결합수와 이중결합이 시작되는 위치, 즉 (n-3), (n-7) 및 (n-9)이 동일할 경우, Lipase-OF 360,000에 의한 지방산의 가수분해율은 지방산을 구성하고 있는 탄소수의 증가에 따라 가수분해율이 감소하는 아실체인 특이성을 나타내었다. 이중결합이 시작되는 탄소의 위치 또한 Lipase-OF 360,000의 가수분해 특이성에 영향을 끼쳤다. 이 외에 Lipase-OF 360,000은 지방산의 탄소수와 이중결합이 시작되는 위치가 동일할 경우, 이중결합수가 증가하면 가수분해율이 감소하는 아실 체인 특이성도 나타내었다. 또한 본 연구에서는 물

고기 기름을 구성하고 있는 각 지방산의 가수분해율을 시간의 함수로 제시함으로써 원하는 지방산을 미반응 글리세라이드 혼합물 내로 농축시키는 공정개발의 기초 자료로 활용할 수 있도록 하였다.

감 사

본 연구는 해양수산부의 수산특정연구개발사업 (과제번호 20020075)에 의해 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Yukihiisa T., J. Hirano, and T. Funada (1993), Concentration of Docosahexaenic Acid in Glyceride by Hydrolysis of Fish Oil with *Candida cylindracea* Lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **36**, 5791-5794.
2. Gudmundur, G. H., BirGirÖ. Gudmundsson and Öm Almarsson (1993), The Preparation of Homogeneous Triglycerides of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid by Lipase, *Tetrahedron Lett.* **34**(36), 5791-5794.
3. Yoshitsugu, K. and N. Azum (1994), Synthesis of Triacylglycerol from Polyunsaturated Fatty Acid by Immobilized Lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71**, 1397-1403.
4. Tanaka, Y., J. Hirano, and T. Funda (1992), Concentration of Docosahexaenoic Acid in Glyceride by Hydrolysis of Fish Oil with *Candida cylindracea* Lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 1210-1211.
5. Okumura, S., M. Zwai, and Y. Tsujisaka (1980), Purification and Properties of Partial Glyceride Hydrolase of *Penicillium cyclopium* M1, *J. Biochem.* **87**, 205-211.
6. 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**, 707-711.
7. 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**, 956-95.
8. Li, Z. Y. and O. P. Ward (1993), Enzyme Catalysed Production of Vegetable Oils Containing Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid, *Biotechonl. Lett.* **15**, 185-188.
9. Mukherjee, K. D., I. Kiewitt, and M. J. Hills (1993), Substrate Specificities of Lipase in View of Kinetic Resolution of Unsaturated Fatty Acid, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 489-493.
10. 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**, 951-954.
11. Jin, Y. S. and B. K. Hur (1998), Process Development of Concentration of n-3 PUFAs from Fish Oil by means of Lipase, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **13**, 90-95.
12. Korea Standard Association (1985), Hydration method of lipid, Korea Industrial Standard KS M 2731.
13. Guy Lepage and Claude C. Roy (1984), Improved Recovery of Fatty Acid Through Direct Transesterification without Prior Extraction or Purification, *J. Lipid Res.* **25**, 1391-1396.
14. Hur, B. K., D. J. Woo, and K. W. Park (2000), The Effect of Acyl Chain Structure on the Hydrolysis of Fatty Acids from Fish Oil by Lipase-OF 360,000, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**(1), 72-75.